



## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Εκτροφή αχινού του είδους  
*Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea),  
με τεχνητά σιτηρέσια

ΓΕΩΡΓΙΑ ΤΑΡΙΦΑ



ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ  
Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας Βιοτεχνολογίας  
και Υδατοκαλλιεργειών

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
Τμήμα Βιολογίας

ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ  
Ενυδρείο Κρήτης

**Π.Μ.Σ.: «Περιβαλλοντική Βιολογία – Διαχείριση Χερσαίων και  
Θαλάσσιων Βιολογικών Πόρων»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Εκτροφή αχινού του είδους *Paracentrotus lividus*  
(Echinodermata, Echinoidea), με τεχνητά σιτηρέσια**

**Ταρίφα Γεωργία**

**Επιβλέπουσα (Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας):** Καθηγήτρια Μαρουδιώ Κεντούρη  
**Συνπιβλέπουσα (Ελ.Κε.Θ.Ε, Ενυδρείο Κρήτης):** Ερευνήτρια Γ' Ασπασία Στεριώτη

*Μαρουδιώ Κεντούρη (Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης)*

**Εξεταστική Επιτροπή:** *Ασπασία Στεριώτη (Ερευνήτρια Γ', Τμήμα Ενυδρειολογίας Ενυδρείου Κρήτης, Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών, Ελ.Κε.Θ.Ε)*

*Σταύρος Χατζηφώτης (Ερευνητής Β', Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών, Ελ.Κε.Θ.Ε)*

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ  
2017**



HELLENIC CENTRE FOR MARINE RESEARCH  
Institute of Marine Biology, Biotechnology and  
Aquaculture



UNIVERSITY OF CRETE  
Biology Department



HELLENIC CENTRE FOR MARINE RESEARCH  
Cretaquarium

**M.S.D: «Environmental Biology – Management of Terrestrial and  
Marine Biological Resources»**

**MASTER THESIS**

**Culture of sea urchin of the species *Paracentrotus lividus*  
(Echinodermata, Echinoidea), with artificial feeds**

**Tarifa Georgia**

**Supervisor (University of Crete, Biology Department):** *Professor Maroudio Kentouri*  
**Co-Supervisor (HCMR, Cretaquarium):** *Researcher C' Aspasia Sterioti*

*Maroudio Kentouri (Professor, Biology Department, University of Crete)*

**Examination Commission:** *Aspasia Sterioti (Researcher C', Aquariology department of Cretaquarium,  
Institute of Marine Biology, Biotechnology and Aquaculture, HCMR)*

*Stavros Chatzifotis (Researcher B', Institute of Marine Biology, Biotechnology  
and Aquaculture, HCMR)*

**HERAKLION  
2017**

## Πρόλογος

Η παρούσα εργασία αποτελεί μεταπτυχιακή διατριβή στα πλαίσια του προγράμματος Περιβαλλοντική Βιολογία - Διαχείριση Χερσαίων και Θαλάσσιων Βιολογικών Πόρων του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Εκπονήθηκε στο Ενυδρείο Κρήτης του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών σε συνεργασία με το εργαστήριο Διατροφής και το εργαστήριο Γενετικής του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών (Ι.Θ.Α.Β.Β.ΥΚ) του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών (Ελ.Κε.Θ.Ε) υπό την ευθύνη της Καθηγήτριας του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης κας Μαρουδιώς Κεντούρη και της υπεύθυνης Ερευνήτριας Γ' του Τμήματος Ενυδρειολογίας του Ενυδρείου Κρήτης του Ελ.Κε.Θ.Ε, Δρ. Ασπασίας Στεριώτη.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κα. Κεντούρη Μαρουδιώ και την συνεπιβλέπουσα ερευνήτρια του Ενυδρείου Κρήτης Δρ. Στεριώτη Ασπασία για τη θερμή υποστήριξη της προσπάθειάς μου και την επιστημονική τους καθοδήγηση. Τις ευχαριστώ για την ψύχραιμη ματιά τους και τη στήριξή τους ιδιαίτερα στις δύσκολες στιγμές και στα προβλήματα που αντιμετώπισα.

Ευχαριστώ τον Δρ. Χατζηφώτη Σταύρο για την καθοδήγησή του σε κομμάτι του πειραματικού μέρους, για την πρόθυμη φιλοξενία στο εργαστήριό του στο οποίο πραγματοποιήθηκε το μεγαλύτερο μέρος των αναλύσεων της παρούσας διατριβής και την παροχή του εργαστηριακού εξοπλισμού.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στον Δρ. Καθάριο Παντελή για τη βοήθειά του, το χρόνο και τις συμβουλές που απλόχερα μου διέθεσε και το ίδιο ισχύει συνολικά για όλους τους εργαζόμενους στο Εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας, που με βοήθησαν σημαντικά και μου διέθεσαν πρόθυμα το χρόνο τους χωρίς δεύτερη σκέψη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Δρ. Σταυρουλάκη Μελίνα, που χωρίς εκείνη δεν θα γινόταν εφικτή η πραγματοποίηση μοριακών αναλύσεων. Εκτιμώ από καρδιάς το χρόνο που μου διέθεσε, την υπομονή που έδειξε, τη φροντίδα της και την επιστημονική της καθοδήγηση. Θεωρώ πολύτιμη την εμπειρία δίπλα της και τις γνώσεις που μου μετέδωσε. Ευχαριστώ συνολικά τους εργαζόμενους του Εργαστηρίου Γενετικής για τη βοήθειά τους και το όμορφο κλίμα στο εργαστήριο.

Τέλος, θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους τους εργαζόμενους του Ενυδρείου Κρήτης για τη βοήθειά τους και τις συμβουλές τους. Τη Μαρία Μαστοράκη για την προθυμία της να με βοηθήσει ουσιαστικά οποιαδήποτε στιγμή την είχα ανάγκη, στις καθημερινές δυσκολίες.

Ξεχωριστά θέλω να εκφράσω τη θερμότερη ευγνωμοσύνη μου στους πολυτιμότερους ανθρώπους για μένα, στους γονείς μου. Δεν αρκούν οι λέξεις για να εκφράσω το πόσο τους ευχαριστώ και το πόσο ευγνώμων νιώθω για όσα κάνουν για μένα, για το ότι στέκονται πάντα στο πλευρό μου, με στηρίζουν ολόπλευρα και με όλες τους τις δυνάμεις σε κάθε μου επιλογή και σε κάθε μου βήμα. Με τη συμβουλή τους, την ψυχολογική στήριξη, την κατανόηση και την αγάπη τους, μου δίνουν ώθηση και κουράγιο να ξεπερνάω κάθε πρόβλημα, δυσκολία ή εμπόδιο. Ευχαριστώ όλη μου την οικογένεια που είτε από κοντά είτε από μακριά με υποστηρίζει και με συμβουλεύει με αγάπη. Τέλος ευχαριστώ ιδιαίτερα το φίλο Μιχάλη Ρέκατα για την σημαντική στήριξή του στην προσπάθειά μου, όπως και για την επιμέλεια και την επεξεργασία των εικόνων και των εξωφύλλων.

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

<b>ΠΙΝΑΚΕΣ</b> .....	8
<b>ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ</b> .....	9
<b>ΕΙΚΟΝΕΣ</b> .....	10
Περίληψη .....	12
Abstract.....	13
<b>1. ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	14
<b>1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΕΧΙΝΟΔΕΡΜΩΝ</b> .....	15
1.1.1 Δομή σώματος.....	16
1.1.2 Υδραγγειακό σύστημα.....	17
1.1.3 Πεπτικό σύστημα.....	17
1.1.4 Αναπνοή .....	17
1.1.5 Νευρικό σύστημα και συμπεριφορά .....	18
1.1.6 Αναπαραγωγή και αναπαραγωγικός κύκλος .....	18
1.1.7 Κύκλος ζωής.....	19
1.1.8 Επίδραση των φυσικών παραμέτρων .....	19
<b>1.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΕΧΙΝΟΕΙΔΩΝ (Echinoidea)</b> .....	20
1.2.1 Δομή σώματος - Κίνηση .....	20
1.2.2 Σωματική αύξηση .....	22
1.2.3 Διατροφή .....	22
1.2.4 Πεπτικό σύστημα – Ρυθμός διατροφής .....	23
1.2.5 Αναπνοή .....	24
1.2.6 Αναπαραγωγικό σύστημα και γοναδική ανάπτυξη .....	24
<b>1.3 ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ <i>Paracentrotus lividus</i></b> .....	25
1.3.1 Βιολογία του είδους .....	25
1.3.2 Διατροφή – Θηρευτές .....	26
1.3.3 Πεπτικό σύστημα – Ρυθμός διατροφής .....	27
1.3.4 Αναπαραγωγή .....	28
1.3.5 Ενδιαίτημα.....	28
1.3.6 Φυσικές παράμετροι.....	29
1.3.7 Εμπορική-οικονομική αξία .....	30
<b>1.4 ΕΚΤΡΟΦΗ ΑΧΙΝΩΝ</b> .....	31
1.4.1 Ανάγκη ένταξης αχινών σε καλλιέργεια.....	31
1.4.2 Τεχνητές τροφές .....	32

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	34
2.1 1 <sup>Η</sup> ΕΝΟΤΗΤΑ: ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ.....	35
2.1.1 Μεθοδολογία .....	35
2.1.1.1 Εγκαταστάσεις – Δεξαμενές .....	35
2.1.1.2 Διατροφή .....	36
2.1.1.3 Σχεδιασμός πειράματος .....	39
2.1.2 Αποτελέσματα .....	40
2.1.3 Αποτελέσματα επανασχεδιασμένου πειράματος .....	41
2.1.3.1 Θνησιμότητα .....	41
2.1.3.2 Εκδήλωση ασθένειας .....	43
2.1.3.3 Μορφολογικές διαφορές των αχινών στους δύο τύπους υδάτων εκτροφής τους.....	44
2.1.4 Συζήτηση - Συμπεράσματα.....	45
2.1.4.1 Συμπεράσματα .....	45
2.1.4.2 Ζητήματα για περαιτέρω διερεύνηση.....	47
2.2 2 <sup>Η</sup> ΕΝΟΤΗΤΑ: ΚΥΡΙΩΣ ΠΕΙΡΑΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ.....	48
2.2.1 Προσδιορισμός καροτενοειδών .....	48
2.2.1.1 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας – Thin Layer Chromatography (TLC) .....	48
2.2.1.2 Καροτενοειδή στις γονάδες Εχινοειδών .....	49
2.2.1.3 Σημασία του χρώματος των γονάδων .....	50
2.2.2 Μεθοδολογία .....	51
2.2.2.1 Σχεδιασμός πειράματος .....	51
2.2.2.2 Βιομετρικές αναλύσεις.....	52
2.2.2.3 Στατιστική ανάλυση.....	53
2.2.2.4 Εκχύλιση καροτενοειδών .....	54
2.2.3 Αποτελέσματα .....	57
2.2.3.1 Γοναδοσωματικός δείκτης (GSI).....	57
2.2.3.2 Χρώμα γονάδων – Ανάλυση καροτενοειδών .....	61
2.2.4 Συζήτηση.....	64
2.2.4.1 Αύξηση μάζας γονάδων - Γοναδοσωματικός Δείκτης.....	64
2.2.4.2 Χρώμα γονάδων .....	65
2.2.4.3 Παρατηρήσεις κατά τη διεξαγωγή του πειράματος .....	65
2.3 3 <sup>Η</sup> ΕΝΟΤΗΤΑ: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΝΕΡΟΥ ΓΕΩΤΡΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΟΥ ΑΧΙΝΟΥ .....	67
2.3.1 Επιπτώσεις του χαμηλού pH στους θαλάσσιους οργανισμούς (Οξίνιση των ιωκεανών).....	67
2.3.2 Επιπτώσεις στα Εχινόδερμα.....	68

2.3.2.1	Ασβεστοποίηση .....	69
2.3.2.2	Ιοντική ρύθμιση .....	70
2.3.3	Χρήση νερού γεώτρησης με χαμηλότερο pH για την εκτροφή θαλάσσιων ειδών... ..	71
2.3.4	Επιπτώσεις των βαρέων μετάλλων στο περιβάλλον των Εχινοειδών .....	72
2.3.5	Στόχος των πειραμάτων της Ενότητας .....	72
2.3.6	Προκαταρκτικό πείραμα εκτροφής αχινών.....	72
2.3.6.1	Μεθοδολογία .....	72
2.3.6.2	Παρατηρήσεις που οδήγησαν στη διερεύνηση της επίδρασης του pH γεώτρησης στην εκτροφή των αχινών .....	73
2.3.7	Μείωση του pH του θαλασσινού νερού .....	75
2.3.7.1	Μεθοδολογία .....	75
2.3.7.2	Αποτελέσματα .....	75
2.3.8	Αύξηση του pH του νερού γεώτρησης .....	76
2.3.8.1	Μεθοδολογία .....	76
2.3.8.2	Αποτελέσματα .....	76
2.3.9	Ρόλος του χαμηλού pH.....	76
2.3.10	Ρόλος των βαρέων μετάλλων στο νερό εκτροφής.....	77
2.4	4 <sup>η</sup> ΕΝΟΤΗΤΑ: ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ .....	79
2.4.1	Ασθένεια «bald-sea-urchin».....	79
2.4.1.1	Συμπτωματολογία .....	80
2.4.1.2	Αιτιολογία - Νοσογόνος παράγοντας.....	81
2.4.1.3	Ανάρρωση – Αποκατάσταση .....	82
2.4.2	Οικολογία .....	83
2.4.3	Η ασθένεια σε συνθήκες υδατοκαλλιέργειας.....	83
2.4.4	Μοριακή ανάλυση για την ταυτοποίηση των παθογόνων παραγόντων.....	84
2.4.4.1	DNA metabarcoding με τη χρήση τεχνολογιών αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing) .....	84
2.4.4.2	Ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA για τη διερεύνηση της μικροβιακής ποικιλότητας.....	85
2.4.5	Καλλιέργεια .....	86
2.4.6	Μοριακή ανάλυση.....	87
2.4.6.1	Εξαγωγή μικροβιακού DNA από αχινούς.....	87
2.4.6.2	Εξαγωγή μικροβιακού DNA από νερό .....	90
2.4.6.3	Εξαγωγή μικροβιακού DNA από τις τροφές.....	90
2.4.6.4	Πολλαπλασιασμός των επιθυμητών γονιδίων μέσω της PCR .....	90
2.4.7	Συζήτηση.....	94

3. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	96
3.1 ΒΑΣΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	97
3.2 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ.....	98
4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	99



## ΠΙΝΑΚΕΣ

<b>Πίνακας 1:</b> Αναλυτικά η σύσταση των τροφών που χρησιμοποιήθηκαν.....	37
<b>Πίνακας 2:</b> Ο σχεδιασμός του πειράματος.....	40
<b>Πίνακας 3:</b> Ο νέος σχεδιασμός του πειράματος. Replicates 1: οι αχινοί διατηρούνται στα ατομικά δοχεία, Replicates 2: οι αχινοί κινούνται ελεύθερα στη δεξαμενή.....	41
<b>Πίνακας 4:</b> Ο σχεδιασμός του πειράματος.....	51
<b>Πίνακας 5:</b> Ο μέσος όρος των μετρήσεων των φυσικοχημικών παραμέτρων κατά τη διάρκεια του πειράματος.....	52
<b>Πίνακας 6:</b> Οι συνθήκες διατήρησης των αχινών στις 2 δεξαμενές διαφορετικής ποιότητας νερού (θαλασσινό/γεώτρησης). .....	73
<b>Πίνακας 7:</b> Οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν και οι αλληλουχίες τους. ....	91
<b>Πίνακας 8:</b> Τα συστατικά του μίγματος και οι συνθήκες των κύκλων αντιδράσεων της δοκιμαστικής PCR.....	92
<b>Πίνακας 9:</b> Τα συστατικά και οι ποσότητές τους στα δύο μίγματα που ελέγχθηκαν, και οι συνθήκες των κύκλων αντιδράσεων της δεύτερης δοκιμαστικής PCR. ....	93
<b>Πίνακας 10:</b> Τα συστατικά του μίγματος και οι συνθήκες των κύκλων αντιδράσεων της αντίδρασης PCR για το σύνολο των δειγμάτων (αχινοί, νερά, τροφές). ....	94

## **ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ**

<b>Γράφημα 1:</b> Το ποσοστό της θνησιμότητας σε κάθε χειρισμό με τεχνητό σιτηρέσιο, ανά επανάληψη.....	42
<b>Γράφημα 2:</b> Ο αριθμός των ατόμων που εμφάνισαν πληγές στους διάφορους χειρισμούς διατροφής. ....	44
<b>Γράφημα 3:</b> Τα αποτελέσματα του Γοναδοσωματικού Δείκτη. Στον τίτλο του οριζόντιου άξονα αναφέρονται για κάθε στήλη το σιτηρέσιο (M1, A), η επανάληψη (r1, r2), και η δειγματοληψία στην παρένθεση (1, 2 ή 3). ....	58
<b>Γράφημα 4:</b> Ο μέσος ( $\pm$ SD) Γοναδοσωματικός Δείκτης (GSI) ανά δειγματοληψία του πειράματος και από τις ομάδες των μαρτύρων. Ο διαφορετικός γραμματικός δείκτης υποδεικνύει τις στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P \leq 0,05$ ) στο ποσοστό του GSI μεταξύ των δειγματοληψιών (One-Way ANOVA on Ranks).....	58
<b>Γράφημα 5:</b> Ο μέσος ( $\pm$ SD) Γοναδοσωματικός Δείκτης (GSI) της 1ης δειγματοληψίας κάθε ομάδας αχινών, ανά σιτηρέσιο και τύπο ύδατος. Ο διαφορετικός γραμματικός δείκτης υποδεικνύει τις στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P \leq 0,05$ ) στο ποσοστό του GSI μεταξύ των παραγόντων (Two-Way ANOVA).....	59
<b>Γράφημα 6:</b> Ο μέσος ( $\pm$ SD) Γοναδοσωματικός Δείκτης (GSI) της 2ης δειγματοληψίας κάθε ομάδας αχινών, ανά σιτηρέσιο και τύπο ύδατος. Ο διαφορετικός γραμματικός δείκτης υποδεικνύει τις στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P \leq 0,05$ ) στο ποσοστό του GSI μεταξύ των παραγόντων (Two-Way ANOVA).....	60
<b>Γράφημα 7:</b> Ο μέσος ( $\pm$ SD) Γοναδοσωματικός Δείκτης (GSI) της 3ης δειγματοληψίας κάθε ομάδας αχινών, ανά σιτηρέσιο και τύπο ύδατος. Ο διαφορετικός γραμματικός δείκτης υποδεικνύει τις στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P \leq 0,05$ ) στο ποσοστό του GSI μεταξύ των παραγόντων (Two-Way ANOVA).....	60
<b>Γράφημα 8:</b> Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης του ποσοστού των αχινών που χαρακτηρίστηκαν με κατάλληλο χρώμα στις γονάδες. ....	61
<b>Γραφήματα 9 - 12:</b> Η ποσότητα των ολικών καροτενοειδών ( $\mu\text{g/g}$ ) των γονάδων σε κάθε μήκος κύματος που μετρήθηκε. M1/Γ: σιτηρέσιο M1 σε νερό γεώτρησης, M1/Θ: σιτηρέσιο M1 σε θαλασσινό νερό, A/Γ: σιτηρέσιο A σε νερό γεώτρησης, A/Θ: σιτηρέσιο A σε θαλασσινό νερό. Ο αριθμός στην παρένθεση αντιστοιχεί στη δειγματοληψία.....	63
<b>Γραφήματα 13 - 16:</b> Η ποσότητα των ολικών καροτενοειδών ( $\mu\text{g/g}$ ) των δειγμάτων από τους κύβους των τροφών σε κάθε μήκος κύματος που μετρήθηκε. Ο χαρακτήρας U υποδηλώνει τους κύβους τροφής στους οποίους πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των καροτενοειδών μετά της παραμονή τους για 2 ημέρες στις δεξαμενές.....	63

## **EΙΚΟΝΕΣ**

<b>Εικόνα 1:</b> Δείγματα από τις 6 Ομοταξίες των Εχινοδέρμων. Φωτογραφίες από: 1) FtLaudGirl / iStockphoto: Starfish – Asteroidea, 2) Jeff Rotman / Getty Images: Red Sea Urchin - Strongylocentrotus franciscanus, 3) Neil: "Green brittle star" – Ophiarachna incrassate <a href="https://en.wikipedia.org/wiki/File:Greenbrittlestar.jpg#/media/File:Greenbrittlestar.jpg">https://en.wikipedia.org/wiki/File:Greenbrittlestar.jpg#/media/File:Greenbrittlestar.jpg</a> , 4) <a href="http://www.studyblue.com">www.studyblue.com</a> : Holothuroidea, 5) NOAA Photo Library: "Proisocrinus ruberrimus" <a href="https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Proisocrinus_ruberrimus.jpg#/media/File:Proisocrinus_ruberrimus.jpg">https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Proisocrinus_ruberrimus.jpg#/media/File:Proisocrinus_ruberrimus.jpg</a> , 6) <a href="https://www.studyblue.com">https://www.studyblue.com</a> .....	15
<b>Εικόνα 2:</b> Οι πέντε βαδιστικές αύλακες-ambulacral grooves (ambulacral area). .....	21
<b>Εικόνα 3:</b> Σχεδιάγραμμα της μορφολογίας της κοιλιακής και της ραχιαίας πλευράς του σκελετού ενός αχινού (EnchantedLearning.com). .....	21
<b>Εικόνα 4:</b> Η εικόνα περιγράφει σχηματικά τα βασικά εσωτερικά και εξωτερικά όργανα ενός αχινού. ....	21
<b>Εικόνα 5:</b> Παγκόσμιος χάρτης γεωγραφικής κατανομής του <i>Paracentrotus lividus</i> ( <a href="http://www.discoverlife.org">www.discoverlife.org</a> ). .....	29
<b>Εικόνα 6:</b> Οι δεξαμενές των εγκαταστάσεων του ενυδρείου. ....	35
<b>Εικόνα 7:</b> Οι δεξαμενές που χρησιμοποιήθηκαν με διπλό πυθμένα για το πείραμα. ....	35
<b>Σχέδιο 1:</b> Το σχήμα και οι διαστάσεις κάθε δεξαμενής των 150 lt που χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα. ....	36
<b>Εικόνα 8:</b> Τα πλαστικά διάτρητα δοχεία στα οποία τοποθετήθηκε ο κάθε αχινός. ....	36
<b>Εικόνα 9:</b> Η τεμαχισμένη σε κύβους πάστα της τροφής, μετά την αποξήρανσή της στο φούρνο. ....	39
<b>Εικόνα 10:</b> (α) Η αρχική μορφή του σιτηρεσίου M2 και ο κύβος στον οποίο μετετρέπη για να εξυπηρετήσει τη διατροφή των αχινών. (β) Ένας κύβος από κάθε σιτηρέσιο που παρασκευάστηκε. ....	39
<b>Εικόνα 11:</b> Ο σχηματισμός των πληγών ξεκινά με την εμφάνιση πράσινων στιγμάτων συνήθως γύρω από φυμάτια αποκομμένων αγκαθιών, που σταδιακά επεκτείνονται αφήνοντας στο κέντρο τους την κάψα γυμνή από δέρμα. ....	43
<b>Εικόνα 12:</b> Η διαφορά ανάμεσα στους αχινούς που διατηρήθηκαν σε θαλασσινό νερό (α) και σε νερό γεώτρησης (β), ενώ ίσχυαν οι ίδιες συνθήκες εκτροφής. ....	45
<b>Εικόνα 13:</b> Φωτογραφία από την ανατομή των αχινών για την απομόνωση και το ζύγισμα των γονάδων. ....	53
<b>Εικόνα 14:</b> Δημιουργία φάσεων και μεταφορά του εκχυλίσματος των καρτενοειδών σε εξάνιο. ....	55
<b>Εικόνα 15:</b> Ο Rotary evaporator που χρησιμοποιήθηκε για την συμπύκνωση των διαλυμάτων των καρτενοειδών. ....	55
<b>Εικόνα 16:</b> Φιλτράρισμα του τελικού διαλύματος των καρτενοειδών με φίλτρο σύριγγας πόρου 0,2 μm. ....	56
<b>Εικόνα 17:</b> Το φασματοφωτόμετρο στο οποίο πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της απορρόφησης των διαλυμάτων των καρτενοειδών. ....	57
<b>Εικόνα 18:</b> α) Το επιθυμητό χρώμα στις γονάδες, β) Ακατάλληλο εμπορικά χρώμα. ....	62
<b>Εικόνα 19:</b> Σύγκριση αχινών του πειράματος από δεξαμενή με θαλασσινό νερό (α) – νερού γεώτρησης (β) (διατροφή με φαιοφύκη). ....	74
<b>Εικόνα 20:</b> Σύγκριση αχινού από άγριο πληθυσμό (α) με αχινό διατηρημένο σε νερό γεώτρησης σε δεξαμενή του Ενυδρείου (β). ....	74

<b>Εικόνα 21:</b> Νεκροί αχινοί μετά από μικρή παραμονή σε pH 7,5.....	75
<b>Εικόνα 22:</b> Πληγές στο σώμα αχινού του πειράματος διατροφής. Φαίνεται καθαρά ο πράσινος νεκρωτικός ιστός που καθώς επεκτείνεται αφήνει απογυμνωμένο σκελετό.....	80
<b>Εικόνα 23:</b> Φωτογραφίες από ασθενείς αχινοί του πειράματος διατροφής: (α) Πολλαπλές πληγές στο ίδιο άτομο, (β) Συνύπαρξη παλιάς πληγής που επουλώνεται, με νέα, (γ) Πληγή που επουλώνεται.....	81
<b>Εικόνα 24:</b> Τα τρυβλία των καλλιεργειών στα διαφορετικά θρεπτικά υλικά, στα οποία φαίνονται οι αποικίες που αναπτύχθηκαν από το επίχρισμα των πληγών (πάνω τμήμα του τρυβλίου) και από το κοιλωματικό υγρό (κάτω τμήμα του τρυβλίου). .....	86
<b>Εικόνα 25:</b> Τα τρυβλία της δεύτερης καλλιέργειας που πραγματοποιήθηκε με δείγμα από το κοιλωματικό υγρό, στα οποία δεν αναπτύχθηκαν αποικίες. ....	87
<b>Εικόνα 26:</b> Φωτογραφία του πηκτώματος κατά την έκθεσή του σε υπεριώδη ακτινοβολία, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης.....	89
<b>Εικόνα 27:</b> Θερμικός κυκλοποιητής όπου πραγματοποιείται η κλασική αντίδραση PCR. Στην οθόνη απεικονίζεται το πρόγραμμα των διαδοχικών κύκλων για τη διενέργεια της αντίδρασης. ( <a href="http://www.biocompare.com/Nucleic-Acid-Electrophoresis/23396-Thermal-Cyclers- Thermocyclers-96-Well/">http://www.biocompare.com/Nucleic-Acid-Electrophoresis/23396-Thermal-Cyclers- Thermocyclers-96-Well/</a> ) .....	91
<b>Εικόνα 28:</b> Φωτογραφία του πηκτώματος της δοκιμαστικής αντίδρασης PCR υπό υπεριώδη ακτινοβολία, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης.....	92

## Περίληψη

Ο αχινός *Paracentrotus lividus* (Lamarck 1816) παρουσιάζει ιδιαίτερο οικονομικό ενδιαφέρον λόγω της υψηλής εμπορικής και θρεπτικής αξίας των γονάδων του οι οποίες καταναλώνονται ευρέως. Η αυξημένη ζήτηση έχει προκαλέσει υπεραλίευση του είδους και κατάρρευση των φυσικών αποθεμάτων σε περιοχές που αφθονούσαν (π.χ. Γαλλία). Έτσι, δημιουργήθηκε η ανάγκη ανάπτυξης μεθόδων εκτροφής του με τη χρήση κατάλληλης τροφής. Στην παρούσα εργασία δοκιμάστηκαν 3 τεχνητά σιτηρέσια που παρασκευάστηκαν από εμάς και χρησιμοποιήθηκαν για την εκτροφή αχινών σε νερό γεώτρησης: 1) 44,7% σιτάρι– 44,7% ιχθυάλευρο με προσθήκη φυσικής β-καροτίνης (M1), 2) 89,4% ιχθυάλευρο (A), 3) 68% κριθάρι – 22% krill (M2). Στην πορεία των πειραμάτων εκτροφής εκδηλώθηκε ασθένεια με χαρακτηριστικές πληγές στο σώμα των αχινών, αισθητή υποβάθμιση των σκελετικών στοιχείων των αχινών και υψηλή θνησιμότητα. Ο σχεδιασμός του πειράματος τροποποιήθηκε: η εκτροφή επαναλήφθηκε σε δύο διαφορετικές ποιότητες νερού, σε θαλασσινό (αλατότητα 36 ‰, pH ~7,8) και νερό γεώτρησης (αλατότητα 36 ‰, pH 8,1), όπου δοκιμάστηκαν τα σιτηρέσια στα οποία παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη (M1) και η μικρότερη (A) θνησιμότητα. Υπό αυτές τις συνθήκες η ανάπτυξη των γονάδων υπήρξε ικανοποιητική εντός μικρού χρονικού διαστήματος, σε σύγκριση με αχινούς του φυσικού περιβάλλοντος, αλλά όχι και το χρώμα τους, παρά τον εμπλουτισμό του ενός σιτηρεσίου με β-καροτίνη. Ως εκ τούτου μετρήθηκε, μετά από εκχύλιση, η συγκέντρωση των (ολικών) καροτενοειδών στις γονάδες των αχινών και στην τροφή τους. Φάνηκε ότι η ποσότητα τους φθίνει με την πάροδο του χρόνου κατά την εξέλιξη του πειράματος πιθανώς λόγω ανεπάρκειας είτε της ποσότητας β-καροτίνης που προσετέθη στο μίγμα της τροφής M1, είτε του απαραίτητου χρόνου ούτως ώστε να «εκφραστεί» σε χρώμα η β-καροτίνη που προσλάμβαναν από τη διατροφή τους οι αχινοί. Επίσης, έγινε προσπάθεια ταυτοποίησης των παθογόνων μικροοργανισμών που θα μπορούσαν να ευθύνονται για την εκδήλωση της ασθένειας, με την χρήση μικροβιολογικών και μοριακών μεθόδων, με τα αποτελέσματα των τελευταίων να βρίσκονται σε εξέλιξη. Τέλος, η υποβάθμιση των σκελετικών στοιχείων των αχινών που εκτρέφονταν σε νερό γεώτρησης και εκδηλωνόταν με την απώλεια των αγκαθιών τους, έγινε προσπάθεια να συσχετιστεί με το χαμηλότερο pH που χαρακτηρίζει το νερό γεώτρησης, ή/και την «ποιότητα» γενικότερα του νερού αυτού.

Η εργασία αναπτύσσεται σε 4 ενότητες οι οποίες αφορούν διαδοχικά: (α) στα αποτελέσματα της εκτροφής σε νερό γεώτρησης και θαλασσινό νερό (Ενότητα 1 και 2), (β) στην επίδραση του νερού γεώτρησης στην επιβίωση και ανάπτυξη των αχινών (Ενότητα 3) και (γ) στην παθολογία των αχινών (Ενότητα 4).

### **Λέξεις κλειδιά**

Αχινός, *Paracentrotus lividus*, Ανάπτυξη γονάδων, Εκτροφή, Τεχνητά σιτηρέσια, Παθολογία, Νερό γεώτρησης, pH, Καροτενοειδή

## Abstract

The sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck 1816) is of particular economic interest due to the high commercial and nutritional value of its gonads which are widely consumed. Increased demand has led to overfishing of the species and the collapse of natural stocks in areas where it was in abundance (e.g. France). Thus, the need for culture methods with the use of appropriate food was emerged. In the present study, three artificial handmade feeds were tested in rearing urchins in forage water: 1) 44.7% wheat - 44.7% fish meal with the addition of  $\beta$ -carotene (M1), 2) 89.4% fishmeal (A), 3) 68% barley - 22% krill (M2). In the course of the culturing experiment, were manifested a disease with characteristic wounds in the body of the urchins, a marked degradation of skeletal elements of the urchins and high mortality. The design of the experiment was modified: culturing was repeated in two different water qualities, in seawater (salinity 36 ‰, pH ~7,8) and in forage water (salinity 36 ‰, pH 8,1), and were tested the feeds which presented the highest (M1) and the lowest mortality (A). Under these conditions, gonadal growth had been satisfactory over a short period of time, compared to urchins of the natural environment, but not their color as well, despite the enrichment of a feed with  $\beta$ -carotene. Therefore, extraction of carotenoids from the gonads and from food pellets was performed and the concentration of (total) carotenoids was measured. It turned out that their amount declined over time during the course of the experiment probably due to a deficiency in either the amount of  $\beta$ -carotene added to the M1 food mix or the time necessary so as the  $\beta$ -carotene the urchins received from their diet, to be “expressed” in color. An attempt to identify the pathogenic micro-organisms that could be responsible for the onset of the disease was also made, using microbiological and molecular methods, with the results of the latter being in progress. Finally, the degradation of the skeletal elements of the urchins that were cultured in forage water which was manifested by the loss of their thorns, was attempted to be associated with the lower pH which characterizes the forage water and/or based on the total water “quality”.

This thesis is developed in 4 sections, which concern: (a) the results of culture in drilling water and seawater (Section 1 and 2), (b) the effect of forage water on the survival and development of the urchins (Section 3), and (c) the pathology of the sea urchins (Section 4).

### **Key words**

Sea urchin, *Paracentrotus lividus*, Gonad development, Culture, Artificial feeds, Pathology, Forage water, pH, Carotenoids



## 1. ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ



## 1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΕΧΙΝΟΔΕΡΜΩΝ

Τα Εχινόδερμα (Echinodermata) αποτελούν μια μεγάλη ομάδα, περίπου 7.000 αποκλειστικά θαλάσσιων ειδών. Χωρίζονται σε δέκα Ομοταξίες (Hyman, 1955) από τις οποίες έξι συμπεριλαμβάνουν αρτίγονα είδη ενώ οι άλλες εμφανίζονται μόνο ως απολιθώματα. Οι έξι αυτές Ομοταξίες είναι τα: Κρινοειδή, Αστεροειδή, Οφιουροειδή, Ομοκεντροκυκλοειδή, Εχινοειδή και Ολοθουροειδή. Είναι οργανισμοί ευρέως κατανεμημένοι σε όλους τους ωκεανούς και τα βάθη. Κατέχουν σημαντική θέση τόσο στα σκληρά όσο και στα μαλακά υποστρώματα, αποτελούν μια από τις κύριες ομάδες της επιφανίδας και παίζουν σπουδαίο ρόλο στην θαλάσσια τροφική αλυσίδα. Κατέχουν θεμελιώδη θέση σε πολλά από τα πιο ευάλωτα ωκεάνια οικοσυστήματα από την Ανταρκτική έως τροπικά και εύκρατα (Byrne, 1994).



**Εικόνα 1:** Δείγματα από τις 6 Ομοταξίες των Εχινόδερμων. Φωτογραφίες από: 1) FtLaudGirl / iStockphoto: Starfish – Asteroidea, 2) Jeff Rotman / Getty Images: Red Sea Urchin - Strongylocentrotus franciscanus, 3) Neil: "Green brittle star" – Ophiarachna incrassate <https://en.wikipedia.org/wiki/File:Greenbrittlestar.jpg#/media/File:Greenbrittlestar.jpg>, 4) [www.studyblue.com](http://www.studyblue.com): Holothuroidea, 5) NOAA Photo Library: "Proisocrinus ruberrimus" [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Proisocrinus\\_ruberrimus.jpg#/media/File:Proisocrinus\\_ruberrimus.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Proisocrinus_ruberrimus.jpg#/media/File:Proisocrinus_ruberrimus.jpg), 6) [https://www.studyblue.com](http://www.studyblue.com)



Τα βενθικά τάξα συχνά παίζουν σημαντικό ρόλο στο οικοσύστημα για παράδειγμα σαν βιοαναμοχλευτές όπως και, όντας σημαντικό κομμάτι της τροφικής αλυσίδας σαν θήραμα σαρκοφάγων ψαριών και καρκινοειδών (Bowmer & Keegan, 1983, Sköld & Rosenberg, 1996). Τα υποπαράλια είδη αστερίων και αχινών αντιπροσωπεύουν μια σημαντική κοινωνία βοσκητών ενώ σε πολλές περιοχές τα Εχινόδερμα όπως οι αχινόι και τα ολοθούρια είναι εκμεταλλεύσιμα σαν τροφή (Micael et al., 2009).

### **1.1.1 Δομή σώματος**

Ξεχωρίζουν από τις άλλες ομάδες ασπονδύλων και παρουσιάζουν πολλά μοναδικά και απρόσμενα χαρακτηριστικά. Τα Εχινόδερμα είναι ακτινοσυμμετρικά, ωστόσο η ακτινωτή συμμετρία είναι χαρακτηριστικό της δευτερογενούς ανάπτυξης. Οι πλαγκτονικές προνύμφες είναι αμφιπλευροσυμμετρικές και μόνο τα ενήλικα οικοδομούν ακτινωτή συμμετρία, με τα περισσότερα Εχινόδερμα να έχουν πεντακτινωτή συμμετρία, δηλαδή συμμετρία βασισμένη σε πέντε τμήματα. Ο κοινός προσανατολισμός όλων των Εχινόδερμων επιτυγχάνεται αν οριστεί ένας κεντρικός άξονας, ο οποίος είναι κατά κανόνα εκείνος που ενώνει τον στοματικό με τον εδρικό πόλο. Γύρω από αυτόν τον άξονα 5 ακτινωτές (radial) περιοχές εναλλάσσονται με 5 μεσοακτινωτές (interradial). Επειδή όμως κατά μήκος των ακτίνων βρίσκονται οι ποδίσκοι, οι οποίοι πολύ συχνά έχουν βαδιστικό ρόλο, αυτές οι περιοχές ονομάζονται επίσης βαδιστικές και μεσοβαδιστικές (Pancucci-Paradourouli, 1996).

Δεν έχουν κεφαλή, εμπρόσθιο ή οπίσθιο άκρο, ραχιαία ή κοιλιακή πλευρά. Ωστόσο αναφερόμαστε στην βάση στην οποία το κέντρο βρίσκεται το στόμα ως κοιλιακή ή στοματική πλευρά και στην κορυφή του σκελετού στην οποία το κέντρο βρίσκεται η έδρα ως ραχιαία ή αντιστοματική πλευρά. Στα κανονικά Εχινοειδή, τα Αστεροειδή και τα Οφιοουροειδή ο κεντρικός άξονας είναι κατακόρυφος, με την κοιλιακή επιφάνεια στραμμένη προς τα κάτω. Το δε στόμα και η έδρα βρίσκονται περίπου στο κέντρο των αντίστοιχων επιφανειών. Στα Ακανόνιστα Εχινοειδή στόμα και έδρα βρίσκονται σε έκκεντρη θέση. Στα Ολοθουροειδή το σώμα στρέφεται κατά 90° και έτσι τοποθετείται οριζόντια με το στόμα προς τα εμπρός, ενώ στα Κρινοειδή η κοιλιακή επιφάνεια βρίσκεται προς τα πάνω.

Έχουν ένα ολοκληρωμένο πεπτικό σύστημα, μια ανεπτυγμένη κοιλωματική κοιλότητα (η κοιλότητα του σώματος που παρουσιάζουν δομικά πολύπλοκα ζώα - coelom) και ενδοσκελετό. Ο σκελετός αυτός είναι ασβεστολιθικός και μεσοδερμικής προέλευσης, συνεπώς καλύπτεται από ιστό και δεν είναι εξωτερικός όπως στα αρθρώποδα. Αποτελείται είτε από συνεχόμενα πλακίδια είτε από μεμονωμένους σκληρίτες (όπως στα Ολοθουροειδή). Στα Αστεροειδή, Οφιοουροειδή και Κρινοειδή τα πλακίδια εναρθρώνονται μεταξύ τους, ενώ στα Εχινοειδή είναι σταθερά ενώμενα. Εκτός από τον κύριο σκελετό, τα Εχινόδερμα είναι εφοδιασμένα και με άλλα σκελετικά μέρη, κινητά ή ακίνητα, όπως οι κινητές άκανθες των Εχινοειδών ή οι ακίνητες των Αστεροειδών, οι οποίες αντιπροσωπεύουν προεξοχές των πλακιδίων. Ακόμα, σε Εχινοειδή και Αστεροειδή παρουσιάζονται ποδολαβίδες οι οποίες είναι μικρά λαβιδοειδή όργανα (pedicellariae) και στην άκρη φέρουν δύο (Αστεροειδή) ή τρεις (Εχινοειδή) σιαγόνες και χρησιμεύουν για τη σύλληψη μικρών οργανισμών ή για την άμυνα (μερικές φορές φέρουν δηλητηριώδεις αδένες στη βάση τους) ή βοηθούν να παραμένει η επιφάνεια καθαρή (Pancucci-Paradourouli, 1996, Castro & Huber, 1992).

### **1.1.2 Υδραγγειακό σύστημα**

Μοναδικό στα Εχινόδερμα είναι το υδραγγειακό τους σύστημα, ένα δίκτυο καναλιών γεμάτων με υγρό όμοιο με το κοιλωματικό, που συνδέεται με το περιβάλλον μέσω της μητροπόρου πλάκας, μιας πορώδους πλάκας που βρίσκεται στην αντιστοματική πλευρά. Από αυτήν αρχίζει ο πετρώδης σωλήνας (ασβεστοποιημένος σε μερικές ομάδες) ο οποίος καταλήγει στον κυκλικό σωλήνα που βρίσκεται γύρω από τον οισοφάγο. Πάνω στον κυκλικό σωλήνα βρίσκονται οι μικρές κύστεις του Poli, οι οποίες ρυθμίζουν την πίεση του εσωτερικού υγρού και λείπουν από τα Κρινοειδή. Από τον κυκλικό σωλήνα ξεκινούν τα ακτινωτά σωληνάκια, που είναι τυπικά 5, κάθε ένα από τα οποία φέρει από τις δύο πλευρές του τους ποδίσκους (Pancucci-Paradopolou, 1996). Οι βαδιστικοί ποδίσκοι είναι μυϊκές προεκβολές των καναλιών του υδραγγειακού συστήματος, που εκτείνονται όταν γεμίζουν με υγρό, μερικές φορές με τη δράση μυωδών σάκων (τις φύσιγγες) που εκτείνονται μέσα στο σώμα, αντίθετα από τους βαδιστικούς ποδίσκους και ρυθμίζουν την έκταση ή την κάμψη τους. Συνεπώς χαρακτηρίζονται από ένα πολύπλοκο βαδιστικό σύστημα, εν μέρει εξωτερικό, ορατό (ποδίσκοι) και με το μεγαλύτερο μέρος του να βρίσκεται στο εσωτερικό του σώματος. Οι ποδίσκοι πολύ συχνά καταλήγουν σε μυζητήρα και χρησιμοποιούνται για διάφορες λειτουργίες όπως για την προσκόλληση στο υπόστρωμα, τη μετακίνηση, την αναπνοή, τη διατροφή, την υποδοχή χημικών και μηχανικών ερεθισμάτων (Castro & Huber, 1992, Pancucci-Paradopolou, 1996).

### **1.1.3 Πεπτικό σύστημα**

Το πεπτικό σύστημα των Εχινοδέρμων είναι απλό. Οι αστερίες οι οποίοι είναι κυρίως σαρκοφάγοι για να τραφούν επεκτείνουν τμήμα του στομάχου τους έξω από το στόμα για να συλλάβουν την τροφή. Στη συνέχεια το στομάχι εκκρίνει τα πεπτικά ένζυμα που παράγονται στους πεπτικούς αδένες. Η τροφή που έχει ήδη υποστεί πέψη, μεταφέρεται στους αδένες για την απορρόφηση και το στομάχι αποσύρεται ξανά μέσα στο σώμα. Το έντερο είτε είναι μικρό είτε λείπει τελείως. Οι οφίουροι και τα κρινοειδή έχουν επίσης απλούς και κοντούς πεπτικούς σωλήνες. Ο πεπτικός σωλήνας των αχινών και των ολοθουρίων είναι μακρύς και περιελιγμένος. Στους αχινούς αυτό αποτελεί μια προσαρμογή για πιο παρατεταμένη πέψη που είναι απαραίτητη για την αποικοδόμηση των φυτικών υλικών. Στα ολοθούρια εξυπηρετεί ως προς το ότι χρειάζεται να αφαιρέσουν οργανικό υλικό από τις μεγάλες ποσότητες ιζήματος που προσλαμβάνουν. Σε όλα τα Εχινόδερμα τα θρεπτικά συστατικά μεταφέρονται με το κοιλωματικό υγρό που γεμίζει την διευρυμένη σωματική κοιλότητα (κοιλώμα) (Castro & Huber, 1992).

### **1.1.4 Αναπνοή**

Τα Εχινόδερμα είναι αερόβιοι οργανισμοί, και η πρόσληψη οξυγόνου εξαρτάται κυρίως από το θρεπτικό επίπεδο, το μέγεθός τους και τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος, αλλά και από τη συγκέντρωση του οξυγόνου, την εποχικότητα, την αλατότητα και το pH (π.χ. Hiestand, 1940, Farmanfarmaian, 1966, McPherson, 1968, Diehl et al., 1979, Sabourin & Stickle, 1981, Lawrence & Lane, 1982, Brockington & Clarke, 2001, Talbot & Lawrence, 2002, Siikavuopio & Mortensen, 2008, Wood et al., 2008, 2010, 2011, Christensen et al., 2011). Ο ρυθμός πρόσληψης οξυγόνου από τα Εχινόδερμα είναι γενικά χαμηλότερος από άλλα ασπόνδυλα, πιθανώς λόγω του μικρότερου βαθμού μυϊκής ανάπτυξης (Lawrence & Lane, 1982), ενώ

γενικά εξαρτώνται από το περιβάλλον τους, καθώς έχουν λίγες προσαρμογές εξωτερικής και εσωτερικής μεταφοράς οξυγόνου σε σχέση με άλλα ασπόνδυλα (Shick, 1983).

Το οξυγόνο μεταφέρεται από το κοιλωματικό υγρό, αφού τα Εχινόδερμα στερούνται ξεχωριστού κυκλοφορικού συστήματος. Στους αστερίες και τους αχινοί, η ανταλλαγή αερίων γίνεται κατά μήκος των δερματικών βραγχίων που είναι μικρές διακλαδισμένες προεκβολές του σωματικού τοιχώματος που συνδέονται στη βάση με το κοίλωμα. Στα ολοθούρια, το νερό εισέρχεται μέσα από την έδρα σε ένα ζεύγος λεπτών διακλαδισμένων σωλήνων (αναπνευστικά δένδρα) που αποτελούν προεκβολές του πεπτικού σωλήνα μέσα στη σωματική κοιλότητα και παρέχουν μεγάλη αναπνευστική επιφάνεια (Castro & Huber, 1992). Ο ρυθμός αναπνοής είναι υψηλότερος στα επιβενθικά Εχινόδερμα σε σχέση με τα ενδοβενθικά (Lewis, 1968, Thorson, 1936) γιατί είναι σαφώς πιο δραστήρια. Τα θρεπτικά που θα καταναλωθούν για την αναπνοή, είναι συνάρτηση του μεγέθους, με τη θερμοκρασία να παίζει επίσης κάποιο ρόλο. Βασικό χαρακτηριστικό των Εχινόδερμων είναι η εποχιακή αλλαγή της φυσιολογικής τους κατάστασης: εποχιακές αλλαγές στο ρυθμό αύξησης ή στη γαμετογένεση μπορούν να επιφέρουν μεταβολές στην απαιτούμενη οξείδωση των θρεπτικών. Ο ρυθμός αναπνοής εξαρτάται επίσης από την τροφική δραστηριότητα των ατόμων, και μειώνεται δραστικά σε περιόδους νηστείας (McPherson, 1968, Fenaux et al., 1977 σε Rancucci-Paradourouli, 1996).

#### **1.1.5 Νευρικό σύστημα και συμπεριφορά**

Η γνώση για το νευρικό σύστημα των εχινόδερμων είναι περιορισμένη. Υπάρχει ένα δίκτυο νεύρων που συντονίζει τις κινήσεις των βαδιστικών ποδίσκων και των αγκαθιών, παρά την απουσία εγκεφάλου. Όμως ακόμα πιο πολύπλοκες συμπεριφορές όπως η επαναφορά του σώματος μετά από αναποδογύρισμα και το καμουφλάρισμα με κομμάτια διάφορων υλικών στους αχινοί, αποτελούν αποδείξεις ότι το νευρικό σύστημα μπορεί να μην είναι τόσο απλό.

#### **1.1.6 Αναπαραγωγή και αναπαραγωγικός κύκλος**

Στα περισσότερα Εχινόδερμα τα φύλα είναι χωριστά. Στις πιο πολλές ομάδες, πέντε, δέκα ή περισσότερες γονάδες απελευθερώνουν σπερματοζωάρια ή ωάρια απευθείας μέσα στο νερό. Οι γονάδες βρίσκονται συνήθως μέσα στη σωματική κοιλότητα και ανοίγονται προς τα έξω διαμέσου ενός αγωγού. Οι γαμέτες δεν επιβιώνουν για πολύ μέσα στο νερό, γι' αυτό πολλά άτομα του ίδιου είδους απελευθερώνουν ταυτόχρονα γαμέτες για να εξασφαλιστεί η γονιμοποίηση.

Η ανάπτυξη των γονιμοποιημένων ωαρίων συνεχίζεται στο πλαγκτό και τυπικά καταλήγει σε μια βλεφαριδοφόρα προνύμφη, χαρακτηριστική για κάθε ομάδα. Οι προνύμφες των Εχινόδερμων είναι αμφίπλευρα συμμετρικές και η ακτινωτή συμμετρία δεν αναπτύσσεται πριν τη μεταμόρφωση. Μερικά Εχινόδερμα δεν έχουν πλαγκτικές προνύμφες και φυλάσσουν τα γονιμοποιημένα ωάρια σε ειδικούς σάκους ή κάτω από το σώμα τους (Castro & Huber, 1992).

Για την περίοδο και την περιοδικότητα της αναπαραγωγής των Εχινόδερμων, δεν υπάρχουν σαφή συμπεράσματα. Οι παράγοντες που καθορίζουν την εποχή της αναπαραγωγής είναι πολλοί και περιπλέκονται, καθώς στις ίδιες περιβαλλοντικές συνθήκες δύο διαφορετικά είδη συμπεριφέρονται διαφορετικά, αλλά και το ίδιο είδος να παρουσιάζει διαφορετική

συμπεριφορά σε διαφορετικά περιβάλλοντα (Lessios, 1985). Αυτό δείχνει ότι οι τοπικοί πληθυσμοί παρουσιάζουν μια προσαρμογή για να μπορέσουν να ανταποκριθούν στα διαφορετικά περιβάλλοντα. Περιοδικότητα σε σχέση με τη θερμοκρασία και την γεωγραφική εξάπλωση ενός είδους έχει αναφερθεί σε Ολοθουροειδή (*Holothuria forskali*, Tuwo & Conand, 1922), Αστεροειδή (*Asterias rubens*, Nichols & Barker, 1984) και πολλά Εχινοειδή (*Sinechinocyamus mai*, Chen & Chen, 1993, *Loxechinus albus*, Gutierrez & Otsu, 1975 σε Pancucci-Paradopolou, 1996).

### **1.1.7 Κύκλος ζωής**

Πολλά τάξα Εχινοδέρμων παρουσιάζουν ένα στάδιο ή στάδια ζωής στο οποίο ζουν σε περιβάλλον τελείως διαφορετικό από αυτό άλλων σταδίων ζωής. Για παράδειγμα η πελαγική προνύμφη μπορεί να ξοδέψει από ώρες έως μήνες στη στήλη του νερού πριν εγκατασταθεί στο ενδιαίτημα (συχνά βενθικό) των ενηλίκων. Η πλαγκτονική περίοδος διαφέρει ανάμεσα στα είδη και συνήθως συγχρονίζεται με τις εξειδικευμένες ανά είδος ανάγκες ή αντοχές (αφθονία τροφής, βέλτιστες συνθήκες αβιοτικού περιβάλλοντος όπως το pH, κ.α.). Τα ενήλικα μπορεί να έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής όπως κάποια Οφιοουροειδή που ζουν έως τα 20 ή και παραπάνω χρόνια, ενώ έχουν μια τυπικά μικρή περίοδο σαν προνύμφη, διάρκειας από μερικές ημέρες έως εβδομάδες (Muus, 1981).

### **1.1.8 Επίδραση των φυσικών παραμέτρων**

Μεγάλο μέρος της επιδερμίδας των Εχινοδέρμων είναι εκτεθειμένο στο εξωτερικό περιβάλλον, ενώ λείπει ένα εξειδικευμένο όργανο για την ωσμωτική ή ιοντική ρύθμιση (Shumway, 1977, Diehl, 1986). Επομένως, δεν αντέχουν σε μεγάλες διακυμάνσεις της αλατότητας στο περιβάλλον τους (Tortonese, 1965 σε Pancucci-Paradopolou, 1996). Πληθυσμοί του ίδιου είδους που διαβιούν σε διαφορετικές περιοχές με διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, προσαρμοζόμενοι σε αυτές, παρουσιάζουν διαφορετικές συμπεριφορές στα όρια αντοχής και επιβίωσης σε ακραίες τιμές αλατότητας και θερμοκρασίας (Stancyk & Shaffer, 1977, Vernberg, 1981, Watts & Lawrence 1986). Για παράδειγμα έχει καταγραφεί μείωση του ρυθμού διατροφής και συνεπώς του ρυθμού αύξησης σε Αστεροειδή (Forcucci & Lawrence 1986, Shirley & Stickle 1982a,b) ή δημιουργία ανώμαλων μορφών (Watts et al., 1983) σε χαμηλές ή υψηλές αλατότητες. Ωστόσο, υπάρχουν και αναφορές Εχινοδέρμων με διευρυμένα όρια αντοχής σε χαμηλές αλατότητες (< 20 ‰) και ζουν ακόμα και σε υφάλμυρα νερά (*Asterias rubens* : Binyon, 1966, 1976, *Strongylocentrotus droebachiensis* : Himmelman et al., 1984, *Ophiura albida*, *Amphiura chiajei* : Pagett, 1980), όπως και σε υπεράλμυρα (52-60 ‰, *Amphipholis squamata*, *Amphiura fasciata*, *Leptosynapta chela*, *Asterina burtoni*, *Astropecten polyacanthus* : Price, 1982), παρουσιάζοντας πλαστικότητα στις φυσιολογικές διεργασίες που τους δίνει τη δυνατότητα να επιβιώσουν σε αφιλόξενα περιβάλλοντα, αρκεί να έχουν λυθεί τα προβλήματα της αναπαραγωγής και του ανταγωνισμού (Pagett, 1980).

Η αντοχή σε χαμηλές συγκεντρώσεις O<sub>2</sub> φαίνεται να είναι κοινή σε όλα τα Εχινόδερμα και οφείλεται στο χαμηλό μεταβολισμό τους, στη χρήση του περισπλαχνικού υγρού ως αποθήκης οξυγόνου καθώς και σε κάποια ικανότητα αναερόβιας αναπνοής.

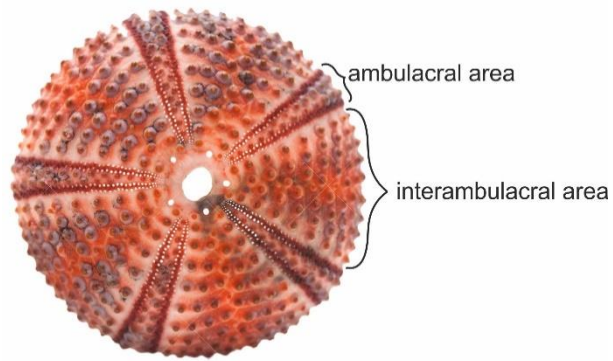
Η θερμοκρασία θεωρείται ένας από τους σπουδαιότερους παράγοντες ελέγχου της αναπαραγωγής των Εχινοειδών (O'Connor et al., 1976, O'Connor & Mulley, 1977, Harding et al., 1983, Kobayashi, 1992b, Bougis, 1971 σε Pancucci-Paradopolou, 1996). Η θερμοκρασία και ο μεταβολισμός συνδέονται στενά, καθώς παρ' ότι το ετήσιο εύρος θερμοκρασιών διαφέρει σε κάθε περιοχή, τη στιγμή που η θερμοκρασία αρχίζει να αυξάνεται, αρχίζει να αυξάνεται και ο μεταβολισμός (Frantzis & Gremare, 1992) και ξεκινά η γοναδική ανάπτυξη. Σε θερμότερες περιοχές η γεννητική ωρίμανση επιτυγχάνεται σε μικρότερο μέγεθος και ηλικία (Orton, 1920). Η εποχή της ωοτοκίας διαφέρει ανάμεσα στα είδη, με μερικά να ωοτοκούν με την αύξηση της θερμοκρασίας την άνοιξη, άλλα όταν η θερμοκρασία φτάνει τη μέγιστη τιμή της το καλοκαίρι και άλλα όταν αρχίζει και μειώνεται το φθινόπωρο (Vernberg, 1981). Επίσης, η σχέση μεταξύ αύξησης της θερμοκρασίας και αρχής και διάρκειας της ωοτοκίας, αποτυπώνεται και από το γεγονός ότι πληθυσμοί του ίδιου είδους αλλά σε διαφορετικά γεωγραφικά πλάτη ωοτοκούν σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Επίσης, στο Βόρειο Ημισφαίριο τα περισσότερα ζώα ωοτοκούν την άνοιξη και το καλοκαίρι, αλλά η ωοτοκία συνήθως ξεκινάει νωρίτερα και έχει μεγαλύτερη διάρκεια σε νοτιότερα πλάτη (Orton, 1920, Thorson 1950 σε Rumrill & Pearse, 1985).

## **1.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΕΧΙΝΟΕΙΔΩΝ (Echinoidea)**

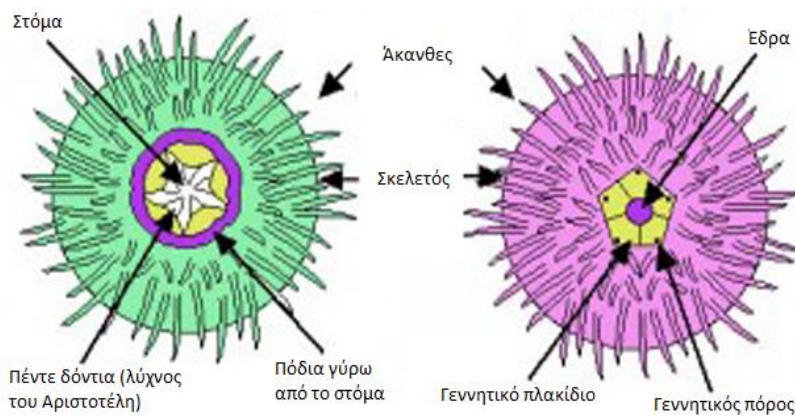
Τα Εχινοειδή βρίσκονται σε όλες τις θάλασσες και όλα τα υποστρώματα και παρουσιάζουν μεγάλη βαθυμετρική εξάπλωση. Τα Κανονικά προτιμούν το σκληρό υπόστρωμα, ενώ τα Ακανόνιστα το μαλακό και συχνά διεισδύουν στη λάσπη. Η κίνησή τους σε σκληρό υπόστρωμα γίνεται χάρη στους ποδίσκους και στις άκανθες, ενώ σε μαλακό παίρνει μέρος και ο λύχνος του Αριστοτέλη.

### **1.2.1 Δομή σώματος - Κίνηση**

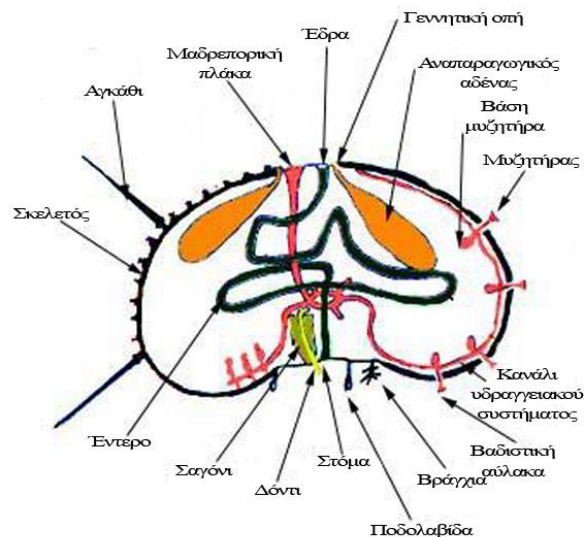
Στους αχινούς, ο σκελετός σχηματίζει ένα σφαιρικό σκληρό όστρακο με κινητά αγκάθια και ποδολαβίδες. Η μετακίνηση επιτυγχάνεται με τα κινητά αγκάθια, που αρθρώνονται μέσω επαρμάτων (φυμάτια) και μερικών μυών στο σκελετό, και τους βαδιστικούς ποδίσκους που καταλήγουν σε μυζητήρες. Οι πλάκες που συνθέτουν το σκελετό και οι πέντε βαδιστικές αύλακες (ακτινωτά κανάλια που εκτείνονται κατά μήκος των πόλων του σώματος) (ambulacral grooves) μπορούν να γίνουν εμφανείς μετά την απομάκρυνση των αγκαθιών και των ιστών (Εικόνα 2). Οι σειρές των πόρων κατά μήκος των βαδιστικών αυλάκων αντιστοιχούν στις σειρές των βαδιστικών ποδίσκων.



**Εικόνα 2:** Οι πέντε βαθιστικές αύλακες-ambulacral grooves (ambulacral area).



**Εικόνα 3:** Σχεδιάγραμμα της μορφολογίας της κοιλιακής και της ραχιαίας πλευράς του σκελετού ενός αχινού (EnchantedLearning.com).



**Εικόνα 4:** Η εικόνα περιγράφει σχηματικά τα βασικά εσωτερικά και εξωτερικά όργανα ενός αχινού.

Οι αχινοί κινούνται αργά αλλά μπορούν να διανύσουν σημαντικές αποστάσεις προκειμένου να αναζητήσουν τροφή ή να βρουν μια καλύτερη θέση ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν (π.χ. έντονος κυματισμός, καταιγίδα, άμπωτη). Η κίνησή τους είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού των βασικών κινήσεων έκτασης και συστολής των ποδίσκων και της σύσπασης των μυών των αγκαθιών της κοιλιακής επιφάνειας. Σε μερικές περιπτώσεις μπορούν να αφεθούν και να μεταφερθούν από τα ρεύματα σε άλλο μέρος.

Το στόμα, που έχει φορά προς τα κάτω, φέρει ένα πολύπλοκο σύστημα από σιαγόνες και μύες (λύχνος του Αριστοτέλη) και χρησιμεύει στην απόσπαση φυκών και άλλων κομματιών τροφής από το βυθό (Castro & Huber, 1992).

### **1.2.2 Σωματική αύξηση**

Τα νεαρά Εχινοειδή παρουσιάζουν υψηλό ρυθμό σωματικής αύξησης σε αντίθεση με τα ώριμα άτομα που ο ρυθμός αύξησης είναι χαμηλός (Lewis, 1958, Fuji, 1967, Moore et al., 1963a,b, Regis, 1979a σε Pancucci-Papadopoulou, 1996, Allain, 1978, σε Pancucci-Papadopoulou, 1996, Azzolina & Boudouresque, 1984, σε Pancucci-Papadopoulou, 1996, Greenwood, 1980). Έρευνες σε διάφορα είδη Εχινοειδών (Field, 1972, Miller & Mann, 1973, Propp, 1977, Greenwood, 1980) έδειξαν μια μεγάλη απώλεια ενέργειας με τη μορφή διαλυμένου οργανικού άνθρακα και ότι η αποτελεσματικότητα αύξησης ελαττώνεται με την ηλικία. Δεν είναι απολύτως σαφές το γιατί τα άτομα μετά τη μεταμόρφωση παύουν να αυξάνονται με ταχύ ρυθμό, αλλά ενδεχομένως οφείλεται στην αλλαγή διαιτολογίου (Fuji, 1967, Traer, 1980, Verlaque, 1987 σε Pancucci-Papadopoulou, 1996) και την ικανότητα προσαρμογής στη νέα δίαιτα (Birkeland, 1974 για Αστεροειδή). Ο ρυθμός αύξησης επηρεάζεται πολύ από τα χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος, έτσι ώστε είναι σχεδόν αδύνατο να συγκριθούν βιομετρικοί τύποι ακόμα και για το ίδιο είδος σε διαφορετικά περιβάλλοντα (Lawrence & Lane, 1982).

Σε γενικές γραμμές, όμως, η αύξηση στα Εχινοειδή είναι συχνά εποχιακή και όχι συνεχής. Μείωση του ρυθμού διατροφής μπορεί να παρατηρηθεί σε πολύ χαμηλές/πολύ υψηλές θερμοκρασίες (Moore et al., 1963b, Moore & McPherson, 1965, Lawrence & Lane, 1982), ενώ πιθανόν συνδέεται με την αναπαραγωγική περίοδο (Leighton, 1968). Για ορισμένα είδη έχει αναφερθεί αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ σωματικής και γοναδικής αύξησης (Lewis, 1958, Fuji, 1967, McPherson, 1968, Greenway, 1976, Greenwood, 1980).

### **1.2.3 Διατροφή**

Τα Εχινοειδή θεωρούνται γενικά φυτοφάγοι οργανισμοί. Είναι γνωστή η προτίμησή τους για τα φυτά, κάτι που πιθανώς συνδέεται με τα χημικά χαρακτηριστικά και τη θρεπτική αξία της τροφής (Lawrence, 1975). Ωστόσο, αποδεικνύεται ότι πολλά είδη είναι παμφάγα αν όχι σαρκοφάγα (McPherson, 1968, Sammarco et al., 1974, Bak & Van Eys, 1975, Karlson, 1978, Krumbain & Van Der Pers, 1974), καθώς μελέτες του στομαχικού περιεχομένου αχινών από διάφορα περιβάλλοντα δείχνουν ότι οι τροφές ζωικής προέλευσης όχι μόνο δεν αποφεύγονται, αντιθέτως κάποιες φορές αναζητούνται ενεργά. Έχει παρατηρηθεί σε διάφορα είδη η ενεργή σύλληψη ζωοπλαγκτού από τις δευτερεύουσες άκανθες (Leighton, 1968). Σε γενικές γραμμές, τρέφονται από προσκολλημένο ή ελεύθερο φυτικό υλικό αλλά και με ελεύθερα κρουστώδη ζώα, όπως σπόγγοι και βρυόζωα, και νεκρά οργανικά υλικά.

Τα Ακανόνιστα Εχινοειδή καταπίνουν το ίζημα και πέπτουν τα οργανικά θρύμματα που περιέχει, ενώ όλα τα Κανονικά Εχινοειδή είναι συνήθως ευκαιριακά στη διατροφή τους, δείχνοντας κάποιες προτιμήσεις όταν αυτό είναι δυνατόν. Η δίαιτα μερικών ειδών διαφέρει ανάλογα με το περιβάλλον και την εποχή (Lewis, 1958, 1964, Moore, 1966, Dix, 1970a, Niell & Pastor, 1973 σε Pancucci-Paradopolou, 1996, Lowe & Lawrence, 1976, Ayling, 1978, Regis, 1979a, 1979b σε Pancucci-Paradopolou, 1996). Ένας αχινός μπορεί να λειτουργεί ενεργά ως φυτοφάγος σε ένα συγκεκριμένο τόπο ή χρόνο, επειδή υπάρχει αφθονία σε φυτά, αυτό όμως δεν σημαίνει ότι είναι υποχρεωτικά φυτοφάγος. Παράδειγμα είναι ο *Acanthocidaris crassispina*, που την καλοκαιρινή περίοδο, όταν λιγοστεύουν τα φύκη τρέφεται με σωλήνες από *Serpulidae*, ίζημα αλλά και χαρτιά και φυτά από την ξηρά. Το χειμώνα, με την ανάπτυξη των φυκών, στρέφεται αμέσως σε αυτά. Η συμπεριφορά αυτή πιθανόν είναι ένας τρόπος διαφύλαξης της ίδιας της τροφής τους, δηλαδή δίνεται η ευκαιρία σε κάποια φύκη να αναπτυχθούν, έτσι ώστε να ξαναβρεί τροφή (Chiu, 1985). Δηλαδή, τελικά γίνεται συμβιβασμός μεταξύ προτίμησης και διαθεσιμότητας της τροφής στο φυσικό περιβάλλον (Lilly, 1975, Lawrence, 1975, Vadas, 1977), με προτιμήσεις να υφίστανται μόνο όταν υπάρχει αφθονία τροφής.

Είναι γνωστή η ελάττωση της κατανάλωσης τροφής με την αύξηση του μεγέθους και της ηλικίας (Fuji, 1967, Leighton, 1968). Φαίνεται ότι τα Εχινοειδή έχουν ένα μέγιστο μέγεθος πέραν του οποίου η κατανάλωση τροφής είναι μειωμένη, αξιοποιώντας την περισσότερη ενέργειά τους στη διατήρηση.

Συχνοί θηρευτές τους είναι τα Αστεροειδή, αλλά αποτελούν λεία και για ψάρια, πτηνά και υδρόβια θηλαστικά. Οι γονάδες μερικών ειδών είναι βρώσιμες από τον άνθρωπο.

#### **1.2.4 Πεπτικό σύστημα – Ρυθμός διατροφής**

Όπως προαναφέρθηκε, το πεπτικό σύστημα των αχινών αποτελείται από ένα μακρύ και περιελιγμένο πεπτικό σωλήνα που εξυπηρετεί την παρατεταμένη πέψη που είναι απαραίτητη για την διάσπαση του φυτικού υλικού. Ο σωλήνας ενώνει το στόμα με την έδρα δημιουργώντας κυρίως δύο συστροφές. Λεπτομερέστερα, διακρίνονται τρία τμήματα: το πρώτο είναι ο φάρυγγας και ο οισοφάγος που εκτελούν χρέη παραγωγής βλέννας. Το δεύτερο τμήμα είναι το στομάχι που φαίνεται να εξειδικεύεται στην παραγωγή πεπτικών ενζύμων και το τρίτο τμήμα είναι το έντερο, το οποίο έχει πολλά μιτοχόνδρια και μικρολάχνες, και πιθανόν μέρος του στομάχου όπου γίνεται η απορρόφηση της τροφής (Jangoux, 1982). Ο χρόνος παραμονής της τροφής στο στομάχι δεν είναι μεγάλος, ενώ μεγαλύτερος είναι στο έντερο, όπου φαίνεται να λαμβάνει χώρα το μεγαλύτερο μέρος της πέψης και της απορρόφησης (Lawrence, 1982). Όπως σε όλα τα Εχινόδερμα, τα θρεπτικά συστατικά μεταφέρονται με το κοιλωματικό υγρό που γεμίζει την αρκετά διευρυμένη σωματική κοιλότητα.

Ο ρυθμός της διατροφής εξαρτάται από πολλούς παράγοντες οι σημαντικότεροι από τους οποίους είναι: πρώτον το μέγεθος, καθώς τα μικρότερα άτομα τρέφονται ταχύτερα (Fuji, 1962, Moore & McPherson, 1965, Miller & Mann, 1973). Δεύτερον, η αναπαραγωγική φάση, καθώς πριν την ωοτοκία τα άτομα τρέφονται λιγότερο, ενώ ο ρυθμός διατροφής αυξάνεται πολύ περισσότερο μετά την ωοτοκία (Fuji, 1962, 1967). Δεν έχει διασαφηνιστεί εάν αυτή η συμπεριφορά είναι ένα φυσιολογικό φαινόμενο ή συμβαίνει απλά λόγω έλλειψης χώρου στην κοιλωματική περιοχή εφόσον αυξάνεται ο όγκος των γονάδων κατά τη διάρκεια της



γαμετογένεσης. Τρίτος παράγοντας είναι το είδος της τροφής, καθώς οι περισσότερες μελέτες έχουν δείξει ότι η προτίμηση προς ένα είδος τροφής διαμορφώνει και την ταχύτητα με την οποία αυτή καταναλώνεται. Τέταρτον, είναι η πυκνότητα του πληθυσμού, με το ρυθμό διατροφής να μειώνεται με την αύξηση του πληθυσμού, λόγω φυσικής αλληλεπίδρασης (Greenway, 1976, Levitan, 1989). Πέμπτον, η θερμοκρασία, με τις εποχιακές αλλαγές στο ρυθμό διατροφής αρκετών ειδών να είναι περισσότερο συνδεδεμένες με τις αλλαγές της θερμοκρασίας παρά με την αναπαραγωγική κατάσταση (Moore et al., 1963 a,b, Moore & McPherson, 1965, Pearse, 1968, Percy, 1973, Leighton, 1971). Τελευταίος παράγοντας, φαίνεται να είναι ο υδροδυναμισμός, με παρατηρήσεις στο πεδίο (McPherson, 1968, Campbell et al., 1973) και στο εργαστήριο (Moore & McPherson, 1965) να δίνουν συγκρουόμενα αποτελέσματα για το ρόλο των κινήσεων του νερού στη διατροφή διαφόρων ειδών.

### **1.2.5 Αναπνοή**

Όπως αναφέρθηκε στην παρ. 1.1.4, το κοιλωματικό υγρό μεταφέρει το οξυγόνο, και η ανταλλαγή αερίων γίνεται κατά μήκος των δερματικών βραγχίων. Οι αναπαραγωγικές συνθήκες δε φαίνεται να επηρεάζουν τους ρυθμούς αναπνοής στα Εχινοειδή (McPherson 1968, Fenaux et al. 1977 σε Pancucci-Paradourouli, 1996). Ο ρυθμός αναπνοής των Εχινοειδών μειώνεται με την αύξηση του μεγέθους του ζώου (McPherson, 1968, Percy, 1972, Webster & Giese, 1975), πιθανόν λόγω αύξησης των μεταβολικά αδρανών ιστών με την ηλικία. Επίσης, αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας (McPherson, 1968, Percy, 1972, Ulbricht & Pritchard, 1972) αν και σε κάποια είδη η κατανάλωση οξυγόνου είναι ανεξάρτητη της θερμοκρασίας εντός συγκεκριμένου εύρους θερμοκρασιών (Ulbricht & Pritchard, 1972). Η κατανάλωση οξυγόνου μειώνεται με τη μείωση του διαλυμένου οξυγόνου, και για κάποια είδη όταν αυτό πέσει κάτω από ένα συγκεκριμένο επίπεδο (Johansen & Vadas, 1967, Webster & Giese, 1975, Lane & Lawrence, 1979). Τέλος, έχουν καταγραφεί και αλλαγές στην κατανάλωση οξυγόνου ανάλογα με τη διαίτα (Lilly, 1978). Όμως σημειώνεται ότι αν και μεγίστης σημασίας, ο αναπνευστικός ρυθμός δεν είναι μια πλήρης ένδειξη της συνολικής μεταβολικής δραστηριότητας των ιστών, καθώς σημαντική είναι επίσης η ικανότητά τους για αναερόβιο μεταβολισμό (Ellington, 1982).

### **1.2.6 Αναπαραγωγικό σύστημα και γοναδική ανάπτυξη**

Το αναπαραγωγικό σύστημα των αχινών αποτελείται από 5 γονάδες κάθε μια από τις οποίες επικοινωνεί με το περιβάλλον μέσω σωλήνων που εκβάλλουν στις μητροπόρες πλάκες γύρω από την έδρα. Το εσωτερικό των γονάδων αποτελείται από μεγάλα κύτταρα με αποθηκευτικό ρόλο και μικρά για τη δημιουργία γαμετών. Τα τοιχώματα των γονάδων αποτελούνται από συνδετικό ιστό και μυϊκές ίνες οι οποίες χρησιμεύουν στην αποβολή των γεννητικών προϊόντων.

Στο φυσικό περιβάλλον οι όγκοι των γονάδων μεταβάλλεται κατά περιόδους ανάλογα με τη φάση του κύκλου αναπαραγωγής. Αρχικά αυξάνεται ενώ παράλληλα τα σωματικά κύτταρα αποθηκεύουν θρεπτικά στοιχεία. Έπειτα τα γεννητικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και αρχίζουν να ωριμάζουν εις βάρος των αποθηκευμένων ουσιών. Στη συνέχεια, αν οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι ευνοϊκές, οι γαμέτες αποβάλλονται, οι γονάδες αδειάζουν και ο κύκλος ξαναρχίζει. Η διάρκεια του κύκλου ποικίλλει ανάλογα με το είδος, τα

χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος αλλά και ανάλογα με τον πληθυσμό. Στα είδη με ευρεία γεωγραφική εξάπλωση, η περίοδος της αναπαραγωγής είναι γενικά μεγαλύτερη για τους νότιους πληθυσμούς σε σχέση με τους βόρειους (Pancucci-Paradourouli, 1996).

Γενικά, τα αρσενικά άτομα φαίνεται να ωριμάζουν πριν από τα θηλυκά (Fuji, 1960b, McPherson, 1968). Οι αρσενικές γονάδες είναι κάπως μικρότερες και η ποσότητα των λιπιδίων είναι μεγαλύτερη στις θηλυκές, ακόμα και σε ίδιο μέγεθος γονάδων. Αυτό δείχνει ότι γενικά τα θηλυκά χρειάζονται περισσότερη ενέργεια για την ωογένεση (Lawrence & Lane, 1982). Σε μερικά είδη η έλλειψη τροφής παίζει μεγάλο ρόλο και έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της γεννητικής ωρίμανσης (Buchanan, 1966, σε *Echinocardium cordatum*) ή την καθυστέρησή της (Dix, 1970b).

Σύμφωνα με διάφορες μελέτες (Fuji, 1967, Leighton, 1968, 1971, Vadas, 1977), η ανάπτυξη των γονάδων εξαρτάται, όπως και η σωματική ανάπτυξη τόσο, από την ποσότητα της τροφής όσο και από την ποιότητά της. Όμως, πειράματα διατροφής με χρήση τροφών διαφορετικής σύστασης και θρεπτικής αξίας δεν έδειξαν συσχέτιση της ανάπτυξης των γονάδων των νεαρών ατόμων με την ποιότητα της τροφής αλλά με την ποσότητά της η οποία φαίνεται να επάγει τόσο την σωματική όσο και την γοναδική ανάπτυξη (Lawrence, 1985, 1987, Lawrence et al., 1992, Klinger et al., 1994). Επίσης, παρουσία άφθονης τροφής οι γονάδες των νεαρών ατόμων αναπτύσσονται ακόμα και σε περιόδους που στο φυσικό περιβάλλον δεν παρατηρείται αύξησή τους, γεγονός που δείχνει ότι η διατροφή μπορεί να είναι καθοριστικός παράγοντας στο πεδίο, αλλά ότι με πλουσιότερη διαίτα μπορεί να υπάρξει γοναδική παραγωγή και εκτός εποχής. Αντίθετα, σε μεγαλύτερου μεθέθους και ώριμα αναπαραγωγικά άτομα, αντίστοιχα πειράματα διατροφής (Lawrence, 1985, 1987, Lawrence et al., 1992) απέδειξαν ότι την άνοιξη (περίοδος κανονικής γαμετογένεσης) παρουσιάζουν γοναδική αλλά όχι σωματική αύξηση, καθώς έχοντας φτάσει στο τέλος της σωματικής τους ανάπτυξης η κάθε επιπλέον αύξηση είναι πολύ πιο αργή και δύσκολη διαδικασία.

### **1.3 ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Paracentrotus lividus***

#### **1.3.1 Βιολογία του είδους**

	<b>Βασίλειο</b>	<i>Animalia</i>
	<b>Φύλο</b>	<i>Echinodermata</i>
	<b>Ομοταξία</b>	<i>Echinoidea</i>
	<b>Τάξη</b>	<i>Echinoidea</i>
	<b>Οικογένεια</b>	<i>Echinidae</i>
	<b>Γένος</b>	<i>Paracentrotus</i>
	<b>Είδος</b>	<i>Paracentrotus lividus</i>

Το είδος *Paracentrotus lividus* (Lamarck 1816) είναι ένα από τα πιο γνωστά και κοινά είδη Εχινοειδών της Μεσογείου. Συστηματικά ανήκει στα Κανονικά Εχινοειδή (*Echinoidea Regularia*). Χαρακτηρίζεται από πεντακτινωτή συμμετρία, η οποία προκύπτει δευτερογενώς

μετά από μια περίοδο αμφίπλευρης συμμετρίας, κατά την πρώιμη οντογένεση. Το σώμα του είναι σφαιρικό, ελαφρώς πεπλατυσμένο. Η διάμετρος του σώματος των ενηλίκων ατόμων, χωρίς τα ακάθια, είναι περίπου 5 cm, και σε ευνοϊκές συνθήκες μπορεί να φτάσει μέχρι και τα 7 ή 8 cm (Bonnet 1925, Boudouresque et al., 1989, Lozano et al., 1995). Το χρώμα του έχει μεγάλη ποικιλομορφία παρουσιάζοντας χρωματισμούς από μαύρο και καφέ έως πράσινο, κόκκινο και μωβ. Το χρώμα δεν σχετίζεται με το βάθος στο οποίο διαβιεί ή το μέγεθος του (Koebler 1893, Mortensen 1943, Cherbonnier 1956, Tortonese 1965, Gamble 1966, 1967, σε Boudouresque & Verlaque 2001). Φέρει ισχυρές άκανθες κατανεμημένες σε όλο το σώμα, μικρότερες στην κοιλιακή περιοχή, ενδιάμεσα από τις οποίες υπάρχουν οι βαδιστικοί ποδίσκοι και οι ποδολαβίδες.

Όπως έχει αναφερθεί στα γενικά χαρακτηριστικά των Εχινοδέρμων, ο αχινός προσκολλάται στο υπόστρωμα χάρη σε ένα πολύπλοκο βαδιστικό σύστημα, εν μέρει εξωτερικό (ποδίσκοι) και εν μέρει στο εσωτερικό του σώματος. Η δομή των ποδίσκων είναι όμοια σε όλο το σώμα, αλλά εκτελούν διαφορετικές λειτουργίες αναλόγως με το πού βρίσκονται. Οι ποδίσκοι που βρίσκονται στην κοιλιακή πλευρά χρησιμεύουν για την προσκόλληση στο υπόστρωμα και τη λήψη τροφής. Στη ραχιαία πλευρά, χρησιμεύουν για τη σύλληψη και συγκράτηση ανόργανων θρυμμάτων (φαινόμενο κάλυψης) (Pancucci-Papadopoulou, 1996) καθώς και φυτικών ή ζωικών υπολειμμάτων που συχνά, με τη βοήθεια και των ακάνθων, οδηγούνται ενεργητικά προς το στόμα όπου τα δόντια στρέφονται και τα συλλαμβάνουν (Roaf, 1909, Stott, 1955). Το φαινόμενο της κάλυψης έχει θεωρηθεί ότι συμβαίνει για πολλούς διαφορετικούς λόγους: ως τρόπος αύξησης του βάρους για αντίσταση σε ισχυρά ρεύματα, ως μηχανισμός κάλυψης από τους εχθρούς, ως προστασία από την ξήρανση του δέρματος, από ακραίες θερμοκρασίες ή την φωτεινή ακτινοβολία, είτε ως απόθεμα τροφής (Millott, 1975). Σύμφωνα με τον Zavodnik (1979) στο *P. lividus* το φαινόμενο αυτό είναι εντονότερο στα ώριμα άτομα παρά στα νεαρά.

### **1.3.2 Διατροφή – Θηρευτές**

Ενώ συνήθως περιγράφεται σαν φυτοφάγο στο φυσικό του περιβάλλον, το *P. lividus* έχει καταγραφεί σαν ευκαιριακό είδος όσον αφορά στη διατροφή του, ικανό να εκμεταλλευτεί οποιαδήποτε πηγή τροφής (Boudouresque & Verlaque, 2007), συμπεριλαμβανομένου και οργανικού υλικού ζωικής προέλευσης (Neill & Pastor, 1973, Verlaque, 1987 σε Pancucci-Papadopoulou, 1996). Σύμφωνα με τον Verlaque (1987), το *P. lividus* τρέφεται ακόμα και με τα ψάρια που απορρίπτονται οι ψαράδες. Στο σκληρό υπόστρωμα, η διατροφή των ώριμων ατόμων του *P. lividus* ποικίλλει, αλλά γενικά θεωρείται εκλεκτική. Διαφορές παρουσιάζονται ανάλογα με την φυτική κάλυψη (San Martin, 1986, 1987 σε Pancucci-Papadopoulou, 1996) και με τα είδη των φυτών που υπάρχουν σε κάθε περιοχή. Δείχνει κάποιες διατροφικές προτιμήσεις όταν αυτό είναι δυνατόν, ενώ η δίαιτά του προσαρμόζεται στο περιβάλλον και την εποχή (Kempf, 1962, Neill & Larkum, 1965, Niell & Pastor, 1973, Verlaque & Nedelec, 1983a,b, Frantzis, 1988, 1992, Frantzis et al., 1988 σε Pancucci-Papadopoulou, 1996). Για παράδειγμα, μελέτες στην Κορσική (Nedelec, 1982, Verlaque & Nedelec, 1983b σε Pancucci-Papadopoulou, 1996) έδειξαν ότι όπου υπάρχει αφθονία τροφής, τα ενήλικα *P. lividus* τρέφονται με μακροφύκη, κατά προτίμηση *Cystoseira* (Neill & Larkum, 1965, Niell & Pastor, 1973 σε Pancucci-Papadopoulou, 1996, Maggiore et al., 1987, Verlaque, 1987 σε Pancucci-Papadopoulou, 1996). Μάλιστα, για τη μείωση της *Cystoseira* στη Μεσόγειο ενοχοποιούνται οι αχινόι (Augier & Boudouresque, 1970, Verlaque, 1987). Σε περιοχές όμως όπου δεν υπάρχουν μακροφύκη, το *P. lividus* δεν δείχνει καμία προτίμηση στην τροφή του, καθώς το

γεγονός ότι τα δόντια του μεγαλώνουν συνέχεια (1 με 1.5 χιλιοστά την εβδομάδα, Rico et al., 1990 σε Pancucci-Papadopoulou, 1996) το βοηθάει να ξύνει τα πάντα, ακόμα και την πέτρα, με συνέπεια μερικές φορές να είναι σημαντικός παράγοντας διάβρωσης (Verlaque & Nedelec, 1983b, Verlaque, 1987 σε Pancucci-Papadopoulou, 1996, Trudgill et al., 1987). Συνεπώς, γενικά σημαντικό ρόλο στη διατροφή του *P. lividus* παίζει ο παράγοντας «εποχή», καθώς η δίαιτά του αποτελείται από διαφορετικά είδη φυτών σε διαφορετικές εποχές του χρόνου (Verlaque & Nedelec, 1983a,b). Επίσης οι Nedelec et al. (1983) αναφέρουν για το *P. lividus* την ύπαρξη φάσεων συνεχούς διατροφής που εναλλάσσονται με φάσεις ανάπαυσης (Pancucci-Papadopoulou, 1996). Σύμφωνα με τον Verlaque (1987) οι προτιμήσεις του *P. lividus* είναι κατά σειρά: Φαιοφύκη, Ροδοφύκη, *Posidonia*, Διάτομα, Χλωροφύκη και τελευταία σε προτίμηση τα Κυανοφύκη. Η κατάποση της *Posidonia* από αχινούς που ζουν σε σκληρό υπόστρωμα θεωρείται ως χρήση φερτής ύλης με την οποία το ζώο πρώτα καλύπτεται και μετά καταναλώνει, ένας τρόπος διατροφής που μπορεί να καλύψει μέχρι και το 40% (Verlaque & Nedelec, 1983a σε Pancucci-Papadopoulou, 1996) ή το 48% (Bergin, 1987 σε Pancucci-Papadopoulou, 1996) των διατροφικών αναγκών του. Η αποφυγή μερικών φυκών έχει συσχετισθεί είτε με την μορφολογία τους είτε με την απελευθέρωση κάποιων απωθητικών χημικών ουσιών (Anderson & Velimirov, 1982, Knoerffler-Peguy et al., 1987, Menager, 1994 σε Pancucci-Papadopoulou, 1996), οι οποίες πιθανόν να είναι διαφορετικές για το ίδιο είδος σε διαφορετικές εποχές του χρόνου. Οι χημειοϋποδοχείς στο *P. lividus* είναι πιθανόν οι σφαιροειδείς ποδολαβίδες (Hamann, 1887, Hyman, 1955 σε Pancucci-Papadopoulou).

Ελάχιστοι είναι οι εχθροί των ώριμων αχινών, αλλά τα νεαρά αποτελούν εύκολη λεία για ψάρια και καβούρια. Στην Ιρλανδία έχει αποδειχθεί ότι ο πληθυσμός του *P. lividus* ρυθμίζεται από το *Carcinus maenas* (Muntz et al., 1965), ενώ στον κόλπο της Νεάπολης από το *Maia crispata* (Tertschnig, 1989). Στον Ατλαντικό θεωρείται ότι σημαντικότεροι εχθροί του είναι τα Δεκάποδα και το *Marthasterias glacialis*, που τρέφονται τη νύχτα (Savy, 1987 σε Pancucci-Papadopoulou, 1996) ενώ το *P. lividus* τρέφεται κατά τη διάρκεια της ημέρας (Ebling et al., 1966). Στη Μεσόγειο κύριοι θηρευτές θεωρούνται τα ψάρια *Diplodus sargus* και *Diplodus vulgaris* (Rosacchi, 1987 σε Pancucci-Papadopoulou, 1996), που τρέφονται κατά τη διάρκεια της ημέρας, και το *Marthasterias glacialis* (Dance & Savy, 1987 σε Sala & Zabala, 1996) με ρυθμό κατανάλωσης ενός αχινού κάθε 4 ή 5 ημέρες. Στη θάλασσα αυτή έχει αναφερθεί ότι, αντίθετα με ό,τι συμβαίνει στον Ατλαντικό, το *P. lividus* τρέφεται κατά τη διάρκεια της νύχτας (Shepherd & Boudouresque, 1979, Dance, 1985 σε Pancucci-Papadopoulou, 1996). Στην Αδριατική, σύμφωνα με τον Zavodnik (1987), κύριοι θηρευτές του *P. lividus* είναι Ιχθείς (*Diplodus vulgaris*), Κεφαλόποδα (*Octopus vulgaris*), Αστεροειδή (*Marthasterias glacialis*) και Δεκάποδα (*Maja squinado* και *Palinurus elephas*).

### **1.3.3 Πεπτικό σύστημα – Ρυθμός διατροφής**

Η γενική δομή του πεπτικού συστήματος του *P. lividus* είναι παρόμοια με αυτή των Εχινοειδών γενικότερα που περιγράφεται παραπάνω. Το ίδιο ισχύει για τους παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό διατροφής. Όμως, συγκεκριμένα για το *P. lividus*, οι αναφορές για το ρυθμό διατροφής του είναι λίγες. Σύμφωνα με τον Powis (1978 σε Pancucci-Papadopoulou, 1996), ο χρόνος διέλευσης της τροφής για το *P. lividus* είναι 60 ώρες, ενώ άλλες βιβλιογραφικές πηγές αναφέρουν χρόνο διέλευσης μεταξύ 1,5 και 3 ημερών (Kempf, 1962, Nedelec et al., 1981, San Martin, 1987 σε Pancucci-Papadopoulou, 1996).

### **1.3.4 Αναπαραγωγή**

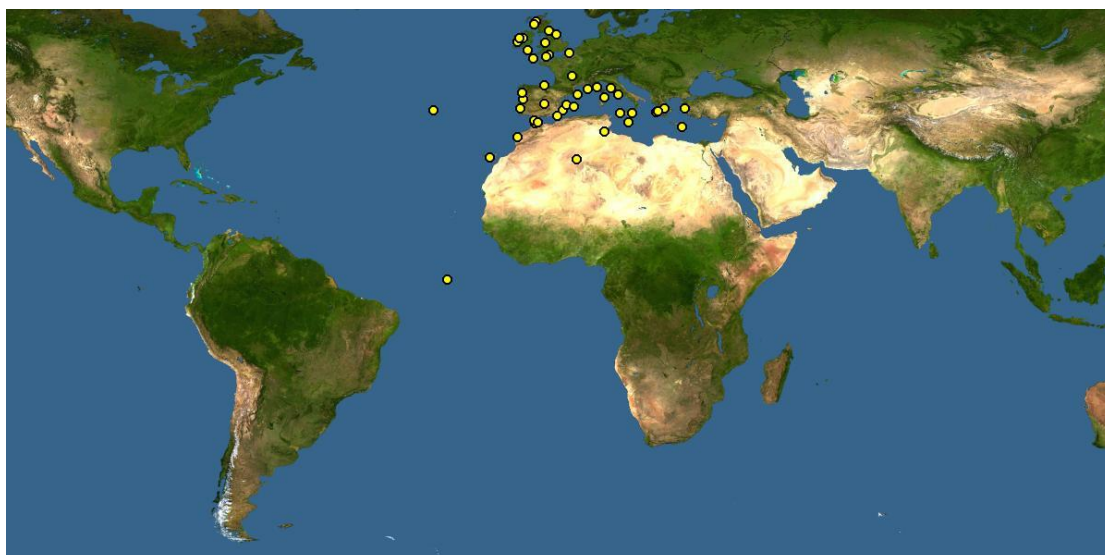
Είναι γονοχωριστικό είδος και η γονιμοποίηση είναι εξωτερική. Τα στάδια του αναπαραγωγικού κύκλου έχουν περιγραφεί προηγουμένως στο αναπαραγωγικό σύστημα των Εχινοειδών (Γενική Εισαγωγή, παρ. 1.2.6). Για τους πληθυσμούς της Μεσογείου του *P. lividus*, παρατηρείται ένας ετήσιος κύκλος γοναδικής ανάπτυξης με δύο κύριες περιόδους αναπαραγωγής (άνοιξη και φθινόπωρο) (Fenaux 1968, Regis 1979 σε Pancucci-Paradopolou, 1996), αλλά γενικά η περίοδος αναπαραγωγής του είναι πολύ εκτεταμένη και σχεδόν καθ' όλη τη διάρκεια του έτους μπορούν να βρεθούν μερικά άτομα γεννητικά ώριμα, ειδικά στις νοτιότερες περιοχές (Pancucci-Paradopolou, 1996).

Έχει αναφερθεί (Fox 1924, Hymann 1955, Azzolina & Nedelec 1981 σε Pancucci-Paradopolou, 1996) ότι η παρουσία ατόμων *P. lividus* σε ωτοκία προκαλεί το ίδιο και σε άλλα άτομα, ενώ έχει αποδειχθεί ότι ίδιο αποτέλεσμα επιτυγχάνεται και με διάλυμα γαμετών σε νερό (Reverberi, 1967 σε Pancucci-Paradopolou, 1996), δηλαδή είναι μια διεργασία που ελέγχεται χημικά (Fenaux, 1980-81 σε Pancucci-Paradopolou, 1996). Είναι επίσης γνωστή η συγκέντρωση αχινών σε ρηχά νερά την εποχή της ωτοκίας (Orton, 1914 σε Hyman, 1955). Μια αντίληψη η οποία επικρατεί είναι ότι η ωτοκία του *P. lividus* είναι συνάρτηση των σεληνιακών φάσεων, δηλαδή, οι αχινοί έχουν αυξημένη μάζα γονάδων στην πανσέληνο οπότε αρχίζει η ωτοκία. Το φαινόμενο αυτό δεν επιβεβαιώνεται, δηλαδή δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της κατάστασης των γονάδων και του σεληνιακού κύκλου. Τουλάχιστον για το *P. lividus*, η εκτεταμένη βιβλιογραφική ανασκόπηση αλλά και οι προσωπικές παρατηρήσεις του Allain (1975) επί σειρά ετών αποδεικνύουν ότι η αντίληψη αυτή δεν ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα (Pancucci-Paradopolou, 1996).

Ο κύκλος ζωής του *P. lividus*, όπως και στα άλλα Εχινοειδή, περιλαμβάνει μια πλαγκτονική και μια βενθική φάση. Τα έμβρυα αναπτύσσονται σε πλαγκτονοφάγες προνύμφες (echinopluteus) και ζουν για αρκετούς μήνες πριν βυθιστούν στον πυθμένα χρησιμοποιώντας τις ποδολαβίδες για να προσκολληθούν στο υπόστρωμα όπου μεταμορφώνονται σε νεαρούς αχινούς. Οι προνύμφες αφθονούν στο πλαγκτό βασικά σε δύο περιόδους, στα τέλη Μαΐου-μέσα Ιουνίου και Οκτώβριο-Νοέμβριο (Fenaux, 1968 σε Pancucci-Paradopolou, 1996).

### **1.3.5 Ενδιαίτημα**

Το είδος *P. lividus* (Lamarck, 1816) είναι ένα από τα πιο κοινά είδη αχινών παρουσιάζοντας ευρεία γεωγραφική εξάπλωση. Απαντάται σε όλη τη Μεσόγειο και στις βορειοανατολικές ακτές του Ατλαντικού Ωκεανού από τη Σκωτία και την Ιρλανδία έως το νότιο Μαρόκο, τις Κανάριες Νήσους και τις Αζόρες (Boudouresque & Verlaque, 2007).



**Εικόνα 5:** Παγκόσμιος χάρτης γεωγραφικής κατανομής του *Paracentrotus lividus* ([www.discoverlife.org](http://www.discoverlife.org)).

Το *P. lividus* ζει σε ενδιαιτήματα της παλιρροιακής και υποπαλιρροιακής ζώνης. Είναι ιδιαίτερα κοινό σε περιοχές όπου το εύρος των χειμερινών θερμοκρασιών της θάλασσας είναι περίπου 10-15 °C και των θερινών θερμοκρασιών από 18 έως 25 °C. Σύμφωνα με τον Tortonese (1958, 1965 σε Pancucci-Paradopolou, 1996), τα βαθυμετρικά του όρια κυμαίνονται από λίγα εκατοστά μέχρι 80 m, αλλά συνήθως απαντάται από το χαμηλότερο σημάδι του νερού έως τα 10-20 m βάθος (Gamble, 1966, Allain, 1975, Régis, 1978, 1996 σε Boudouresque & Verlaque, 2013, Harmelin et al., 1981 σε Boudouresque & Verlaque, 2013). Ζει κυρίως σε στερεά πετρώματα, βράχους και σε λιβάδια *Posidonia oceanica* και *Zostera marina* (Mortensen, 1928, Tortonese, 1965, Ebling et al., 1966, Verlaque, 1987a). Προτιμά το σκληρό υπόστρωμα και απουσιάζει ή απαντάται σπάνια σε λιβάδια *Cymodocea nodosa*, παρ'ότι αποτελεί προτιμώμενη τροφή, ίσως λόγω ακαταλληλότητας του αμμόδους πυθμένα μεταξύ των βλαστών της *C. nodosa* για μετακίνηση ή λόγω μεγάλης θηρευτικής πίεσης (Traer, 1980). Συχνά δημιουργεί μόνο του τις κοιλότητες στους βράχους στις οποίες ζει, φαινόμενο ιδιαίτερα κοινό στη Δυτική Μεσόγειο, αν και έχει παρατηρηθεί και στην Ανατολική (Tortonese, 1958 σε Pancucci-Paradopolou, 1996). Η διαφορετική συμπεριφορά πιθανολογείται ότι οφείλεται στο διαφορετικό εύρος παλίρροιας. Είναι οπορτουμιστικό είδος αλλά μπορεί να βοσκήσει με καταστροφικές συνέπειες μακροφύκη, αλλάζοντας τα βενθικά ενδιαιτήματα (Boudouresque & Verlaque, 2013). Στη βορειοδυτική Μεσόγειο, η θήρευση και η μετατόπιση-εκτοπισμός από ισχυρές καταιγίδες είναι βασικοί παράγοντες για τη θνησιμότητα του *P. lividus* (Hereu et al., 2012), παρ'ότι η ρύπανση, η αλιεία και οι ασθένειες επίσης επηρεάζουν την αφθονία των πληθυσμών (Sala et al., 1998, Boudouresque & Verlaque, 2013).

### **1.3.6 Φυσικές παράμετροι**

Το *P. lividus* είναι στενόαλο είδος, όπως γενικά τα Εχινοειδή, ευαίσθητο σε χαμηλές και υψηλές τιμές αλατότητας και στις διακυμάνσεις της (Roller & Stickle, 1993). Οι κατώτατες και ανώτατες θανατηφόρες τιμές αλατότητας είναι της τάξης των 15-20 και 39-40‰ αντίστοιχα

για μακρόχρονη έκθεση (Pastor, 1971, Allain, 1975 σε Pancucci-Papadopoulou, 1996, Le Gall, 1989). Το είδος αυτό δεν είναι ευαίσθητο στην οργανική ρύπανση ενώ τέτοιες χημικές ενώσεις ενισχύουν την ανάπτυξή του (Tortonese, 1965, Allain, 1975 σε Pancucci-Papadopoulou, 1996, Zavodnik, 1987, Delmas, 1992, Pancucci-Papadopoulou, 1996). Έχουν καταγραφεί πυκνοί πληθυσμοί σε ισχυρά ρυπασμένες περιοχές όπως στο Bay of Brest (Brittany) και το Berre lagoon (πλησίον της Marseilles). Επίσης παρουσιάζει μεγάλη αντοχή σε υψηλές τιμές βαρέων μετάλλων, τα οποία συσσωρεύει παρ'ότι ο ρυθμός ανάπτυξης μειώνεται (Augier et al., 1989, Delmas, 1992, San Martin, 1995).

Ο αχινός *Paracentrotus lividus* παρουσιάζει στρατηγικές που του επιτρέπουν να αποικίζει παράκτιες περιοχές όπου η καταπόνηση (μια παράμετρος που περιορίζει την παραγωγή) και οι οχλήσεις γενικότερα (παράμετρος που προκαλεί καταστροφή της βιομάζας) είναι συχνές (Lawrence, 1990). Χαρακτηρίζεται από ευρεία θερμοκή ανοχή, και μπορεί να παραμένει εκτεθειμένος σε πολύ χαμηλές χειμερινές θερμοκρασίες (π.χ. 4 °C) και υψηλές θερινές θερμοκρασίες (π.χ. 28 °C), κάτι το οποίο υποδεικνύει μια μεγάλη φαινοτυπική πλαστικότητα (Catarino et al., 2012).

### **1.3.7 Εμπορική-οικονομική αξία**

Από το 1792 (Olivi σε Zavodnik, 1987) ήταν ήδη γνωστό ως εμπορεύσιμο είδος. Το *Paracentrotus lividus* έχει συγκεντρώσει ιδιαίτερα την προσοχή καθώς έχει αποκτήσει ιδιαίτερη εμπορική σημασία λόγω των γονάδων του (δε γίνεται διαχωρισμός μεταξύ αρσενικών και θηλυκών αχινών) (Palacin et al., 1998) οι οποίες καταναλώνονται ευρέως και εκτιμώνται ιδιαίτερα σαν θαλασσινό έδεσμα. Επίσης, σύμφωνα με την Pacific Urchin Harvesters Association οι γονάδες έχουν και ιδιαίτερη θρεπτική αξία. Περιέχουν ελάχιστο λίπος, αποτελούμενο σχεδόν εξ'ολοκλήρου από ακόρεστα λιπαρά που συνεισφέρουν στην ελάττωση των επιπέδων χοληστερόλης. Επίσης αποτελούν την καλύτερη πηγή ω-3 λιπαρών οξέων που βοηθούν στην μείωση της αρτηριακής πίεσης και περιορίζουν τον κίνδυνο ενός μη φυσιολογικού καρδιακού ρυθμού σύμφωνα με την American Heart Association. Έχουν υψηλή περιεκτικότητα (~13,3%) σε καλής ποιότητας πρωτεΐνη, όμοιας με αυτήν του βακαλάου και του μωσαριού (FAO, 1981, Abdel Aziz et al., 1997, Suzuki, 1990 σε González et al., 2001) αλλά και σε φυτικές ίνες. Παρέχουν μια ποικιλία μεταλλικών αλάτων και μικροστοιχείων στη διαίτα, ενώ αποτελούν και σημαντική πηγή ψευδαργύρου που είναι σημαντικό ιχνοστοιχείο για το ανοσοποιητικό σύστημα, την επούλωση πληγών και για υγιή όραση, όσφρηση και γεύση (livestrong.com, <http://www.healthsenses.net/>). Τέλος, αποτελούν πηγή βιταμινών C και A, απαραίτητων για το ανοσοποιητικό σύστημα (<http://healthbenefitsofeating.com/>).

Σαν συνέπεια της αυξημένης ζήτησης, το είδος αυτό είτε σε σταθερή είτε σε περιστασιακή βάση έχει αλιευτεί εντατικά, στις περισσότερες περιοχές όπου απαντάται και ειδικά στη Μεσόγειο (Ballesteros & Garcia-Rubies, 1987, Le Direac'h et al., 1987 σε Caltagirone et al., 1992). Για παράδειγμα στη Γαλλία η εμπορική εκμετάλλευση, αρχικά περιορισμένη στις μεσογειακές ακτές, επεκτάθηκε στις ατλαντικές ακτές έως τη Βρετάνη (ΒΔ Γαλλία) ούτως ώστε να ικανοποιηθεί η ολοένα αυξανόμενη ζήτηση από την περιοχή του Παρισιού (Le Gall, 1987). Η υπεραλίευση του είδους οδήγησε στην κατάρρευση του αποθέματος των φυσικών πληθυσμών, με την εξαφάνιση των αχινών από περιοχές όπου αφθονούσαν (Allain, 1971, 1973, 1975, Le Direac'h, 1987, Southward & Southward, 1975, Regis et al., 1986, Regis, 1987, Le Gall, 1987, 1990, Conand & Sloan, 1989, Lawrence, 2001 σε Andrew et al., 2002) και τη

ζήτηση να καλύπτεται πια από εισαγωγή αχινών από άλλες χώρες (Birais & Le Gall, 1986, Serrao, 1988 σε Caltagirone et al., 1992). Η ελάττωση των φυσικών αποθεμάτων, η αγοραστική ζήτηση και η υψηλή τιμή λιανικής πώλησης δημιούργησε το ενδιαφέρον για την ανάπτυξη οικονομικά βιώσιμων καλλιεργητικών μεθόδων, και έδωσε ώθηση στην έρευνα για τις δυνατότητες και τις συνθήκες ένταξης των αχινών στην υδατοκαλλιεργητική δραστηριότητα (Birais & Le Gall, 1986, Le Gall & Bucaille, 1987, Le Gall, 1987, 1989, Le Gall et al., 1989, 1990, Fernandez, 1989, 1990 σε Caltagirone et al., 1992).

## **1.4 ΕΚΤΡΟΦΗ ΑΧΙΝΩΝ**

### **1.4.1 Ανάγκη ένταξης αχινών σε καλλιέργεια**

Οι Keesing & Hall (1998) και πιο πρόσφατα και πιο λεπτομερώς οι Andrew et al. (2002), έχουν περιγράψει τη σοβαρή κατάσταση στην οποία έχει περιέλθει η παγκόσμια αλιεία αχινών. Στις περισσότερες περιπτώσεις, αν όχι σε όλες, έχει ακολουθηθεί το ίδιο μοτίβο, δηλαδή μια ταχεία επέκταση της αλιείας σε μη βιώσιμο σημείο, η οποία στη συνέχεια ακολουθείται από μια εξίσου ταχεία πτώση. Όπως προαναφέρθηκε, στην Ευρώπη το απόθεμα αχινών (*P. lividus*) αρχικά στη Γαλλία και μετά στην Ιρλανδία αλιεύτηκε μέχρι αποδεκατισμού τη δεκαετία του 1980 για την παροχή των γαλλικών αγορών και αυτά τα αποθέματα δεν έχουν ανακάμψει (Barnes et al. 2001, 2002, Barnes & Crook, 2001, Symonds et al., 2007). Υπάρχουν μεγάλοι πληθυσμοί βρώσιμων αχινών στη Σκωτία (*Echinus esculentus* και *Psammechinus miliaris*), αλλά τα αποθέματα τους δεν μπορούν να καλύψουν τη ζήτηση της αγοράς, καθώς οι γονάδες τους είναι είτε πολύ περιορισμένες σε ποσότητα, είτε ποικίλλουν πολύ ποιοτικά (Kelly et al. 1998, Kelly et al., 2001). Το ίδιο ισχύει και για το *Strongylocentrotus droebachiensis* από τη Νορβηγία (Hagen, 2000, Sivertsen, 2003).

Τα εναπομείναντα εμπορικά αποθέματα στο φυσικό περιβάλλον χαρακτηρίζονται συχνά από μικρό βάρος γονάδων και φτωχό χρώμα και επομένως έχουν πολύ μειωμένο δείκτη κερδοφορίας. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα έναν φαύλο κύκλο αυξημένης αλιευτικής προσπάθειας, της οποίας όμως η απόδοση είναι μειωμένη, και τη περεταίρω εξάντληση των αποθεμάτων. Το γεγονός ότι η στρατολόγηση νεαρών είναι και σποραδική και απρόβλεπτη (Kelly, 2000, Harris et al., 2001) και ότι κάποια είδη αχινών έχουν εξαιρετικά μεγάλη διάρκεια ζωής (Ebert 1998), κάνει την πρόγνωση οι εκφορτώσεις να συνεχίσουν να βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα απίθανη. Από την άλλη, υπάρχει αισιοδοξία για την ανάπτυξη μιας οικονομικά βιώσιμης καλλιέργειας αχινών. Σε συνδυασμό με τα λογικά μέτρα προστασίας στην αλιεία, η καλλιέργεια έχει γίνει αναγκαιότητα και για τα προγράμματα ενίσχυσης των αποθεμάτων και για την ικανοποίηση των απαιτήσεων της αγοράς, με τα τελευταία 20 χρόνια να υπάρχει μια σημαντική αύξηση στην ερευνητική προσπάθεια για την ανάπτυξη οικονομικά αποδοτικών μεθόδων καλλιέργειας αχινών (Leighton, 1995, Liu et al., 2007).

Η πρώτη εμπορική μονάδα εκτροφής αχινών στην Ευρώπη ιδρύθηκε το 1995. Πρόκειται για την Dunmanus Seafoods, Ireland, η οποία παράγει νεαρά άτομα *P. lividus* που εκτρέφονται και στην πλειοψηφία τους πωλούνται στα εστιατόρια του Ηνωμένου Βασιλείου και δευτερευόντως στην τοπική αγορά, ή εξάγονται (Symonds et al., 2007). Η υδατοκαλλιέργεια των αχινών βασίζεται στην παραγωγή εμπορεύσιμων γονάδων. Για να θεωρούνται εμπορεύσιμες οι γονάδες των αχινών, πρέπει να χαρακτηρίζονται από το σωστό χρώμα, την κατάλληλη γεύση και υφή, με την ποιότητα να καθορίζει την τιμή του τελικού προϊόντος, το



οποίο κυμαίνεται από US\$6 έως \$200 kg<sup>-1</sup> (Unuma, 2002). Ενώ η διατροφή με χρήση του φύκου *Laminaria digitata* συχνά έχει σαν αποτέλεσμα οι γονάδες του *P. lividus* να παρουσιάζουν το επιθυμητό χρώμα, ερευνητές και παραγωγοί αναγνωρίζουν την ανάγκη για οικονομικά αποδοτικά τεχνητά σιτηρέσια που θα ενίσχυαν τη μάζα των γονάδων χωρίς αρνητικές συνέπειες στη γεύση ή το χρώμα.

#### **1.4.2 Τεχνητές τροφές**

Ένα από τα βασικότερα προβλήματα στην έναρξη μιας δραστηριότητας εκτροφής αχινών *P. lividus*, είναι ο προσδιορισμός της καταλληλότερης δίαιτας. Όπως ήδη ελέχθη, στη φύση, το *P. lividus* προτιμά τα μακροφύκη (Lawrence, 1975, Nedelec, 1982, Verlaque & Nedelec, 1983 σε Caltagirone et al., 1991), αλλά στη Μεσόγειο είναι αδύνατο να συλλεχθούν επαρκείς ποσότητες μακροφυκών για να υποστηριχθεί μια εντατική καλλιέργεια ενώ, σε κάποιες περιοχές, η μεγάλης κλίμακας συλλογή θεωρείται ως περιβαλλοντικά επισφαλής πρακτική. Συνεπώς, για να επιτευχθεί και να διευκολυνθεί η εκτροφή των αχινών, η χρήση τεχνητών σιτηρεσίων φαίνεται να είναι απολύτως απαραίτητη (Caltagirone et al., 1991).

Η ανάπτυξη των τεχνητών σιτηρεσίων είναι αναγκαία για να καλύψει απαιτήσεις όπως η διαθεσιμότητα, η σταθερότητα στην ποιότητα και τη σύνθεση, η σταθερότητα στο νερό και η ευκολία χρήσης σε σύγκριση με τα φρέσκα φύκη (Caltagirone et al., 1991, Fernandez, 1996). Επίσης, γενικά εξασφαλίζουν καλύτερους ρυθμούς ανάπτυξης από ότι τα φύκη, τα οποία έχουν το μειονέκτημα να παρουσιάζουν περιοδικές διακυμάνσεις στην ποιότητα και την αφθονία τους (Pearse et al., 2003 σε Shrigel et al., 2004). Τα τεχνητά σιτηρέσια έχουν υιοθετηθεί ευρέως και χρησιμοποιούνται επιτυχώς για την εκτροφή Εχινοειδών αλλά και για τη διατήρησή τους σε ενυδρεία (Lawrence et al., 1989, 1992, Klinger et al., 1994). Πιο συγκεκριμένα, τα τεχνητά σιτηρέσια χρησιμοποιούνται για:

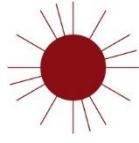
- Την πάχυνση αχινών νεαρής ηλικίας έως το εμπορεύσιμο μέγεθος σε μονοκαλλιέργειες.
- Το τελικό στάδιο εκτροφής προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η ποιότητα των γονάδων σε συστήματα πολυκαλλιέργειας.
- Την βελτίωση της ποσότητας και της ποιότητας των γονάδων αλιευμένων αχινών που δεν είναι ικανοποιητικές με εμπορικά κριτήρια.

Είναι γνωστό ότι οι γονάδες έχουν διπλή λειτουργία: στην αναπαραγωγή και στην αποθήκευση θρεπτικών (Lawrence & Lane 1982, Hughes et al. 2006). Η γοναδική παραγωγή εξαρτάται από συνδυασμό παραγόντων όπως η πρόσληψη τροφής, η φάση του αναπαραγωγικού κύκλου, η εποχή, η θερμοκρασία. Καθοριστική όμως, είναι η κατανάλωση θρεπτικών (Lawrence & Lane, 1982), με τις τεχνητές τροφές να προάγουν πιο αποτελεσματικά τον πολλαπλασιασμό των γαμετοκυττάρων και/ή τη γαμετογένεση (Spirlet et al., 2001), ενώ η αύξηση του όγκου των γονάδων οφείλεται και στην αποθήκευση λιπιδίων και/ή αποθεμάτων υδατάνθρακα στα κύτταρά τους (Fernandez, 1997). Η αιτία φαίνεται ότι είναι ότι από τη στιγμή που ένα ποσοστό ενέργειας έχει καταναλωθεί στη διατήρηση, το υπόλοιπο ποσοστό διανέμεται στην αναπαραγωγή και την σωματική ανάπτυξη (Calow, 1981 σε Fernandez & Pergent, 1998). Σε αντίθεση με τα τεχνητά σιτηρέσια, η διατροφή με κάποια φύκη συχνά είναι ανεπαρκής θρεπτικά για να προάγει οτιδήποτε άλλο πέρα από τη σκελετική ανάπτυξη. Για παράδειγμα, όπως υπέδειξαν οι Beddingfield & McClintock (1998), όταν η τροφή δεν εξασφαλίζει συσσώρευση θρεπτικών στο έντερο σε επαρκή επίπεδα, δεν υπάρχει στη συνέχεια μετατόπιση θρεπτικών στις γονάδες για την ανάπτυξή τους. Σύμφωνα με τους

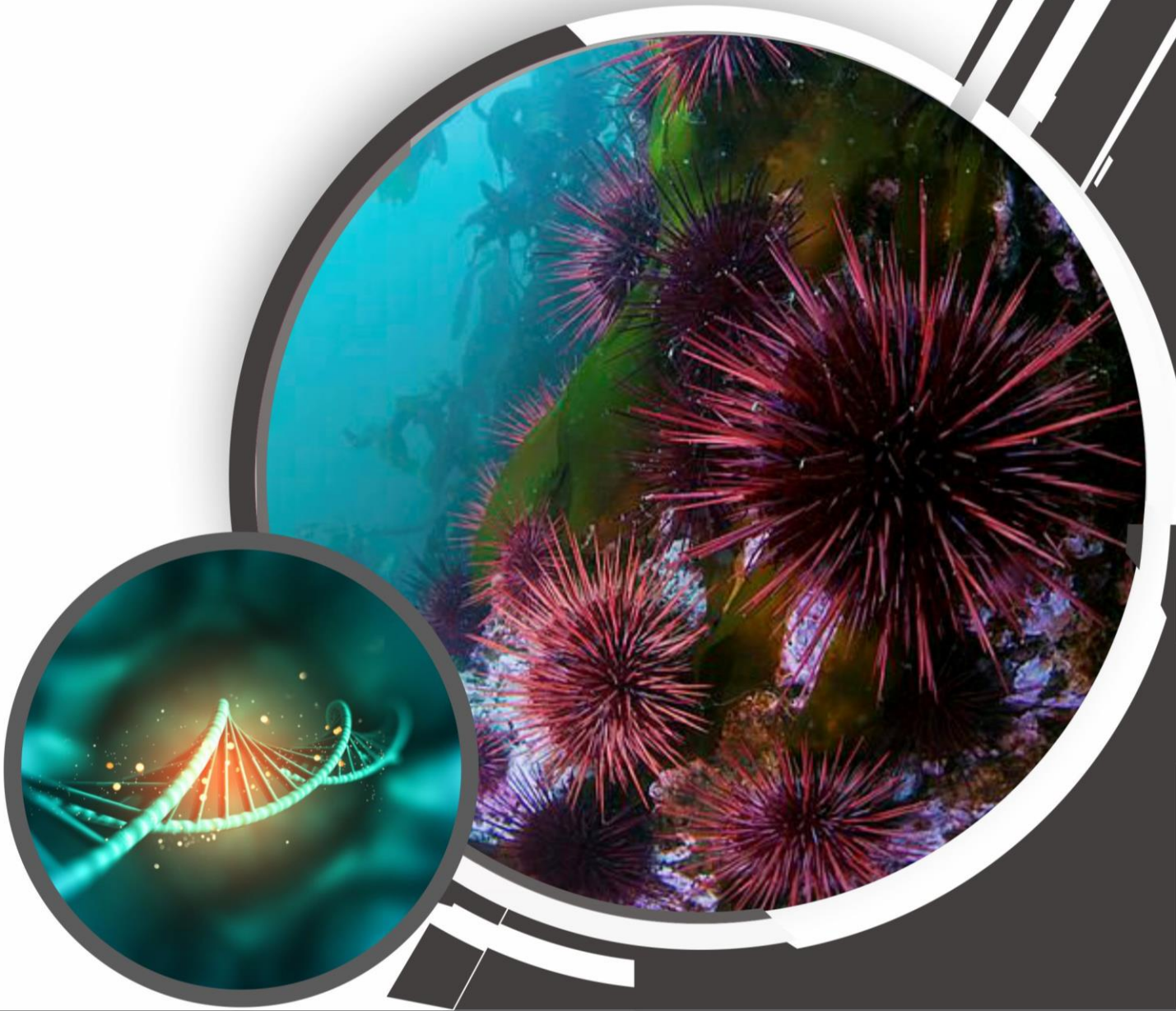
Spirlet et al. (2001), η τεχνητή τροφή επάγει τη γοναδική παραγωγή σε σύγκριση με τη *Laminaria*, δεδομένου ότι ο γοναδοσωματικός δείκτης είναι ιδιαίτερα αυξημένος (30 %) σε σχέση με τις μέγιστες τιμές που είχαν παρατηρηθεί στο πεδίο (Spirlet et al. 1998b). Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγουν οι Fernandez & Pergent (1998) που διαπιστώνουν ότι τα τεχνητά σιτηρέσια εξασφαλίζουν μια σημαντική ανάπτυξη των γονάδων, μεγαλύτερη από ό,τι παρατηρείται στο φυσικό περιβάλλον. Τα ίδια συμπεράσματα εξήγαγαν οι Lawrence et al. (1997) για το *Loxechinus albus*, ενθαρρύνοντας τη χρήση αυτού του τύπου τροφής καθώς προήγε τόσο τη σωματική όσο και τη γοναδική ανάπτυξη κάτι που οφειλόταν σε καλύτερη διαθεσιμότητα ή/και ποιότητα της τεχνητής τροφής. Η κατανάλωση τεχνητών τροφών από τους αχινούς είναι ικανοποιητική, ενώ η υψηλή σωματική και γοναδική ανάπτυξη που εξασφαλίζουν, δείχνει υψηλή θρεπτικότητα που ευνοεί την αποθήκευση θρεπτικών ακόμα και μετά από μια περίοδο νηστείας όπου η κατανομή των θρεπτικών εκτρέπεται προς τη γοναδική ανάπτυξη (Spirlet et al., 2001). Ωστόσο, η θρεπτική αξία και το διατροφικό κέρδος μπορεί να υποσκελιστούν από τη σταδιακή υποβάθμιση της τεχνητής τροφής κατά την παραμονή της στο νερό και τα θρεπτικά που χάνονται λόγω διάλυσής τους στο νερό να αποτελέσουν αιτία ρύπανσης σε εντατικές συνθήκες εκτροφής, δημιουργώντας την ανάγκη ενίσχυσης της σταθερότητας των κόκκων τροφής («pellets») στο νερό για αρκετό χρονικό διάστημα.

Επίσης, έχει ήδη αναφερθεί ότι, στο φυσικό περιβάλλον, τα Εχινοειδή παρουσιάζουν διάφορες διατροφικές στρατηγικές που, σε πολλές περιπτώσεις, οδηγούν σε έκφραση προτίμησης για θηράματα, όπως οι πολύχαιτοι *Polydora ciliate* από τα είδη *Echinus esculentus* και *Psammechinus miliaris* (Krumbein & Van Der Pers, 1974) ή ο σπόγγος *Cliona lampra* από το *Euclidaris tribuloides* (McPherson, 1968). Κάτι αντίστοιχο συμβαίνει και με τον αχινό *Euclidaris thouarsii* ο οποίος προτιμά να τρέφεται με κοράλλια όταν είναι διαθέσιμα και η θηρευτική πίεση προς αυτά είναι μειωμένη (Glynn et al., 1979). Η διερεύνηση των διατροφικών προτιμήσεων των Εχινοειδών (*Euclidaris tribuloides*, *Lytechinus variegatus*, *Echinometra lucunter*), υπό ελεγχόμενες συνθήκες, από τους McClintock et al. (1982) έδειξε μια εμφανή έλξη των Εχινοειδών από τη «ζωικής προέλευσης» τεχνητή τροφή. Έτσι συμπεράναν ότι: (α) σε αντίθεση με παλαιότερες έρευνες που αντιμετώπιζαν τα Εχινοειδή κυρίως σαν φυτοφάγα, οι αναλύσεις στομαχικών περιεχομένων αχινών που διαβιούν στο φυσικό περιβάλλον δείχνουν τι καταναλώνουν και όχι τι μπορεί να προτιμούν (Lawrence, 1975 σε McClintock et al., 1982), και (β) τα ζωικής προέλευσης διατροφικά συστατικά δεν μπορούν να αγνοούνται όταν διερευνώνται οι διατροφικές προτιμήσεις, και ειδικά όταν οι προτιμήσεις αποτελούν κριτήριο για τη διαμόρφωση της καταλληλότερης δίαιτας για κάποιο Εχινοειδές.

Σύμφωνα με τον Klinger (1982), τα άτομα του είδους *Lytechinus variegatus* έτρωγαν με διπλάσια ταχύτητα τις τεχνητές τροφές με «pellets» σε σχήμα κύβου σε σχέση με αυτές που ήταν πεπλατυσμένες ή είχαν κυλινδρικό σχήμα. Τα λεπτότερα τεμάχια τροφής ανάγκαζαν τα άτομα να επανατοποθετούν συνεχώς το σώμα τους για να τα χειριστούν καλύτερα και να τα καταναλώσουν σε αντίθεση με τα πιο ογκώδη. Επιπλέον, κομμάτια τροφής που ήταν στερεωμένα κάθετα στο υπόστρωμα καταναλώνονταν ταχύτερα σε σχέση με άλλα που ήταν ελεύθερα και ενδεχομένως παρασύρονταν σε δύσκολα προσβάσιμα σημεία του ενυδρείου.



## 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



## **2.1 1<sup>Η</sup> ΕΝΟΤΗΤΑ: ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ**

Κύριος στόχος της παρούσας εργασίας είναι η επίτευξη γρήγορης γοναδικής ανάπτυξης στους αχινούς του είδους *P. lividus*. Αυτό που καθορίζει την ανάπτυξη γενικά είναι η ποσότητα των πρωτεϊνών που καταναλώνονται (Lowe & Lawrence, 1976, Frantzis & Gremare, 1992). Αν και ο γοναδοσωματικός δείκτης συνήθως αυξάνει με την αύξηση του μεγέθους (Nichols et al., 1985, Pearse & Cameron, 1991, Lumingas, 1994 σε Fernandez & Pergent, 1998, Fuji, 1967), έχει παρατηρηθεί ότι διατροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη συμβάλλει στην ταχύτερη ανάπτυξη των γονάδων, μέσω της εναπόθεσης θρεπτικών σε αυτές (de Jong-Westman et al., 1995a, Fernandez & Boudouresque, 1998, Pearce et al., 2002, Cook & Kelly, 2007, Phillips et al., 2010, Kalam Azad et al., 2011). Επίσης, βασικό στόχο αποτελεί η επίτευξη του επιθυμητού χρώματος στις γονάδες, όμοιου με των άγριων πληθυσμών δηλαδή το φωτεινό κίτρινο-πορτοκαλί, καθώς οι αχινοί που ταΐζονται με τεχνητές τροφές συχνά παράγουν μεγάλες γονάδες αλλά με χλωμό χρώμα που δεν είναι αποδεκτό εμπορικά. Ο χρωματισμός των γονάδων προκύπτει βασικά από τα καροτενοειδή, ειδικά την εχινενόνη που συντίθεται από τη β-καροτίνη από τον αχινό. Οι φυσικές τροφές από φύκια ή η προσθήκη β-καροτίνης έχουν σαν αποτέλεσμα την ενίσχυση του χρώματος των γονάδων.

### **2.1.1 Μεθοδολογία**

#### **2.1.1.1 Εγκαταστάσεις – Δεξαμενές**

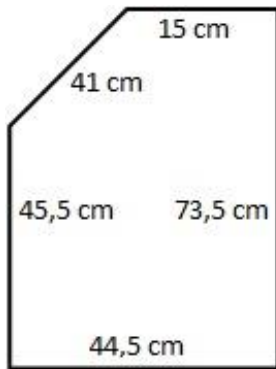
Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του Ενυδρείου Κρήτης – Θαλασσόκοσμος (Cretaquarium). Οι δεξαμενές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν χωρητικότητας 150 lt (Εικόνα 6). Εξοπλίστηκαν με ένα δεύτερο διάτρητο πυθμένα ύψους 1 cm ούτως ώστε να αποφεύγεται η ανακύκλωση των περιττωμάτων που καταλήγουν εκεί (Εικόνα 7). Το σχήμα και οι διαστάσεις των δεξαμενών που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στο Σχέδιο 1.



**Εικόνα 6:** Οι δεξαμενές των εγκαταστάσεων του ενυδρείου.



**Εικόνα 7:** Οι δεξαμενές με διπλό πυθμένα που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα



**Σχέδιο 1:** Το σχήμα και οι διαστάσεις κάθε δεξαμενής των 150 lt που χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα.

Οι αχινοί τοποθετήθηκαν στις δεξαμενές αφού πρώτα εισήχθησαν ατομικά σε πλαστικά δοχεία, στην επιφάνεια των οποίων ανοίχθηκαν τρύπες για να υπάρχει καλή κυκλοφορία του νερού (Εικόνα 8). Με αυτόν τον τρόπο, δινόταν η δυνατότητα κάθε άτομο να είναι απομονωμένο προκειμένου να αποφευχθεί το ενδεχόμενο ανταγωνισμού και τραυματισμών (Jobling, 1994 σε Siikanuorio et al., 2007) από τα άλλα άτομα. Επίσης, κάθε άτομο είχε πρόσβαση μόνο στην ποσότητα τροφής που του παρέχόταν και υπήρχε η δυνατότητα οπτικού ελέγχου της τροφής που κατανάλωνε.



**Εικόνα 8:** Τα πλαστικά διάτρητα δοχεία στα οποία τοποθετήθηκε ο κάθε αχινός.

Για την παρούσα εργασία συλλέχθηκαν 320 αχινοί από τον Κόλπο Χερσονήσου Ηρακλείου Κρήτης με κατάδυση. Επιλέχθηκαν άτομα με διάμετρο 3,5-4 εκατοστά χωρίς τα αγκάθια, μέγεθος που θεωρείται εμπορεύσιμο.

### 2.1.1.2 Διατροφή

Παρασκευάστηκαν 3 διαφορετικά σιτηρέσια: **(1)** ανάμικτο αποτελούμενο κατά 50% από ιχθυάλευρο και 50% από φυτικά αλεύρα και εμπλουτισμένο με φυσική β-καροτίνη (στο εξής

Mixed feed 1 – **M1**), (**2**) ανάμικτο, όπως και το προηγούμενο, στο οποίο το ιχθυάλευρο είχε αντικατασταθεί από φαρίνα krill (στο εξής Mixed feed 2 – **M2**), (**3**) τροφή αποτελούμενη αποκλειστικά από ιχθυάλευρο (στο εξής Animal feed – **A**). Στον Πίνακα 1 παρατίθεται αναλυτικά η σύσταση κάθε τροφής που παρασκευάστηκε. Η M2 παρασκευάστηκε δοκιμαστικά από τον Καθηγητή Benedetto Sicuro (Department of Veterinary Sciences, Torino, Italy) αλλά το σχήμα και η συνεκτικότητά της (Εικόνα 10) δεν ήταν τα δέοντα καθώς εντός περίπου 20-30 λεπτών διαλυόταν εξ ολοκλήρου στο νερό, οπότε κονιορτοποιήθηκε, αναμίχθηκε με διάλυμα ζελατίνης και της δόθηκε η μορφή κύβων όπως και στις άλλες που παρασκευάστηκαν από εμάς (M1 και A).

Πριν την έναρξη του πειράματος πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικές δοκιμές για να επιβεβαιωθεί ότι οι αχινοί καταναλώνουν τα τεχνητά σιτηρέσια που παρασκευάστηκαν όπως και αρκετές πειραματικές δοκιμές έως ότου επιτευχθεί το επιθυμητό σχήμα και η κατάλληλη συνοχή της τροφής στο νερό. Από αυτές τις δοκιμές φάνηκε ότι οι αχινοί πολύ πρόθυμα κατανάλωναν τις τροφές. Μάλιστα καταγράφηκαν περιπτώσεις όπου αχινοί που κυκλοφορούσαν ελεύθερα στο ενυδρείο, κατάφεραν να περάσουν από την οπή του δοχείου στο οποίο είχε τοποθετηθεί η τροφή για τη δοκιμή, σε μέγεθος οριακά του σκελετού του αχινού χωρίς τα αγκάθια, προκειμένου να φτάσουν στον κύβο της τροφής.

**Πίνακας 1:** Αναλυτικά η σύσταση των τροφών που χρησιμοποιήθηκαν.

ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΡΟΦΩΝ					
Ανάμικτη 1 (M1)		Ανάμικτη 2 (M2)		Ιχθυοτροφή (A)	
Αλεύρι σίτου	44,7%	Krill	22%	Ιχθυάλευρο	89,4%
Ιχθυάλευρο	44,7%	Νιφάδες κριθαριού	68%	Ιχθυέλαιο	8,9%
Ιχθυέλαιο	8,9%	Μεταλλικά στοιχεία	4%	Βιταμίνες	1,7%
Βιταμίνες	1,7%	Βιταμίνες	1%		
B – καροτίνη	0,24%	Guam powder	5%		

➤ Στο στερεό μείγμα των τροφών προστέθηκε σταδιακά διάλυμα ζελατίνης 12,5% για διατήρηση της συνοχής της τροφής στο νερό

Επιλέχθηκε η παρασκευή ανάμικτων σιτηρεσίων πρωτεΐνης και υδατανθράκων, καθώς έχει δειχθεί από άλλους ερευνητές ότι δίνουν πολύ καλά αποτελέσματα στην ανάπτυξη των αχινών, παρόμοια με αυτά ενός σιτηρεσίου 100% ζωικής προέλευσης, με μικρότερο κόστος (Fernandez & Pergent, 1998). Επίσης, κατά κανόνα, τα ανάμικτα σιτηρέσια χαρακτηρίζονται από χαμηλό ρυθμό κατανάλωσης και υψηλή ικανότητα απορρόφησης.

Επειδή, σύμφωνα με τις έρευνες που εξετάζουν και τον παράγοντα του χρώματος των γονάδων, τα τεχνητά σιτηρέσια έχουν σαν αποτέλεσμα τη παραγωγή μεγάλων γονάδων, αλλά χλωμών σε χρώμα, στο σιτηρέσιο M1 προσετέθη φυσική β-καροτίνη σε υγρή μορφή (Natural beta carotene softgels 25.000 IU, Nature's Plus), που προέρχεται από το μικροφύκος *Dunaliella salina*, η οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία επιτυγχάνει τα βέλτιστα

αποτελέσματα στην ένταση του χρώματος των γονάδων (McBride et al., 1997, 1999, 2004, Orset & Young, 2000, Robinson et al., 2002, Pearce et al., 2004), σε αντίθεση με την συνθετική β-καροτίνη (Goebel & Barker, 1998 σε Shpigel et al., 2005, Robinson et al., 2002, Symonds et al., 2007 ειδικά για το *P. lividus*) ή την ασταξανθίνη που, σύμφωνα με έρευνες, δεν δίδουν τα επιθυμητά αποτελέσματα (Goebel & Barker, 1998 σε Shpigel et al., 2005, Håvardsson et al., 1999). Στην M2, η πρωτεΐνη προέρχεται από krill που αποτελεί πηγή ασταξανθίνης.

Όσον αφορά στην παρασκευή σιτηρεσίων για αχινοούς είναι σημαντικό η τροφή να είναι επαρκώς συνεκτική και συμπαγής κατά την παραμονή της στο νερό. Ο λόγος είναι ότι οι αχινοί παρουσιάζουν κυκλική διατροφική συμπεριφορά, εναλλάσσοντας περιόδους κατανάλωσης τροφής και νηστείας των οποίων η διάρκεια είναι μερικές ημέρες και διαφέρουν από άτομο σε άτομο (Fernandez, 1989, Nedelec, 1982, Rico, 1989 σε Caltagirone et al., 1992). Επομένως πρέπει να υπάρχει μόνιμα διαθέσιμη τροφή *ad libitum* δεδομένου ότι επιπλέον καταναλώνουν αργά την τροφή με αποτέλεσμα να υπάρχουν και απώλειες κατά τη βόσκηση. Επίσης, οι αχινοί καταναλώνουν πιο πρόθυμα μια συμπαγή τροφή καθώς το μασητικό τους σύστημα είναι προσαρμοσμένο να ξύνουν/ρινίζουν την τροφή. Συνεπώς είναι απαραίτητο το σιτηρέσιο που παρασκευάζεται για το *P. lividus* να αντέχει μερικές ημέρες κατά την παραμονή του στο νερό, σε αντίθεση με κάποια είδη ψαριών, που η τροφή τους σε μορφή «pellet» χρειάζεται να μένει άθικτη στο νερό μόνο για μερικά λεπτά, ή τις γαρίδες, που η τροφή χρειάζεται να παραμένει συμπαγής για μερικές ώρες (Caltagirone et al., 1992). Ένα τεχνητό σιτηρέσιο που δεν είναι επαρκώς συμπαγές υφίσταται μια ποσοτική και ποιοτική υποβάθμιση, με την επιλεκτική διάλυση ή οξειδωση συγκεκριμένων συστατικών όπως βιταμίνες, μεταλλικά στοιχεία, πρωτεΐνες και λιπίδια, η οποία μειώνει την θρεπτική αξία της τροφής (Caltagirone et al., 1992, Pearce et al., 2002). Επιπλέον, η αποσύνθεση της τροφής, ειδικά αυτής που εμπεριέχει πρωτεΐνες ζωϊκής προέλευσης, μπορεί να δημιουργήσει ρύπανση στο νερό, λόγω αύξησης των διαλυμένων αζωτούχων υποπροϊόντων (νιτρικών, νιτρωδών και αμμωνίας) (Fernandez & Pergent, 1998), περιοχές ανοξίας και παραγωγή θειούχων ενώσεων αν συσσωρεύεται στον πυθμένα (Pearce et al., 2002), ειδικά σε κλειστά συστήματα. Αυτό έχει σαν συνέπεια την αύξηση του ρυθμού αναπνοής, άρα μεγαλύτερες μεταβολικές απώλειες, ενώ αποτελεί παράγοντα καταπόνησης ικανό να αναστείλει την ανάπτυξη και ίσως να προκαλέσει το θάνατο λόγω έλλειψης οξυγόνου (Gonzalez et al., 1993).

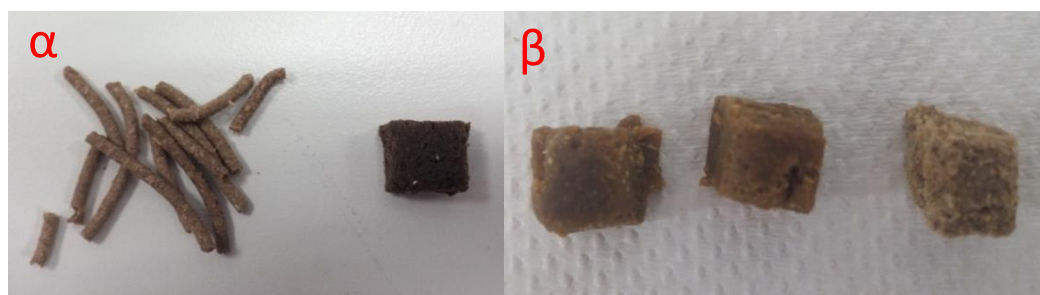
Για αυτό το λόγο μετά από αρκετές δοκιμές, καταληκτικά, η προσθήκη στο στερεό μείγμα των σιτηρεσίων διαλύματος ζελατίνης 12,5% (Premium Gel Grado 1, Enologica Vason) συνέβαλε στο να επιτευχθεί μια καλή συνοχή του σιτηρεσίου και η δυνατότητα παραμονής του στο νερό για τουλάχιστον 2 ημέρες. Η επιλογή της ζελατίνης έγινε βάσει των αποτελεσμάτων ερευνών (Caltagirone et al., 1992, Pearce et al., 2002) σχετικά με τον βαθμό συνοχής που εξασφαλίζουν σε σιτηρέσια για το *P. lividus* διάφορες ουσίες. Οι έρευνες αυτές έδειξαν ότι διάλυμα ζελατίνης σε υψηλές συγκεντρώσεις δίνει πάρα πολύ καλά αποτελέσματα όσον αφορά τη συνοχή του σιτηρεσίου μετά από παραμονή στο νερό. Για παράδειγμα οι Pearce et al. (2002) κατέγραψαν σταθερότητα του σιτηρεσίου για 216 h, και καλύτερη αντοχή στην προσβολή από βακτήρια σε σχέση με το άγαρ-άγαρ (Caltagirone et al., 1992). Ωστόσο, όταν υπολογίζεται το ενεργειακό περιεχόμενο του σιτηρεσίου, χρειάζεται να λαμβάνεται υπόψιν ότι προσθέτει στο σιτηρέσιο μια επιπλέον ποσότητα πρωτεΐνης.

Το μείγμα της τροφής προετοιμάστηκε αρχικά με τη ανάμειξη του αλευριού και/ή του ιχθυαλεύρου και του μείγματος βιταμινών, και στη συνέχεια την προσθήκη του ιχθυέλαιου και της β-καροτίνης. Τέλος, προσετέθη σταδιακά η διαλυμένη σε νερό ζελατίνη και το μείγμα (πάστα) της τροφής απλώθηκε σε λαμαρίνα, κόπηκε σε κύβους πλευράς ~1 cm (Klinger, 1982,

Fernandez & Pergent, 1998) και αφέθηκε να στεγνώσει καλά, σε ανοιχτό φούρνο στους 40 °C για 32 ώρες (16 για κάθε πλευρά) καθώς το μεγάλο πάχος της επέβαλλε την αφύγρανση και από τις δύο πλευρές. Στην συνέχεια, η τροφή διατηρήθηκε στην κατάψυξη (-20 °C) ως τη χρήση της.



**Εικόνα 9:** Η τεμαχισμένη σε κύβους πάστα της τροφής, μετά την αποξήρασή της στο φούρνο.



**Εικόνα 10:** (α) Η αρχική μορφή του σιτηρεσίου M2 και ο κύβος στον οποίο μετετράπη για να εξυπηρετήσει τη διατροφή των αχινών. (β) Ένας κύβος από κάθε σιτηρέσιο που παρασκευάστηκε.

### 2.1.1.3 Σχεδιασμός πειράματος

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζεται ο σχεδιασμός του πειράματος που αποτελείται από 5 χειρισμούς. Για κάθε χειρισμό χρησιμοποιήθηκαν 60 άτομα, προκειμένου να υπάρχει δυνατότητα δειγματοληψίας 9 ατόμων κάθε μήνα για τουλάχιστον 4 μήνες. Στον 1ο χειρισμό, οι αχινοί τράφηκαν με *Cystoseira barbata* (Phaeophyceae) και διατηρήθηκαν σε θαλασσινό νερό, ενώ στο 2ο, τράφηκαν επίσης με *Cystoseira barbata* αλλά διατηρήθηκαν σε νερό γεώτρησης, καθώς το θαλασσινό νερό και το νερό της γεώτρησης παρουσιάζουν διαφορές στο pH και στην περιεκτικότητα σε μέταλλα. Το συγκεκριμένο φαιοφύκος επιλέχθηκε διότι, κατά τη συλλογή τους από το φυσικό περιβάλλον, οι αχινοί διαβιούσαν σε λιβάδια του είδους αυτού. Στον 3<sup>ο</sup> χειρισμό στους αχινοί παρέχονταν το τεχνητό σιτηρέσιο M1 και στον 4<sup>ο</sup> χειρισμό το M2. Τέλος, στον 5<sup>ο</sup> χειρισμό, στους αχινοί παρέχονταν το σιτηρέσιο A για την επαγωγή της ανάπτυξης, με σκοπό να αντικατασταθεί τον τελευταίο μήνα του πειράματος από *Cystoseira barbata*. Ο λόγος της αντικατάστασης ήταν η βελτίωση του χρώματος των



γονάδων, καθώς έχει αποδειχθεί ότι η αντικατάσταση των τεχνητών σιτηρεσιών με φύκη, ακόμα και για ένα σύντομο χρονικό διάστημα, επιφέρει μεγαλύτερη βελτίωση του χρώματος σε σχέση με τα συνθετικά καροτενοειδή (Shrigel et al., 2005). Οι ομάδες των αχινών και των τριών χειρισμών που ταΐζονταν με τεχνητά σιτηρέσια, διατηρούνταν σε νερό γεώτρησης. Χορήγηση «φρέσκιας» τροφής σε όλους τους χειρισμούς πραγματοποιούνταν τρεις φορές την εβδομάδα (Δευτέρα-Τετάρτη-Παρασκευή), μαζί με άδειασμα και καθαρισμό των δεξαμενών από τις απεκκρίσεις και τα υπολείμματα της εναπομείνουσας τροφής.

Η θερμοκρασία του νερού των δεξαμενών διατηρήθηκε στους  $19 \pm 1$  °C. Ο παράγων αυτός είναι πολύ σημαντικός για την ανάπτυξη των Εχινειδών, και θεωρείται ότι το βέλτιστο εύρος θερμοκρασιών για τη μεγιστοποίηση της ανάπτυξης είναι μεταξύ 18 και 23 °C (Le Gall et al., 1990, Grosjean et al., 1998 σε Fernandez & Pergent, 1998) με άριστη τιμή γύρω στους 20 °C (Fernandez & Pergent, 1998). Η τιμή του pH ήταν 7,7 – 7,8 στις δεξαμενές με παροχή νερού γεώτρησης και 8,1 στη δεξαμενή με παροχή θαλασσινού νερού. Έγινε προσπάθεια το οξυγόνο να παραμείνει σε υψηλά επίπεδα (>80%) και τα αζωτούχα και αμμωνιακά ιόντα σε χαμηλά προκειμένου να διασφαλιστεί ένας ικανοποιητικός ρυθμός ανάπτυξης. Η αλατότητα ήταν 36 ppt, η φωτοπερίοδος φυσική (12/12 h) και η ανανέωση του νερού ήταν ~1,7 lt/min. Οι φυσικοχημικές παράμετροι ελέγχονταν 1 (αλατότητα, αμμωνία, νιτρικά) ή 2 φορές την εβδομάδα (pH, θερμοκρασία, οξυγόνο).

**Πίνακας 2:** Ο σχεδιασμός του πειράματος.

Χειρισμοί	Αρ. ατόμων	Δειγματοληψίες			
		1 <sup>ος</sup> μήνας	2 <sup>ος</sup> μήνας	3 <sup>ος</sup> μήνας	4 <sup>ος</sup> μήνας
Μάρτυρας/έναρξη	20				
<b>Διατροφή</b>		<b>1<sup>ος</sup> μήνας</b>	<b>2<sup>ος</sup> μήνας</b>	<b>3<sup>ος</sup> μήνας</b>	<b>4<sup>ος</sup> μήνας</b>
1. Διατροφή με <i>Cystoseira barbata</i> (Phaeophyceae) σε θαλασσινό νερό	60	9	9	9	9
2. Διατροφή με <i>Cystoseira barbata</i> (Phaeophyceae) σε νερό γεώτρησης	60	9	9	9	9
3. Ανάμικτη τεχνητή τροφή 50% φυτική-50% ζωική, με φυσική β-καροτίνη ( <i>D. salina</i> ) σε νερό γεώτρησης (M1)	60	9	9	9	9
4. Ανάμικτη τεχνητή τροφή 68% φυτική-22% ζωική από krill (πηγή ασταξανθίνης) σε νερό γεώτρησης (M2)	60	9	9	9	9
5. Ζωική τεχνητή τροφή (A)/αντικατάστασή της τον τελευταίο μήνα με <i>C. barbata</i> σε νερό γεώτρησης	60	9	9	9	9

### 2.1.2 Αποτελέσματα

Εντός δύο εβδομάδων η θνησιμότητα των ατόμων που κατανάλωναν τεχνητά σιτηρέσια ήταν καθολική, σε αντίθεση με τους αχινούς που τρέφονταν με τα φαιοφύκη (*Cystoseira barbata*), που δεν παρουσίασαν θνησιμότητα. Η αρνητική αυτή εξέλιξη απεδόθη στον μεγάλο αριθμό ατόμων ανά δεξαμενή (60) και συγκεκριμένα στην συνολική ποσότητα της τροφής που παρέμενε στο νερό και αποσυντίθεντο σταδιακά δημιουργώντας πιθανώς πρόβλημα με την επάρκεια του οξυγόνου.

Το πείραμα επαναλήφθηκε με τη συλλογή νέων ατόμων αχιών με τη διαφορά ότι ο αριθμός των ατόμων ανά δεξαμενή μειώθηκε σε 20, ενώ και το μέγεθος των κύβων της τροφής περιορίστηκε από 1 cm σε 0,8 cm, ούτως ώστε να μειωθεί περαιτέρω η συνολική ποσότητα τροφής που παρέμενε στο νερό. Επίσης σχεδιάστηκαν για τον κάθε χειρισμό 2 επαναλήψεις εκ των οποίων στην 1<sup>η</sup> επανάληψη οι αχινοί συνέχισαν να διατηρούνται στα ατομικά δοχεία, ενώ στην 2<sup>η</sup> μπορούσαν να κινηθούν ελεύθερα στη δεξαμενή και τους παρέχονταν ισάριθμοι κύβοι τροφής (20). Η αλλαγή αυτή πραγματοποιήθηκε για να αποκλειστεί η πιθανότητα η θνησιμότητα να οφείλεται σε μη επαρκή κυκλοφορία του νερού εντός του δοχείου και με την αποσύνθεση της τροφής να δημιουργείται στο δοχείο ένα μικροπεριβάλλον με ιδιαίτερα επιβαρυνμένες συνθήκες για τον αχινό, αν και πριν την έναρξη του πειράματος είχε ελεγχθεί αυτό το ενδεχόμενο, και είχε φανεί ότι δεν υπήρχε τέτοιο πρόβλημα. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζεται ο επανασχεδιασμός του πειράματος. Οι χειρισμοί με διατροφή από φαιοφύκη παρέμειναν ως είχαν καθώς δεν υπήρχε θνησιμότητα.

Χειρισμοί		Αρ. ατόμων	Δειγματοληψίες			
Μάρτυρας/έναρξη		20				
Διατροφή			1 <sup>ος</sup> μήνας	2 <sup>ος</sup> μήνας	3 <sup>ος</sup> μήνας	4 <sup>ος</sup> μήνας
1.	Διατροφή με <i>C. barbata</i> /θαλασσινό νερό	60	9	9	9	9
2.	Διατροφή με <i>C. barbata</i> /νερό γεώτρησης	60	9	9	9	9
3.	Ανάμικτη τεχνητή τροφή 50% φυτική-50% ζωική, με β-καροτίνη ( <i>D. salina</i> )/νερό γεώτρησης (M1) Rep. 1	20	3	3	3	3
	Ανάμικτη τεχνητή τροφή 50% φυτική-50% ζωική, με β-καροτίνη ( <i>D. salina</i> )/νερό γεώτρησης (M1) Rep. 2	20	3	3	3	3
4.	Ανάμικτη τεχνητή τροφή 68% φυτική-22% ζωική από krill/νερό γεώτρησης (M2) Rep. 1	20	3	3	3	3
	Ανάμικτη τεχνητή τροφή 68% φυτική-22% ζωική από krill/νερό γεώτρησης (M2) Rep. 2	20	3	3	3	3
5.	Ζωική τεχνητή τροφή (A)/αντικατάστασή της τον τελευταίο μήνα με <i>C. barbata</i> /νερό γεώτρησης Rep. 1	20	3	3	3	3
	Ζωική τεχνητή τροφή (A)/αντικατάστασή της τον τελευταίο μήνα με <i>C. barbata</i> /νερό γεώτρησης Rep. 2	20	3	3	3	3

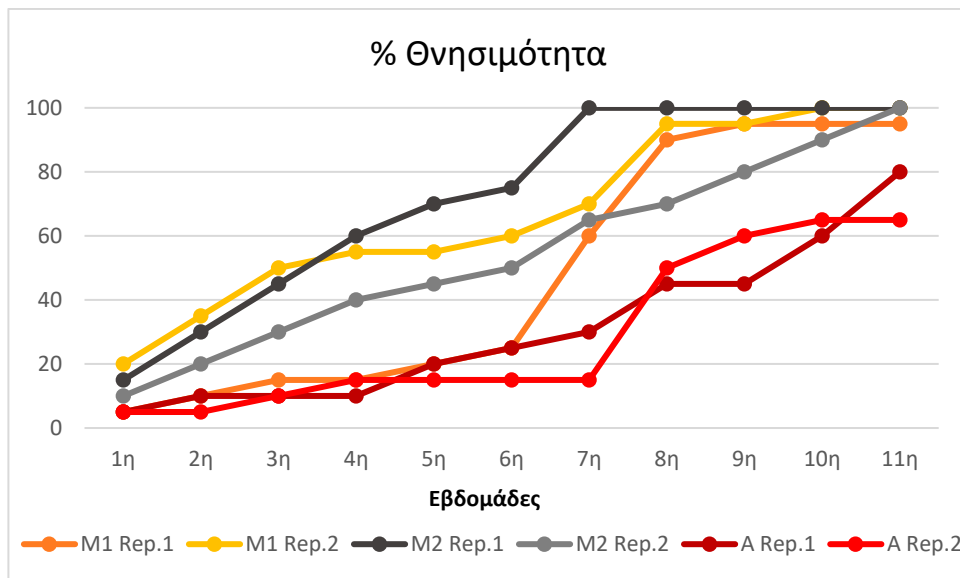
**Πίνακας 3:** Ο νέος σχεδιασμός του πειράματος. *Replicates 1:* οι αχινοί διατηρούνται στα ατομικά δοχεία, *Replicates 2:* οι αχινοί κινούνται ελεύθερα στη δεξαμενή.

### 2.1.3 Αποτελέσματα επανασχεδιασμένου πειράματος

#### 2.1.3.1 Θνησιμότητα

Η θνησιμότητα στους χειρισμούς με τεχνητά σιτηρέσια παρέμεινε συνολικά υψηλή, αλλά εκδηλώθηκε με πιο αργό ρυθμό σε σχέση με το αρχικό πείραμα (60 άτομα ανά δεξαμενή), κάτι που έδωσε τη δυνατότητα παρακολούθησης των διάφορων πληθυσμών για 11 εβδομάδες (11/7/2016 έως 23/9/2016).

**Γράφημα 1:** Το ποσοστό της θνησιμότητας σε κάθε χειρισμό με τεχνητό σιτηρέσιο, ανά επανάληψη.



Τα άτομα που κατανάλωναν το σιτηρέσιο A παρουσίασαν μικρότερη και πιο καθυστερημένη θνησιμότητα σε σχέση με αυτά στα οποία χορηγούνταν τα ανάμικτα σιτηρέσια M1 και M2, στα οποία η θνησιμότητα ήταν σχεδόν καθολική από την 8η εβδομάδα.

Η θνησιμότητα στους χειρισμούς 1 και 2, στους οποίους είχαν διατηρηθεί τα 60 άτομα/δεξαμενή, ήταν 25% και 50% αντίστοιχα. Θεωρείται ότι τα ποσοστά αυτά, και ειδικά του χειρισμού 1 (θαλασσινό νερό) είναι μέσα σε λογικά πλαίσια, καθώς είναι σύνηθες να παρατηρούνται κάποιοι θάνατοι λόγω καταπόνησης από τη μεταβολή των συνθηκών κατά τη μεταφορά από το φυσικό περιβάλλον σε δεξαμενές. Επιπλέον, όπως εξηγείται στην παράγραφο 3.1.3, λόγω προβλημάτων στη συλλογή φυκών, οι ομάδες αυτές υπέστησαν νηστεία για σχεδόν 2 μήνες.

Σε γενικές γραμμές φαίνεται ότι η μείωση των ατόμων στις δεξαμενές, και συνακόλουθα του αριθμού των κύβων τροφής αλλά και του μεγέθους τους, καθυστέρησε την εμφάνιση της θνησιμότητας χωρίς όμως να την εξαλείψει. Είχε σαν αποτέλεσμα απλώς την καθυστέρηση του ρυθμού θνησιμότητας, συνεπώς οι μετατροπές με σκοπό τον περιορισμό της συνολικής ποσότητας τροφής ανά δεξαμενή δεν ήταν επαρκείς και θα έπρεπε να είναι πιο δραστικές. Το ότι αναλογεί ευθύνη στην συνολική ποσότητα τροφής σε κάθε δεξαμενή, υπογραμμίζεται και από το γεγονός ότι, με δεδομένη την αποτυχία των δύο πειραμάτων, στα εναπομείναντα άτομα του 1<sup>ου</sup> χειρισμού, παρασχέθηκε η τροφή A χωρίς άλλη αλλαγή στις συνθήκες, για να μελετηθεί η απόκρισή τους. Το αποτέλεσμα ήταν, εντός 4 ημερών, η θνησιμότητα να είναι σχεδόν καθολική (44 από τα 45 άτομα), επιβεβαιώνοντας ότι η παραμονή στο νερό (αυτή τη φορά στο θαλασσινό) μεγάλης ποσότητας τροφής επιβαρύνει σημαντικά τις συνθήκες οδηγώντας μέχρι και στο θάνατο των αχιών.

### 2.1.3.2 Εκδήλωση ασθένειας

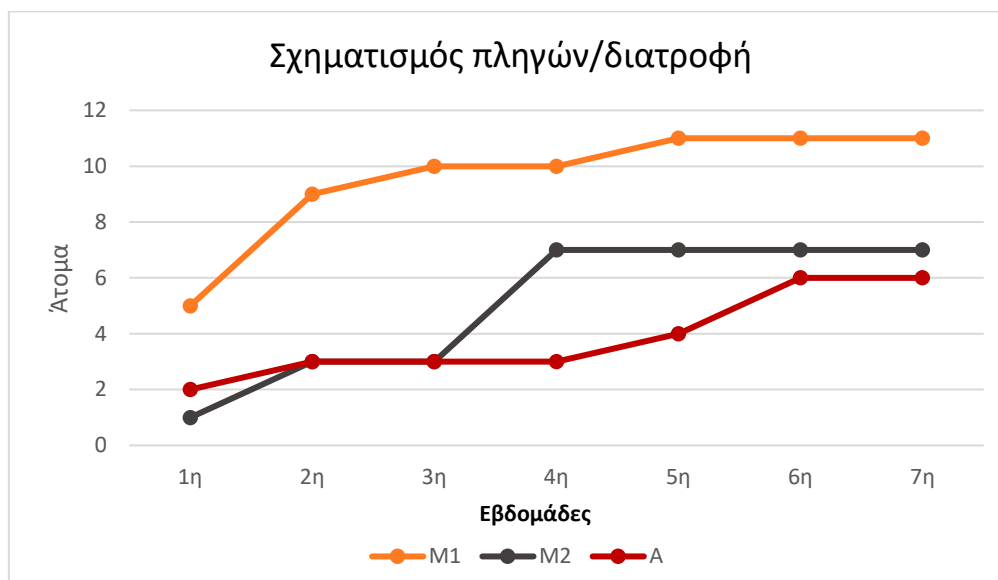
Από τη δεύτερη εβδομάδα εκτροφής, παρατηρήθηκε η εκδήλωση ασθένειας με σύμπτωμα τη δημιουργία πληγών στην επιφάνεια του σώματος των αχινών που διάβρωναν το δέρμα, απογυμνώνοντας την κάψα. Κατά κανόνα, σταδιακά οδηγούσαν στο θάνατο των προσβεβλημένων ατόμων (Εικόνα 11). Η λεπτομερής περιγραφή της ασθένειας, αποτελεί αντικείμενο επόμενης ενότητας (Ενότητα 4).



**Εικόνα 11:** Ο σχηματισμός των πληγών ξεκινά με την εμφάνιση πράσινων στιγμάτων συνήθως γύρω από φυμάτια αποκομμένων αγκαθιών, που σταδιακά επεκτείνονται αφήνοντας στο κέντρο τους την κάψα γυμνή από δέρμα.

Εκδήλωση της ασθένειας παρατηρήθηκε μόνο στις ομάδες των αχινών που τρέφονταν με τεχνητά σιτηρέσια, και όχι στις ομάδες αχινών που τρέφονταν με φύκη. Επίσης, ο αριθμός των ατόμων τα οποία εμφάνιζαν πληγές δεν ήταν ίδιος για κάθε τροφή. Καταμετρήθηκαν τα άτομα τα οποία εμφάνισαν πληγές για ένα χρονικό διάστημα 7 εβδομάδων (1/8/2016 έως 16/9/2016). Οι διαφορές αναφορικά με τον τύπο τροφής που καταναλώθηκε παρατίθενται σχηματικά στο Γράφημα 2.

**Γράφημα 2:** Ο αριθμός των ατόμων που εμφάνισαν πληγές στους διάφορους χειρισμούς διατροφής.

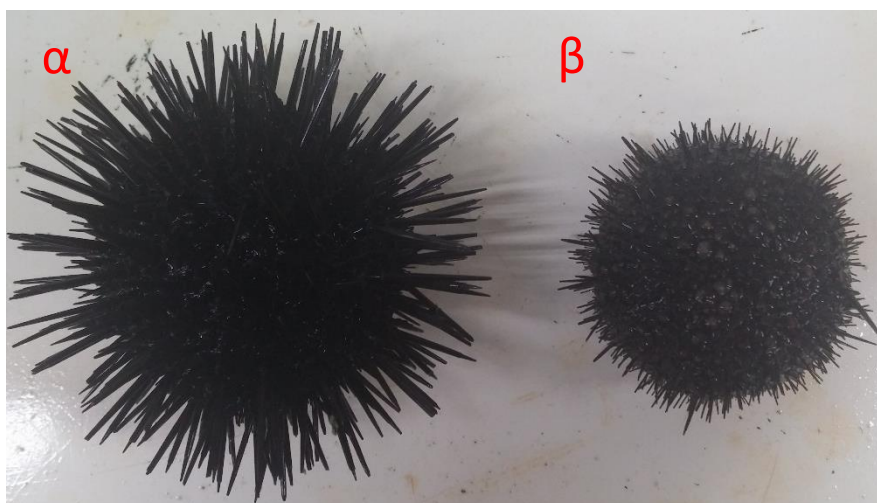


Τα περισσότερα άτομα που εμφάνισαν πληγές τρέφονταν με την τροφή M1 (χειρισμός 3), ενώ σημαντικά λιγότερα προσβεβλημένα άτομα παρουσιάστηκαν στη τροφή A (χειρισμός 5). Σε αυτό το χρονικό διάστημα των 7 εβδομάδων, γινόταν μέτρηση με μεζούρα των διαστάσεων των πληγών έως το θάνατο των ατόμων. Η αποτίμηση της συχνότητας του μεγέθους των πληγών κατέστη δύσκολη διότι η διάρκεια ζωής των ατόμων που ασθενούσαν διέφερε (από λίγες ημέρες έως αρκετές εβδομάδες), αλλά κυρίως γιατί ένα άτομο μπορεί να εμφάνιζε περισσότερες από μία πληγές (π.χ. το άτομο της Εικόνας 11 στο οποίο παρατηρούνται 4 πληγές). Όμως από τις μετρήσεις της έκτασης των πληγών συμπεραίνεται ότι κατά μέσο όρο (εκτός ελάχιστων περιπτώσεων) η εβδομαδιαία επέκτασή τους ήταν της τάξης του 1 mm.

### 2.1.3.3 Μορφολογικές διαφορές των αχινών στους δύο τύπους υδάτων εκτροφής τους

Όσον αφορά τους χειρισμούς 1 (θαλασσινό νερό) και 2 (νερό γεώτρησης), λόγω παρατεταμένης κακοκαιρίας που δεν επέτρεπε τη συλλογή *C. barbata* από τη θάλασσα για τη διατροφή των αχινών, τα άτομα και των δύο χειρισμών παρέμειναν για το ίδιο χρονικό διάστημα (περίπου 2 μήνες) χωρίς τροφή. Αφ' ενός η θνησιμότητα ήταν μικρή (βλ. παρ. 3.1.1) σε σχέση με τους αχινοί στους οποίους παρέχονταν τεχνητά σιτηρέσια, όμως παρατηρήθηκε εντυπωσιακή μορφολογική διαφορά μεταξύ των αχινών των δύο χειρισμών. Στους αχινοί του χειρισμού 2 είχε αποκοπεί σχεδόν το σύνολο των αγκαθιών τους ενώ οι αχινοί του χειρισμού 1, παρά την παρατεταμένη νηστεία, έδειχναν υγιείς χωρίς κάποια μορφολογική διαφορά από τους αχινοί του φυσικού περιβάλλοντος (Εικόνα 12). Η συγκεκριμένη διαφορά πιθανώς οφείλεται σε συνέργεια παραγόντων μεταξύ των οποίων και

τα διαφορετικά επίπεδα του pH, και γίνεται προσπάθεια να αναλυθεί εκτενέστερα σε επόμενη ενότητα (Ενότητα 3).



**Εικόνα 12:** Η διαφορά ανάμεσα στους αχινούς που διατηρήθηκαν σε θαλασσινό νερό (α) και σε νερό γεώτρησης (β), ενώ ίσχυαν οι ίδιες συνθήκες εκτροφής.

#### **2.1.4 Συζήτηση - Συμπεράσματα**

##### **2.1.4.1 Συμπεράσματα**

Τα αποτελέσματα του αρχικού και του επανασχεδιασμένου πειράματος, και τα προβλήματα που προέκυψαν, ανέδειξαν πληθώρα ερωτηματικών όσον αφορά τις συνθήκες εκτροφής του *P. lividus* που συνοψίζονται στα παρακάτω:

- Κατά πόσο η πυκνότητα των ατόμων στις δεξαμενές σχετίζεται με τους μαζικούς θανάτους;
- Εάν και σε ποιο βαθμό οι κύβοι της τεχνητής τροφής λειτουργούν σαν θρεπτικό υλικό για την αναπαραγωγή και ανάπτυξη μικροοργανισμών που προκαλούν τις πληγές στο σώμα των αχινών ή/και προκαλούν θανάτους χωρίς κάποια άλλα συμπτώματα;
- Οι μικροοργανισμοί που πιθανώς ευθύνονται για τους θανάτους ή απλώς συνεισφέρουν σε αυτούς, προέρχονται από το νερό ή αποτελούν πληθυσμούς που φυσιολογικά συμβιώνουν με τους αχινούς, και υπό συγκεκριμένες συνθήκες δημιουργείται μια διαταραχή των φυσιολογικών πληθυσμών με αποτέλεσμα παθογένεια και θνησιμότητα;
- Υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της απώλειας των αγκαθιών και της εκδήλωσης της ασθένειας;
- Στα προβλήματα που προέκυψαν διαδραματίζει κάποιο ρόλο η προέλευση του νερού εκτροφής;

Όσον αφορά στη χρήση τεχνητών σιτηρεσίων, όπως αναφέρθηκε εισαγωγικά, ο ρυθμός κατανάλωσης τροφής στα Εχινοειδή καθορίζεται από διάφορους παράγοντες, μεταξύ των οποίων το είδος της τροφής. Τα τεχνητά σιτηρέσια που παρασκευάστηκαν, καταναλώνονταν πρόθυμα από τους αχινούς (εκτός από αυτούς που ασθενούσαν στους οποίους η κατανάλωση μειωνόταν αισθητά), αλλά σε μικρότερες ποσότητες ή με χαμηλότερο ρυθμό

από ότι τα φαιοφύκη τα οποία τα κατανάλωναν σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες (επίσης σε Spirlet et al., 2001). Όμως, κατά τη σύγκριση πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν ότι οι δύο τροφές (φύκη και τεχνητά σιτηρέσια) διαφέρουν ως προς την περιεκτικότητα τους σε νερό, επομένως η μέτρηση της κατανάλωσης δεν είναι ασφαλής δείκτης (Spirlet et al., 2001). Επίσης, οι περισσότερες έρευνες που έχουν εξετάσει τα θρεπτικά αλλά και τα οικονομικά οφέλη της χρήσης τεχνητών σιτηρεσίων στην εκτροφή αχινών, υποδεικνύουν ότι παρά τη μικρότερη κατανάλωσή τους από τα Εχινοειδή, η θρεπτική τους αξία αλλά και η αφομοίωσή τους (ικανότητα απορρόφησης) είναι υψηλότερη και παράλληλα η διατροφή με φύκη πιθανώς συνεπάγεται την κατανάλωση περισσότερης ενέργειας για το χειρισμό και την κατανάλωση αυτού του μεγάλου όγκου (Spirlet et al., 2001). Συνεπώς τα τεχνητά σιτηρέσια μπορούν να παράσχουν μεγαλύτερα θρεπτικά οφέλη στους αχινούς παρά τη μικρότερη κατανάλωση που και στο παρόν πείραμα παρατηρήθηκε.

Για τη μαζική θνησιμότητα που παρατηρήθηκε, η πυκνότητα των ατόμων φαίνεται ότι δεν αποτελεί από μόνη της παράγοντα θνησιμότητας καθώς ακόμα και ο αρχικός αριθμός ατόμων που τοποθετήθηκε στις δεξαμενές (60 άτομα), δεν θεωρείται μεγάλος (Siikanuorio et al., 2006). Επίσης, στα άτομα που τρέφονταν με *Cystoseira barbata* δεν παρατηρήθηκε μεγάλη θνησιμότητα. Συνεπώς φαίνεται πιο πιθανό να ευθύνεται η συνολική ποσότητα της τεχνητής τροφής στις δεξαμενές και όχι απλώς ο αριθμός των ατόμων. Οι μετατροπές που έγιναν κατά τον επανασχεδιασμό του πειράματος δεν διόρθωσαν το πρόβλημα, ενώ δεν κρίνεται σωστή πρακτική η περαιτέρω μείωση του μεγέθους των κύβων της τροφής κάτω από τα 0,8 cm, γιατί με αυτό το μέγεθος των κύβων αρκετά άτομα εξαντλούσαν την τροφή τους έως το επόμενο τάισμα, επομένως παύουν να διαθέτουν τροφή κατά βούληση. Άρα κρίνεται ότι για να περιοριστεί συνολικά η ποσότητα της τροφής που παραμένει στο νερό, χρειάζεται να μειωθεί περισσότερο η πυκνότητα των ατόμων στις δεξαμενές, όπως και έγινε σε επόμενο πείραμα εκτροφής (βλ. Ενότητα 2), αν και πιο σημαντικός παράγοντας φαίνεται να είναι η προσπάθεια περαιτέρω βελτίωσης της συνεκτικότητας και σταθερότητας των τεμαχίων του σιτηρεσίου.

Επιπρόσθετα, εστιάζοντας στη διαφορετική σύσταση των σιτηρεσίων, παρατηρείται από τα αποτελέσματα ότι και η θνησιμότητα και ο αριθμός κρουσμάτων της ασθένειας ήταν υψηλότερα στα ανάμικτα σιτηρέσια (M1 και M2) και χαμηλότερα στο σιτηρέσιο ζωικής προέλευσης (A). Σύμφωνα με τους Caltagirone et al. (1991) από αδημοσίευτα δεδομένα, η σύνθεση του κάθε σιτηρεσίου επηρεάζει τη σταθερότητά του στο νερό. Τα τεχνητά σιτηρέσια που αποτελούνται κυρίως από φυτικά προϊόντα παρουσιάζουν πιο αδύναμη συνοχή από αυτά που περιέχουν προϊόντα ζωικής προέλευσης. Στο παρόν πείραμα παρατηρήθηκε όντως, μια ελάχιστα καλύτερη σταθερότητα του σιτηρεσίου A κατά την παραμονή του στο νερό, κάτι που πιθανώς διαδραμάτισε ρόλο στις διαφορές στη θνησιμότητα και στον αριθμό κρουσμάτων της ασθένειας που καταγράφηκαν.

Παρ' όλα αυτά, καθώς για μια σειρά από λόγους η χρήση τεχνητών σιτηρεσίων στην εκτροφή αχινών είναι απαραίτητη, όπως προκύπτει και από τα αποτελέσματά μας, υπάρχει η ανάγκη να βρεθεί μια χρυσή τομή ούτως ώστε να αποκομίζονται όλα τα οφέλη που η χρήση της προσφέρει, χωρίς όμως να ευθύνεται για επιβάρυνση των συνθηκών εκτροφής και να προκαλείται θνησιμότητα.

#### 2.1.4.2 Ζητήματα για περαιτέρω διερεύνηση

Από τα ερωτήματα που ετέθησαν κατά την διάρκεια της προκαταρκτικής αυτής έρευνας προσπαθήσαμε να απαντήσουμε τα πλέον σημαντικά κατά την άποψη μας μέσα στα πλαίσια του διαθέσιμου χρόνου με τον σχεδιασμό και την εκτέλεση εξειδικευμένων πειραμάτων που παρουσιάζονται στις ενότητες που ακολουθούν.

Έτσι, σε επόμενη ενότητα που αφορά στην παθολογία (Ενότητα 4) γίνεται μια προσπάθεια ανάλυσης και περιγραφής των χαρακτηριστικών της ασθένειας που εμφάνισαν οι αχινοί. Βάσει των συμπτωμάτων που παρατηρήθηκαν φαίνεται ότι πρόκειται για μια ασθένεια για την οποία υπάρχουν αναφορές εδώ και αρκετές δεκαετίες από το φυσικό περιβάλλον. Λόγω έλλειψης στοχευμένων μελετών επιχειρήσαμε να προσδιορίσουμε τον αριθμό και την ταυτότητα των παθογόνων παραγόντων στους οποίους πιθανώς οφείλεται. Ακόμη, διερευνήσαμε αν πιθανή προέλευση των παθογόνων είναι το νερό (γεώτρησης και θαλασσινό) και κατά πόσο η τροφή βοηθά στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους, καθώς δεν παρατηρήθηκε εκδήλωση της ασθένειας στους αχινοί που τρέφονταν με φαιοφύκη.

Η μορφολογική διαφοροποίηση, με την εμφανή υποβάθμιση των σκελετικών στοιχείων (μεγάλη απώλεια αγκαθιών), που παρατηρήθηκε στους αχινοί που εκτρέφονταν σε νερό γεώτρησης σε σχέση με αυτούς που εκτρέφονταν σε θαλασσινό νερό, έγινε επίσης αντικείμενο διερεύνησης (Ενότητα 3). Όπως προαναφέρθηκε, το νερό γεώτρησης που χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο στις εγκαταστάσεις του Ενυδρείου, παρουσιάζει διαφορές από το φυσικό θαλασσινό νερό ως προς τα επίπεδα του pH, που είναι χαμηλότερα, και τις συγκεντρώσεις κάποιων μετάλλων, που είναι υψηλότερες, ενώ υπάρχουν αναφορές και για άλλα θαλάσσια ζώα που εμφανίζουν προβλήματα υγείας κατά τη διατήρησή τους σε νερό γεώτρησης. Επιχειρήσαμε λοιπόν στη συνέχεια, να εξετάσουμε χωριστά την επίδραση του pH από αυτήν της συνολικής ποιότητας του νερού γεώτρησης στην σκελετική υποβάθμιση που παρατηρήθηκε και να προσδιορίσουμε το μερίδιο ευθύνης καθενός από τους δύο αυτούς παράγοντες ή και του συνδυασμού τους. Ο λόγος είναι ότι εάν αναλογεί ευθύνη μόνο ή κυρίως στο χαμηλότερο pH, δημιουργείται περαιτέρω προβληματισμός για τις επιπτώσεις της οξίνισης των ωκεανών στα Εχινοειδή.

Τέλος, σε επόμενη ενότητα (Ενότητα 2), εξετάσαμε τον ρόλο της ποιότητας του νερού εκτροφής στη διαβίωση και ευζωία των αχινών, με το σχεδιασμό νέου πειράματος εκτροφής αχινών στα δύο διαφορετικά είδη ύδατος.



## **2.2 2<sup>η</sup> ΕΝΟΤΗΤΑ: ΚΥΡΙΩΣ ΠΕΙΡΑΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

Σε συνέχεια των δύο πρακαταρκτικών πειραμάτων διατροφής (Ενότητα 1) τα οποία δεν ολοκληρώθηκαν σύμφωνα με τον σχεδιασμό λόγω των προβλημάτων που προέκυψαν κατά τη διεξαγωγή τους, στην παρούσα ενότητα περιγράφεται η εκπόνηση νέου πειράματος διατροφής, με μερικώς διορθωμένο σχεδιασμό.

Ο στόχος του παρόντος πειράματος παραμένει ο ίδιος: η επίτευξη γρήγορης γοναδικής ανάπτυξης με τη χρήση τεχνητών σιτηρεσιών 50% πρωτεΐνης- 50% υδατανθράκων και 100% πρωτεΐνης, που υποδεικνύεται από σειρά ερευνών ότι ενισχύουν τη γοναδική παραγωγή. Επίσης, η επίτευξη του επιθυμητού χρώματος στις γονάδες, όμοιου με των φυσικών πληθυσμών δηλαδή το φωτεινό κίτρινο-πορτοκαλί, καθώς οι αχινοί που ταΐζονται με τεχνητά σιτηρέσια συχνά παράγουν μεγάλες γονάδες αλλά με χλωμό χρώμα που δεν είναι αποδεκτό εμπορικά. Το χρώμα των γονάδων καθορίζεται από τα καροτενοειδή που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής και κυρίως από την εχινενόνη την οποία συνθέτει ο αχινός από μετατροπή της β-καροτίνης μέσω μεταβολικών διεργασιών. Για τον συσχετισμό των ειδών και της ποσότητας των καροτενοειδών των γονάδων, με το χρώμα που προκύπτει από την εκτροφή με τα συγκεκριμένα σιτηρέσια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των καροτενοειδών των γονάδων.

### **2.2.1 Προσδιορισμός καροτενοειδών**

#### **2.2.1.1 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας – Thin Layer Chromatography (TLC)**

Η χρωματογραφία είναι μια ευρύτατα διαδεδομένη εργαστηριακή τεχνική διαχωρισμού ουσιών από ένα μίγμα τους. Το μίγμα των ουσιών τοποθετείται στη μία άκρη ενός υλικού προσρόφησης που ονομάζεται στατική φάση. Στη συνέχεια, το μίγμα εκλούεται από μία κινητή φάση (έναν διαλύτη ή ένα αέριο) η οποία κινείται προς την άλλη άκρη της στατικής φάσης. Όσες ουσίες κατακρατούνται ασθενέστερα από τη στατική φάση και είναι πιο διαλυτές στην κινητή φάση κινούνται ταχύτερα κατά τη ροή της κινητής φάσης, ενώ όσες κατακρατούνται ισχυρότερα «τρέχουν» πιο αργά. Το αποτέλεσμα είναι ο διαχωρισμός τους.

Στη Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) χρησιμοποιείται μια λεπτή στιβάδα προσροφητικού υλικού που στηρίζεται πάνω σε λεία επιφάνεια (συνήθως οξείδιο πυριτίου ή αλουμίνα πάνω σε γυάλινη πλάκα). Η TLC αποτελεί μια ουσιαστική και φθηνή μέθοδο, που είναι εύκολη στην εκτέλεσή της και είναι χρήσιμη για μια πιλοτική εξέταση των μιγμάτων καροτενοειδών άγνωστης σύνθεσης. Σαν μέθοδος, αν και υπάρχει η τάση να αντικαθίσταται από την HPLC, παρουσιάζει πληθώρα πλεονεκτημάτων κυρίως όσον αφορά την ευελιξία και την απλότητα, παραμένοντας μια πολύ χρήσιμη μέθοδος για την απομόνωση και τον προσδιορισμό των καροτενοειδών. Για την αναγνώριση των καροτενοειδών λαμβάνονται υπόψιν διάφοροι παράγοντες, εκ των οποίων βασική παράμετρος είναι η τιμή Rf η οποία περιγράφει την μετατόπιση στην TLC. Η τιμή Rf είναι ο συντελεστής επιβράδυνσης (Retardation factor, Rf) μιας ουσίας και ορίζεται ως ο λόγος της απόστασης που διανύεται από την ουσία προς την απόσταση που διήνυσε ο διαλύτης. Το εύρος των τιμών του είναι από 0 έως 1. Εάν η τιμή Rf μιας ουσίας είναι μηδέν, αυτό σημαίνει

ότι η διαλυμένη ουσία παραμένει στη στατική φάση αμετακίνητη. Αν η τιμή  $R_f=1$ , τότε η διαλυμένη ουσία δεν έχει καμία συγγένεια για τη στατική φάση και «ταξιδεύει» με το μέτωπο του διαλύτη. Ο προσδιορισμός των ενώσεων από την TLC βασίζεται αρχικά στη σύγκριση των τιμών  $R_f$  με αυτές των αυθεντικών προτύπων. Η τιμή  $R_f$  εξαρτάται από τη θερμοκρασία και τον διαλύτη που χρησιμοποιείται κάθε φορά, επομένως διαφορετικοί διαλύτες δίνουν διαφορετικές τιμές  $R_f$  για το ίδιο μίγμα ουσιών.

### 2.2.1.2 Καροτενοειδή στις γονάδες Εχινοειδών

Τα καροτενοειδή είναι σημαντικά στην διατροφή των ζώων, έχοντας ρόλο σαν βιταμίνες, αντιοξειδωτικά, χρωστικές ουσίες και έχουν φωτοπροστατευτική δράση (Snodderly, 1995, Bohne et al., 1997), ενώ υποδεικνύεται ότι είναι σημαντικά στην αναπαραγωγή, την παραγωγή υψηλής ποιότητας αυγών, στην επιβίωση των προνυμφών και την πρώιμη μορφογένεση (Monroy et al., 1951, Tsushima et al., 1997, Kawakami et al., 1998, George et al., 2001). Βρίσκονται σε όλα τα μέρη του σώματος του αχινού, με το είδος και τη συγκέντρωση να διαφέρουν σε κάθε όργανο (Matsuno & Hirao, 1989, Matsuno & Tsushima, 2001).

Στις γονάδες των Κανονικών Εχινοειδών σαν κύρια καροτενοειδή έχουν αναφερθεί η  $\beta$ , $\beta$ -καροτίνη και η  $\beta$ -εχινενόνη (=β,β-καροτεν-4-όνη), μαζί με τα  $\alpha$ -καροτίνη (β,ε-καροτίνη),  $\beta$ -ισοκρυπτοξανθίνη, ισοζεαξανθίνη, κανθαξανθίνη, λουτεΐνη, ζεαξανθίνη, φουκοξανθίνη και φουκοξανθινόλη, ενώ πιο άφθονες είναι η εχινενόνη και δευτερευόντως η  $\beta$ -καροτίνη (Nicola & Goodwin, 1954, Fox & Hopkins, 1966a, Griffiths & Perrott, 1976, Shina et al., 1978, Hallenstvet et al., 1978, Goodwin, 1984, Matsuno & Hirao, 1989, Tsushima & Matsuno, 1990). Η εχινενόνη έχει αναγνωριστεί σαν το κυρίαρχο καροτενοειδές στις γονάδες των περισσότερων Εχινοειδών που έχουν μελετηθεί (Griffiths, 1966, Griffiths & Perrot, 1976, Tsushima & Matsuno, 1990, Tsushima et al., 1995, Garama et al., 2012), αποτελώντας έως το 90% των ολικών καροτενοειδών στις γονάδες. Υποδεικνύεται ότι αυτό είναι το τελικό καροτενοειδές στα όργανα των αχινών, και ότι αυτά τα υψηλά επίπεδα δείχνουν την σημασία του για την ανάπτυξη γαμετών, αυγών και εμβρύων (Plank et al., 2002, Tsushima & Matsuno, 1990). Η  $\beta$ -καροτίνη προσδιορίζεται ως ο πρόδρομος της μεταβολικής διεργασίας που οδηγεί στην παραγωγή της εχινενόνης (Tsushima et al., 1993, George et al., 2001), καθώς έχει αποδειχθεί ότι ενώ είναι το κυρίαρχο καροτενοειδές στις γονάδες, δεν είναι παρόν στα φύκη που αποτελούν το βασικό συστατικό της δίαιτας των αχινών (Robinson et al., 2002, Symonds et al., 2007).

Γενικά, τα ζώα δεν συνθέτουν καροτενοειδή εξ' αρχής. Τα καροτενοειδή συντίθενται μόνο από φυτά και μικροοργανισμούς, και αυτά που βρίσκονται στα σώματα των ζώων είναι λόγω είτε άμεσης συσσώρευσης καροτενοειδών από την τροφή είτε είναι μερικώς τροποποιημένα μέσω μεταβολικών αντιδράσεων. Η  $\beta$ -εχινενόνη μπορεί να προέλθει από την διατροφική  $\beta$ -καροτίνη μέσω της  $\beta$ -ισοκρυπτοξανθίνης στις γονάδες των αχινών (Griffiths & Perrott, 1976, Shina et al., 1978). Σύμφωνα με τους Shripigel et al. (2005), το γεγονός ότι η έλλειψη εχινενόνης στο έντερο και η υψηλή συγκέντρωσή της στις γονάδες, σε ακριβώς αντίστροφη αναλογία με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις της  $\beta$ -καροτίνης, υποδεικνύει βιομετατροπή εντός των γονάδων ή πιθανώς κατά την αφομοίωση. Γενικά δεν είναι ξεκάθαρο πού λαμβάνει χώρα η βιομετατροπή της  $\beta$ -καροτίνης σε εχινενόνη. Οι Griffiths & Perrot (1976) υποστηρίζουν ότι στο *P. lividus* η διεργασία αυτή γίνεται αποκλειστικά στις γονάδες, ενώ οι Tsushima & Matsuno (1990) και Tsushima et al. (1995) αξιώνουν ότι η σύνθεση λαμβάνει χώρα στο έντερο

(gut) λόγω των υψηλών επιπέδων εχινενόνης και του προδρόμου της, της ισοκρυπτοξανθίνης που εντόπισαν στο έντερο. Οι Shrigel et al. (2005) διαπίστωσαν υψηλότερα επίπεδα ισοκρυπτοξανθίνης στο έντερο από ότι στις γονάδες, αντιστρόφως ανάλογα από τα επίπεδα εχινενόνης, προτείνοντας ότι τουλάχιστον ένα μέρος της σύνθεσης πραγματοποιείται στο έντερο. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζουν και οι Plank et al. (2002), παρατηρώντας ότι πολλά μονοπάτια υπάρχουν για το μεταβολισμό των διατροφικών καροτενοειδών στον *Lytechinus variegatus*, συμπεριλαμβανομένων των θρεπτικών φαγοκυττάρων στις γονάδες που αποθηκεύουν τα θρεπτικά που χρησιμοποιούνται στη γαμετογένεση.

### 2.2.1.3 Σημασία του χρώματος των γονάδων

Όπως έχει προαναφερθεί, τα χαρακτηριστικά των γονάδων όπως η εμφάνιση, η υφή, η γεύση και κυρίως το χρώμα, επηρεάζουν σημαντικά το πόσο επιθυμητό θα είναι το προϊόν στη παγκόσμια αγορά, επομένως και την αξία του (Unuma et al., 2002, Symonds, 2007). Ο χρωματισμός στις γονάδες των Εχινειδών προέρχεται πρωτίστως από τις καροτενοειδείς χρωστικές της διαίτας τους και τα πρόδρομα καροτενοειδή, τα οποία αποτίθενται απευθείας ή μετατρέπονται και αποτίθενται στον γοναδικό ιστό (Galasko et al., 1969, Hora et al., 1970, Tsushima & Matsuno, 1990, Symonds et al., 2007, Symonds et al., 2009). Ο κυρίαρχος παράγοντας όμως που καθορίζει την ένταση του χρώματος των γονάδων είναι η εχινενόνη (Shina et al., 1978, Goodwin, 1984, Matsuno & Tsushima, 2001, Symonds et al., 2007), με την ύπαρξη θετικής συσχέτισης μεταξύ των επιπέδων εχινενόνης και του χρώματος των γονάδων (Shrigel et al., 2005). Υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον όσον αφορά την ενίσχυση της διατροφής των αχινών με στόχο την παραγωγή ενός αποδεκτού εμπορικά χρώματος των γονάδων, με πολλές έρευνες να εξετάζουν τα καροτενοειδή σε αχινούς που διατρέφονται με τεχνητές τροφές (Goebel & Barker, 1998, Matsuno & Tsushima, 2001, McLaughlin & Kelly, 2001, Pearse et al., 2003, Plank et al., 2002, Robinson et al., 2002, Shrigel et al., 2005). Ο λόγος είναι ότι οι αχινοί που διατρέφονται με τεχνητές τροφές, συχνά παράγουν γονάδες αυξημένου όγκου αλλά με χλωμό χρώμα (McBride et al., 1997, 2004, Lawrence et al., 1997, Barker et al., 1998, Walker & Lesser, 1998, Pearse et al., 2004), και τέτοιες γονάδες είναι εμπορικά μη αποδεκτές (Lawrence et al., 1995, Robinson & Colborne, 1998, Watts et al., 1998, McLaughlin & Kelly, 2001). Για την επίτευξη του επιθυμητού χρώματος γονάδων σε διάφορα είδη αχινών έχει υποδειχθεί ότι βοηθούν διαφορετικά μικροφύκη, σε γενικές γραμμές όμως, όπως έχει προαναφερθεί, η συνθετική β-καροτίνη δεν επηρεάζει σημαντικά το χρώμα των γονάδων, ενώ η φυσική β-καροτίνη είναι η πιο αποτελεσματική. Μη επαρκώς αποτελεσματικές στην παραγωγή χρώματος στις γονάδες των αχινών είναι και οι διαιτητικές ξανθοφύλλες όπως η καψανθίνη, ζεαξανθίνη, λουτεΐνη, ασταξανθίνη και φουκοξανθίνη. Δεν είναι ξεκάθαρο γιατί η φυσική β-καροτίνη είναι πιο αποτελεσματική σε σχέση με τη συνθετική all-E-β καροτίνη ή αν ο χρωματισμός των γονάδων συνδέεται με τη βιοδιαθεσιμότητα, τη βιοαπορρόφηση ή τη βιομετατροπή των προστιθέμενων χρωστικών στο έντερο και στις γονάδες (Tsushima, 2006).

## 2.2.2 Μεθοδολογία

### 2.2.2.1 Σχεδιασμός πειράματος

Για τη διεξαγωγή του παρόντος πειράματος επιλέχθηκαν οι χειρισμοί που στα αρχικά πειράματα παρουσιάστηκε η μεγαλύτερη (σιτηρέσιο M1) και η μικρότερη (σιτηρέσιο A) θνησιμότητα. Επίσης, καθώς στα αρχικά πειράματα (Ενότητα 1) προέκυψε ο προβληματισμός για το ρόλο της ποιότητας του νερού εκτροφής στη διαβίωση και ευζωία των αχινών, χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη υδάτων για την εκτροφή των αχινών (γεώτρησης και θαλασσινό) σε κάθε τύπο σιτηρεσίου. Πραγματοποιήθηκε νέα συλλογή συνολικά 100 ατόμων αχινών από την Ελούντα τον νομό Λασιθίου και στο νέο πείραμα διατροφής (Πίνακας 1), μειώθηκε περαιτέρω ο αριθμός των ατόμων σε 10 ανά δεξαμενή και αποτελείται από 4 χειρισμούς, καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει δύο επαναλήψεις:

- Διατροφή με ανάμικτη (50% ζωικής – 50% φυτικής προέλευσης) τεχνητή τροφή, εμπλουτισμένη με φυσική β-καροτίνη από το μικροφύκος *Dunaliella salina* (M1), σε θαλασσινό νερό.
- Διατροφή με ανάμικτη (50% ζωικής – 50% φυτικής προέλευσης) τεχνητή τροφή, εμπλουτισμένη με φυσική β-καροτίνη από το μικροφύκος *Dunaliella salina* (M1), σε νερό γεώτρησης.
- Διατροφή με ζωικής προέλευσης τεχνητή τροφή (A) σε θαλασσινό νερό.
- Διατροφή με ζωικής προέλευσης τεχνητή τροφή (A) σε νερό γεώτρησης.

Τα αποτελέσματα του πειράματος συγκρίνονται με δύο ομάδες από μάρτυρες-αχινούς του φυσικού περιβάλλοντος που συλλέχθηκαν από την ίδια περιοχή, στην έναρξη και στο τέλος της διεξαγωγής του πειράματος.

**Πίνακας 4:** Ο σχεδιασμός του πειράματος

Χειρισμοί		Νερό εκτροφής	Αρ. ατόμων	Δειγματοληψίες		
Μάρτυρας 1/έναρξη πειράματος			10			
Διατροφή				1ος μήνας	2ος μήνας	3ος μήνας
1.	Ανάμικτη τεχνητή τροφή 50% φυτική – 50% ζωική, με φυσική β-καροτίνη (M1) <b>rep. 1</b>	Θαλασσινό	10	3	3	3
	Ανάμικτη τεχνητή τροφή 50% φυτική – 50% ζωική, με φυσική β-καροτίνη (M1) <b>rep. 2</b>	Θαλασσινό	10	3	3	
2.	Ζωική τεχνητή τροφή (A) <b>rep. 1</b>	Θαλασσινό	10	3	3	3
	Ζωική τεχνητή τροφή (A) <b>rep. 2</b>	Θαλασσινό	10	3	3	
3.	Ανάμικτη τεχνητή τροφή 50% φυτική – 50% ζωική, με φυσική β-καροτίνη (M1) <b>rep. 1</b>	Γεώτρησης	10	3	3	2
	Ανάμικτη τεχνητή τροφή 50% φυτική – 50% ζωική, με φυσική β-καροτίνη (M1) <b>rep. 2</b>	Γεώτρησης	10	3	3	
4.	Ζωική τεχνητή τροφή (A) <b>rep. 1</b>	Γεώτρησης	10	3	3	3
	Ζωική τεχνητή τροφή (A) <b>rep. 2</b>	Γεώτρησης	10	3	3	
Μάρτυρας 2/λήξη πειράματος			10			

**Πίνακας 5:** Ο μέσος όρος των μετρήσεων των φυσικοχημικών παραμέτρων κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Χειρισμοί	T (° C)	pH	O <sub>2</sub> (% sat)	S (ppt)	NH <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/l)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	
1.	rep1	21,1 ± 0,3	8,11 ± 0,02	94 ± 1	36	0	0
	rep2	21,2 ± 0,3	8,12 ± 0,03	94 ± 1	36	0	0
2.	rep1	21,3 ± 0,3	8,12 ± 0,04	94 ± 1	36	0	0
	rep2	21,2 ± 0,3	8,12 ± 0,03	94 ± 1	36	0	0
3.	rep1	18,7 ± 0,7	7,93 ± 0,03	94 ± 1	36	0	0
	rep2	18,3 ± 0,1	7,94 ± 0,04	94 ± 1	36	0	0
4.	rep1	18,4 ± 0,1	7,89 ± 0,14	94 ± 1	36	0	0
	rep2	19,8 ± 0,2	7,84 ± 0,09	94 ± 1	36	0	0

Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 5 δειγματοληψίες. Η 1<sup>η</sup> δειγματοληψία αφορά ένα μάρτυρα κατά την έναρξη του πειράματος, από αχινούς στους οποίους πραγματοποιήθηκε η ανατομή και οι βιομετρικές αναλύσεις αμέσως μετά τη συλλογή τους από τη θάλασσα. Η 2<sup>η</sup> δειγματοληψία περιλάμβανε 3 άτομα από κάθε επανάληψη μετά από ένα μήνα εκτροφής. Αντίστοιχα η 3<sup>η</sup> δειγματοληψία, μετά από δύο μήνες εκτροφής και η 4<sup>η</sup> δειγματοληψία με όσα άτομα είχαν απομείνει μετά από τρεις μήνες εκτροφής. Επειδή η δειγματοληψία του 1<sup>ου</sup> μάρτυρα απείχε χρονικά από τις επόμενες, για να επιβεβαιωθεί ότι οι όποιες αλλαγές στο Γοναδοσωματικό Δείκτη των αχινών οφείλονται στη διατροφή και όχι σε διαφορετική φάση του αναπαραγωγικού κύκλου, πραγματοποιήθηκε και δεύτερη δειγματοληψία μάρτυρα από τη θάλασσα κατά το τέλος του πειράματος, μαζί με την τελευταία δειγματοληψία από τις δεξαμενές.

### 2.2.2.2 Βιομετρικές αναλύσεις

Κατά την δειγματοληψία των αχινών πραγματοποιήθηκαν οι εξής βιομετρικές αναλύσεις: Αρχικά ζυγίστηκε το βάρος του σώματος (g) μετά την παραμονή των ατόμων για 10 λεπτά σε απορροφητικό χαρτί για την αποβολή του πλεονάζοντος νερού, και μετρήθηκαν με παχύμετρο οι διαστάσεις του σώματος (διάμετρος και ύψος) χωρίς τα αγκάθια (cm). Στη συνέχεια, έγινε η ανατομή των ατόμων, ξεχωρίστηκαν οι γονάδες και μετά από παραμονή τους σε απορροφητικό χαρτί για 10 λεπτά, ούτως ώστε να αποβληθεί το επιπλέον υγρό, ζυγίστηκαν (g) (Εικόνα 2). Τέλος, αξιολογήθηκε το χρώμα των γονάδων με προσωπική παρατήρηση υπό σταθερές συνθήκες φωτός σε κάθε δειγματοληψία. Το χρώμα των γονάδων κάθε ατόμου συγκρίθηκε με χρωματικό πίνακα (Munsell color chart) και σημειώθηκε ο αριθμός RGB. Άριστο χρώμα θεωρείται το φωτεινό κίτρινο-πορτοκαλί.



**Εικόνα 13:** Φωτογραφία από την ανατομή των αχινών για την απομόνωση και το ζύγισμα των γονάδων.

Μετά την ανατομή, οι γονάδες που απομονώθηκαν διατηρήθηκαν σε κατάψυξη έως την περαιτέρω ανάλυσή τους.

Ο Γοναδοσωματικός Δείκτης (Gonad Somatic Index - GSI) δείχνει το ποσοστό του υγρού βάρους των γονάδων προς το συνολικό υγρό βάρος του ατόμου. Παρά το ότι επηρεάζεται από την ποσότητα του κοιλωματικού υγρού και του περιεχομένου των ιστών σε νερό, καθώς και από τη σωματική ανάπτυξη, είναι ο πιο κοινός δείκτης που χρησιμοποιείται στη βιβλιογραφία για να περιγράψει τη γοναδική παραγωγή (π.χ. Byrne, 1990, Lawrence et al., 1991, Urgorri et al., 1994, Guettaf & San Martin, 1995, Lozano et al., 1995, Fernandez, 1996 για το *P. lividus*). Ο δείκτης υπολογίστηκε από την εξής εξίσωση:

$$\text{GSI (\%)} = \frac{\text{Υγρό βάρος γονάδων}}{\text{Υγρό βάρος σώματος}} \times 100$$

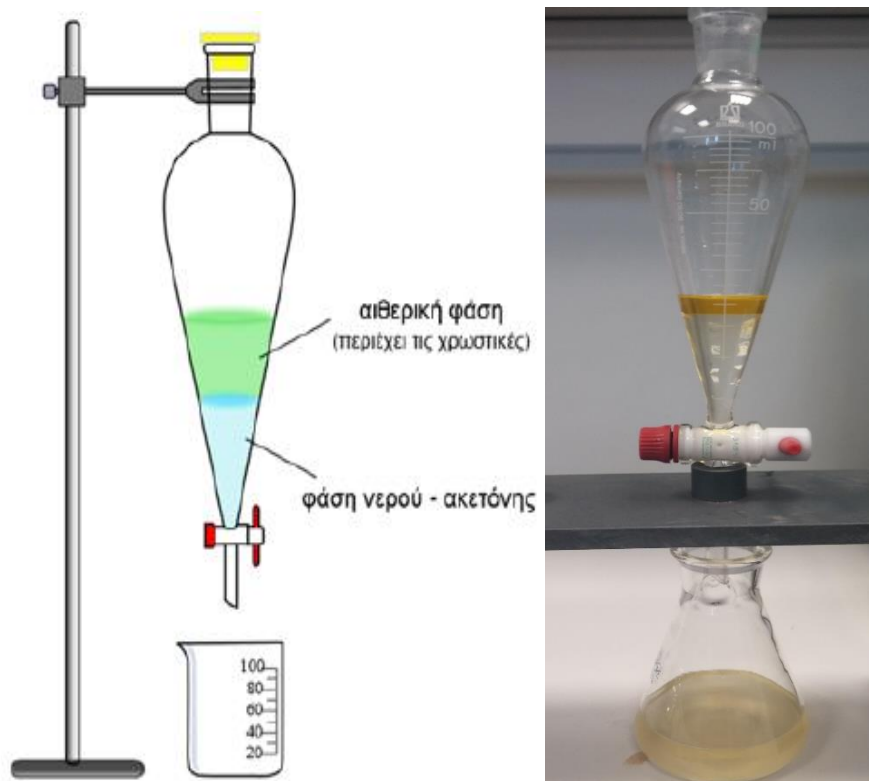
### 2.2.2.3 Στατιστική ανάλυση

Στις διαφορές στο Γοναδοσωματικό Δείκτη μεταξύ των ομάδων των αχινών κάθε δειγματοληψίας και των μαρτύρων, ο έλεγχος κανονικότητας απέτυχε, και εκτιμήθηκε εάν οι διαφορές μεταξύ των μέσω τιμών των διαφορετικών ομάδων είναι στατιστικά σημαντικές ή όχι, μέσω One-Way ANOVA on Ranks (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks). Ο προσδιορισμός των διαφορών έγινε με All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunn's Method). Οι διαφορές μεταξύ των δύο διαφορετικών σιτηρεσίων και μεταξύ των δύο τύπων υδάτων εκτροφής των αχινών, εκτιμήθηκαν με Two-Way ANOVA. Όλα τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Η πιθανότητα στατιστικής σημασίας ήταν  $P \leq 0,05$ . Όταν οι μέσες τιμές διέφεραν στατιστικά σημαντικά, χρησιμοποιήθηκε το Tukey's test για την ανάλυση των διαφορών. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος SigmaStat Version 3.5 για τα Windows.

#### 2.2.3.4 Εκχύλιση καροτενοειδών

Για την εκχύλιση-απομόνωση των χρωστικών οι γονάδες λειοτριβούνται παρουσία ενός εκχυλιστικού μέσου, το οποίο είναι ένας οργανικός διαλύτης στον οποίο διαλύονται οι λιπόφιλες χρωστικές. Τα καροτενοειδή γενικά, έχουν καλή διαλυτότητα σε μίγματα ακετόνης και ακετόνης/μεθανόλης. Εφόσον η ακετόνη και η μεθανόλη είναι αναμειγμένες με το νερό, αυτοί είναι οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται πιο συχνά για την εξαγωγή καροτενοειδών από βιολογικά υλικά που περιέχουν νερό. Τα καροτένια διαλύονται σε διαλύτες χαμηλής πολικότητας όπως το εξάνιο και η τολουΐνη (Schiedt & Liaaen-Jensen, 1995). Σημειώνεται ότι όλοι οι χειρισμοί πρέπει να εκτελούνται με ταχύτητα ούτως ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος καταστροφής ή ανεπιθύμητων αντιδράσεων από τις βλαπτικές συνέπειες του οξυγόνου, της ζέστης, του φωτός και του οξέος. Συγκεκριμένα, επειδή ανεπιθύμητες αντιδράσεις προωθούνται σε υψηλότερες θερμοκρασίες, η εξαγωγή των καροτενοειδών πρέπει να έρχεται εις πέρας στη χαμηλότερη πρακτικά θερμοκρασία, δηλαδή σε θερμοκρασία δωματίου ή χαμηλότερη.

Οι γονάδες από την ανατομία των αχινών, αφού ζυγίστηκαν, αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη (-20 °C για ανάλυση των καροτενοειδών. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε είναι αυτή που περιγράφηκε από τους Tsushima & Matsuno (1990). Τα καροτενοειδή εξήχθησαν με ακετόνη  $\geq 99,5\%$  σαν εκχυλιστικό μέσο, καθώς όπως προαναφέρθηκε, αναμιγνύεται καλά με το περιεχόμενο στα κύτταρα νερό χωρίς να δημιουργεί γαλάκτωμα. Οι γονάδες παρέμειναν σε ακετόνη για περίπου 30 λεπτά και ομογενοποιήθηκαν με την ακετόνη σε γουδί όσο γινόταν περισσότερο. Το διάλυμα συλλέχθηκε και έγινε επανάληψη της διαδικασίας όσες φορές χρειάστηκε έως ότου το διάλυμα της ακετόνης μετά την πολτοποίηση να ήταν διαφανές. Το ακετονικό διάλυμα φιλτραρίστηκε σε φίλτρα κυτταρίνης με μέγεθος πόρου 20-25  $\mu\text{m}$  (No 4, 90 mm διάμετρος, Whatman) για να απομακρυνθούν συσσωματώματα και υπολείμματα κυττάρων από τις γονάδες. Στη συνέχεια, για να ξεπλυθεί το διάλυμα από την ακετόνη, αναμίχθηκε ήπια με εξάνιο (n-hexane, > 99%) και νερό σε αναλογία 1:1 σε διαχωριστική χοάνη μέχρι να δημιουργηθούν δύο φάσεις (Εικόνα 2). Η άχρωμη υποκείμενη φάση νερού-ακετόνης απορρίφθηκε και η υπερκείμενη αιθερική φάση που περιείχε τα καροτενοειδή απομονώθηκε.



**Εικόνα 14:** Δημιουργία φάσεων και μεταφορά του εκχυλίσματος των καρτενοειδών σε εξάνιο.

Στη συνέχεια έγινε συγκέντρωση του εξαχθέντος διαλύματος σε περιστρεφόμενο εξατμιστήρα (Rotary evaporator) (Εικόνα 3) στους 40 °C και 30 στροφές/λεπτό. Η ποσότητα των καρτενοειδών ξεπλύθηκαν με 3 ml εξανίου και τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια BOD. Το διάλυμα φιλτραρίστηκε ξανά με φίλτρο σύριγγας από polytetrafluoroethylene (PTFE) πόρου 0,2 μm (13 mm διάμετρος, PTFE CR φίλτρα σύριγγας, Gelman).



**Εικόνα 15:** Ο Rotary evaporator που χρησιμοποιήθηκε για την συμπύκνωση των διαλυμάτων των καρτενοειδών.



**Εικόνα 16:** Φιλτράρισμα του τελικού διαλύματος των καροτενοειδών με φίλτρο σύριγγας πόρου 0,2 μm.



Η ίδια μεθοδολογία ακολουθήθηκε για την εκχύλιση καροτενοειδών και από κύβους τροφής των δύο σιτηρεσιών. Σαν δείγματα χρησιμοποιήθηκαν ένας κύβος τροφής του σιτηρεσίου M1 ο οποίος παρέμεινε για διάστημα δύο ημερών σε δεξαμενή και αντίστοιχα από το σιτηρέσιο A. Επιλέχθηκε η δειγματοληψία από τους κύβους των τροφών για να διερευνηθεί το ενδεχόμενο κατά την παραμονή των κύβων στο νερό των δεξαμενών και τη σταδιακή μείωση της συνοχής τους, να αποβάλλεται μέρος της β-καροτίνης η οποία είχε προστεθεί σε μορφή ελαίου (στη βιβλιογραφία χρησιμοποιείται σε μορφή σκόνης, βλ. Ενότητα 1, παρ. 2.2) στο μίγμα του σιτηρεσίου M1, άρα να μην αξιοποιείται από τους αχινούς.

Τέλος, μετρήθηκε στο φασματοφωτόμετρο η απορρόφηση των διαλυμάτων στα 445, 450, 459 και 473 nm. Επιλέχθηκε η μέτρηση της απορρόφησης στα αναφερόμενα μήκη κύματος, με σκοπό να εκτιμηθεί η συγκέντρωση των ολικών καροτενοειδών βάσει των συγκεκριμένων καροτενοειδών που μας ενδιαφέρουν στην προκειμένη περίπτωση. Τα καροτενοειδή αυτά είναι η εχινενόνη που ευθύνεται για το χρωματισμό των γονάδων, η β-καροτίνη ως ο μεταβολικός πρόδρομος της εχινενόνης και η ισοκρυπτοξανθίνη η οποία συμβάλλει στη μεταβολική διεργασία της μετατροπής της β-καροτίνης σε εχινενόνη (παρ. 2.2.1.2). Βάσει της βιβλιογραφίας, η β-καροτίνη σε διαλύτη εξανίου παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 449,9 nm (δεδομένα SCOR WG 78) και η εχινενόνη σε διαλύτη εξανίου παρουσιάζει μέγιστο στα 459 nm (Davies, 1976). Σύμφωνα με τους Plank et al. (2002), η μέτρηση των απορροφήσεων στα 445 nm εξυπηρετεί τον εντοπισμό της εχινενόνης, της β-καροτίνης, των λουτεΐνη και ζεαξανθίνη, ενώ και στην παρούσα εργασία αποδόθηκαν καλά αποτελέσματα κατά τις προκαταρκτικές δοκιμές, οπότε η μέτρηση στα 445 nm εφαρμόστηκε και στα δείγματα του πειράματος. Τέλος, οι Shina et al. (1978) εντόπισαν μέγιστο απορρόφησης της ισοκρυπτοξανθίνης στα 450 και 473 nm. Η τεχνική της TLC η οποία περιγράφεται εισαγωγικά, λόγω χρονικού περιορισμού δεν περιλαμβάνεται στην παρούσα εργασία, ωστόσο θα πραγματοποιηθεί για την ταυτοποίηση των καροτενοειδών που υπάρχουν στα δείγματα.



**Εικόνα 17:** Το φασματοφωτόμετρο στο οποίο πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της απορρόφησης των διαλυμάτων των καρτενοειδών.

### Υπολογισμός συγκέντρωσης ολικών καρτενοειδών

Η συγκέντρωση των ολικών καρτενοειδών η οποία αποδίδεται σαν  $\mu\text{g/g}$  υγρού βάρους των γονάδων, υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$x (\mu\text{g/g}) = \frac{A * y (\text{ml}) * 10^4}{A_{1\text{cm}}^{1\%} * B}$$

Όπου  $x$  : η συγκέντρωση των καρτενοειδών

$A$  : η απορρόφηση στο μήκος κύματος

$y$  : ο όγκος του διαλύματος

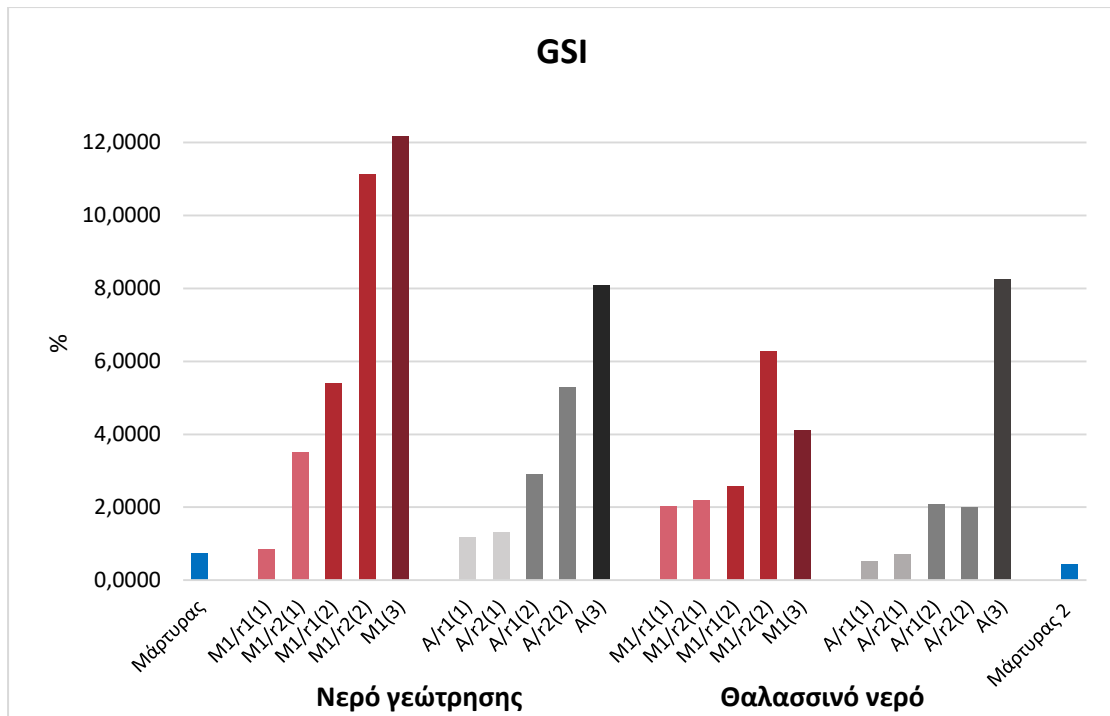
$A_{1\text{cm}}^{1\%}$  : ο συντελεστής απορρόφησης του καρτενοειδούς στο συγκεκριμένο διαλύτη  
(εδώ  $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 2500$ )

$B$  : το βάρος του δείγματος

## 2.2.3 Αποτελέσματα

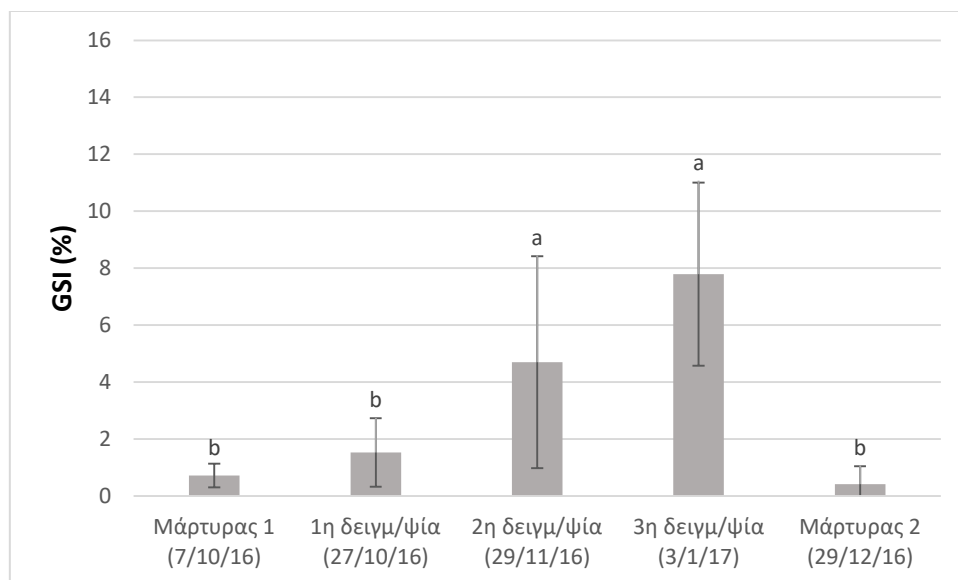
### 2.2.3.1 Γοναδοσωματικός δείκτης (GSI)

Στο Γράφημα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του υπολογισμού του Γοναδοσωματικού Δείκτη από τις δειγματοληψίες κατά την εξέλιξη του πειράματος, καθώς κι από τους μάρτυρες. Φαίνεται ότι η διατροφή με τεχνητά σιτηρέσια είχε σαν αποτέλεσμα την γρήγορη ανάπτυξη των γονάδων, ενώ όσο μεγαλύτερο ήταν το διάστημα που οι αχινοί διατρέφονταν με αυτά, τόσο μεγαλύτερη ήταν η γοναδική αύξηση.



**Γράφημα 3:** Τα αποτελέσματα του Γοναδοσωματικού Δείκτη. Στον τίτλο του οριζόντιου άξονα αναφέρονται για κάθε στήλη το σιτηρέσιο (M1, A), η επανάληψη (r1, r2), και η δειγματοληψία στην παρένθεση (1, 2 ή 3).

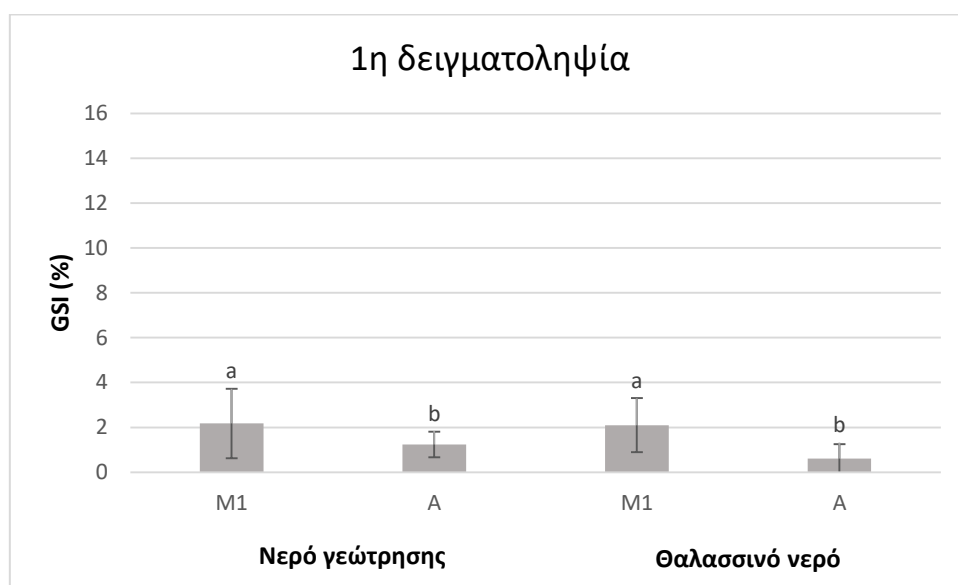
Στο Γράφημα 4 παρατίθενται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης συνολικά για όλα τα άτομα των αχιών ανά δειγματοληψία και σε σύγκριση με τους μάρτυρες.



**Γράφημα 4:** Ο μέσος ( $\pm$  SD) Γοναδοσωματικός Δείκτης (GSI) ανά δειγματοληψία του πειράματος και από τις ομάδες των μαρτύρων. Ο διαφορετικός γραμματικός δείκτης υποδεικνύει τις στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P \leq 0,05$ ) στο ποσοστό του GSI μεταξύ των δειγματοληψιών (One-Way ANOVA on Ranks).

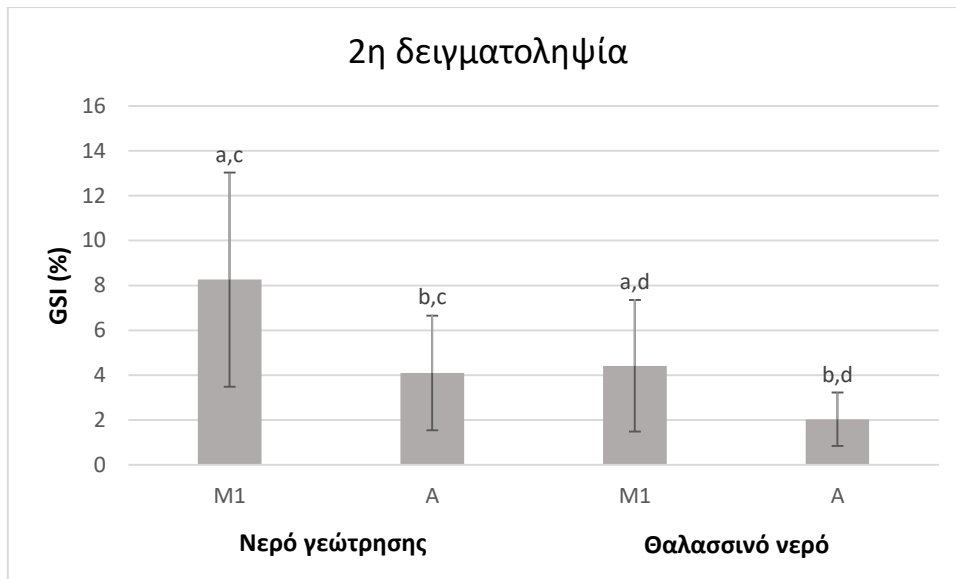
Προκύπτει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P < 0,001$ ) μεταξύ του μέσου όρου του Γοναδοσωματικού Δείκτη όλων των ατόμων της 2<sup>ης</sup> και της 3<sup>ης</sup> δειγματοληψίας σε σχέση με τους μάρτυρες, επίσης μεταξύ της 3<sup>ης</sup> και της 1<sup>ης</sup> δειγματοληψίας και μεταξύ της 2<sup>ης</sup> και της 1<sup>ης</sup> δειγματοληψίας.

Στα Γραφήματα 5-7 παρατίθενται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης από τη σύγκριση μεταξύ των χειρισμών για κάθε δειγματοληψία ξεχωριστά και περιγράφονται οι παράγοντες μεταξύ των οποίων υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά.



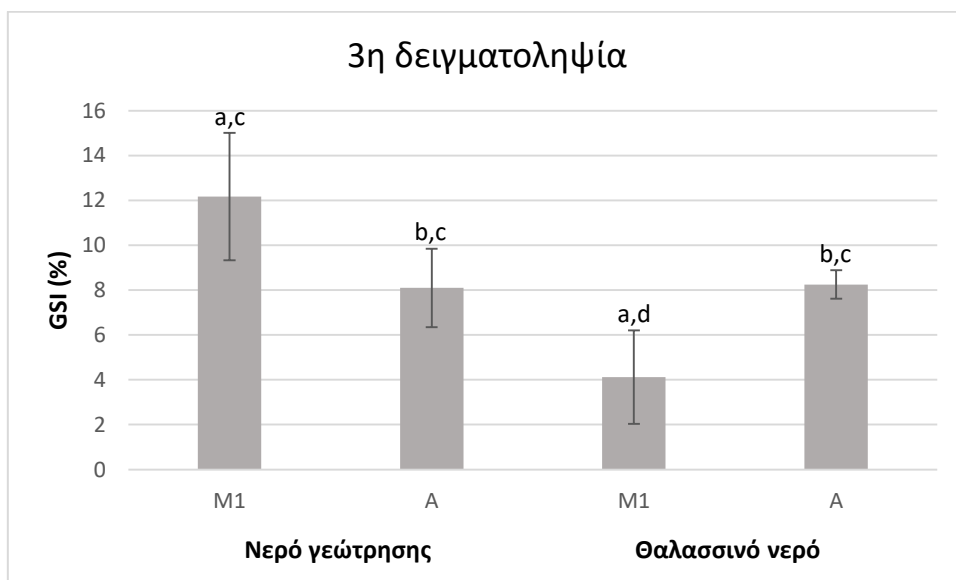
**Γράφημα 5:** Ο μέσος ( $\pm$  SD) Γοναδοσωματικός Δείκτης (GSI) της 1ης δειγματοληψίας κάθε ομάδας αχινών, ανά σιτηρέσιο και τύπο ύδατος. Ο διαφορετικός γραμματικός δείκτης υποδεικνύει τις στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P \leq 0,05$ ) στο ποσοστό του GSI μεταξύ των παραγόντων (Two-Way ANOVA).

Παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στο Γοναδοσωματικό Δείκτη μεταξύ των δύο τύπων σιτηρεσίων ( $P = 0,012$ ), ανεξάρτητα από το είδος του νερού εκτροφής.



**Γράφημα 6:** Ο μέσος ( $\pm$  SD) Γοναδοσωματικός Δείκτης (GSI) της 2ης δειγματοληψίας κάθε ομάδας αχινών, ανά σιτηρέσιο και τύπο ύδατος. Ο διαφορετικός γραμματικός δείκτης υποδεικνύει τις στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P \leq 0,05$ ) στο ποσοστό του GSI μεταξύ των παραγόντων (Two-Way ANOVA).

Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P = 0,019$ ) μεταξύ των 2 σιτηρεσίων και επίσης μεταξύ των 2 τύπων υδάτων ( $P = 0,032$ ). Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των παραγόντων των σιτηρεσίων και της ποιότητας του νερού ( $P = 0,495$ ), δηλαδή οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των σιτηρεσίων δεν εξαρτώνται από το είδος του νερού εκτροφής, συνεπώς δεν υπάρχει αλληλεπίδραση.

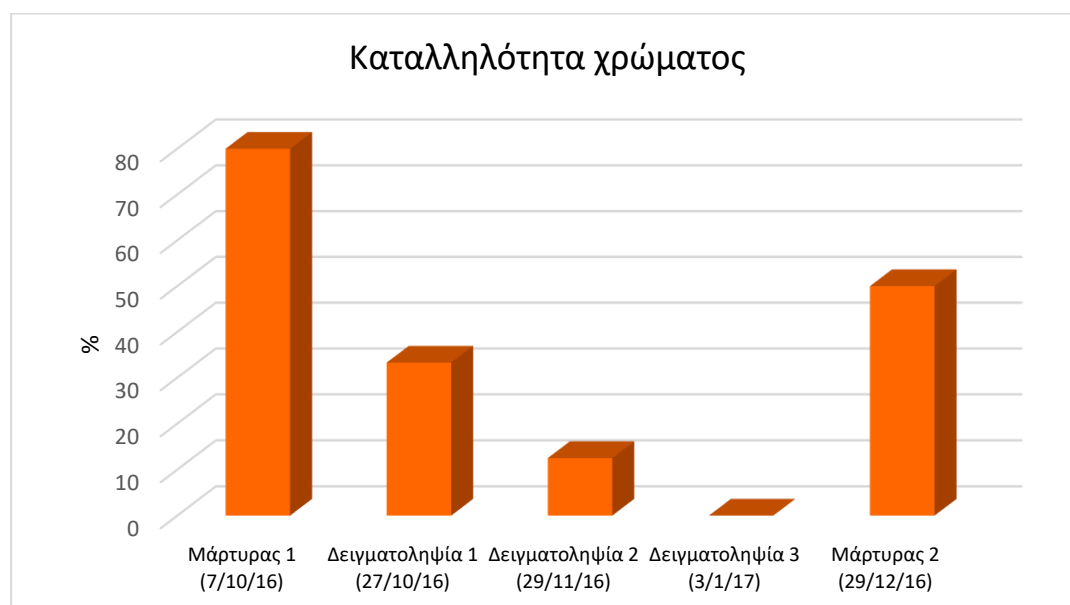


**Γράφημα 7:** Ο μέσος ( $\pm$  SD) Γοναδοσωματικός Δείκτης (GSI) της 3ης δειγματοληψίας κάθε ομάδας αχινών, ανά σιτηρέσιο και τύπο ύδατος. Ο διαφορετικός γραμματικός δείκτης υποδεικνύει τις στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P \leq 0,05$ ) στο ποσοστό του GSI μεταξύ των παραγόντων (Two-Way ANOVA).

Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P = 0,002$ ) μεταξύ των δύο τύπων υδάτων όσον αφορά την ανάμικτη τροφή (M1), ενώ δεν παρατηρείται το ίδιο για τη ζωικής προέλευσης τροφή (A). Επίσης υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο τύπων σιτηρεσιών όσον αφορά το νερό γεώτρησης ( $P = 0,046$ ) και το θαλασσινό νερό ( $P = 0,029$ ). Φαίνεται ότι η επίδραση του κάθε σιτηρεσίου στο GSI εξαρτάται από το είδος του νερού στο οποίο γίνεται η εκτροφή, με την ύπαρξη στατιστικά σημαντικής αλληλεπίδρασης ( $P = 0,008$ ) μεταξύ των δύο παραγόντων (σιτηρέσια και τύποι υδάτων).

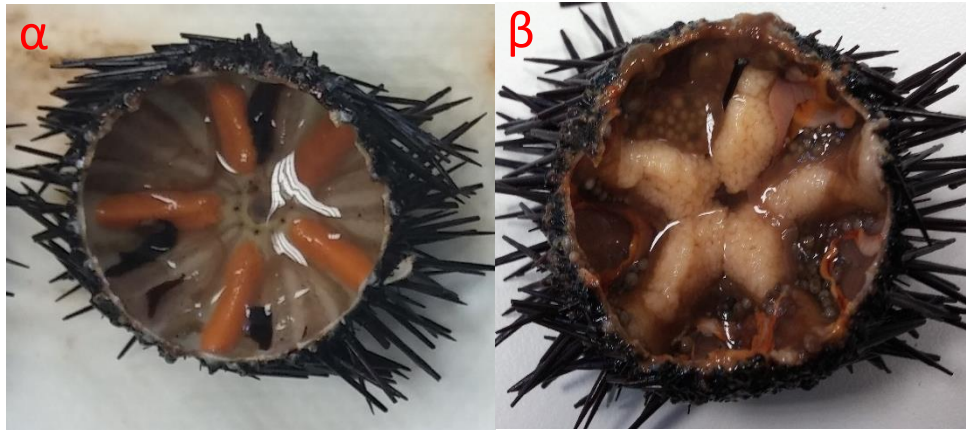
### 2.2.3.2 Χρώμα γονάδων – Ανάλυση καρτενοειδών

Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζεται σε ποσοστό επί του συνόλου ο αριθμός των αχινών που σε κάθε δειγματοληψία κρίθηκε ότι χαρακτηρίζεται από το κατάλληλο χρώμα στις γονάδες σύμφωνα με την εκτίμηση από τον οπτικό έλεγχο.



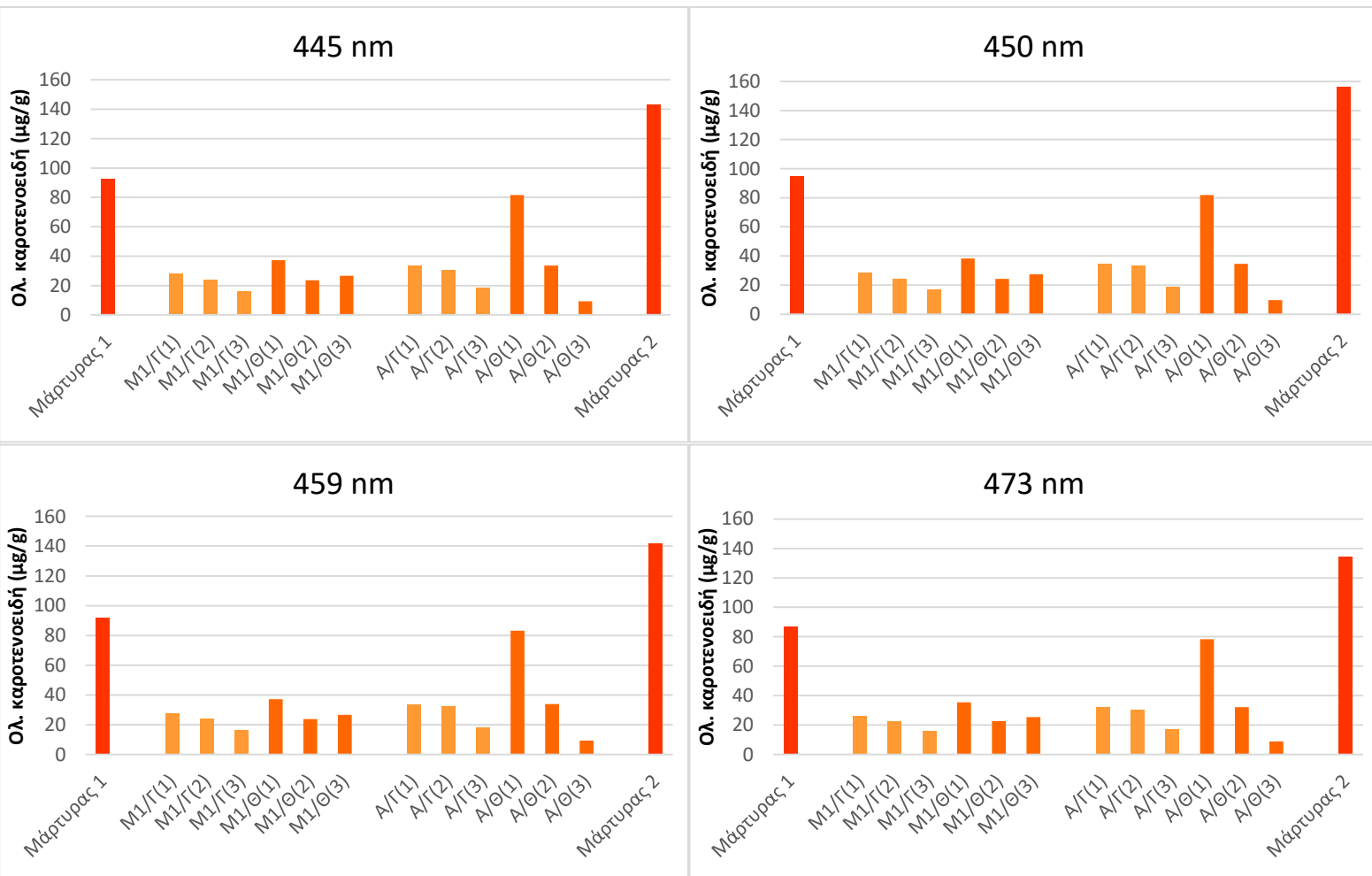
**Γράφημα 8:** Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης του ποσοστού των αχινών που χαρακτηρίστηκαν με κατάλληλο χρώμα στις γονάδες.

Φαίνεται ότι όσο αυξάνεται ο όγκος των γονάδων, τόσο μειώνεται ο αριθμός των ατόμων που τα χαρακτηρίζει το κατάλληλο χρώμα, με τις γονάδες της πλειοψηφίας των αχινών να χαρακτηρίζονται από χλωμό χρώμα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συνολικά ανά δειγματοληψία, χωρίς να γίνεται κάποιος διαχωρισμός μεταξύ των δύο σιτηρεσιών και μεταξύ των δύο τύπων νερού εκτροφής, γιατί δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στα επίπεδα του χρώματος.



**Εικόνα 18:** α) Το επιθυμητό χρώμα στις γονάδες, β) Ακατάλληλο εμπορικά χρώμα.

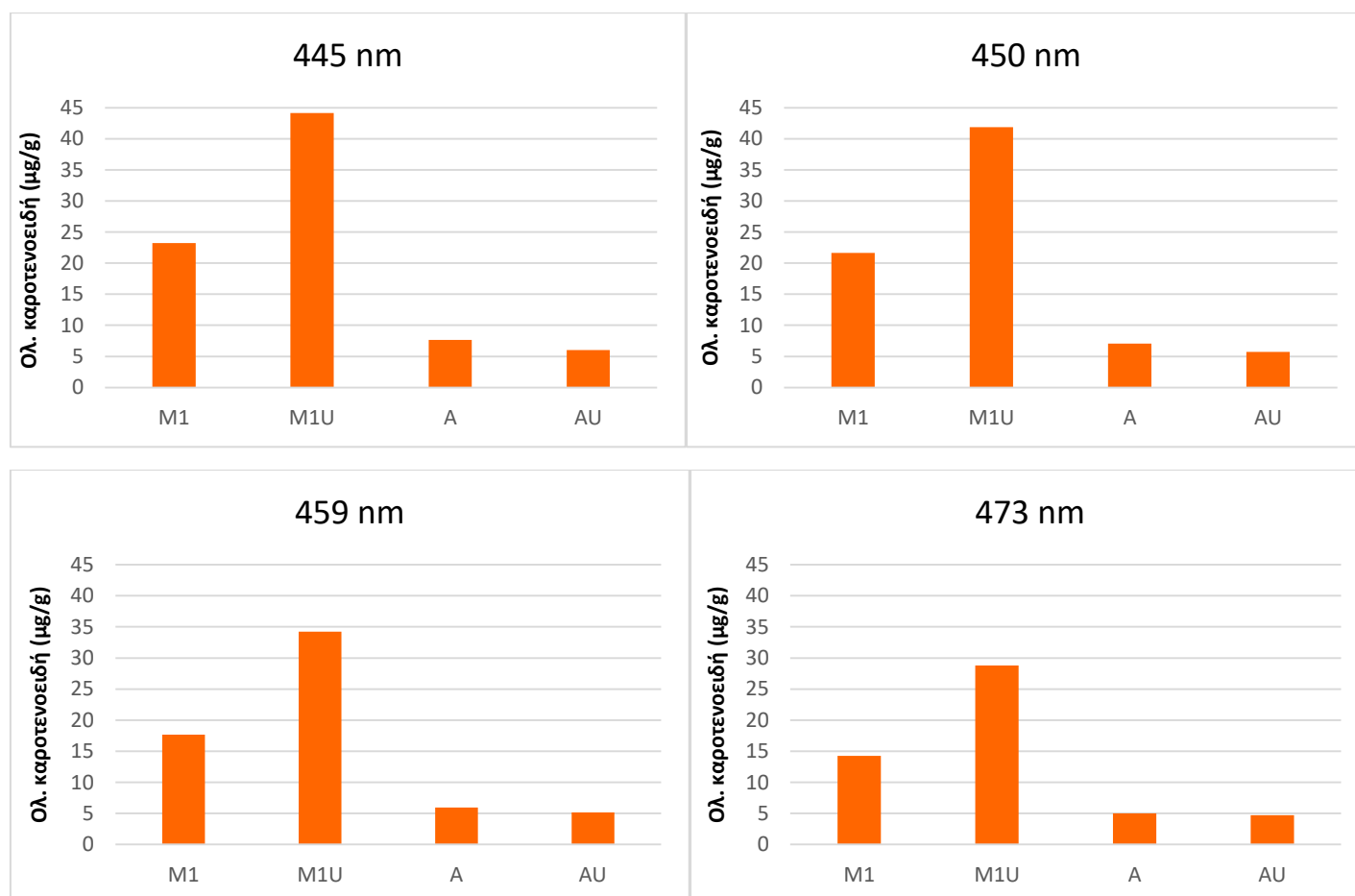
Στα παρακάτω γραφήματα (Γραφήματα 9-12) παρουσιάζεται η ποσότητα (μg/g) των ολικών καροτενοειδών των δειγμάτων των γονάδων, που υπολογίστηκε βάσει της απορρόφησής τους στα επιλεγμένα μήκη κύματος. Οι στήλες των γραφημάτων αφορούν τον μέσο όρο των αποτελεσμάτων ανά χειρισμό και ανά δειγματοληψία.



**Γραφήματα 9 - 12:** Η ποσότητα των ολικών καροτενοειδών (μg/g) των γονάδων σε κάθε μήκος κύματος που μετρήθηκε. M1/Γ: σιτηρέσιο M1 σε νερό γεώτρησης, M1/Θ: σιτηρέσιο M1 σε θαλασσινό νερό, A/Γ: σιτηρέσιο A σε νερό γεώτρησης, A/Θ: σιτηρέσιο A σε θαλασσινό νερό. Ο αριθμός στην παρένθεση αντιστοιχεί στη δειγματοληψία.

Σε γενικές γραμμές φαίνεται ότι δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των μηκών κύματος στα οποία μετρήθηκε η απορρόφηση, ενώ τα γραφήματα παρουσιάζουν το ίδιο μοτίβο που παρατηρήθηκε και από την οπτική παρατήρηση του χρώματος των γονάδων: η ποσότητα των ολικών καροτενοειδών τείνει να μειώνεται όσο αυξάνεται το χρονικό διάστημα που οι αχινοί διατρέφονται με τα τεχνητά σιτηρέσια, όπως μειώνεται και το ποσοστό των αχινών που χαρακτηρίζονται από το κατάλληλο χρώμα γονάδων σε κάθε δειγματοληψία.

Στα Γραφήματα 13-16 παρουσιάζεται η ποσότητα (μg/g) των ολικών καροτενοειδών των δειγμάτων των κύβων των τροφών, που υπολογίστηκε βάσει της απορρόφησής τους στα επιλεγμένα μήκη κύματος.



**Γραφήματα 13 - 16:** Η ποσότητα των ολικών καροτενοειδών (μg/g) των δειγμάτων από τους κύβους των τροφών σε κάθε μήκος κύματος που μετρήθηκε. Ο χαρακτήρας U υποδηλώνει τους κύβους τροφής στους οποίους πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των καροτενοειδών μετά της παραμονή τους για 2 ημέρες στις δεξαμενές.



Φαίνεται ότι δεν υπάρχει μείωση των ολικών καροτενοειδών που περιέχονται στις τροφές, με την παραμονή των κύβων τροφής στις δεξαμενές λόγω της σταδιακής αποσύνθεσής τους, άρα πιθανώς πρέπει να προσεγγιστεί διαφορετικά το πρόβλημα ότι η προσθήκη β-καροτίνης στη σύνθεση του σιτηρεσίου M1 δεν απέδωσε διαφορετικό αποτέλεσμα στο χρώμα των γονάδων σε σχέση με το σιτηρέσιο A.

## **2.2.4 Συζήτηση**

### **2.2.4.1 Αύξηση μάζας γονάδων - Γοναδοσωματικός Δείκτης**

Η γοναδική παραγωγή γενικά εξαρτάται από την πρόσληψη τροφής, το ρυθμό κατανάλωσης, τον αναπαραγωγικό κύκλο, την εποχή και τη θερμοκρασία (Moore, 1966 και Lawrence & Lane, 1982 σε Catarino et al., 2012, Liyana-Pathirana et al. 2002, Hughes et al. 2006, Siikanuorio & Mortensen 2008). Τα αποτελέσματα του πειράματος συμφωνούν με αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών σε διάφορα είδη Εχινοειδών, με το Γοναδοσωματικό Δείκτη των αχινών που διατρέφονται με τεχνητά σιτηρέσια να εμφανίζεται σημαντικά αυξημένος σε σύγκριση με αχινοί που η διατροφή τους αποτελείται από φύκη (Lawrence et al., 1991, Lawrence et al., 1997, Klinger et al., 1997, Spirlet et al., 2001, Pearce et al., 2003, Shrigel et al., 2005). Στην παρούσα εργασία, η μάζα των γονάδων αυξήθηκε σημαντικά σε διάστημα μόλις τριών μηνών σε σχέση με αυτή αχινών του φυσικού περιβάλλοντος, ενώ με τη δειγματοληψία και δεύτερου μάρτυρα κατά τη λήξη του πειράματος, αποκλείστηκε η πιθανότητα η ανάπτυξη αυτή να οφείλεται σε διαφορετική φάση του αναπαραγωγικού κύκλου λόγω του χρονικού διαστήματος που μεσολάβησε. Επίσης, δεν παρατηρείται αναστολή της γοναδικής ανάπτυξης λόγω των επιπέδων του pH, όπως έχει καταγραφεί για άλλα είδη αχινών όπως το *Hemicentrotus pulcherrimus* σε pH επίσης 7,8 (βλ. Ενότητα 3, παρ. 1.2), πιθανώς γιατί η έκθεση σε αυτό το pH δεν ήταν μακρόχρονη. Παρά το γεγονός ότι οι δύο τροφές που παρασκευάστηκαν περιείχαν διαφορετικό ποσοστό πρωτεΐνης, έδωσαν εξίσου καλά αποτελέσματα στην ανάπτυξη των γονάδων, ενώ καταναλώνονταν το ίδιο πρόθυμα από τους αχινοί. Συνεπώς φαίνεται ότι μια ανάμικτη διατροφή υδατανθράκων-πρωτεΐνης μπορεί να δώσει τα επιθυμητά αποτελέσματα με μια διατροφή 100% πρωτεΐνης, με μικρότερο κόστος. Επίσης, η μορφή της τροφής (κύβοι) φαίνεται ότι εξυπηρέτησε τις ανάγκες των αχινών παρέχοντάς τους τη δυνατότητα να τη χειριστούν εύκολα (Klinger, 1982, Spirlet et al., 2001), τουλάχιστον στο ειδικό δοχείο που ήταν τοποθετημένοι, αν και το μέγεθος των κύβων θα έπρεπε να είναι μεγαλύτερο (πλευράς 1 cm όπως σχεδιάστηκαν αρχικά) καθώς αρκετά άτομα είχαν καταναλώσει εξ' ολοκλήρου την τροφή έως την παροχή νέας, όπως αναφέρθηκε και στη Συζήτηση της Ενότητας 1. Ωστόσο ο χλωμός χρωματισμός των γονάδων των αχινών, τις κάνει εμπορικά μη αποδεκτές (Lawrence et al., 1995, Robinson & Colborne, 1998, Watts et al., 1998, McLaughlin & Kelly, 2001).

#### 2.2.4.2 Χρώμα γονάδων

Γενικά, τα είδη και οι συγκεντρώσεις των καροτενοειδών στις γονάδες των Εχινόδερμων ποικίλλουν με την εποχή και την τοποθεσία ενδοειδικά και διαειδικά. Έτσι, το χρώμα των γονάδων άγριων πληθυσμών του *P. lividus* ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό (ακόμα και από άτομα που συλλέχθηκαν την ίδια ημέρα στην ίδια τοποθεσία) και μπορεί να ποικίλλει από πολύ αχνό κίτρινο έως σκούρο καφέ/κόκκινο (Symonds et al., 2007). Ωστόσο, και οι πολύ χλωμές και οι πολύ σκούρες γονάδες είναι ανεπιθύμητες στην αγορά. Όπως έχει αναφερθεί, η διατροφή με φύκη έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχημένα στη βελτίωση του χρώματος των γονάδων (Vadas et al., 2000, Robinson et al., 2002) και έχει καταγραφεί επιτυχία κατά την παροχή του προδρόμου της εχινένονης, της β-καροτίνης σαν μέρος τεχνητής τροφής (Robinson et al., 2002, Shrigel et al., 2005). Παρόλα αυτά, στην παρούσα εργασία, παρά τον εμπλουτισμό του σιτηρεσίου M1 με φυσικό προϊόν β-καροτίνης από το μικροφύκος *Dunaliella salina*, δεν παρατηρήθηκε καμία βελτίωση του χρώματος σε σχέση με το σιτηρέσιο A το οποίο δεν περιείχε καροτενοειδή. Το γεγονός ότι η β-καροτίνη προστέθηκε σε μορφή ελαίου και όχι σκόνης δημιούργησε προβληματισμό όσον αφορά την πιθανότητα το έλαιο να διαφεύγει ευκολότερα στο νερό κατά τη διάσπαση των κύβων της τροφής από το νερό και από το ρίνισμα των αχινών σε σχέση με τη σκόνη, και άρα να μην αξιοποιείται από τους αχινούς. Ωστόσο η ανάλυση των καροτενοειδών από τους κύβους της τροφής δεν έδειξε να υπάρχει απώλεια καροτενοειδών λόγω της παραμονής της τροφής στο νερό. Επομένως πιθανολογείται ότι είτε η ποσότητα β-καροτίνης που προσετέθη στην τροφή δεν ήταν επαρκής, είτε ότι το χρονικό διάστημα διεξαγωγής του πειράματος δεν ήταν αρκετό και/ή η γοναδική μάζα αυξήθηκε απότομα, οπότε η προσθήκη β-καροτίνης δεν «εκφράστηκε» σε χρώμα στις γονάδες, και το χρώμα μπορεί να βελτιωνόταν με την πάροδο του χρόνου και/ή όταν η μάζα των γονάδων σταθεροποιούνταν.

#### 2.2.4.3 Παρατηρήσεις κατά τη διεξαγωγή του πειράματος

Εντός 10 ημερών διεξαγωγής του πειράματος, διαπιστώθηκε ότι άτομα που εκτρέφονταν σε νερό γεώτρησης και με τα δύο σιτηρέσια (σε μικρότερο βαθμό στο χειρισμό 3 rep.2), άρχισαν να αποβάλλουν αγκάθια, και αυτό διατηρήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, με σταδιακά μεγαλύτερο αριθμό ατόμων να παρατηρείται ότι ρίχνουν τα αγκάθια τους. Εξετάστηκε το ενδεχόμενο το φαινόμενο αυτό να οφείλεται σε διακύμανση του pH (παροδική μείωσή του) λόγω του αδειάσματος των δεξαμενών για τον καθαρισμό τους σε κάθε τάισμα. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις του pH πριν το άδειασμα των δεξαμενών και μετά, και διαπιστώθηκε ότι το pH στις δεξαμενές με παροχή θαλασσινού νερού δεν παρουσίαζε κάποια αλλαγή, ενώ στις δεξαμενές με παροχή νερού γεώτρησης, τα επίπεδα του pH παρουσίαζαν μια μείωση 0,1 U, έως ότου σταθεροποιηθεί ξανά μετά το γέμισμα των δεξαμενών. Το ζήτημα αναλύεται πιο λεπτομερώς στην Ενότητα 3 με πείραμα εκτροφής αχινών σε νερό γεώτρησης υψηλότερου pH (8,1), πάντως φαίνεται ότι αυτή η παροδική μείωση του pH πιθανώς είναι αμελητέα σε σχέση με άλλους παράγοντες ειδικά εφόσον το φαινόμενο παρατηρήθηκε και σε άλλες δεξαμενές του Ενωδρείου.

Αν και απώλεια αγκαθιών παρατηρήθηκε μόνο σε αχινούς που εκτρέφονταν σε νερό γεώτρησης, η εκδήλωση της ασθένειας με την εμφάνιση πληγών σε συνολικά 7 άτομα, παρατηρήθηκε σε όλους τους χειρισμούς, ανεξάρτητα από το νερό εκτροφής και τον τύπο σιτηρεσίου. Το γεγονός ότι η ασθένεια δεν εκδηλώθηκε μαζικά όπως στα αρχικά πειράματα διατροφής, πιθανώς αποδίδεται στον πολύ μικρότερο αριθμό ατόμων ανά δεξαμενή και άρα

στην περιορισμένη συνολική ποσότητα τροφής στις δεξαμενές. Με τα αποτελέσματα και τις παρατηρήσεις από το παρόν πείραμα, φαίνεται ότι ενώ η εκδήλωση της ασθένειας είναι ανεξάρτητη από το είδος του νερού και πιθανότατα σχετίζεται με τη χρήση τεχνητών σιτηρεσίων στη διατροφή, η υποβάθμιση των σκελετικών στοιχείων που εκδηλώνεται με την απώλεια αγκαθιών αποτελεί χαρακτηριστικό αποκλειστικά των ατόμων που εκτρέφονται σε νερό γεώτρησης. Συνεπώς απαιτείται:

- Η διερεύνηση των αιτιών εκδήλωσης της ασθένειας, κάτι το οποίο βρίσκεται σε εξέλιξη.
- Πειράματα σχεδιασμένα για να προσεγγιστεί ή και να προσδιοριστούν οι αιτίες του φαινομένου της υποβάθμισης των σκελετικών στοιχείων των αχινών που εκτρέφονται σε νερό γεώτρησης, με έλεγχο της επίδρασης διαφορετικών επιπέδων pH και έλεγχο της συνολικής ποιότητας του νερού και των χημικών χαρακτηριστικών του.
- Συνολική βελτίωση της σύνθεσης των τεχνητών σιτηρεσίων, ούτως ώστε να αποκτήσουν ικανοποιητικότερη συνοχή κατά την παραμονή τους στο νερό και να περιορίζεται η προσβολή από μικροοργανισμούς που πιθανώς συμβάλλουν στην εκδήλωση ασθενειών.

## **2.3 3<sup>η</sup> ΕΝΟΤΗΤΑ: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΝΕΡΟΥ ΓΕΩΤΡΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΟΥ ΑΧΙΝΟΥ**

### **2.3.1 Επιπτώσεις του χαμηλού pH στους θαλάσσιους οργανισμούς (Οξίνιση των ωκεανών)**

Οι συνεχώς αυξανόμενες ανθρωπογενείς δραστηριότητες αυξάνουν τα επίπεδα CO<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα τροποποιώντας τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της. Το θαλασσινό νερό προσλαμβάνει το συνεχώς αυξανόμενο CO<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα, με συνέπεια την αύξηση της επιφανειακής θερμοκρασίας του νερού (0,3 – 0,4 U, IPCC 2007) και τη μείωση του pH. Το πλεόνασμα του ατμοσφαιρικού CO<sub>2</sub> διαλύεται στο θαλασσινό νερό, σχηματίζοντας ανθρακικό οξύ, το οποίο συντελεί στη δημιουργία ισοζυγίου ιόντων υδρογόνου, διττανθρακικών ιόντων και ανθρακικού άλατος. Η συνεχής πρόσληψη CO<sub>2</sub> από τους ωκεανούς αυξάνει την συγκέντρωση ιόντων υδρογόνου και επομένως μειώνει το pH (Dupont et al., 2010). Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως οξίνιση των ωκεανών. Από την βιομηχανική επανάσταση, το pH του επιφανειακού στρώματος των ωκεανών έχει μειωθεί περίπου 0,1 U (από ~8,2 σε ~8,1). Στο κοντινό μέλλον αναμένεται να μειωθεί 0,3-0,5 U έως το 2100 και 0,7-0,8 έως το 2300 (Caldeira & Wickett, 2003, 2005, IPCC 2007, Zeebe et al., 2008, Zeebe, 2012), γεγονός που αποτελεί μια δραστική αλλαγή που σίγουρα θα επηρεάσει την ποιοτική και ποσοτική σύσταση των οικοσυστημάτων και των οργανισμών που ζουν σε αυτά.

Με την αύξηση του CO<sub>2</sub> και τη μείωση του pH, η συγκέντρωση των ανθρακικών ιόντων (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) μειώνεται, ενώ αυτή των διττανθρακικών ιόντων (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) αυξάνεται. Η μείωση των ανθρακικών ιόντων, προκαλεί μείωση της σταθερότητας του ανθρακικού ασβεστίου (CaCO<sub>3</sub>), το οποίο χρησιμοποιείται από πολλούς θαλάσσιους οργανισμούς για την οικοδόμηση σκελετών και κελυφών. Επιπλέον, επιταχύνει το ρυθμό διάλυσης του ανθρακικού ασβεστίου (CaCO<sub>3</sub>) των σκελετών ή κελυφών, ο οποίος, ως γνωστόν (Mucci, 1983), εξαρτάται από την κρυσταλλική μορφή του CaCO<sub>3</sub>: ο αραγωνίτης (που βρίσκεται στα κοράλλια και τα μαλάκια) είναι δύο φορές πιο διαλυτός από τον ασβεστίτη (που βρίσκεται στα καρκινοειδή). Έρευνες σε μικρή (εργαστήρια) και μεγάλη κλίμακα (μεσόκοσμοι και εν πλω), υποδεικνύουν ότι πολλοί θαλάσσιοι οργανισμοί αντιδρούν σε αλλαγές στη γεωχημεία του περιβάλλοντός τους και οι οποίες αναμένεται να συμβούν μέχρι το τέλος του αιώνα (π.χ., Raven et al., 2005, Gattuso & Hansson, 2011 σε Zeebe, 2012). Για παράδειγμα, συχνά, ασβεστοποιητικοί οργανισμοί παράγουν λιγότερο CaCO<sub>3</sub>, ενώ κάποιοι μπορεί να παράγουν περισσότερο οργανικό άνθρακα. Βάσει των συμπερασμάτων τέτοιων πειραμάτων, αναμένονται πιθανώς σημαντικές αλλαγές στη δομή οικοσυστημάτων (Zeebe, 2012), χωρίς να παραβλέπεται ότι σε μια χρονική κλίμακα αιώνων, οι πραγματικές μελλοντικές επιπτώσεις στους θαλάσσιους οργανισμούς και η απόκρισή τους μπορεί να διαφέρουν.

Εκτός από την ασβεστοποίηση (calcification), η έκθεση των θαλάσσιων οργανισμών σε συνθήκες υψηλού CO<sub>2</sub> (environmental hypercapnia) μπορεί να περιορίσει τις μεταβολικές τους διεργασίες (Pörtner, 2008, Melzner et al., 2009) καθώς και τους ρυθμούς ανάπτυξης και τη γονιμότητά τους (Doney et al., 2009, Fabry et al., 2008, Pörtner, 2008, Melzner et al., 2009, Hofmann et al., 2010, Hofmann & Todgham, 2010). Τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια κάποιων θαλάσσιων οργανισμών εμφανίζουν αναπτυξιακές διαταραχές όταν αναπτύσσονται σε θαλασσινό νερό χαμηλού pH όπως ελαττωματική εμβρυογένεση, μείωση στο μέγεθος των προνυμφών και/ή καθυστέρηση στην ανάπτυξή τους (Kurihara, 2008, Dupont et al., 2010).

Στα ενήλικα άτομα, δεν έχουν μέχρι στιγμής αναφερθεί σημαντικές επιπτώσεις της οξίνισης των ωκεανών, αλλά είναι δύσκολη η εκτίμηση και η καταγραφή τους (Kroeker et al., 2010). Επιπλέον υπάρχουν αποδείξεις ότι ακόμα και σε στενά συγγενικά είδη και/ή σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης, υπάρχει διαφορετική απόκριση στα επίπεδα του pH που προβλέπονται για το εγγύς μέλλον, λόγω της οξίνισης των ωκεανών (Melzner et al., 2009, Ries et al., 2009, Dupont et al., 2010).

Η διατήρηση του εξωκυττάριου pH θεωρείται κρίσιμη για την προστασία των οργανισμών από τις διαταραχές που επιφέρει η υπερκαπνία (Heisler, 1989, Seibel & Walsh, 2003, Pörtner, 2008). Ένας από τους βασικούς μηχανισμούς ρύθμισης της συγκέντρωσης οξέος-βάσης είναι η ενεργή ιοντική μεταφορά που επιτυγχάνεται μέσω εξειδικευμένων επιθηλίων όπως τα βράγχια και οι νεφρικοί ή πεπτικοί ιστοί, δηλαδή η ωσμωρύθμιση (Whiteley et al., 2001, Seibel & Walsh, 2003, Pane & Barry, 2007, Melzner et al., 2009). Υπομεταβολικοί και οσμωσυμμορφωτές οργανισμοί θεωρητικά είναι λιγότερο ικανοί να ανταπεξέλθουν στις επιπτώσεις της οξίνισης των ωκεανών, επειδή στερούνται ιοντορυθμιστικού μηχανισμού που θα προστάτευε τα φυσιολογικά υγρά από την υπερκαπνία (Pane & Barry, 2007, Pörtner, 2008, Melzner et al., 2009). Η παραδοχή αυτή πιθανώς να εξηγεί την αυξημένη ευαισθησία κάποιων θαλάσσιων ασπονδύλων στην οξίνιση των ωκεανών, δεδομένου ότι η μείωση του εξωκυττάριου pH μπορεί να προκαλέσει μεταβολική δυσλειτουργία (Reipschläger & Pörtner, 1996, Michaelidis et al., 2005, Pörtner, 2008). Αυτό μπορεί να μειώσει το ποσοστό της ενέργειας που χρειάζεται σε ενεργοβόρες κυτταρικές διεργασίες όπως η πρωτεϊνοσύνθεση καταλήγοντας σε περιορισμό της ανάπτυξης και της αναπαραγωγής (Gurpy & Withers, 1999, Seibel & Walsh, 2003).

### **2.3.2 Επιπτώσεις στα Εχινόδερμα**

Τα Εχινόδερμα είναι βενθικά ασπόνδυλα, με ευρεία κατανομή σε πληθώρα ενδιαιτημάτων, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στα οικοσυστήματα στα οποία διαβιούν. Σύγχρονες έρευνες υποδεικνύουν ότι η απόκρισή τους στην οξίνιση διαφέρει ανάλογα με την ομοταξία, το είδος, ακόμα και το ενδιαίτημα. Έχουν δειχθεί ποικίλες αποκρίσεις που φαίνεται ότι σχετίζονται με την σταθερότητα ή την αστάθεια του φυσικού περιβάλλοντος όπου διαβιούν (π.χ. παλιρροιακή ζώνη) καθώς και το εύρος θερμοκρασιών και pH του ενδιαιτήματος. Επίσης, διαφορετικά συμπεράσματα μπορεί να προκύψουν από έρευνες λόγω μεθοδολογικών διαφορών, ενώ πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψιν το γεγονός ότι κατά βάση τα συμπεράσματα στηρίζονται σε πειράματα βραχείας διάρκειας που δεν επιτρέπουν τη μακρά έκθεση σε συνθήκες οξίνισης. Όμως, φαίνεται ότι τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια (γονιμοποίηση, επιβίωση, εμβρυογένεση, πρώιμη ανάπτυξη και μορφολογία) επηρεάζονται αρνητικά από την οξίνιση (π.χ. Kurihara, 2008, Fabry et al., 2008, Kurihara et al., 2004, Kurihara & Shirayama, 2004, Pagano et al., 1985) δεδομένου ότι η ανάπτυξη των προνυμφών και των νεαρών ατόμων εμφανίζεται καθυστερημένη (Dupont et al., 2010c, Martin et al., 2011, Wolfe et al., 2013) κάτι που μπορεί να επηρεάσει έμμεσα την επιβίωση, και η ενσωμάτωση Ca για την ασβεστοποίηση είναι περιορισμένη (Clark et al., 2009, Martin et al., 2011). Σημειώνεται, πάντως, ότι έχουν καταγραφεί και τα αντίθετα αποτελέσματα. Για παράδειγμα στο *Heliocidaris erythrogramma* δεν παρατηρήθηκε καμία επίπτωση στη γονιμοποίηση και την επιβίωση (Wolfe et al., 2013), ούτε στο *Paracentrotus lividus* από τους Martin et al., (2011) και τους Dupont & Thorndyke, (2008), σε αντίθεση με άλλες έρευνες που αφορούν στο ίδιο είδος (Moulin et al., 2011, Pagano et al., 1985). Στα ενήλικα Εχινόδερμα,

έχει καταγραφεί επίσης μια ποικιλία αποκρίσεων στην περιβαλλοντική υπερκαπνία οι οποίες φαίνεται να είναι εξειδικευμένες για κάθε είδος. Η ασβεστοποίηση και/ή η αναγέννηση των ασβεστιτικών δομών γενικά υποβαθμίζονται στα Εχινοειδή (π.χ. Fabry et al., 2008, Gooding et al., 2009, Ries et al., 2009, Wood et al., 2010, 2011), αλλά έχει παρατηρηθεί και ενίσχυση σε κάποια είδη που υπεβλήθησαν σε χαμηλό pH, εις βάρος άλλων λειτουργιών (Wood et al., 2008 στον οφίουρο *Amphiura filiformis* εις βάρος της μυϊκής μάζας, Ries et al., 2009). Ομοίως, ο ρυθμός ανάπτυξης εμφανίζεται μειωμένος σε συνθήκες οξίνισης, αλλά έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις όπου αυξάνεται (Grosjean et al., 1996, 1998, Shirayama & Thornton, 2005, Gooding et al., 2009, Byrne, 2011, 2012, Albright et al., 2012). Όσον αφορά το ρυθμό κατανάλωσης τροφής, έχει αναφερθεί μείωσή του με τη μείωση του pH (Siikanuorio et al., 2007), ενώ ο μεταβολισμός και/ή η πρόσληψη οξυγόνου φαίνεται να ενισχύονται σε χαμηλό pH, επίσης εις βάρος άλλων λειτουργιών (Wood et al., 2008, 2010, 2011, Christensen et al. 2011). Σύμφωνα με τους Catarino et al. (2012), η πρόσληψη οξυγόνου από το *P. lividus* αυξήθηκε σε χαμηλό pH, ενώ ο μεταβολισμός απορρυθμίστηκε υποδεικνύοντας μια απόκριση σε μια αυξημένη ενεργειακή απαίτηση για τη διατήρηση μιας κανονικής φυσιολογικά σταθερής κατάστασης. Αυτή η απορρύθμιση του μεταβολισμού, μπορεί να οδηγήσει μακροπρόθεσμα σε αναστολή της γοναδικής ανάπτυξης σε κάποια είδη αχιών (Kurihara, 2008, Siikanuorio et al. 2007) λόγω ελάττωσης της κατανάλωσης τροφής και της αποδοτικότητας της μετατροπής θρεπτικών και πιθανώς συνολική χειροτέρευση της υγείας εφόσον η ενεργειακή απαίτηση ολόκληρου του οργανισμού βρίσκεται σε μη φυσιολογικά επίπεδα. Συγκεκριμένα όσον αφορά τη γοναδική παραγωγή, αυτή μπορεί να υποστηριχθεί κατά 76-92% από τον αναερόβιο μεταβολισμό (Bookbinder & Shick, 1986) επομένως δεν επηρεάζεται άμεσα από την έκθεση στην υπερκαπνία, ωστόσο εξαρτάται από άλλες μεταβολικές διεργασίες που πιθανόν σχετίζονται άμεσα με τα επίπεδα του εξωκυττάριου pH και άρα επηρεάζονται. Σε αυτή την περίπτωση, η υψηλότερη ενεργειακή απαίτηση θα μπορούσε να έχει έμμεση συνέπεια στον αερόβιο μεταβολισμό και μακροπρόθεσμα η γοναδική ανάπτυξη και παραγωγή να μειωθεί για κάποια είδη αχιών. Για παράδειγμα, η μακρόχρονη έκθεση σε pH 7,8 οδήγησε σε μείωση της γοναδικής ανάπτυξης και της γονιμότητας του αχιού *Hemicentrotus pulcherrimus* (Kurihara δημοσίευτα δεδομένα σε Kurihara, 2008). Τέλος, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι επιπτώσεις της θερμοκρασίας αλληλεπιδρούν με αυτές του pH στην ασβεστοποίηση, την ανάπτυξη και την πρόσληψη οξυγόνου (Gooding et al., 2009, Wood et al., 2010, 2011, Christensen et al., 2011) δείχνοντας ότι οι βασικότεροι παράγοντες στρες κατά την οξίνιση των ωκεανών, μπορεί να έχουν συνδυαστική ή και ανταγωνιστική επίδραση στην ανάπτυξη των ασβεστοποιητικών ασπονδύλων (Wolfe et al., 2013). Για παράδειγμα, μια μικρή αύξηση της θερμοκρασίας των ωκεανών μπορεί να ενισχύσει την ανάπτυξη και την ασβεστοποίηση στα νεαρά άτομα (Sheppard Brennard et al., 2010, Byrne et al., 2011) έως ένα σημείο, ενώ η οξίνιση θα περιορίσει την ανάπτυξη. Επίσης φαίνεται ότι μπορεί να υπάρξει η δυνατότητα διατήρησης μηχανισμών προστασίας από την οξίνιση των ωκεανών, αλλά αυτό θα μπορούσε να κοστίζει σημαντικά στην ικανότητα ενός οργανισμού να αντέξει αυξημένη ένταση στρες για παράδειγμα σε τιμές pH χαμηλότερες από 7,5.

### 2.3.2.1 Ασβεστοποίηση

Η ασβεστοποίηση αποτελεί ένα από τους βασικούς ερευνητικούς στόχους για πολλές μελέτες όσον αφορά στις επιπτώσεις της κλιματικής αλλαγής που οφείλεται στο CO<sub>2</sub> στους ωκεανούς, καθώς όπως προαναφέρθηκε, τα κελύφη ή οι σκελετοί από ανθρακικό ασβέστιο πολλών

οργανισμών, όπως των Εχινοειδών, είναι ευαίσθητα στη διάλυση σε όξινα νερά (Orr et al., 2005), ενώ και η ασβεστοποίηση περιορίζεται. Τα Εχινόδερμα παρουσιάζουν δύο αρκετά διαφορετικές φάσεις σκελετογένεσης, μία στο προνυμφικό στάδιο και μία κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής. Οι σκελετικοί άξονες (rods) στο στάδιο της προνύμφης, ο σκελετός, τα δόντια και τα αγκάθια των ενηλίκων, σχηματίζονται από ένα άμορφο κρυσταλλικό πρόδρομο του ασβεστίτη, το μαγνησιούχο ασβεστίτη (αραγωνίτη), ο οποίος είναι 30 φορές πιο διαλυτός από τον ασβεστίτη (Politi et al., 2004, Bertram et al., 1991, Ries et al., 2009, Lebrato et al., 2010). Η διαλυτότητα του ασβεστίτη αυξάνει με το περιεχόμενο σε Mg (Morse et al., 2006, McClintock et al., 2011). Έχει καταγραφεί αύξηση της συγκέντρωσης ιόντων Mg ( $Mg^{2+}$ ) στο κοιλωματικό υγρό σε pH από 6,16 έως 7,44, κάτι που δείχνει διαχωρισμό και εσωτερική διαρροή ιόντων από τον σκελετό λόγω της οξίνισης του κοιλωματικού υγρού (Miles et al., 2007). Η μείωση της διαθεσιμότητας ανθρακικών ιόντων, προκαλεί αύξηση της ενέργειας που απαιτείται για την καθίζηση του ανθρακικού ασβεστίου. Έχει φανεί ότι η σκελετογένεση εμποδίζεται υπό συνθήκες αυξημένου  $CO_2$  και χρειάζεται αυξημένη βιολογική προσπάθεια για να οικοδομηθούν τα σκελετικά στοιχεία σε ενήλικα εχινοειδή (O' Donnell et al., 2009). Καθώς ο σκελετός παρέχει δομική στήριξη και προστασία για τον αχινό, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι τέτοια διάλυση μειώνει την επιβίωση. Κατά συνέπεια, τα Εχινοειδή ανήκουν στα ιδιαίτερα ευαίσθητα τάξα.

### 2.3.2.2 Ιοντική ρύθμιση

Τα ενήλικα άτομα των Εχινოდέρμων έχουν περιορισμένη ικανότητα να ρυθμίζουν την συγκέντρωση ιόντων στα εξωκυττάρια υγρά τους (Stickle & Diehl 1987), και θεωρούνται υπομεταβολικά (Melzner et al. 2009) καθώς έχουν χαμηλό ρυθμό αναπνοής (Lawrence & Lane 1982, Shick 1983). Η ιοντική ρύθμιση στα Εχινοειδή, αν και περιορισμένη, εξαρτάται από το κάθε είδος (Binyon, 1966 σε Catarino et al., 2012). Είναι ιδιαίτερα σημαντική σε αχινούς που διαβιούν σε παράκτια περιβάλλοντα ή σε ρηχά νερά όπου υπάρχουν διακυμάνσεις της αλατότητας (Vidolin et al. 2007), καθώς είναι υποχρεωμένα να αντέξουν οσμωτικά στρες σε ένα περιορισμένο εύρος (Himmelman et al. 1984, Vidolin et al. 2007). Στην παλιρροιακή ζώνη συχνά, με τις διακυμάνσεις της αλατότητας συνδέονται και αλλαγές στο pH (Truchot & Duhamel-Jouve 1980, Morris & Taylor 1983). Η ικανότητα να ρυθμίζουν τέτοιες διακυμάνσεις, έστω και περιορισμένα, μπορεί να αποτελέσει ένα χαρακτηριστικό προσαρμογής που να επιτρέπει στους οργανισμούς να ανταπεξέρχονται σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις.

Η ιοντική σύνθεση του κοιλωματικού υγρού των Εχινოდέρμων είναι όμοια με αυτή του θαλασσινού νερού, ωστόσο υπάρχουν κάποια είδη τα φυσιολογικά υγρά των οποίων μπορούν να είναι υπεροσμωτικά (Binyon, 1966 σε Catarino et al., 2012, Ferguson, 1990), και υπάρχουν αποδείξεις ότι είναι πιθανή μια περιορισμένη ιοντική ρύθμιση (Binyon, 1966 σε Catarino et al., 2012, Bishop et al., 1994, Vidolin et al., 2007). Το pH του κοιλωματικού υγρού είναι συνήθως 0.5–1.5 U χαμηλότερο από αυτό του θαλασσινού νερού κατά πάσα πιθανότητα λόγω κατακράτησης του  $CO_2$  (χαμηλός ρυθμός διάχυσης) και συσσώρευσης όξινων μεταβολιτών (Farmanfarmaian, 1966, Shick, 1983), ωστόσο έχουν υπάρξει υποθέσεις που υποστηρίζουν ότι το κοιλωματικό υγρό έχει μια ελαφρώς μεγαλύτερη ρυθμιστική ικανότητα από το θαλασσινό νερό (Binyon, 1966, Shick, 1983). Παρ' όλα αυτά, γενικά καταγράφεται μείωση του pH του κοιλωματικού υγρού αντίστοιχα με τη μείωση του pH του θαλασσινού νερού, δείχνοντας είτε μια πολύ χαμηλή είτε μια μερική ικανότητα

αντιστάθμισης (Miles et al., 2007, Catarino et al., 2012). Αυτή η περιορισμένη ικανότητα ιοντικής ρύθμισης δείχνει ότι τα ενήλικα Εχινόδερμα θα μπορούσαν να υποστούν σοβαρές συνέπειες από την οξίνιση των ωκεανών.

Σύμφωνα με τους Catarino et al. (2012), το pH του κοιλωματικού υγρού του *P. lividus*, μειώνεται με το pH του θαλασσινού νερού ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία, αν και υποδεικνύεται ότι ασκείται η επιρροή και άλλων σημαντικών παραγόντων. Αξιοσημείωτο είναι ότι κάποια άτομα, σε συνθήκες πολύ χαμηλού pH (pH 7,4), μπορούν να διατηρήσουν το pH του κοιλωματικού τους υγρού σε υψηλότερα επίπεδα από το pH του περιβάλλοντος θαλασσινού νερού. Επομένως φαίνεται ότι το pH του κοιλωματικού υγρού αντισταθμίζεται σε περιπτώσεις μέτριας υπερκαπνίας του θαλασσινού νερού, παρουσιάζοντας μεγαλύτερη ρυθμιστική ικανότητα σε σχέση με το θαλασσινό νερό (Catarino et al., 2012). Το κοιλωματικό υγρό βασικά ρυθμίζεται από το σύστημα διοξειδίου του άνθρακα-διττανθρακικού (Farmanfarmaian, 1966, Shick, 1983, Miles et al., 2007). Όμως, θα μπορούσε να ενισχυθεί περαιτέρω από την περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνες όπως υποδεικνύεται από μελέτες που η ρυθμιστική ικανότητα του κοιλωματικού υγρού σχετίζεται με αυξημένη συγκέντρωση πρωτεΐνης λόγω ανάπτυξης των ωοθηκών (Bookbinder & Shick, 1986, Holland et al., 1967, Burnett et al., 2002, Shick, 1983).

### **2.3.3 Χρήση νερού γεώτρησης με χαμηλότερο pH για την εκτροφή θαλάσσιων ειδών**

Η χρήση νερού γεώτρησης κατά την εκτροφή θαλάσσιων ψαριών μπορεί αποδεδειγμένα να προκαλέσει εκτεταμένες δερματοπάθειες (Chronic ulcerative dermatopathy – CUD) σε κάποια από αυτά. Σύμφωνα με τους Katharios et al. (2011) οι οποίοι μελέτησαν το φαινόμενο στις εγκαταστάσεις ιχθυοκαλλιεργειών και του ενυδρείου του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε Κρήτης, η Χρόνια Ελκώδης Δερματοπάθεια ή Χρόνια διαβρωτική Δερματοπάθεια είναι μια ασθένεια άγνωστης αιτιολογίας που έχει περιγραφεί πρόσφατα και εντοπίζεται στην πλευρική γραμμή στο κεφάλι και τον κορμό συγκεκριμένων ειδών ψαριών που εκτρέφονται σε νερό γεώτρησης, ενώ σε άλλα είδη δεν εμφανίζεται ποτέ. Ειδικότερα η CUD έχει σαν αποτέλεσμα διάβρωση, έλκωση και απώλεια της επιδερμίδας και του δέρματος που καλύπτει τα αισθητήρια κανάλια της κεφαλής και του κορμού των προσβεβλημένων ψαριών. Σχετίζεται με μειωμένους ρυθμούς ανάπτυξης και αυξημένη θνησιμότητα, ενώ το σημαντικότερο αποτέλεσμα είναι η σοβαρή παραμόρφωση των προσβεβλημένων ψαριών κάτι το οποίο οδηγεί σε σημαντική μείωση της εμπορευσιμότητάς τους. Το φαινόμενο αποδίδεται στη χρήση θαλασσινού νερού γεώτρησης στις εγκαταστάσεις (Katharios et al. 2011, Baily et al., 2005 σε Katharios et al. 2011) κάτι που φαίνεται και από το γεγονός ότι όταν τα ψάρια μεταφερθούν από το νερό της γεώτρησης στο θαλασσινό νερό, οι πληγές επουλώνονται εντελώς, αν τα ψάρια βρίσκονται σε αρχικό στάδιο της δερματοπάθειας. Είναι γνωστό ότι τα υπόγεια ύδατα χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα διοξειδίου του άνθρακα και χαμηλό pH σε σχέση με το φυσικό θαλασσινό νερό, τα οποία όμως, δε θεωρούνται εντόνως τοξικά για τη λάρβα των ψαριών και τα ιχθύδια καθώς κάποια είδη μπορούν να προσαρμοστούν σε αυξημένα επίπεδα CO<sub>2</sub> (Noga, 1996 σε Katharios et al. 2011). Ωστόσο, τόσο το pH (ακόμα και μια ήπια μείωσή του), όσο και το CO<sub>2</sub> είναι δυνατόν να ευθύνονται για δυσμορφίες και δυσπλασίες στο δέρμα των ψαριών (Noga 2000, σε Katharios et al. 2011).



#### **2.3.4 Επιπτώσεις των βαρέων μετάλλων στο περιβάλλον των Εχινοειδών**

Η κρυσταλλική δομή των σκελετών των αχινών οικοδομούνται με συγκεκριμένες, για κάθε είδος, ποσότητες Ca και Mg, που προσλαμβάνουν από το περιβάλλον. Παρ' όλα αυτά, κατά τη χημική ανάλυση, εντοπίζονται σημαντικές ποσότητες από άλλα στοιχεία (Auernheimer & Chinchón, 1997). Κάθε είδος ενσωματώνει συγκεκριμένες ποσότητες αυτών των στοιχείων, οι οποίες, όμως διαφέρουν ανάμεσα στα πλακίδια του σκελετού και τα αγκάθια, πιθανόν λόγω του ότι το καθένα έχει διαφορετική κρυσταλλική δομή (Auernheimer & Chinchón, 1997, Chinchón et al., 2000). Η ύπαρξη αυξημένων συγκεντρώσεων μετάλλων και βαρέων μετάλλων (Mg, Mn, Sr, Fe, Zn, Pb) στο περιβάλλον όπου ζουν οι αχινοί (ίζημα και βράχοι), έχει σαν αποτέλεσμα αυτά τα στοιχεία να τείνουν να αντικαταστήσουν το Ca στην κρυσταλλική δομή των σκελετών των αχινών μέσω ισομορφικής υποκατάστασης (Auernheimer & Chinchón, 1997). Η αντικατάσταση του Ca από αυτά τα στοιχεία, τα οποία έχουν μικρότερη ιοντική ακτίνα, αλλάζει την απόσταση στο κρυσταλλικό πλέγμα. Οι σκελετοί από ανθρακικό ασβέστιο έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν και να συγκεντρώνουν ποσότητες βαρέων μετάλλων σε επίπεδα αρκετών τάξεων μεγέθους πάνω από αυτά που υπάρχουν στο περιβάλλον τους (Campbell & Evans, 1987, Scott, 1990, Bourgoin, 1990, Anderlini, 1992, Guzman & Gimenez, 1992, Auernheimer et al., 1984, 1996, Auernheimer & Chinchón, 1997). Αναμφίβολα, όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωσή τους στο περιβάλλον (ίζημα, νερό) τόσο μεγαλύτερη ποσότητα ενσωματώνεται στο σκελετό.

#### **2.3.5 Στόχος των πειραμάτων της Ενότητας**

Σε συνέχεια των όσων αναφέρθηκαν στις προηγούμενες παραγράφους (2.3.3 και 2.3.4), επιχειρήθηκε η εκτίμηση των επιπτώσεων του pH του νερού γεώτρησης στην υποβάθμιση των σκελετικών στοιχείων αχινών που παρατηρήθηκαν κατά την διάρκεια προκαταρκτικού πειράματος εκτροφής τους. Ελήφθη μέριμνα να διαχωριστεί η επίδραση του pH από αυτή της συνολικής ποιότητας του νερού γεώτρησης στην υποβάθμιση των σκελετικών στοιχείων του αχινού. Προς τούτο σχεδιάστηκαν δύο πειράματα εκτροφής σε νερό γεώτρησης και θαλασσινό νερό αντίστοιχα.

#### **2.3.6 Προκαταρκτικό πείραμα εκτροφής αχινών**

##### **2.3.6.1 Μεθοδολογία**

Όπως αναφέρθηκε στα προκαταρκτικά πειράματα εκτροφής αχινών *P. lividus* (Ενότητα 1 παρούσας εργασίας), χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι υδάτων (γεώτρησης και θαλασσινό) για την εκτροφή των αχινών στις εγκαταστάσεις του Ενωδρείου Κρήτης. Οι αχινοί διατηρήθηκαν σε ατομικά δοχεία ούτως ώστε να αποκλείεται το ενδεχόμενο τραυματισμού και η τροφή που τους παρέχόταν ατομικά ήταν το φαιοφύκος *Cystoseira barbata*, το οποίο επιλέχθηκε καθώς αυτό αποτελούσε την διατροφή τους στο φυσικό περιβάλλον στο σημείο από όπου έγινε η συλλογή των ατόμων στην Ελούντα, Ν. Λασιθίου. Τα επίπεδα του pH του νερού της γεώτρησης που χρησιμοποιήθηκε για την εκτροφή των αχινών κυμαίνονται μεταξύ 7,7 και 7,8. Αντίστοιχα, το pH του θαλασσινού νερού που χρησιμοποιήθηκε στις δεξαμενές ήταν 8,1.

Στον Πίνακα 1 παρατίθενται αναλυτικά οι συνθήκες υπό τις οποίες πραγματοποιήθηκε η εκτροφή των αχινών.

**Πίνακας 6:** Οι συνθήκες διατήρησης των αχινών στις 2 δεξαμενές διαφορετικής ποιότητας νερού (θαλασσινό/γεώτρησης).

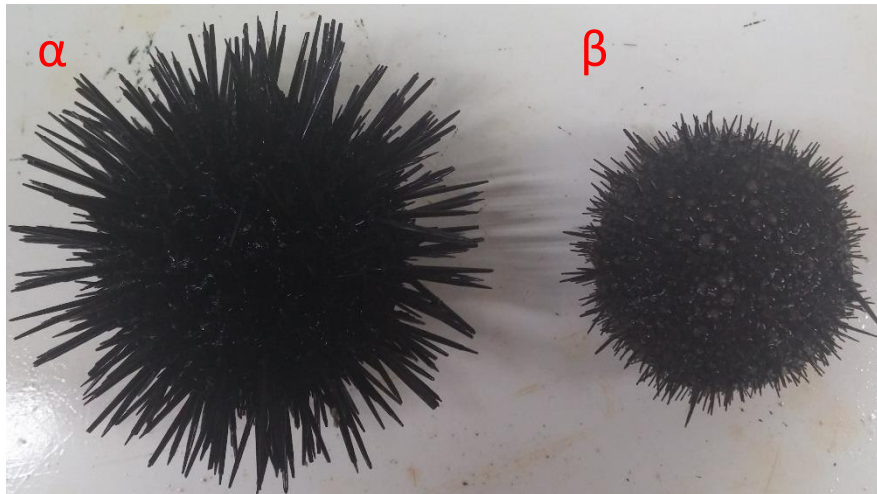
Συνθήκες	Νερό γεώτρησης	Θαλασσινό νερό
Χωτηρικότητα δεξαμενών	150 lt	150 lt
Αριθμός ατόμων/δεξαμενή	60	60
Μεγέθη ατόμων	35-40 mm	35-40 mm
Τροφή	<i>Cystoseira barbata</i> (Phaeophyceae)	<i>Cystoseira barbata</i> (Phaeophyceae)
Θερμοκρασία	18,7 °C	20,9 °C
pH	7,75	8,1
Αλατότητα	36 ppt	36 ppt
Φωτοπερίοδος	12 h	12 h
Ανανέωση νερού	1,7 lt/min	0,6 lt/min

Στην εξέλιξη του πειράματος εκτροφής παρατηρήθηκαν μορφολογικές αλλοιώσεις στα σκελετικά στοιχεία των αχινών που εκτρέφονταν σε νερό γεώτρησης. Γι' αυτό το λόγο, σχεδιάστηκαν επιπλέον πειράματα (παράγραφοι 2.2 και 2.3) για να προσδιοριστεί η ευθύνη που αναλογεί στα διαφορετικά επίπεδα pH μεταξύ των δύο τύπων υδάτων.

### 2.3.6.2 Παρατηρήσεις που οδήγησαν στη διερεύνηση της επίδρασης του pH γεώτρησης στην εκτροφή των αχινών

Παρατίθενται οι παρατηρήσεις των συμπτωμάτων στους αχινούς που οδήγησαν σε σκεπτικισμό και προβληματισμό όσον αφορά την επίδραση του νερού της γεώτρησης στους αχινούς *P. lividus* σε σύγκριση με το θαλασσινό νερό.

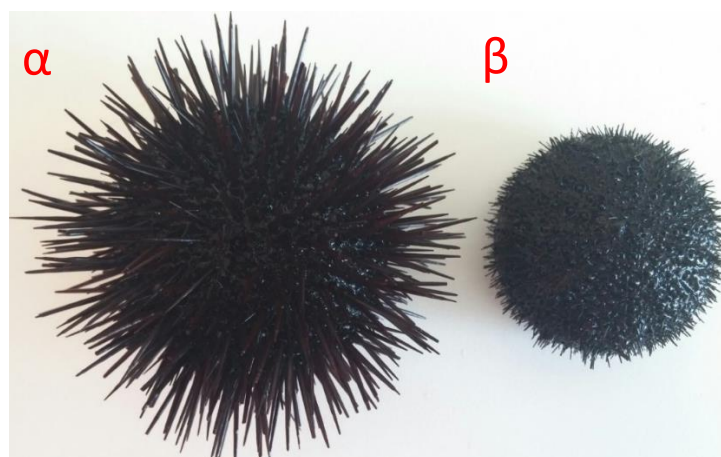
Στην Εικόνα 19 αποτυπώνεται η διαφορά δύο ατόμων αχινών που οποίοι είχαν διατηρηθεί για το ίδιο χρονικό διάστημα και υπό τις ίδιες συνθήκες στις δεξαμενές του Ενυδρείου με μόνη διαφορά την παροχή θαλασσινού νερού στη δεξαμενή του ενός (α) και νερού γεώτρησης στη δεξαμενή του άλλου (β). Η φωτογραφία δεν αποτυπώνει δύο ακραία παραδείγματα, αντιθέτως είναι εξ' ολοκλήρου αντιπροσωπευτική καθώς το σύνολο των ατόμων της δεξαμενής θαλασσινού νερού παρουσίαζαν την κατάσταση του (α) και όλα τα άτομα της δεξαμενής νερού γεώτρησης παρουσίαζαν την κατάσταση του ατόμου (β). Παρατηρείται απώλεια της πλειοψηφίας των αγκαθίων και σίγουρα των πιο μεγάλων. Τα αγκάθια που απομένουν είναι εύκαμπτα και σπάνε σε αντίθεση με αχινούς που βρίσκονται σε καλή κατάσταση των οποίων τα αγκάθια είναι σκληρά και άκαμπτα.



**Εικόνα 19:** Σύγκριση αχινών του πειράματος από δεξαμενή με θαλασσινό νερό (α) – νερού γεώτρησης (β) (διατροφή με φαιοφύκη).

Σημειώνεται ότι λόγω αδυναμίας συλλογής *Cystoseira barbata* από το φυσικό περιβάλλον λόγω παρατεταμένης κακοκαιρίας, οι αχινοί και των 2 δεξαμενών δεν είχαν παροχή τροφής για περίπου ένα μήνα. Παρά την παρατεταμένη νηστεία, οι αχινοί της δεξαμενής με το θαλασσινό νερό μορφολογικά ήταν πανομοιότυποι με αχινούς του φυσικού περιβάλλοντος, ενώ οι αχινοί στο νερό της γεώτρησης παρουσίαζαν την εικόνα που φαίνεται στη φωτογραφία.

Οι διαφορές μεταξύ των αχινών της Εικόνας 19 είναι ίδιες και μεταξύ των αχινών της Εικόνας 20 η οποία αφορά ένα άτομο που συλλέχθηκε από το φυσικό περιβάλλον (α) και ένα άτομο το οποίο δεν αποτέλεσε μέρος του πειράματος, αλλά διατηρούνταν σε δεξαμενή του Ενυδρείου με παροχή νερού γεώτρησης για μερικούς μήνες (β). Συνεπώς, το πρόβλημα φάνηκε ότι προκύπτει λόγω του είδους του νερού εκτροφής.



**Εικόνα 20:** Σύγκριση αχινού από άγριο πληθυσμό (α) με αχινό διατηρημένο σε νερό γεώτρησης σε δεξαμενή του Ενυδρείου (β).

## **2.3.7 Μείωση του pH του θαλασσινού νερού**

### **2.3.7.1 Μεθοδολογία**

Για να διερευνηθεί αν η αιτία της μορφολογικής αλλοίωσης είναι το χαμηλό pH, επιχειρήθηκε η τεχνητή πτώση του pH σε δεξαμενή με παροχή θαλασσινού νερού. Αυτό επιτεύχθηκε με την τοποθέτηση ηλεκτροδίων συνδεδεμένων με ένα pH controller ρυθμισμένου να διατηρεί το pH στο 7,5 μέσω του εμπλουτισμού του νερού με CO<sub>2</sub>. Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 5 αχινοί στους οποίους παρεχόταν η ανάμικτη τροφή που παρασκευάστηκε (M1) και 5 άτομα στα οποία παρεχόταν η ζωικής προέλευσης τροφή που παρασκευάστηκε (A) (Ενότητα 2). Στο συγκεκριμένο πείραμα αντιμετωπίστηκε τεχνικό πρόβλημα κατά τη χρήση του pH controller, το οποίο εξηγείται παρακάτω.

### **2.3.7.2 Αποτελέσματα**

Η προσπάθεια μείωσης του επιπέδου του pH σε δεξαμενή με παροχή θαλασσινού νερού με τη χρήση pH controller, δεν απέδωσε αποτελέσματα γιατί εντός 2 ημερών πέθανε σχεδόν το σύνολο των αχινών του πειράματος (Εικόνα 21). Συγκεκριμένα νεκροί βρέθηκαν 4/5 από τους αχινοί στην ανάμικτη τροφή, και 2/5 από τους αχινοί στη ζωικής προέλευσης τροφή.



**Εικόνα 21:** Νεκροί αχινοί μετά από μικρή παραμονή σε pH 7,5.

Οι αχινοί αντικαταστάθηκαν με νέους και τα αποτελέσματα ήταν ξανά τα ίδια εντός του ίδιου χρονικού διαστήματος, εκτός από ένα άτομο το οποίο επιβίωσε του σοκ και διατηρήθηκε με επιτυχία για μήνες, χωρίς να προκύψει κάποιο πρόβλημα λόγω του χαμηλού pH, τουλάχιστον μορφολογικά και στην ανάπτυξη των γονάδων (διατρέφονταν με τεχνητό σιτηρέσιο), ίσως επειδή από έρευνες το pH 7,5 γενικά θεωρείται скаλοπάτι κάτω από τα επίπεδα του οποίου μπορεί να προκληθεί σοβαρή βλάβη.

Ο σχεδόν ακαριαίος θάνατος των ατόμων του πειράματος αποδόθηκε σε μεγάλο βαθμό σε σοκ λόγω της απότομης μετάβασης από pH 7,8 περίπου, σε pH 7,5. Δυστυχώς το pH controller ήταν ρυθμισμένο σε αυτήν την τιμή pH και δεν υπήρχε η δυνατότητα για σταδιακή πτώση του pH ανά μερικές ημέρες για να αποφευχθεί το σοκ. Για αυτό το λόγο επιλέχθηκε εναλλακτικά ο σχεδιασμός νέου πειράματος το οποίο περιγράφεται στη συνέχεια.

### **2.3.8 Αύξηση του pH του νερού γεώτρησης**

#### **2.3.8.1 Μεθοδολογία**

Σαν συνέπεια του εμποδίου στην ανάπτυξη της μεθοδολογίας για την τεχνητή μείωση του pH του θαλασσινού νερού, σχεδιάστηκε ένα εναλλακτικό πείραμα με εκτροφή αχινών σε δεξαμενή με νερό γεώτρησης και υψηλό pH όμοιου με τις τιμές του θαλασσινού νερού, για να εντοπιστεί κατά πόσο ευθύνεται ο παράγοντας του pH στην αλλαγή των μορφολογικών χαρακτηριστικών των αχινών που εκτρέφονται σε νερό γεώτρησης. Η άνοδος του επιπέδου του pH του νερού γεώτρησης, επετεύχθη με τον περιορισμό της παροχής νερού στη δεξαμενή σε 0,05 lt/min. Πραγματοποιήθηκε νέα συλλογή 10 ατόμων αχινών από τη θάλασσα (20/12/2016) τα οποία διατηρήθηκαν νερό γεώτρησης με pH  $8,14 \pm 0,02$ .

#### **2.3.8.2 Αποτελέσματα**

Μετά την πάροδο 6 μηνών εκτροφής των 10 ατόμων σε νερό γεώτρησης με αυξημένο pH (pH ~8,1), υπήρξε θνησιμότητα τεσσάρων ατόμων λόγω της ασθένειας που περιεγράφηκε νωρίτερα (Πείραμα διατροφής – Ενότητα 1). Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε η φθορά των σκελετικών στοιχείων με χαρακτηριστική την απώλεια αγκαθιών που σημειώθηκε αρχικά κατά την εκτροφή αχινών με φαιοφύκη σε νερό γεώτρησης με χαμηλό pH, καθώς και σε άλλους αχινούς των εγκαταστάσεων του Ενυδρείου στην ίδια ποιότητα νερού. Συνεπώς βάσει αυτού του απλού πειράματος που πραγματοποιήθηκε, συγκρατημένα μπορεί να ειπωθεί ότι ίσως να συνέβαλε το υψηλότερο pH στο να μην εμφανιστεί η υποβάθμιση-απώλεια αγκαθιών που είχε περιγραφεί, αν και πιθανώς δεν αναλογεί σε αυτόν τον παράγοντα η αποκλειστική ευθύνη.

### **2.3.9 Ρόλος του χαμηλού pH**

Η κατανόηση των πιθανών επιπτώσεων της οξίνισης των ωκεανών απαιτεί διεπιστημονική έρευνα πάνω στη μακροπρόθεσμη απόκριση στα αυξημένα επίπεδα CO<sub>2</sub> (Hilmi et al., 2012). Η έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί έως σήμερα στην πλειοψηφία της αφορά βραχυπρόθεσμες επιπτώσεις που πιθανόν να υπερεκτιμούν τις αποκρίσεις των ειδών, χωρίς να υπολογίζεται ο εγκλιματισμός και η προσαρμογή ή τυχόν διαγενεακές επιδράσεις (Duront et al., 2012, Pespeni et al., 2013). Οι περισσότερες έρευνες δείχνουν αρνητικές επιπτώσεις της οξίνισης των ωκεανών στους αχινούς, ωστόσο η απόκριση κάθε είδους είναι διαφορετική. Ο αχινός *Arbacia lixula* παρουσιάζει μεγαλύτερη αντοχή σε όξινες συνθήκες, αν και εποικεί με την ίδια ένταση (ίδια πληθυσμιακή πυκνότητα) περιοχές με φυσιολογικό pH (~8,1) και περιοχές με φυσικά όξινα νερά λόγω γειτνίασης με πηγές (Bray et al., 2014, Calosi et al., 2013a). Αντιθέτως, στον *P. lividus*, παρ'ότι τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια μπορούν να αντέχουν βραχυπρόθεσμη οξίνιση (Martin et al., 2011), τα ενήλικα άτομα είναι πιο ευαίσθητα σε φυσικά όξινα νερά, παρουσιάζοντας απότομη πτώση στην πυκνότητα των πληθυσμών σε σχέση με περιοχές φυσιολογικού pH (Hall-Spencer et al., 2008, Johnson et al., 2012, Bray et al., 2014). Τέτοιες εξειδικευμένες ανά είδος διαφορές, πιθανότατα θα επηρεάσουν την πορεία των οικοσυστημικών αλλαγών καθώς θα επιδεινώνεται η οξίνιση

των ωκεανών. Για αυτό το λόγο μετά την παρατήρηση των μορφολογικών διαφορών που αναφέρθηκαν, έγινε προσπάθεια να εντοπιστεί η ευθύνη του χαμηλού pH, καθώς τα αγκάθια αποτελούν σημαντική αμυντική δομή για τα νεαρά άτομα, παρέχοντας προστασία από τη θήρευση (Strathmann, 1981, Keesing, 2013). Πιο κοντά και πιο αδύναμα αγκάθια σε ένα θερμό, χαμηλού pH ωκεανό, θα αύξανε την τρωτότητα των νεαρών ατόμων στη θήρευση και θα μείωνε την επιβίωση έως την ενηλικίωση (Wolfe et al., 2013).

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με τα διαφορετικά επίπεδα pH δεν απέδωσαν σαφή συμπεράσματα, παρ' όλα αυτά δεν επαναλήφθηκε το φαινόμενο που περιεγράφηκε στα αρχικά πειράματα με την έντονη μορφολογική διαφορά μεταξύ των αχινών που διατηρούνταν σε θαλασσινό νερό και νερό γεώτρησης. Τα επίπεδα του pH του νερού γεώτρησης των εγκαταστάσεων του Ευυδρείου δεν είναι ιδιαίτερα χαμηλά, σε σύγκριση με έρευνες που αφορούν την επίδραση της οξίνισης των ωκεανών στα Εχινόδερμα. Για παράδειγμα, οι Miles et al. (2007) παρατήρησαν αντίστοιχες αλλαγές στην κινητικότητα και την μορφολογία των αχινών *Psammechinus miliaris* πριν τον θάνατο, με απώλεια αγκαθιών και απογύμνωση του σκελετού, αλλά σε πολύ χαμηλότερο pH (6,16), και οι Wolfe et al. (2013) διαπίστωσαν μειωμένο μήκος και αλλαγή στη δομή των αγκαθιών σε νεαρά άτομα *Helicodaris erythrogramma* σε pH 7,4. Ωστόσο, το γεγονός ότι δεν επαναλήφθηκε το φαινόμενο στο δεύτερο πείραμα πιθανώς υποδεικνύει ότι το υψηλότερο επίπεδο του pH είναι τουλάχιστον ένας παράγοντας αποτροπής της εμφάνισης του φαινομένου αν και ίσως όχι ο μόνος.

### **2.3.10 Ρόλος των βαρέων μετάλλων στο νερό εκτροφής**

Το νερό γεώτρησης που αντλείται για την εκτροφή αρκετών ειδών στο Ευυδρείο Κρήτης, χαρακτηρίζεται από υψηλές συγκεντρώσεις ψευδαργύρου (Zn). Εκτός του γεγονότος ότι τα ελεύθερα ιόντα ψευδαργύρου θεωρούνται υψηλής τοξικότητας για φυτά, ασπόνδυλα, ακόμα και για τα ψάρια, σύμφωνα με τους Chinchón et al. (2000), Auernheimer & Chinchón (1997), καθώς και από προσωπικά δεδομένα, σε περιβάλλοντα με υψηλές συγκεντρώσεις μετάλλων όπως Pb και Zn, τα στοιχεία αυτά ενσωματώνονται στην κρυσταλλική δομή του ενδοσκελετού και των αγκαθιών των αχινών μέσω ισομορφισμού. Ο ισομορφισμός είναι φαινόμενο που βασίζεται στο γεγονός ότι δύο ουσίες που διαφέρουν ως προς τη χημική σύσταση έχουν τον ίδιο τύπο κρυσταλλικού πλέγματος. Παρατηρείται για παράδειγμα σε ουσίες του τύπου ανθρακικού ασβεστίου και ανθρακικού ψευδαργύρου, όπου διαπιστώνεται ότι ο ψευδάργυρος μπορεί να αντικαταστήσει στο κρυσταλλικό πλέγμα το ασβέστιο. Γενικά, σε αρκετές περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί το φαινόμενο μερικής ή ολικής υποκατάστασης των ιόντων ασβεστίου από άλλα ιόντα στην κρυσταλλική δομή του σκελετού θαλάσσιων οργανισμών (Auernheimer et al., 1984, 1996, Auernheimer & Chinchón, 1997).

Επιπλέον οι Bray et al., (2014) έδειξαν ότι τα αυξημένα επίπεδα CO<sub>2</sub> στο περιβάλλον επηρεάζουν την σκελετική γεωχημεία ειδικά στο *P. lividus*, κάνοντάς το να ενσωματώνει υψηλότερες ποσότητες ιχνοστοιχείων στη σκελετική του δομή όταν εκτίθεται σε τέτοιες συνθήκες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα φθορά του σκελετού και των αγκαθιών, όπως και μείωση του μεγέθους και του πάχους του σκελετού (Ries et al., 2009), κάτι που έχει δειχθεί σε υποθαλάσσιες πηγές CO<sub>2</sub>. Αντίστοιχα, οι Chinchón et al. (2000) έδειξαν ότι οι σκελετοί μικρότερου όγκου ήταν αυτοί που ενσωμάτωναν στη δομή τους τις υψηλότερες συγκεντρώσεις Pb και Zn.

Με αυτόν τον τρόπο πιθανώς να ερμηνεύεται τουλάχιστον σε ένα βαθμό το γεγονός ότι οι αχινοί που διατηρήθηκαν σε νερό γεώτρησης αυξημένου pH δεν παρουσίασαν την ίδια σκελετική υποβάθμιση με απώλεια των αγκαθιών όπως με το μειωμένο pH. Παρ' ότι η έρευνα των Bray et al., (2014) δεν απέδωσε ευθύνη για την σκελετική υποβάθμιση συγκεκριμένα σε υψηλές συγκεντρώσεις Zn, σε συνδυασμό με τις άλλες έρευνες που αναφέρθηκαν προηγουμένως, φαίνεται πιθανό η ταχεία υποβάθμιση που παρατηρήθηκε στο παρόν πείραμα να οφείλεται σε μια επίταση της ενσωμάτωσης του Zn που περιέχεται στο νερό γεώτρησης λόγω του χαμηλού pH.

Για να τεκμηριωθεί η παραπάνω υπόθεση και σαν στόχος για περαιτέρω έρευνα, θεωρείται σημαντική η γεωχημική ανάλυση των σκελετικών στοιχείων των αχινών που εκτρέφονται στο νερό γεώτρησης και παρουσιάζουν σκελετική υποβάθμιση, σε σύγκριση με αχινούς του φυσικού περιβάλλοντος και αχινούς που έχουν εκτραφεί σε νερό γεώτρησης όμως με υψηλότερα επίπεδα pH, όμοια με του θαλασσινού νερού. Η χρήση Φθορισίμετρου Ακτίνων Χ (XRF) μπορεί να εξυπηρετήσει αυτό τον σκοπό, επιτυγχάνοντας τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης των συστατικών χημικών στοιχείων των σκελετών. Επίσης, η χρήση Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου (SEM) θα μπορούσε να υποδείξει εάν όντως η συσσώρευση Zn στη δομή του σκελετού και των αγκαθιών συνεπάγεται υποβάθμισή τους, με την εμφάνιση φθορών, διαφορά στο πάχος του σκελετού και διαφορές στην κρυσταλλική δομή τους.

## **2.4 4<sup>η</sup> ΕΝΟΤΗΤΑ: ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ**

### **2.4.1 Ασθένεια «bald-sea-urchin»**

Στα Εχινόδερμα υπάρχουν φυσιολογικά μη παθογόνα βακτήρια (Gram-αρνητικά βακτήρια), όπως (α) βακτήρια στο έντερο των κανονικών Εχινοειδών που μαζί με ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς (πρωτόζωα, μύκητες) αποτελούν τη φυσιολογική μικροχλωρίδα του εντέρου (Guerinot & Patriquin, 1981, De Ridder & Foret, 2001), (β) υποδερμικά-ενδοσυμβιωτικά βακτήρια που παρατηρούνται στα περισσότερα Εχινόδερμα (Holland & Neelson, 1978, De Ridder & Foret, 2001) και (γ) βακτήρια που έχουν εντοπιστεί στην επιφάνεια του δέρματος στο είδος *Strongylocentrotus droebachiensis* (Roberts-Regan et al., 1988). Ωστόσο στα υγιή άτομα δεν υπάρχουν βακτήρια στο κοιλωματικό υγρό το οποίο είναι κανονικά ασηπτικό και έχει αντιβακτηριακές ιδιότητες (Wardlaw & Unkles, 1978, Gross et al., 1999).

Σε άγριους πληθυσμούς Εχινοειδών έχουν καταγραφεί μαζικοί θάνατοι λόγω μικροοργανισμών (Johnson, 1971a,b σε Scheibling & Stephenson 1984, Pearse et al., 1977 σε Scheibling & Stephenson 1984, Höbaus et al., 1981, Maes & Jangoux, 1984, Scheibling & Stephenson 1984, Girard et al., 2012, Feehan & Scheibling, 2014). Μια μεταδοτική ασθένεια του *P. lividus* και αρκετών άλλων συμπατρικών ειδών αναφέρθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1970 και τις αρχές της δεκαετίας του 1980 στη Μεσόγειο (Ισπανία-Κανάρια Νησιά, Γαλλία, Ιταλία, Κροατία) και στον Ατλαντικό Ωκεανό (Βρετανία, γαλλική ακτή, Καλιφόρνια). Ειδικότερα, αναφορές για την ασθένεια αυτή υπάρχουν και για άτομα που εποικούν τις δύο πλευρές του Β. Ατλαντικού, τον Β.Α. Ειρηνικό και την Δ. Μεσόγειο (γαλλικές μεσογειακές ακτές) (Boudouresque et al., 1980, Höbaus et al., 1981, Maes & Jangoux, 1984). Η ασθένεια φαίνεται να προκάλεσε μαζική θνησιμότητα στη Β.Δ. Μεσόγειο (Boudouresque & Verlaque, 2013 σε Feehan & Scheibling, 2014) τη δεκαετία του 1970, ειδικά κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, σε ρηχά νερά και μεγάλη πυκνότητα πληθυσμών (Boudouresque et al. 1980, Azzolina 1987 σε Feehan & Scheibling, 2014). Αντίστοιχο περιστατικό αναφέρεται και το 2003 (Girard et al., 2012), σε τμήματα της παλιρροιακής ζώνης στα Κανάρια Νησιά, όπου η επικράτηση της ασθένειας συσχετίστηκε θετικά με τη αύξηση της θερμοκρασία της επιφάνειας της θάλασσας και αρνητικά με το ύψος των κυμάτων, συνδεόμενη σύμφωνα με τους ερευνητές με επακόλουθη αλλαγή των αβιοτικών παραμέτρων των ωκεανών. Η επίδραση της υψηλής θερμοκρασίας στη μαζική θνησιμότητα του είδους *S. droebachiensis* (Nova Scotia, Canada) επισημαίνεται και από τους Scheibling & Stephenson (1984). Η ενοχοποιούμενη ασθένεια, γνωστή ως «bald-sea-urchin», προκαλεί πληγές στην εξωτερική επιφάνεια του σώματος αντίστοιχες με τις οποίες είχαν αναφερθεί το 1934 από τους Mortensen & Rosevinge (σε Maes & Jangoux, 1984). Επίσης περιγράφεται και σε εκτρεφόμενους αχινοίς του είδους *Strongylocentrotus intermedius* στην Ιαπωνία από τους Tajima et al. (1997a).

Πρόκειται για μία μεταδοτική ασθένεια, καθώς έχει αποδειχθεί ότι (α) οι νεκρωτικοί ιστοί είναι μολυσματικοί και (β) εκδηλώνεται όταν υγιή Εχινοειδή βρίσκονται στο εγγύς περιβάλλον ασθενών Εχινοειδών.



### 2.4.1.1 Συμπτωματολογία

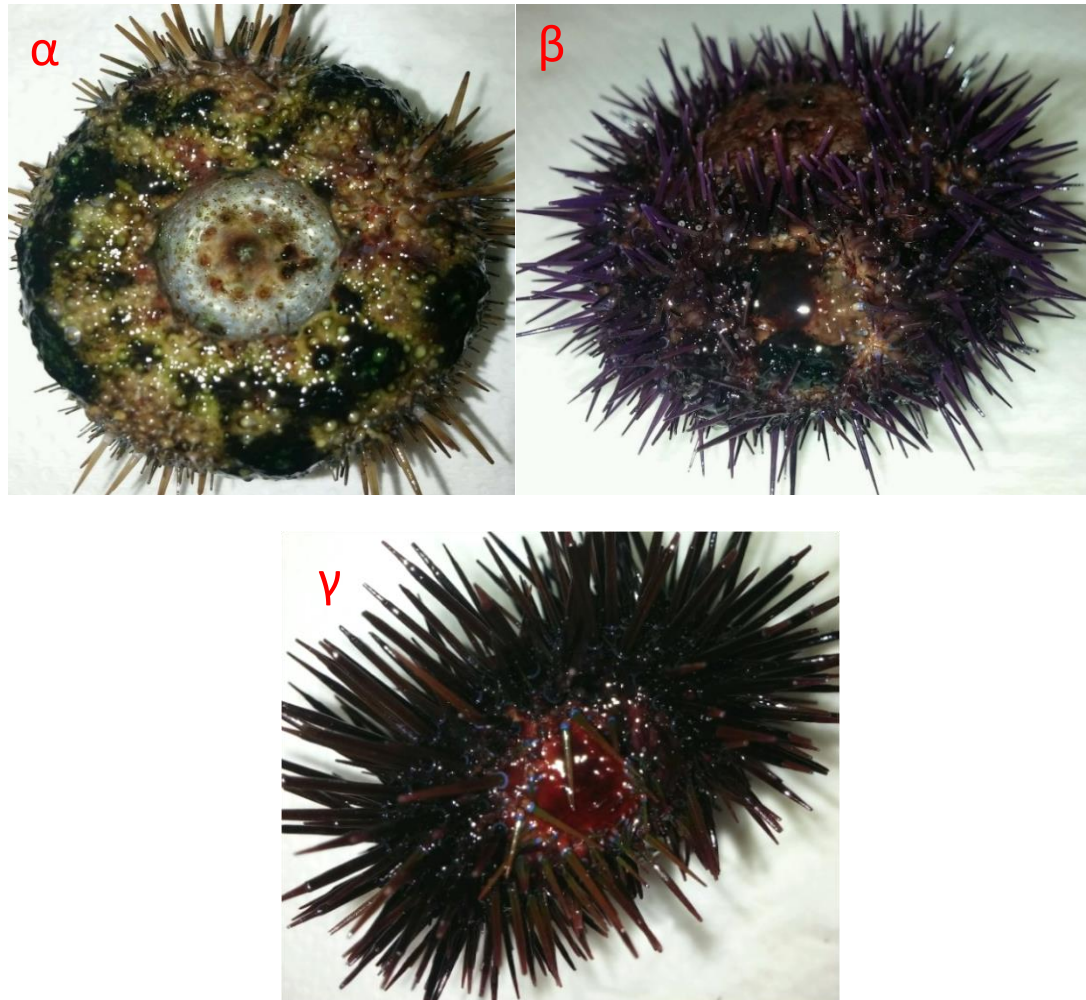
Η ασθένεια «bald-sea-urchin» προκαλεί εμφανείς πληγές στην εξωτερική επιφάνεια του σώματος αρκετών ειδών Εχινοειδών (Johnson, 1971 σε Jangoux, 1984 και Pearse et al., 1977) που μελετήθηκαν και αποικούν τις ακτές της Καλιφόρνια και τη Μεσόγειο Θάλασσα (Höbaus et al., 1981). Οι πληγές συχνά είναι εκτεταμένες (το μέγεθος τους ποικίλλει από λίγα mm<sup>2</sup> έως πάνω από το ένα τρίτο της συνολικής επιφάνειας του σώματος) και η ασθένεια μπορεί να προκαλέσει το θάνατο των Εχινοειδών. Μπορεί να αναπτυχθούν σε οποιοδήποτε σημείο του σώματος περισσότερες από μία πληγές ταυτόχρονα. ενώ ανεξάρτητα του μεγέθους τους, αποτελούνται πάντοτε από μια περιοχή που στερείται πλήρως των εξωτερικών σωματικών εξαρτημάτων του Εχινοειδούς (αγκάθια, ποδίσκοι, ποδολαβίδες) και περιβάλλεται από μια ζώνη κοκκινωπού οίδηματώδους ιστού. Η πληγή μπορεί να είναι καλυμμένη από πρασινωπό νεκρωτικό ιστό, ή να αποτελείται μόνο από απογυμνωμένο σκελετό, με τους υπερκείμενους νεκρωτικούς ιστούς να έχουν αποκοπεί (Εικόνα 22). Στην τελευταία περίπτωση η προσβεβλημένη περιοχή μπορεί να αποικηθεί από επιστρώσεις παρασιτικών οργανισμών (Mortensen & Rosevinge, 1934 σε Maes & Jangoux, 1984). Επίσης, είναι δυνατόν να διατηρηθεί ο σκελετός, με αποτέλεσμα το θάνατο των ατόμων (Jangoux, 1984, Jangoux, 1990 σε Becker et al., 2007).



*Εικόνα 22: Πληγές στο σώμα αχινοού του πειράματος διατροφής. Φαίνεται καθαρά ο πράσινος νεκρωτικός ιστός που καθώς επεκτείνεται αφήνει απογυμνωμένο σκελετό.*

Η πληγή αναπτύσσεται με στερεότυπο τρόπο ως εξής (Johnson, 1971 σε Jangoux, 1984, Maes & Jangoux, 1984): 1) η επιδερμίδα που περιβάλλει τις βάσεις κάποιων αγκαθιών πρασινίζει, 2) παρατηρείται απώλεια αγκαθιών και άλλων εξωτερικών εξαρτημάτων (ποδίσκοι και ποδολαβίδες) καθώς και πράσινος χρωματισμός στην επιδερμίδα και στον υποκείμενο δερματικό ιστό, 3) ακολουθεί απώλεια της επιδερμίδας και του επιφανειακού δερματικού ιστού και σχηματισμός μιας κυκλικής πληγής που επιμηκύνει την απογυμνωμένη περιοχή του σκελετού, και 4) επέρχεται σταδιακή καταστροφή του ανώτερου στρώματος του σκελετού. Εάν οι πληγές προχωρήσουν βαθύτερα ή φτάσουν στις ασθενώς ασβεστοποιημένες περιστοματικές ή περιπρωκτικές μεμβράνες μπορεί να δημιουργηθεί διάτρηση του σκελετού. Οι ανεπηρέαστες εξωτερικές περιοχές του σώματος δείχνουν φυσιολογικές με φαινομενικά υγιή επιδερμίδα και αγκάθια κάτι που υπονοεί ότι ο νοσογόνος παράγοντας δεν μεταφέρεται αποτελεσματικά μέσω του υδραγγειακού συστήματος (Maes & Jangoux, 1984). Η ανάρρωση των προσβεβλημένων ατόμων (αναγέννηση των επιδερμικών ιστών και των εξωτερικών εξαρτημάτων) στο πεδίο, γίνεται αυθόρμητα πιθανώς κατ' αναλογία του μεγέθους και της

θέσης των πληγών επί του σώματος (Jangoux, 1984). Όμως οι Maes & Jangoux (1984) παρατήρησαν ότι τα Εχινοειδή που έχουν προσβληθεί από την ασθένεια φυσικά αν διατηρηθούν σε ενυδρεία, οι πληγές τους μερικές φορές επεκτείνονται ξαφνικά. Συγκεκριμένα, οι επιδερμικοί ιστοί των προσφάτως μολυσμένων περιοχών γρήγορα γίνονται νεκρωτικοί, το τυπικό πράσινο χρώμα εμφανίζεται εντός 1 ημέρας και τα αγκάθια αποκόπτονται σε λιγότερο από 48 h.



**Εικόνα 23:** Φωτογραφίες από ασθενείς αχινοούς του πειράματος διατροφής: (α) Πολλαπλές πληγές στο ίδιο άτομο, (β) Συνύπαρξη παλιάς πληγής που επουλώνεται, με νέα, (γ) Πληγή που επουλώνεται.

#### 2.4.1.2 Αιτιολογία - Νοσογόνος παράγοντας

Πολλοί μικροοργανισμοί έχουν ταυτοποιηθεί στους νεκρωτικούς ιστούς (π.χ. πρωτόζωα, αμοιβάδες) αλλά είναι αμφίβολο αν έχουν παθογόνο χαρακτήρα καθώς φαίνεται να είναι δευτερεύοντες εισβολείς. Αντίθετα, οι βακτηριακές επιμολύνσεις ενοχοποιούνται για την

δημιουργία των πληγών (Johnson, 1971a σε Miller & Colodey, 1983, Maes & Jangoux, 1984, Maes & Jangoux, 1985, Gilles & Pearse, 1986, Maes et al., 1986 σε Roberts-Regan et al., 1988), και συγκεκριμένα αυτές που προκαλούνται από βακτήρια τα οποία για να επιτύχουν την επιμόλυνση χρειάζεται να προκαλέσουν βλάβη στην επιφάνεια του σώματος (Jangoux, 1990 σε Becker et al., 2007). Έχει απομονωθεί μεγάλος αριθμός ειδών βακτηρίων από διάφορα Εχινοειδή, όμως τα παθογόνα είναι κυρίως βακτήρια των γενών *Aeromonas* και *Vibrio* (Höbaus et al. 1981, Gilles & Pearse, 1986 σε Becker et al., 2008, Jangoux & Maes 1987, Jangoux, 1990 σε Becker et al., 2007, Becker et al., 2007 κ.α.).

Στο *P. lividus* συγκεκριμένα, η ασθένεια σχετίζεται επίσης με πολλά είδη βακτηρίων, τα περισσότερα όμως είναι βακτήρια CFB, Αλφα- και Γαμμα- πρωτεοβακτήρια συμπεριλαμβανομένων των *Vibrio sp.* και *Colwellia sp.*. Ο προσδιορισμός τους έγινε μέσω αλληλούχισης του γονιδίου 16S rRNA (Becker et al., 2008). Επίσης, οι Becker et al. (2008) δείχνουν ότι άτομα *P. lividus* με την ίδια ασθένεια, αλλά από διαφορετικές τοποθεσίες, παρουσιάζουν διαφορετικούς βακτηριακούς πληθυσμούς στις πληγές τους. Σύμφωνα με τους Rommier et al. (2007), τα Αλφαπρωτεοβακτήρια, Γαμμαπρωτεοβακτήρια και CFB είναι παγκοσμίως τα πιο κοινά βακτηριακά φύλα στο θαλάσσιο βακτηριοπλαγκτόν. Επομένως, φαίνεται ότι η ασθένεια «bald-sea-urchin» οφείλεται σε οπορτουμιστικά βακτήρια που προέρχονται από το θαλασσινό νερό.

Αξίζει να σημειωθεί ότι, οι Roberts-Regan et al. (1988), διαπίστωσαν αύξηση του συνολικού αριθμού βακτηρίων στις πληγές του *S. droebachiensis* σε σχέση με τις υγιείς περιοχές της επιφάνειας του δέρματος, καταλήγοντας στο ότι οι πληγές αποτελούν σημεία που ευνοούν την ανάπτυξη της φυσιολογικής χλωρίδας.

#### 2.4.1.3 Ανάρρωση – Αποκατάσταση

Γενικότερα, πολλά είδη Εχινοδέρμων ζουν σε παράκτια νερά άρα είναι εκτεθειμένα σε πιθανώς παθογόνους μικροοργανισμούς. Η καταπολέμηση των μολύνσεων πρέπει να περιλαμβάνει ταχεία, αποτελεσματική και μερικές φορές επιλεκτική εκκαθάριση των μικροβιακών εισβολών ούτως ώστε να εξασφαλιστεί η επιβίωση του ζώου (Gross et al., 1999). Για αυτό το λόγο έχουν αναπτύξει αμυντικούς μηχανισμούς που βασίζονται κυρίως σε ανοσοκύτταρα και παράγοντες χυμικής ανοσίας που υπάρχουν στο κοιλωματικό υγρό (Coffaro & Hinegardner, 1977 και Smith, 1981 σε Arizza et al., 2007, Chia & Xing, 1996, Smith et al., 1996, Pancer et al., 1999, Gross et al., 2000, Pancer, 2000, Kudriavtsev & Polevshchikov, 2004 σε Arizza et al., 2007). Στα Εχινοειδή έχουν περιγραφεί τέσσερα είδη κυττάρων του κοιλωματικού υγρού: αμοιβαδοειδή κύτταρα (amoebocytes), κροσσωτά/βλεφαριδωτά κύτταρα, ερυθρά και άχρωμα σφαιροκύτταρα (Booolootian & Giese, 1958 σε Arizza et al., 2007, Johnson, 1969, Karp & Coffaro, 1980 και Smith, 1981 σε Arizza et al., 2007). Τα αμοιβαδοειδή κύτταρα και τα σφαιροκύτταρα αποτελούν τους κυρίαρχους πληθυσμούς στα κύτταρα του κοιλωματικού υγρού και φαίνεται να ευθύνονται για την πλειοψηφία των ανοσολογικών λειτουργιών όπως η κυτταρική αναγνώριση, η φαγοκυττάρωση, η αντιβακτηριακή δράση κ.α. Έχει ερευνηθεί η ικανότητα των Εχινοειδών να εκκαθαρίζουν παθόγονους παράγοντες, ξενογενή κύτταρα, ξένα μη κυτταρικά σωματίδια και πρωτεΐνες (Gross et al., 1999). Για παράδειγμα σε έρευνες στις οποίες εισήχθησαν βακτήρια στο κοιλωματικό υγρό *in vivo*, όπως στα *S. purpuratus* (Yui & Bayne, 1983), *S. droebachiensis* (Plytycz & Seljelid, 1993), είτε *in vitro* (*S. purpuratus* και *S. franciscanus* σε Johnson, 1969c, *Echinus esculentus* σε Wardlaw & Unkles, 1978, *S. droebachiensis* σε Plytycz & Seljelid, 1993),

τα βακτήρια εκκαθαρίστηκαν αποτελεσματικά σε διάστημα από μερικές ώρες έως μερικές ημέρες.

Τα Εχινοειδή αντιδρούν στη μόλυνση από την ασθένεια «bald-sea-urchin», με την εμφάνιση μιας διακριτής κοκκινωπής ζώνης η οποία διογκώνεται σταδιακά γύρω από την μολυσμένη περιοχή. Όπως έδειξε ο Johnson (1971, σε Maes & Jangoux, 1984), αυτή η ζώνη αποτελείται από ένα χαλαρό σύνολο κυττάρων (φαγοκύτταρα και ερυθρά σφαιροκύτταρα) τα οποία προέρχονται από την κοιλωματική κοιλότητα (Gross et al., 1999). Όταν η μολυσμένη περιοχή είναι μικρή, η κοκκινωπή ζώνη σταδιακά καλύπτει την πληγή (Εικόνα 2(β,γ)) η οποία εντέλει εξαφανίζεται, ενώ όταν η περιοχή είναι εκτεταμένη, η ζώνη επεκτείνεται εντός του σκελετού. Στην πραγματικότητα, ο ιστός της ζώνης αυτής δημιουργεί ένα είδος εσωτερικής ασπίδας που απομονώνει ένα επιφανειακό επίπεδο «νεκρού» σκελετού, το οποίο τελικά αποκόπτεται. Επομένως, τα ασθενή Εχινοειδή έχουν άμυνα και τη δυνατότητα να αναρρώσουν από τη μόλυνση, αν και όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, υπάρχουν εκτεταμένες αναφορές από μαζική θνησιμότητα πληθυσμών Εχινοειδών λόγω της ασθένειας.

#### **2.4.2 Οικολογία**

Τα Εχινόδερμα αποτελούν σημαντική συνιστώσα πολλών βενθικών περιβαλλόντων. Οι ασθενείς τους πιθανώς να περιλαμβάνουν σημαντικές οικολογικές επιπτώσεις, χωρίς όμως να υπάρχει εκτεταμένη μελέτη επ' αυτού. Τα Εχινόδερμα της παραλιακής ζώνης είναι συχνά μεγάλοι θηρευτές στην βιοκοινωνία τους ή παράγοντες ελέγχου των μακροφυκών (π.χ. λιβάδια *Posidonia* και kelp). Η αφαίρεση αυτών των θηρευτών μπορεί να προκαλέσει σοβαρές περιβαλλοντικές αλλαγές στη δομή και τη σταθερότητα του οικοσυστήματος της υποπαλιρροιακής ζώνης, σε σύντομο χρονικό διάστημα (Pearse & Hines, 1979, Boudouresque et al., 1980, Scheibling & Stephenson, 1984, Harvell et al., 2007). Μαζικοί θάνατοι από ασθενή Εχινοειδή έχουν ερευνηθεί οικολογικά από τους Pearse & Hines (1979), οι οποίοι ανέφεραν ότι τη μαζική θνησιμότητα των αχινών *Strongylocentrotus franciscanus* στην Καλιφόρνια, ακολούθησε μια ταχεία επέκταση τεσσάρων ειδών φαιοφυκών. Ο ανταγωνισμός μεταξύ των ειδών των φυκών ήταν σημαντικός και εντός ενός έτους, μόνο ένα είδος αποικούσε την περιοχή. Κατ' επέκταση, οι Miller & Colodey (1983) κατέληξαν ότι ο μαζικός θάνατος Εχινοειδών σε ένα βραχώδες ενδιαίτημα στη Nova Scotia του Καναδά θα είχε σαν συνέπεια αποικισμό από υποπαλιρροιακά φύκη και ακολούθως από αύξηση στην βενθική πρωτογενή παραγωγή. Επίσης, η ασθένεια «bald-sea-urchin» που προκάλεσε τη μαζική θνησιμότητα αχινών στη βορειοδυτική Μεσόγειο τη δεκαετία του 1970, οδήγησε σε μια τοπική αύξηση των νηματοειδών επιφύτων στο λιβάδι της *Posidonia oceanica* (Boudouresque et al. 1980).

#### **2.4.3 Η ασθένεια σε συνθήκες υδατοκαλλιέργειας**

Για τη συγκεκριμένη ασθένεια οι περισσότερες αναφορές αφορούν σε πληθυσμούς του φυσικού περιβάλλοντος. Το γεγονός όμως ότι στα πλαίσια της παρούσας εργασίας εκδηλώθηκε κατά τη διατήρηση των αχινών σε ενυδρεία, μας οδηγεί σε περαιτέρω διερεύνηση των αιτίων και των συνθηκών, καθώς μπορεί να επηρεάσει το παραγωγικό και οικονομικό αποτέλεσμα μιας μονάδας εκτροφής αχινών. Συγκεκριμένα, οι γονάδες παύουν την παραγωγή σπέρματος ή ωαρίων στο τελευταίο στάδιο της ασθένειας, δηλαδή όταν το άτομο είναι ετοιμοθάνατο, όμως ο περιορισμός ή η παύση της κατανάλωσης τροφής συμβαίνει στο αρχικό στάδιο της ασθένειας (Jones et al., 1985), συνεπώς περιορίζεται και η

ανάπτυξη των γονάδων που είναι ο κύριος στόχος μιας καλλιέργειας αχινού. Επιπλέον, η μόλυνση πιθανώς συνεπάγεται σε κάποιο βαθμό μια ενεργειακή εξάντληση, η οποία αντικατοπτρίζεται από την παρουσία ατροφικών γονάδων που συναντάται συχνά, και από το χαμηλότερο Γοναδοσωματικό Δείκτη που καταγράφεται σε ασθενή άτομα (Roberts-Regan et al., 1988).

#### **2.4.4 Μοριακή ανάλυση για την ταυτοποίηση των παθογόνων παραγόντων**

Με τα σημερινά διαθέσιμα μοριακά εργαλεία, ο προσδιορισμός των μολυσματικών βακτηρίων αποκλειστικά μέσω καλλιέργειας είναι επισφαλής. Παραδείγματος χάριν, είναι πιθανό να απομονωθεί ένα μολυσματικό στέλεχος και λανθασμένα να θεωρηθεί ως ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας, ενώ στην πραγματικότητα διαδραματίζει δευτερεύοντα ρόλο. Οι μοριακές τεχνικές ωστόσο, μπορούν να εντοπίσουν μη καλλιεργήσιμα βακτήρια που πιθανόν έχουν σημαντικό ρόλο στην ασθένεια (Becker et al., 2007), και αυτή η προσέγγιση επιλέχθηκε και στην παρούσα εργασία για την απάντηση των ερωτημάτων που προέκυψαν σχετικά με την εκδήλωση της ασθένειας «bald-sea-urchin» στους αχινοί των πειραμάτων διατροφής. Οι βασικοί προβληματισμοί συνοψίζονται στα εξής:

- Ποιοι παθογόνοι παράγοντες είναι υπεύθυνοι για την εκδήλωση της ασθένειας;
- Ποια είναι η προέλευσή τους; Πρόκειται για μικροοργανισμούς που ζουν φυσιολογικά στο νερό, συμβιωτικούς φυσιολογικούς πληθυσμούς των αχινών ή εισβολείς;
- Οι συνθήκες εκτροφής των αχινών (π.χ. τεχνητά σιτηρέσια, θερμοκρασία, είδος νερού εκτροφής) ευνοούν τον πολλαπλασιασμό τους ή ευθύνονται με διαφορετικό τρόπο (π.χ. αποδυνάμωση του ανοσοποιητικού συστήματος των αχινών);

##### **2.4.4.1 DNA metabarcoding με τη χρήση τεχνολογιών αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing)**

Η εξέλιξη στη μελέτη της βιοποικιλότητας μέσω της αναγνώρισης ειδών από το DNA, περιλαμβάνει νέες τεχνολογίες στην αλληλούχιση, τη βιοπληροφορική, την υπολογιστική υποδομή και στους πειραματικούς σχεδιασμούς. Έτσι πλέον δίνεται η δυνατότητα επέκτασης της αναγνώρισης ειδών μέσω τυποποιημένων τμημάτων DNA (barcoding), στην αναγνώριση κοινωνιών (metabarcoding) αποτελούμενων από διαφορετικά είδη με διακριτούς ρόλους μέσα στο οικοσύστημα (Ji et al., 2013). Αυτή η ταχύτητα αναπτυσσόμενη, υψηλής απόδοσης και ευαισθησίας, πολυειδική μέθοδος αναγνώρισης, παρέχει τη δυνατότητα εκτίμησης της βιοποικιλότητας σε περιβαλλοντικό DNA, σε συνονθύλευμα δειγμάτων (ολικό DNA) για το οποίο η αναγνώριση ειδών δεν είναι πρακτική (Taberlet et al., 2012, Bohmann et al., 2014 σε Cristescu, 2014), γι'αυτό χρησιμοποιείται συχνά για τη διερεύνηση των μικροβιακών κοινωνιών. Η εξέλιξη του DNA metabarcoding, συνολικά έχει προκαλέσει αύξηση της ταχύτητας, της ακρίβειας και του βάθους της ανάλυσης στην αναγνώριση ειδών (Taylor & Harris, 2012, Ji et al., 2013, Gibson et al., 2014 σε Cristescu, 2014). Το DNA metabarcoding χρησιμοποιεί μοριακές τεχνικές (PCR, τεχνολογία αλληλούχισης επόμενης γενιάς), και τα ενσωματώνει μέσω βιοπληροφορικής με κλασικά δεδομένα οικολογίας.

Τα εργαλεία της τεχνολογίας αλληλούχισης επόμενης γενιάς υψηλής απόδοσης, έχουν την ικανότητα αλληλούχισης δειγμάτων με ένα μαζικό παράλληλο τρόπο, με αυξημένη ταχύτητα

και μειωμένο κόστος. Αυτή η επανάσταση στην τεχνολογία αλληλούχισης, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη των προηγμένων υπολογιστικών εργαλείων που αξιοποιούν τα μεταδεδομένα για να συσχετίσουν μεταξύ τους εκατοντάδες δειγμάτων, έχει επιπλέον διευρύνει τα όρια στην ανάλυση των μικροβιακών κοινοτήτων. Αυτό έχει επιτευχθεί από την αναζωογόνηση των μελετών του βακτηριακού γονιδίου 16S rRNA (Tringe & Hugenholtz, 2008 σε Caporaso et al., 2011), καθώς έγινε δυνατή η αλληλούχιση περισσότερων από τις υπερμεταβλητές περιοχές του γονιδίου 16S, μειώνοντας έτσι την πιθανή προκατάληψη από τη χρήση γενικών (universal) βακτηριακών εκκινητών (Mao, et al., 2012).

Η τεχνολογία αλληλούχισης επόμενης γενιάς προς το παρόν κυριαρχείται από την Illumina και τις πλατφόρμες της, με τα HiSeq και MiSeq να είναι οι πλέον εδραιωμένες (D'Silva, 2016) επιτρέποντας βαθύτερη αλληλούχιση και προσδιορισμό ακόμα και φυλοτύπων που είναι πολύ σπάνιοι (Lazarevic et al., 2009 σε Caporaso et al., 2011). Το MiSeq έχει σχεδιαστεί για χαμηλότερη ταχύτητα και εφαρμογές μικρότερης κλίμακας, με τη λειτουργικότητά του να ταιριάζει περισσότερο στην αλληλούχιση μικρών γονιδιωμάτων και τη στοχευμένη αλληλούχιση, ενώ χαρακτηρίζεται από ταχύτητα στη λειτουργία του, της τάξης των λίγων ωρών, με τη δυνατότητα να προχωρήσει από την προετοιμασία του δείγματος σε ανάλυση δεδομένων σε λιγότερο από μία ημέρα (D'Silva, 2016). Το MiSeq είναι η πλατφόρμα που θα χρησιμοποιηθεί για τη μοριακή ανάλυση των δειγμάτων της παρούσας εργασίας (Εργαστήριο Γενετικής, Ι.ΘΑ.Β.Β.ΥΚ, Ελ.Κε.Θ.Ε).

#### **2.4.4.2 Ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA για τη διερεύνηση της μικροβιακής ποικιλότητας**

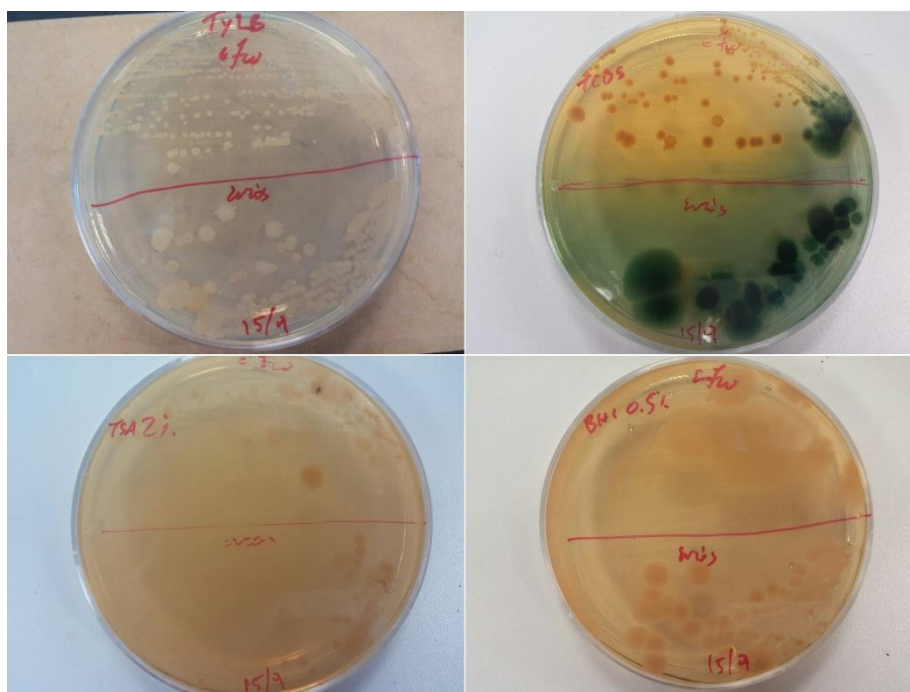
Το γονίδιο 16S ριβοσωμικού RNA (rRNA) είναι ένας σημαντικός γενετικός δείκτης και η αλληλούχιση των αμπλικονίων του παραμένει η βασική προσέγγιση για τη διερεύνηση της μικροβιακής ποικιλότητας και το χαρακτηρισμό της δομής των μικροβιακών κοινοτήτων (Pace, 1997 σε Caporaso et al., 2011, Schmalenberger et al., 2001 σε Mao et al., 2012, Klindworth et al., 2012). Γενικά, οι έρευνες που βασίζονται στο 16S rRNA είναι εξαιρετικά πολύτιμες, δεδομένου ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την καταγραφή της ανεξερεύνητης βιοποικιλότητας και των οικολογικών χαρακτηριστικών είτε ολόκληρων κοινοτήτων είτε συγκεκριμένων μικροβιακών τάξεων (Caporaso et al., 2011).

Οι αλληλουχίες του γονιδίου 16S rRNA περιέχουν 9 υπερμεταβλητές περιοχές (V1-V9) που παρέχουν μοναδικές για κάθε είδος αλληλουχίες κάτι το οποίο είναι πολύ χρήσιμο για τον προσδιορισμό των βακτηρίων (Kolbert & Persing, 1999, Pereira et al., 2010), με αποτέλεσμα η αλληλούχιση του γονιδίου να έχει κυριαρχήσει στην μικροβιολογία σε σχέση με τις μεθόδους φαινοτυπικού προσδιορισμού των βακτηρίων. Οι εκκινητές που στοχεύουν στην υπερμεταβλητή περιοχή 4 (V4) της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος (SSU/small ribosomal subunit – 30S) του γονιδίου rRNA, χρησιμοποιούνται σταθερά σε μελέτες που διερευνούν και συγκρίνουν την ταξινομική ποικιλομορφία των μικροβιακών κοινοτήτων (Caporaso et al. 2012, Kozich et al. 2013 σε Apprill et al., 2015). Οι εκκινητές V4 είναι δημοφιλείς γιατί στοχεύουν τα *Bacteria* και τα *Archaea*, και παράγουν κατάλληλο μέγεθος αμπλικονίων για αλληλούχιση επόμενης γενιάς. Επιπλέον είναι αυξανόμενη η αφθονία των δεδομένων αλληλούχισης της V4, κάτι το οποίο επιτρέπει σημαντικές συγκρίσεις εντός και μεταξύ περιβαλλόντων (Apprill et al., 2015).

#### 2.4.5 Καλλιέργεια

Πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες με δείγμα από το πράσινο επίχρισμα που καλύπτει τις πληγές αχινού που ασθενεί. Επίσης, μετά από ανατομή του αχινού πάρθηκε δείγμα και από το κοιλωματικό υγρό. Η καλλιέργεια έγινε στα εξής θρεπτικά υλικά: TSA (tryptone soy agar), BHI (brain heart infusion agar) με περιεκτικότητα 0,5% σε NaCl, TCBS medium το οποίο είναι εκλεκτικό για *Vibrio sp.* και LB-marine salts (tryptone 1%, yeast 0,5%). Η επώαση έγινε στους 25 °C για τουλάχιστον 24 ώρες.

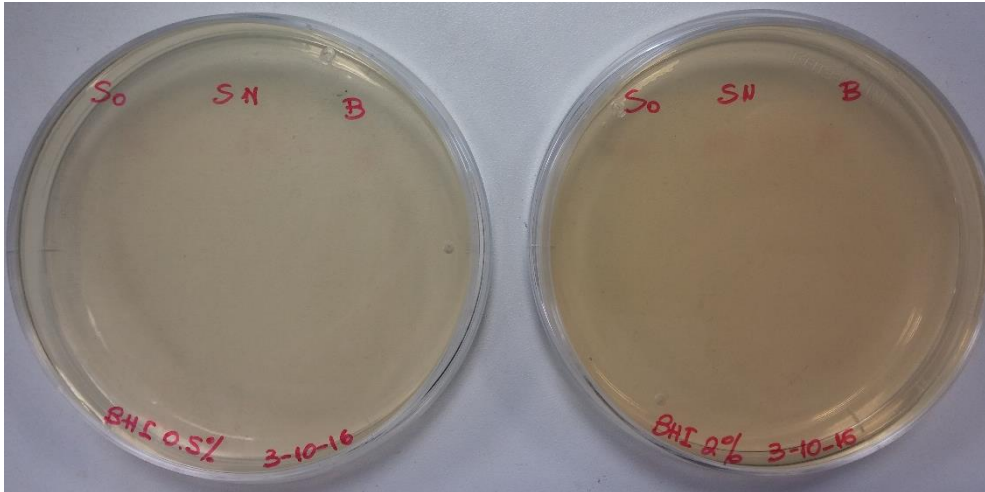
Παρατίθενται οι φωτογραφίες από τα τρυβλία των καλλιεργείων.



**Εικόνα 24:** Τα τρυβλία των καλλιεργείων στα διαφορετικά θρεπτικά υλικά, στα οποία φαίνονται οι αποικίες που αναπτύχθηκαν από το επίχρισμα των πληγών (πάνω τμήμα του τρυβλίου) και από το κοιλωματικό υγρό (κάτω τμήμα του τρυβλίου).

Αναπτύχθηκαν πολυάριθμες αποικίες από πολλούς διαφορετικούς μικροοργανισμούς με αποτέλεσμα να είναι πολύ δύσκολος ο προσδιορισμός τους. Για αυτό το λόγο, καθώς και για λόγους ακρίβειας καθώς, όπως αναφέρθηκε εισαγωγικά (παρ. 1.7), ο προσδιορισμός των παθογόνων παραγόντων αποκλειστικά μέσω καλλιέργειας πιθανόν να είναι ελλιπής και παραπλανητικός, επιλέχθηκε η αξιοποίηση μοριακών μεθόδων για την περαιτέρω διερεύνηση της παθολογίας των αχινών.

Όσον αφορά τις αποικίες που σχηματίστηκαν από το δείγμα του κοιλωματικού υγρού, εκτιμήθηκε ότι πιθανώς είναι αποτέλεσμα επιμόλυνσης καθώς όπως προαναφέρθηκε φυσιολογικά είναι ασηπτικό. Για να επιβεβαιωθεί αυτή η εκτίμηση, πραγματοποιήθηκε δεύτερη καλλιέργεια δείγματος του κοιλωματικού υγρού από άλλο άτομο, σε θρεπτικό υλικό BHI με περιεκτικότητες 0,5% και 2% σε NaCl.



**Εικόνα 25:** Τα τρυβλία της δεύτερης καλλιέργειας που πραγματοποιήθηκε με δείγμα από το κοιλωματικό υγρό, στα οποία δεν αναπτύχθηκαν αποικίες.

Το αποτέλεσμα της καλλιέργειας δείχνει το αναμενόμενο, καθώς δεν αναπτύχθηκαν καθόλου αποικίες. Για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε επανάληψη της καλλιέργειας και τα αποτελέσματα ήταν ίδια.

## **2.4.6 Μοριακή ανάλυση**

### **2.4.6.1 Εξαγωγή μικροβιακού DNA από αχινούς**

Πραγματοποιήθηκε προκαταρκτική δοκιμή ούτως ώστε να διαπιστωθεί με ποια μέθοδο επιτυγχάνεται η εξαγωγή ολικού DNA σε επαρκή ποσότητα. Για τη δοκιμή αυτή χρησιμοποιήθηκαν 3 αχινοί: 1) Ένα ζωντανό άτομο από τις ομάδες που είχαν αξιοποιηθεί για τα αρχικά πειράματα διατροφής, το οποίο παρουσίαζε πληγές, παρέμενε σε ανεξάρτητη δεξαμενή του Ενυδρείου με νερό γεώτρησης και του παρέχονταν το σιτηρέσιο M1. 2) Ένα άτομο που προερχόταν από τις ομάδες που παρέμεναν σε νερό γεώτρησης με παροχή του σιτηρεσίου A και το οποίο αξιοποιήθηκε στην 3<sup>η</sup> και τελευταία δειγματοληψία, και κατόπιν διατηρήθηκε σε βαθιά κατάψυξη (-80 °C). 3) Ένα ζωντανό άτομο από αυτά που απέμειναν μετά τη λήξη του κυρίως πειράματος διατροφής, από το χειρισμό νερό γεώτρησης – παροχή σιτηρεσίου A.

Οι μέθοδοι που ελέγχθηκαν ήταν:

*Μέθοδος (1):* Απόξεση του ιστού του δέρματος με αποστειρωμένο νυστέρι, και όσον αφορά το άτομο με πληγές το δείγμα πάρθηκε από το επίχρισμα της πληγής. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε σωλήνες των 2 ml.

*Μέθοδος (2):* Τοποθέτηση του ατόμου σε σωλήνες των 50 ml με λίγο νερό και περιοδική ανακίνησή τους για να απελευθερωθούν οι μικροοργανισμοί στο νερό.

Η εξαγωγή του μικροβιακού γενωμικού DNA από αυτά τα 6 δείγματα, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του kit DNeasy Blood & Tissue της Qiagen για την εξαγωγή ολικού DNA από ζωικούς



ιστούς. Παρατίθεται το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε (DNeasy Blood & Tissue Handbook 7/2006, Qiagen):

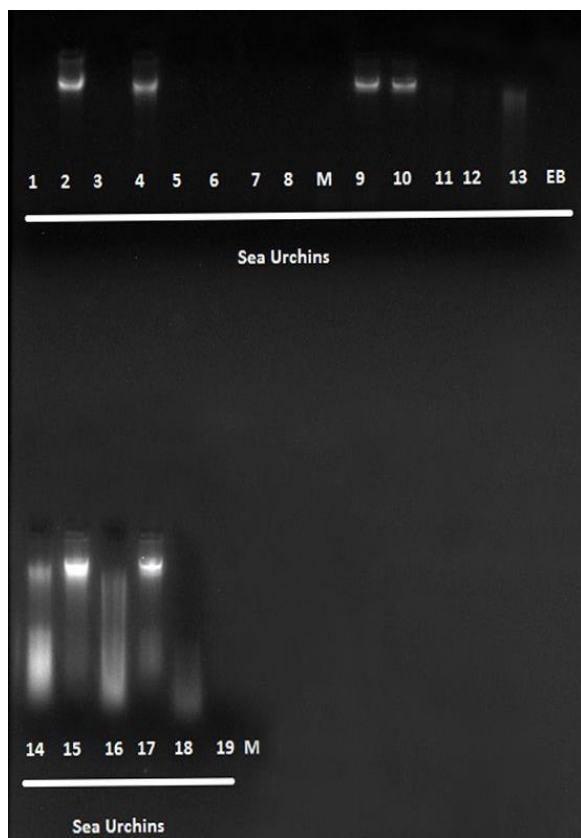
1) Προστέθηκαν 180 µl από το ATL buffer στους σωλήνες της μεθόδου (1) και σε 100 µl από το νερό της μεθόδου (2). 2) Στη συνέχεια προσετέθη 20 µl πρωτεΐνάση K mix και τα δείγματα αναμίχθηκαν στο Vortex. Τα διαλύματα παρέμειναν για 2 hr στους 56 °C για να πραγματοποιηθεί η λύση των ιστών, με ανάμιξη στο Vortex ανά διαστήματα. 3) Μετά την πάροδο των 2 hr τα διαλύματα ανακινήθηκαν στο Vortex για 15 s και προστέθηκαν 200 µl AL Buffer και 200 µl αιθανόλη 95-100% με ανάμιξη μετά από κάθε προσθήκη. 4) Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε κολώνες (DNeasy Mini spin columns) τοποθετημένες σε σωλήνες των 2 ml. Στη συνέχεια μπήκαν στη φυγόκεντρο στα 6000 g (ή 8000 rpm) για 1 min ή έως ότου περάσει όλο το διάλυμα από το φίλτρο της κολώνας. 5) Κρατήθηκαν τα φίλτρα τα οποία τοποθετήθηκαν σε νέους σωλήνες όπου προστέθηκαν 500 µl από το AW1 Buffer. Το δείγμα μπήκε ξανά στη φυγόκεντρο στην ίδια ταχύτητα και για τον ίδιο χρόνο. 6) Τα φίλτρα τοποθετήθηκαν σε νέους σωλήνες όπου προστέθηκαν 500 µl AW2 Buffer. Τα δείγματα μπήκαν στη φυγόκεντρο στα 20.000 g για 3 min. 7) Κατόπιν τα φίλτρα μεταφέρθηκαν σε σωλήνες των 1,5 ml όπου προστέθηκαν 200 µl από το AE Buffer (Elution). Τα δείγματα παρέμειναν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για τουλάχιστον 1 min και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν ξανά στα 6000 g για 1 min για να γίνει η έκλυση των δειγμάτων. 8) Για μέγιστη απόδοση DNA επαναλαμβάνεται το βήμα 7.

Μια ποσότητα 1,5 µl από κάθε δείγμα εξετάστηκε στο φασματοφωτόμετρο NanoDrop-1000 (Thermo-Fisher) στα 230 nm, με τη χρήση του προγράμματος ND-1000 για τον προσδιορισμό της ποσότητας του DNA που εξήχθη ανά µl. Από τον υπολογισμό της ποσότητας DNA (ng/µl) και από το σχεδιασμό των καμπυλών απορρόφησης/μήκους κύματος, εκτιμήθηκε ότι τα δείγματα κατά κανόνα δεν ήταν επαρκώς καθαρά. Οπότε πραγματοποιήθηκε η εξαγωγή μικροβιακού γενωμικού DNA από 13 επιπλέον δείγματα με τη μέθοδο (1), και αυτή τη φορά με τη χρήση του PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA). Παρατίθεται το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε (PowerSoil DNA Isolation Kit 7/2016, Mo Bio):

1) Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στα PowerBead Tubes και 2) αναμίχθηκαν ελαφρά στο Vortex. 3-4) Προστέθηκαν 60 µl Solution C1 και αναμίχθηκαν ελαφρά στο Vortex. 5) Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε Tissue Lyser για 30 min για ανάμιξη. 6) Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 10.000 g για 30 s. 7) 500 µl του υπερκείμενου διαλύματος μεταφέρθηκαν σε σωλήνες 2 ml και 8) προστέθηκαν 250 µl Solution C2, τα διαλύματα αναμίχθηκαν στο Vortex για 5 s, και αφέθηκαν για επώαση στους 4 °C για 5 min. 9) Μετά την πάροδο των 4 min τα διαλύματα φυγοκεντρήθηκαν στα 10.000 g για 1 min. 10) 600 µl του υπερκείμενου υγρού μεταφέρθηκαν σε νέους σωλήνες 2 ml όπου 11) προστέθηκαν 200 µl Solution C3, αναμίχθηκαν ελαφρά και αφέθηκαν για επώαση τους 4 °C για 5 min. 12) Τα διαλύματα φυγοκεντρήθηκαν στα 10.000 g για 1 min και κατόπιν 13) μεταφέρθηκαν 750 µl υπερκείμενου υγρού σε νέους σωλήνες 2 ml όπου 14) προστέθηκαν 1.200 µl Solution C4 και αναμίχθηκαν ελαφρά. 15) 675 µl μεταφέρθηκαν σε Spin Filters και φυγοκεντρήθηκαν στα 10.000 g για 1 min. Το υγρό που πέρασε από το φίλτρο απορρίφθηκε και προστέθηκαν άλλα 675 µl από το υπερκείμενο υγρό, και έγινε ξανά φυγοκέντρωση στα 10.000 g για 1 min. Η διαδικασία επαναλήφθηκε ξανά για την εξάντληση του υπερκείμενου διαλύματος. Στο επόμενο βήμα, 16) προστέθηκαν 500 µl Solution C5 και έγινε φυγοκέντρωση στα 10.000 g για 30 s. 17) Το υγρό που πέρασε από το φίλτρο απορρίφθηκε και 18) έγινε ξανά φυγοκέντρωση στα 10.000 g για 1 min. 19) Τα φίλτρα τοποθετήθηκαν σε νέους σωλήνες 2 ml, και 20) προστέθηκαν 100 µl Solution C6. Τέλος, 21)

τα διαλύματα φυγοκεντρήθηκαν στα 10.000 g για 30 s, 22) τα φίλτρα απορρίφθηκαν και τα δείγματα DNA αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη.

Η απόδοση της εξαγωγής του DNA (ποσότητα-ποιότητα) από τα παραπάνω συνολικά 19 δείγματα, ελέγχθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης του εξαχθέντος προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 26). Σε μια ποσότητα 5 μl του εξαχθέντος DNA προστέθηκαν 5 μl χρωστικής για να είναι καθαρότερα ορατή η μετατόπιση κατά την ηλεκτροφόρηση. Η παρασκευή του πηκτώματος έγινε με αγαρόζη 1% σε διάλυμα buffer TAE 1x, στο οποίο προστέθηκαν 3 μl βρωμιούχου αιθυδίου (1g/dl). Η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 80 Volt για περίπου 30 λεπτά.



**Εικόνα 26:** Φωτογραφία του πηκτώματος κατά την έκθεσή του σε υπεριώδη ακτινοβολία, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης.

Ο έλεγχος της ποιότητας και ποσότητας του εξαχθέντος DNA μέσω ηλεκτροφόρησης, έδειξε ότι τα δείγματα που εξήχθησαν με το PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio) (1-13), όσα έδωσαν αποτελέσματα, ήταν πολύ πιο καθαρά και εξειδικευμένα από τα δείγματα που εξήχθησαν με το DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) (14-19). Από τα τελευταία, τα δείγματα DNA που εξήχθησαν με τη μέθοδο εξαγωγής (2) (15, 17) ήταν καθαρότερα από τα δείγματα DNA που εξήχθησαν με τη μέθοδο εξαγωγής (1) (14, 16, 18).

Συνεπώς, επιλέχθηκε καταληκτικά η εξαγωγή του μικροβιακού DNA από το σύνολο των δειγμάτων να πραγματοποιηθεί με τη χρήση του PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio). Ενώ, όσον αφορά την ποσότητα DNA που απομονώθηκε, διαπιστώθηκε ότι ήταν επαρκής και με τις 2 μεθόδους εξαγωγής, γι' αυτό έγινε η εφαρμογή και των δύο σε όλα τα άτομα των αχιών (σύνολο 16 δείγματα από όλους τους χειρισμούς και από μάρτυρα).

#### **2.4.6.2 Εξαγωγή μικροβιακού DNA από νερό**

Συλλέχτηκε ποσότητα νερού περίπου 2 lt από την Ελούντα Λασιθίου από το ίδιο σημείο που πραγματοποιούνταν η συλλογή των αχινών για τη διεξαγωγή του πειράματος. Η συλλογή έγινε σε παραλιακή περιοχή από τη στήλη του νερού και το νερό τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένη φιάλη και διατηρήθηκε στην κατάψυξη στους -18 °C έως την επεξεργασία του στο εργαστήριο. Δείγματα νερού πάρθηκαν σε φιάλες των 50 ml και από τις δεξαμενές (νερό γεώτρησης και θαλασσινό νερό) όπου διατηρούνταν οι αχινοί κατά τη διεξαγωγή του πειράματος διατροφής, από το σημείο παροχής του νερού και από το νερό εντός της δεξαμενής σε δύο επαναλήψεις για κάθε περίπτωση.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων των νερών (9 δείγματα συνολικά) αρχικά έγινε φυγοκέντριση στα 5.300 g για 30 λεπτά. Πραγματοποιήθηκε όσες φορές χρειάστηκε για να αξιοποιηθεί όλη η ποσότητα του νερού που είχε συλλεχθεί. Στη συνέχεια το ίζημα μεταφέρθηκε σε σωλήνες των 2 ml με λίγο H<sub>2</sub>O D.D. (double distilled water – υψηλής καθαρότητας νερό από εργαστηριακά συστήματα καθαρισμού) και φυγοκεντρήθηκε ξανά στα 20.000 g για 20 λεπτά. 150 μl από τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή του μικροβιακού γενωμικού DNA με το PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio). Μαζί με τα δείγματα των νερών, έγινε εξαγωγή DNA με την ίδια μέθοδο και από τα δείγματα του νερού στο οποίο είχαν απελευθερωθεί μικροοργανισμοί από τους αχινοί, σύμφωνα με τη μέθοδο (2). Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε έχει περιγραφεί παραπάνω (παρ. 2.2.1).

Μια ποσότητα 1,5 μl από κάθε δείγμα εξετάστηκε στο φασματοφωτόμετρο NanoDrop-1000 (Thermo-Fisher) στα 230 nm, με τη χρήση του προγράμματος ND-1000 για τον προσδιορισμό της ποσότητας του DNA που εξήχθη ανά μl.

#### **2.4.6.3 Εξαγωγή μικροβιακού DNA από τις τροφές**

Για να ταυτοποιηθούν οι μικροοργανισμοί που ανέπτυσαν αποικίες στην επιφάνεια των κύβων τροφής μετά από την παραμονή τους για 3 ημέρες στις δεξαμενές, πάρθηκαν δείγματα από τη μούχλα που κάλυπτε την τροφή. Συνολικά τα δείγματα ήταν 8: Σιτηρέσιο M1-νερό γεώτρησης (2 επαναλήψεις), σιτηρέσιο A-νερό γεώτρησης (2 επαναλήψεις), σιτηρέσιο M1-θαλασσινό νερό (2 επαναλήψεις), σιτηρέσιο A-θαλασσινό νερό (2 επαναλήψεις). Η εξαγωγή του μικροβιακού DNA, έγινε με το PowerSoil DNA Isolation Kit της MoBio Laboratories σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιεγράφηκε παραπάνω (παρ. 2.2.1).

Ακολούθως, 1,5 μl από κάθε δείγμα εξετάστηκε στο φασματοφωτόμετρο NanoDrop-1000 (Thermo-Fisher) στα 230 nm, με τη χρήση του προγράμματος ND-1000 για τον προσδιορισμό της ποσότητας του DNA που εξήχθη ανά μl.

#### **2.4.6.4 Πολλαπλασιασμός των επιθυμητών γονιδίων μέσω της PCR**

Ο πολλαπλασιασμός του γονιδίου 16S V4 rRNA έγινε μέσω της PCR (Polymerase Chain Reaction – αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης). Η PCR είναι ένας απλός τρόπος πολλαπλασιασμού συγκεκριμένων τμημάτων του αρχικού γενετικού υλικού, έτσι ώστε να είναι εφικτή η περαιτέρω μελέτη του με διάφορες μεθόδους, όπως η αλληλούχιση, η

ηλεκτροφόρηση κ.α.. Η ταχύτητα, η ειδικότητα, η μεγάλη ευαισθησία και το χαμηλό της κόστος την έχουν κάνει μια από τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους σε ερευνητικό και διαγνωστικό επίπεδο. Η αντίδραση εκτελείται σε τρία διαδοχικά στάδια: (α) αποδιάταξη του γενετικού υλικού, (β) υβριδισμός των εκκινητών στη συμπληρωματική τους αλληλουχία του DNA και (γ) επιμήκυνση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας DNA. Στη μέθοδο αυτή, η χρήση ειδικών ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών (primers - εκκινητών) καθώς και της πολυμεράσης του DNA (Taq DNA polymerase) που συνθέτει τη συμπληρωματική αλυσίδα DNA, σε συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας κάνει εφικτό το πολλαπλασιασμό μόνο της συγκεκριμένης περιοχής του DNA που επιθυμείται, και η οποία ορίζεται από το ζεύγος των εκκινητών που επιλέγεται. Για την παρούσα εργασία επιλέχθηκε η KAPA HiFi Taq πολυμεράση γιατί δε δίνει υποπροϊόντα και είναι κατάλληλη για αλληλούχιση στην πλατφόρμα μαζικής αλληλούχισης MiSeq, Illumina. Στον Πίνακα 7 παρατίθενται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν.

**Πίνακας 7:** Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και οι αλληλουχίες τους.

Γονίδιο	Όνομα	Αλληλουχία (5' – 3')
16S V4	341F	CCTACGGGNGGCWGCAG
	805RB	GGACTACN VGGGTWTCTAAT

Η PCR εκτελείται στον θερμικό κυκλοποιητή (Thermal cycler) (Εικόνα 27), συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα με τη δυνατότητα να εναλλάσσει τις θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια. Στη συσκευή ορίζεται το επιθυμητό πρόγραμμα, με τις θερμοκρασίες, τη διάρκεια κάθε σταδίου και τη διαδοχή τους.



**Εικόνα 27:** Θερμικός κυκλοποιητής όπου πραγματοποιείται η κλασική αντίδραση PCR. Στην οθόνη απεικονίζεται το πρόγραμμα των διαδοχικών κύκλων για τη διενέργεια της αντίδρασης. (<http://www.biocompare.com/Nucleic-Acid-Electrophoresis/23396-Thermal-Cyclers-Thermocyclers-96-Well/>)

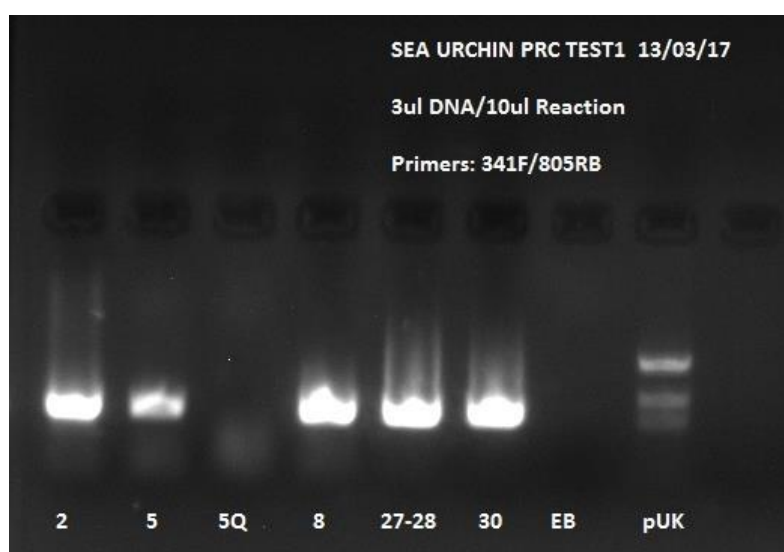
Πραγματοποιήθηκε δοκιμαστική PCR με ενδεικτικό αριθμό δειγμάτων για να επιβεβαιωθεί ότι δεν υπάρχει κάποιο πρόβλημα και αποκομίζονται τα επιθυμητά αποτελέσματα. Στον Πίνακα 8 παρατίθενται το μίγμα της PCR και το πρόγραμμα των κύκλων των αντιδράσεων.

**Πίνακας 8:** Τα συστατικά του μίγματος και οι συνθήκες των κύκλων αντιδράσεων της δοκιμαστικής PCR.

PCR SetUp						
Μίγμα PCR			Κύκλοι αντιδράσεων			
Συστατικά	Ποσότητα (μl) x 1	Ποσότητα (μl) x 9	Στάδια	Θερμοκρασία (° C)	Χρόνος (sec)	
KAPA HiFi Taq	0,2	1,8	Αρχική αποδιάταξη	95	120	x 30 κύκλοι
Trehalose	2	18	Αποδιάταξη	98	20	
Fidelity Buffer	2	18				
dNTPs	0,3	2,7	Υβριδισμός εκκινήτων	57	15	
Primer Frw	0,3	2,7				
Primer Rev	0,3	2,7				
H <sub>2</sub> O	1,9	17,1	Επιμήκυνση	72	30	
DNA	3	3/δείγμα	Τελική επιμήκυνση	72	60	
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>63</b>				

Η απόδοση της αντίδρασης PCR ελέγχθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης του προϊόντος της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης. Μετά το πέρας των κύκλων αντιδράσεων, στα προϊόντα του DNA κάθε δείγματος προστέθηκαν 5 μl χρωστικής για να είναι καθαρότερα ορατή η μετατόπιση κατά την ηλεκτροφόρηση. Η παρασκευή του πηκτώματος έγινε με αγαρόζη 1% σε διάλυμα buffer TAE 1x, στο οποίο προστέθηκαν 3 μl βρωμιούχου αιθυδίου (1g/dl). Η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 80 Volt για περίπου 30 λεπτά.

Από την εικόνα της ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 28), διαπιστώνεται αν με την αντίδραση επετεύχθη πολλαπλασιασμός του γονιδίου στόχου. Επιπλέον από την ένταση της μπάντας που δημιουργείται, μπορεί να γίνει εκτίμηση της ποσότητας του DNA και από την ύπαρξη ή όχι κηλίδων, μπορεί να εκτιμηθεί η ποιότητα του προϊόντος. Ομοίως, μπορεί να διαπιστωθεί ο πιθανός πολλαπλασιασμός μη επιθυμητών περιοχών του DNA από την ενδεχόμενη ύπαρξη διπλής μπάντας ή μπάντας στο μάρτυρα.



**Εικόνα 28:** Φωτογραφία του πηκτώματος της δοκιμαστικής αντίδρασης PCR υπό υπεριώδη ακτινοβολία, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης.

Στην Εικόνα 28 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων στα οποία η εξαγωγή πραγματοποιήθηκε με το PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio) (2, 5, 8, 27-28, 30) τα οποία ήταν ικανοποιητικά εν αντιθέσει με το δείγμα 5Q. Στο συγκεκριμένο δείγμα η εξαγωγή πραγματοποιήθηκε με το DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) εκτός από τη φάση της κυτταρικής λύσης και της απομάκρυνσης των αναστολέων που πραγματοποιήθηκαν με το PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio) (βήματα 8-13 του πρωτοκόλλου, παρ. 2.2.1).

Πραγματοποιήθηκε δεύτερη δοκιμαστική PCR σε 6 δείγματα για να διερευνηθεί η ποσότητα του προϊόντος DNA που θα είναι η καταλληλότερη για την εφαρμογή της τελικής αντίδρασης PCR του συνόλου των δειγμάτων, σύμφωνα με τον παρακάτω σχεδιασμό (Πίνακας 9).

**Πίνακας 9:** Τα συστατικά και οι ποσότητές τους στα δύο μίγματα που ελέγχθηκαν, και οι συνθήκες των κύκλων αντιδράσεων της δεύτερης δοκιμαστικής PCR.

PCR SetUp								
Συστατικά	Μίγμα PCR 1		Μίγμα PCR 2		Κύκλοι αντιδράσεων			
	Ποσότητα (μl) x 1	Ποσότητα (μl) x 8	Ποσότητα (μl) x 1	Ποσότητα (μl) x 8	Στάδια	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (sec)	x 30 κύκλοι
KAPA HiFi Taq	0,5	4	0,5	4	Αρχική αποδιάταξη	95	120	
Trehalose	5	40	5	40	Αποδιάταξη	98	20	
Fidelity Buffer	5	40	5	40				
dNTPs	0,75	6	0,75	6	Υβριδισμός εκκινήτων	57	15	
Primer Frw	1,5	12	1,5	12				
Primer Rev	1,5	12	1,5	12				
H <sub>2</sub> O	4,75	38	7,75	62	Επιμήκυνση	72	30	
DNA	6	6/δείγμα	3	3/δείγμα				
<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>200</b>	<b>25</b>	<b>200</b>	Τελική επιμήκυνση	72	60	

Η δεύτερη δοκιμαστική PCR έδειξε ότι καταλληλότερη ποσότητα DNA, ούτως ώστε να δίνει καλό σήμα, χωρίς όμως να δημιουργείται πρόβλημα αναστολής της αντίδρασης, είναι τα 6 μl προϊόντος (Μίγμα PCR 1).

Στον Πίνακα 10 παρατίθεται ο τελικός σχεδιασμός του μίγματος και των κύκλων αντιδράσεων της τελικής αντίδρασης PCR για το σύνολο των δειγμάτων που πάρθηκαν από αχινούς, νερά και κύβους τροφής.

**Πίνακας 10:** Τα συστατικά του μίγματος και οι συνθήκες των κύκλων αντιδράσεων της αντίδρασης PCR για το σύνολο των δειγμάτων (αχινόι, νερά, τροφές).

PCR SetUp						
Μίγμα PCR			Κύκλοι αντιδράσεων			
Συστατικά	Ποσότητα (μl) x 1	Ποσότητα (μl) x 70	Στάδια	Θερμοκρασία (° C)	Χρόνος (sec)	
KAPA HiFi Taq	0,5	35	Αρχική αποδιάταξη	95	120	x 30 κύκλοι
Trehalose	5	350				
Fidelity Buffer	5	350	Αποδιάταξη	98	20	
dNTPs	0,75	52,5	Υβριδισμός εκκινητών	57	15	
Primer Frw	1,5	105				
Primer Rev	1,5	105				
H <sub>2</sub> O	4,75	332,5	Επιμήκυνση	72	30	
DNA	6	6/δείγμα	Τελική επιμήκυνση	72	60	
<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>1750</b>				

Στην παρούσα εργασία δεν συμπεριλαμβάνονται τα αποτελέσματα της τελικής PCR, η περαιτέρω μεθοδολογία για την προετοιμασία των δειγμάτων για την μαζική αλληλούχιση στην πλατφόρμα MiSeq (Illumina), συνεπώς και τα τελικά αποτελέσματα, τα οποία βρίσκονται σε εξέλιξη.

#### **2.4.7 Συζήτηση**

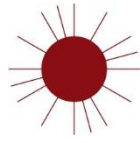
Υπάρχουν αναφορές (Maes & Jangoux, 1984, 1985, Gilles & Pearse, 1986, Maes et al., 1986 σε Roberts-Regan et al., 1988, Jangoux & Maes, 1987 σε Becker et al., 2007) σύμφωνα με τις οποίες οι πληγές στο σώμα των αχινών προκαλούνται μέσω εκδορών στην επιφάνεια του σώματος και επιμόλυνσης της τραυματισμένης περιοχής με υλικό από πληγή ή με βακτήρια απομονωμένα από πληγές. Αυτός είναι ο τρόπος αναπαραγωγής της ασθένειας τεχνητά στο εργαστήριο όπως καταγράφεται σε σειρά ερευνών, ενώ στο πεδίο οι εκδορές είναι συνήθως μηχανικές ή προκαλούνται από οργανισμούς όπως γαστερόποδα (Becker et al., 2007) που παρασιτούν τα Εχινοειδή (Jangoux, 1990 σε Becker et al., 2007), θηρευτές ή από κανιβαλισμό (Roberts-Regan, 1988). Στην παρούσα εργασία φαίνεται ότι η μόλυνση και η δημιουργία πληγών δεν είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί με αυτόν τον τρόπο, καθώς στις δεξαμενές το κάθε άτομο ήταν τοποθετημένο ξεχωριστά στο ειδικό δοχείο, συνεπώς δεν υπήρχε καθόλου και ποτέ επαφή με άλλα άτομα ούτως ώστε να υπάρξει τραυματισμός. Επομένως φαίνεται ότι επιβεβαιώνεται το χαρακτηριστικό της έντονης μεταδοτικότητας της συγκεκριμένης ασθένειας.

Όπως έχει αναφερθεί, υπάρχει προβληματισμός σχετικά με την πιθανότητα η εκδήλωση της ασθένειας να οφείλεται σε κάποιο βαθμό στη χρήση τεχνητών σιτηρεσίων για τη διατροφή των αχινών, ο οποίος μένει να απαντηθεί από τη μοριακή ανάλυση των μικροβιακών κοινοτήτων της επιφάνειας των κύβων τροφής. Η διασταύρωση των αποτελεσμάτων με αυτά από τα δείγματα των αχινών θα δείξει εάν οι κύβοι τροφής χρησιμοποιούνται ως θρεπτικό υλικό για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό παθογόνων μικροοργανισμών. Ωστόσο σημειώνεται ότι σχηματισμός πληγών παρατηρήθηκε και σε άλλους αχινούς των

εγκαταστάσεων του Ενυδρείου, οι οποίοι δεν ήταν μέρος των πειράματων και διατηρούνταν σε νερό γεώτρησης. Συνεπώς, δημιουργείται ένας περαιτέρω προβληματισμός προς μελλοντική διερεύνηση, σχετικά με το κατά πόσο στην εκδήλωση της ασθένειας συνδράμει η χρήση νερού γεώτρησης ως νερό εκτροφής.

Όσον αφορά το μέρος των μεθόδων μοριακής ανάλυσης που συμπεριλαμβάνεται στην παρούσα εργασία, μετά από αρκετές δοκιμές επετεύχθη η απομόνωση επαρκούς ποσότητας ολικού DNA, όπως επίσης και ο πολλαπλασιασμός του γονιδίου-στόχου. Και οι δύο μέθοδοι εξαγωγής (απόξεση δέρματος/επιχρίσματος πληγών και απελευθέρωση μικροοργανισμών σε διάλυμα νερού) έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα, ενώ από τους ελέγχους από την ηλεκτροφόρηση και τις δοκιμαστικές PCR, διαπιστώθηκε ότι η εξαγωγή DNA με το PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio), έδινε καθαρότερο και πιο εξειδικευμένο προϊόν, από ότι το DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen).





### 3. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ



### **3.1 ΒΑΣΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

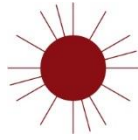
Συνοπτικά, τα κυριότερα συμπεράσματα που προκύπτουν από το σύνολο της παρούσας εργασίας είναι τα ακόλουθα:

- Η χρήση τεχνητών σιτηρεσίων στην εκτροφή αχινών προάγει ικανοποιητικά την γοναδική ανάπτυξη σε σχέση με αχινούς του φυσικού περιβάλλοντος, κάτι που αποτελεί το θεμέλιο λίθο και στόχο μιας υδατοκαλλιέργειας αχινών. Η αύξηση της μάζας των γονάδων σημειώνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα, ενώ ένα ανάμικτο σιτηρέσιο αποδίδει εξίσου καλά αποτελέσματα με ένα σιτηρέσιο 100% ζωικής προέλευσης. Δυστυχώς, το χρώμα των γονάδων το οποίο αποτελεί σημαντικό κριτήριο εμπορευσιμότητας, δεν κρίθηκε κατάλληλο οπότε χρειάζεται περαιτέρω βελτίωση της σύνθεσης των σιτηρεσίων ούτως ώστε να ανταποκρίνεται στα χαρακτηριστικά που απαιτείται να έχει.
- Τα τεχνητά σιτηρέσια μπορεί να προσβληθούν από μικροοργανισμούς, με αρνητικά αποτελέσματα στην υγεία των αχινών, όπως την εκδήλωση ασθενειών, την αναστολή της ανάπτυξης και θνησιμότητα.
- Από προηγούμενες έρευνες καθώς και από τα πειράματα της παρούσας εργασίας, φαίνεται ότι πιθανόν ακόμα και μια μικρή μείωση του pH του νερού εκτροφής συνεπάγεται αρνητικές συνέπειες στην υγεία των αχινών, που εκδηλώνονται με μορφολογικές (σκελετικές) αλλοιώσεις. Το γεγονός όμως ότι στα πειράματα της εργασίας οι αλλοιώσεις αυτές αρχίζουν να εμφανίζονται σε σύντομο χρονικό διάστημα, υποδεικνύει ότι πιθανώς η επίδραση του χαμηλότερου pH συνεπικουρείται από την υψηλή περιεκτικότητα σε κάποια μέταλλα του νερού γεώτρησης, συνδυασμός που έχει αποδειχθεί ότι ευθύνεται για την υποβάθμιση του σκελετού των Εχινοειδών. Ωστόσο επιβάλλεται να σημειωθεί ότι πιθανώς δεν αποκρίνονται όλα τα είδη αχινών με τον ίδιο τρόπο σε αυτές τις συνθήκες. Παρ' όλα αυτά, το χαμηλότερο pH δεν αποτέλεσε παράγοντα αναστολής της γοναδικής ανάπτυξης, τουλάχιστον για το χρονικό διάστημα που διήρκεσαν τα πειράματά μας.
- Επειδή για την ασθένεια που εκδηλώθηκε στα πειράματα φαίνεται να ευθύνεται ή να συμβάλλει μεγάλος αριθμός ειδών μικροοργανισμών, ο προσδιορισμός τους μέσω μοριακών μεθόδων δείχνει να είναι μονόδρομος, ειδικά με την εξέλιξη των μοριακών εργαλείων και των δυνατοτήτων που μας παρέχουν. Η προσπάθεια στησίματος της κατάλληλης μεθοδολογίας για τις μοριακές αναλύσεις στην παρούσα εργασία, πέτυχε την εξαγωγή επαρκούς ποσότητας και ποιότητας DNA και από τις τρεις κατηγορίες δειγμάτων (αχινοί, κύβοι τροφής, νερό).

### **3.2 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι σε εξέλιξη η επεξεργασία μεθοδολογιών και αποτελεσμάτων τα οποία δεν κατέστη δυνατό να συμπεριληφθούν στην παρούσα εργασία, συγκεκριμένα η ταυτοποίηση των καρτενοειδών των γονάδων των αχινών του πειράματος διατροφής και η μοριακή ταυτοποίηση των μικροοργανισμών υπεύθυνων για την ασθένεια. Η ολοκλήρωσή τους ίσως να μπορέσει να δώσει απαντήσεις στα ερωτήματα που προέκυψαν κατά την εξέλιξη των πειραμάτων και να συγκεκριμενοποιήσει τις διορθωτικές αλλαγές που πρέπει να πραγματοποιηθούν ούτως ώστε να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά τα προβλήματα που ανέκυψαν κατά την εκτροφή των αχινών. Κατά τα άλλα, βάσει όλων όσων έχουν αναφερθεί στην παρούσα εργασία, οι μελλοντικές έρευνες προτείνεται να εξετάσουν τα εξής:

- Βελτίωση της συνοχής και σταθερότητας των τεχνητών σιτηρεσιών κατά την παραμονή τους στο νερό, όπως και εξέλιξη της σύνθεσής τους ούτως ώστε να αποφεύγεται η προσβολή τους από μικροοργανισμούς.
- Σχεδιασμό πειραμάτων που θα βάζουν στο επίκεντρο την απόκριση αχινών του είδους *P. lividus* σε διαφορετικά επίπεδα pH, καθώς αποτελεί ζήτημα ιδιαίτερης σημασίας λόγω του φαινομένου της οξίνισης των ωκεανών.
- Πραγματοποίηση γεωχημικών αναλύσεων και παρατήρηση σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο του σκελετού και των αγκαθιών των αχινών για να τεκμηριωθεί σε ποιο βαθμό τα χαμηλότερα επίπεδα pH του νερού γεώρησης και/ή η ύπαρξη υψηλότερων συγκεντρώσεων μετάλλων στο νερό, ευθύνεται για την υποβάθμιση των σκελετικών στοιχείων που παρατηρήθηκε στην παρούσα εργασία.
- Ανάλυση της ποιότητας του νερού γεώρησης, και διερεύνηση της πιθανότητας η χρήση του για την εκτροφή αχινών, να έχει μια ξεχωριστή συμβολή στην εκδήλωση της ασθένειας που παρατηρήθηκε.
- Ανάπτυξη θεραπευτικής αγωγής για την αντιμετώπιση της εκδήλωσης ασθενειών στους αχινούς σε συνθήκες καλλιέργειας.



## 4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



Abdel Aziz S., Hussein L., Esmail S., El-Awadi N., (1997). In vivo rat assay for true protein digestibility and protein quality of beef and meat products extended with soy protein. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 48, 51–56.

Allain J.Y., (1971). Note sur la peche et la commercialization des oursins en Bretagne Nord. *Trav. Lab. Biol. Halieutique, Univ. Rennes, Fr.*, 5: 59-63.

Allain J.Y., (1973). Un nouvel exemple de surexploitation des richesses naturelles: la peche des oursins sur les cotes Nord de Bretagne. *Pen ar bed, Fr.*, 74: 165-174.

Allain J.Y., (1975). Structures des populations de *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata, Echinoidea) soumises a la peche sur les cotes de Bretagne. *Revue Trav. Inst. (scient. tech.) Pech. marit.* 39: 171-212.

Allain J.Y., (1978). Age et croissance de *Paracentrotus lividus* (Lamarck) et de *Psammechinus miliaris* (Gmelin) des cotes nord de Bretagne (Echinoidea). *Cah. Biol. mar.*, XIX : 11-21.

Albright R., Bland C., Gillette P., Serafy J.E., Langdon C., Capo T.R., (2012). Juvenile growth of the tropical sea urchin *Lytechinus variegatus* exposed to near-future ocean acidification scenarios. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 246-247, 12-17.

Anderlini V., (1992). The effect of sewage on trace metal concentrations and scope for growth in *Mytilus edulis aoteanus* and *Perna canaliculus* from Wellington Harbour, New Zealand. *Science of the Total Environment* 155, 236-288.

Anderson R.J., Velimirov B., (1982). An experimental investigation of the palatability of kelp bed algae to the sea urchin *Parechinus angulosus* Leske. *Mar. Ecol.*, 3(4) : 357-353.

Andrew N.L., Agatsuma Y., Ballesteros E., Bazhin A.G., Creaser E.P., Barnes D.K.A., Botsford L.W., Bradbury A., Campbell A., Dixon J., Einarsson S., Gerring P.K., Hebert K., Hunter M., Hur S.B., Johnson C.R., Juinio-Menez M.A., Kalvass P., Miller R.J., Moreno C.A., Palleiro J.S., Rivas D., Robinson S.M.L., Schroeter S.C., Steneck R.S., Vadas R.L., Woodby D.A., Xiaoqi Z., (2002). Status and management of world sea urchin fisheries. *Ann. Rev. Ocean. Mar. Biol.* 40, 343–425.

Apprill A., McNally S., Parsons R., Weber L., (2015). Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton.

Arizza V., Giaramita F.T., Parrinello D., Cammarata M., Parrinello N., (2007). Cell cooperation in coelomocyte cytotoxic activity of *Paracentrotus lividus* coelomocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 147 (2007) 389–394.

Auernheimer C., Llavador F., Pina J.A., (1984). Chemical minority elements in bivalve shell. A natural model. (Mar Menor, Spain). *Archives des Sciences* 37, 317-331.

Auernheimer C., Chinchón S., Pina J.A., (1996). Lead pollution in bivalve shells. Mar Menor, Spain. *Archives des Sciences* 49, 87-98.

Auernheimer C., Chinchón S., (1997). Calcareous skeletons of sea urchins as indicators of heavy metals pollution. Portman Bay, Spain. *Environmental Geology* 29, 78-83.

Augier H., Boudouresque C.F., (1970). Note sur la peche et la commercialization la regression de l'herbier de Posidonies. *Bull. Mus. Hist. nat. Marseille*, 30 : 145-164.

Augier H., Ramonda G., Rolland J., Santimone M., (1989). Heavy metals of the edible urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) collected in four selected areas of the seashore of Marseille (Mediterranean, France). *Marine Life*. 1989.

Ayling A.M., (1978). The relation of food availability and food preference to the field diet of an echinoid *Evechinus chloroticus* (Valenciennes). *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 33 : 223-235.

Azzolina J.F., Nedelec H., (1981). Dynamique des populations de *Paracentrotus lividus* (Echinoderme). *Res. sci. missions CORALIE, Parc nat. Port-Cros* : 16-22.

Azzolina J.F., Boudouresque C.F., (1984). Donnees preliminaires sur la croissance in situ de l'oursin comestible *Paracentrotus lividus* (Echinidae) dans l'herbier a *Posidonia oceanica* de la baie de Port-Cros (Var, France). In: *Intern. workshop on Posidonia oceanica beds*. C.-F. Boudouresque, A. Jeudy de Grissac & J. Olivier eds, GIS Posidonie Publ., Marseille : 283-289.

Azzolina J.F., (1987). Evolution à long terme des populations de l'oursin comestible *Paracentrotus lividus* dans la Baie de Port-Cros (Var, France). In Colloque International sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles. Edited by C.F. Boudouresque, GIS Posidonie Publishers, Marseille, 257-269.

Baily J.E., Bretherton M.J., Gavine F.M., Ferguson H.W., Turnbull J.F., (2005). The pathology of chronic erosive dermatopathy in Murray cod, *Maccullochella peelii peelii* (Mitchell). *Journal of Fish Diseases* 28, 3–12.

Bak P.M., Van Eys G., (1975). Predation of the sea urchin *Diadema antillarum* Philippi on living coral. *Oecologia*, 20 : 111-115.

Ballesteros E., Garcia-Rubies A., (1987). La peche aux oursins en Espagne et plus particulierement en Catalogna. Colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles, Boudouresque C.F. edit., Gis posidonie publ., Marseille, Fr., 5: 325-328.

Barker M.F., Keogh J.A., Lawrence J.M., Lawrence A.L., (1998). Feeding rate, absorption efficiencies, growth, and enhancement of gonad production in the New Zealand sea urchin *Evechinus chloroticus* Valenciennes (Echinoidea: Echinometridae) fed prepared and natural diets. *J. Shellfish Res.* 17, 1583– 1590.

Barnes D.K.A., Crook A.C., (2001). Implications of temporal and spatial variability in *Paracentrotus lividus* populations to the associated commercial coastal fishery. *Hydrobiologia* 465, 95-102.

Barnes D.K.A., Verling E., Crook A., Davidson I., O'Mahoney M., (2002). Local population disappearance follows (20 yr after) cycle collapse in a pivotal ecological species. *Marine Ecology Progress Series* Vol. 226 (January 31 2002), pp. 311-313.

Becker P., Gillan D.C., Eeckhaut I., (2007). Microbiological study of the body wall lesions of the echinoid *Tripneustes gratilla*. *Dis Aquat Org* Vol. 77: 73–82, 2007 doi: 10.3354/dao01821

Beddingfield S.D., McClintock J.B., (1998). Differential survivorship, reproduction, growth and nutrient allocation in the regular echinoid *Lytechinus variegatus* (Lamarck) fed natural diets. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 226(2), 195-215.

Bergin F., (1987). Contenus digestifs de *Paracentrotus lividus* et d' *Arbacia lixula* dans la region d'El Dabaa (Egypte). In: *Colloque international sur Paracentrotus lividus et les oursins comestibles*, C.F. Boudouresque ed., GIS Posidonie Publ., Marseille : 107-116.

Bertram M.A., Mackenzie F.T., Bishop F.C., Bischoff W.D., (1991). Influence of temperature on the stability of magnesian calcite. *American Mineralogist*, 76, 1889-1896.

Binyon G., (1966). Salinity tolerance and ionic regulation. In : *Physiology of Echinodermata*, R.A. Boolootian (ed.), Interscience Publ., New York : 359-377.

Binyon G., (1976). The effects of reduced salinity upon the starfish *Asterias rubens* L. together with a special consideration of the integument and its permeability to water. *Thalassia jugosl.*, 12(1): 11-20.

Birais D., Le Gall P., (1986). Deux cents metres de toboggan pour les oursins. *Aquarevue*, Fr., 5: 31-35.

Birkeland C.E., (1974). Interactions between a sea pen and seven of its predators. *Ecol. Monogr.*, 44 : 211-232.

Bishop C.D., Lee K.J., Watts S.A., (1994). A comparison of osmolality and specific ion concentrations in the fluid compartments of the regular sea urchin *Lytechinus variegatus* Lamarck (Echinodermata: Echinoidea) in varying salinities. *Comp Biochem Physiol* 108A:497–502.

Bohmann K., Evans A., Gilbert M.T.P., Carvalho G.R., Creer S., Knapp M., ... & De Bruyn M., (2014). Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution*, 29(6), 358-367.

Bohne M., Struy H., Gerber A., Gollnick H., (1997). Protection against UVA damage and effects on neutrophil-derived reactive oxygen species by beta-carotene. *Inflammation Res.* 46, 425–426.

Bonnet A., (1925). Documents pour servir à l'étude da la variation chez les Échinides. *Bull Inst Océanogr Monaco* 462:1–28.

Bookbinder L.H., Shick J.M., (1986). Anaerobic and aerobic energy metabolism in ovaries of the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Mar Biol* 93:103–110.

Boolootian R., Giese A., (1958). Coelomic corpuscles of echinoderm. *Biol. Bull.* 15, 53–63.

Boudouresque C.F., Nedelec H., Shepherd S.A., (1980). The decline of a population of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the Bay of Port-Cros (Var, France). - *Tray. scient. Parc natn. Port-Cros* 6, 243-251.

Boudouresque C.F., Verlaque M., Azzolina J.F., Meinesz A., Nedelec H., Rico V., (1989). Evolution des populations de *Paracentrotus lividus* et d' *Arbacia lixula* (Echinoidea) le long d'un transect permanent a Galeria (Corse). *Trav. Sci. Parc. Nat. reg. Res. Nat. Corse*, 22 (1989), pp. 65–82.

Boudouresque C.F., Verlaque M., (2001). Ecology of *Paracentrotus lividus*. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 32, 177-216.

Boudouresque C.F., Verlaque M., (2007). Ecology of *Paracentrotus lividus*. In: Lawrence, J.M. (Ed.), Edible Sea Urchins: Biology and Ecology. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 243–285.

Boudouresque C.F., Verlaque M., (2013). *Paracentrotus lividus*. In: Lawrence JM (ed) Edible sea urchins: biology and ecology. Elsevier, Amsterdam, pp 297–328.

Bougis P., (1971). Effet de la temperature sur le developpement endotrophe des plouteus. In: *Fourth European Marine Biology Symposium*, Crisp D.T. (ed.), Cambridge Univ. Press, London : 197-201.

Bourgoin B.P., (1990). The use of *Mytilus edulis* shells as monitors for lead contamination. Ph.D. thesis, McMaster University, Canada.

Bowmer T., Keegan B.F., (1983). Field survey of the occurrence and significance of regeneration in *Amphiura filiformis* (Echinodermata: Ophiuroidea) from Galway Bay, west coast of Ireland. *Mar Biol* 74: 65–71.

Bray L., Pancucci-Papadopoulou M.A., Hall-Spencer J.M., (2014). Sea urchin response to rising pCO<sub>2</sub> shows ocean acidification may fundamentally alter the chemistry of marine skeletons. *Mediterranean Marine Science*, 15, 510-519.

Brockington S., Clarke A., (2001). The relative influence of temperature and food on the metabolism of a marine invertebrate. *J Exp Mar Biol Ecol* 258:87–99.

Buchanan J.B., (1966). The biology of *Echinocardium cordatum* (Echinodermata, Spatangoida) from different habitats. *J. mar. biol. Ass. UK*, 46 : 97-114.

Burnett L., Terwilliger N., Carroll A., Jorgensen D., Scholnick D., (2002). Respiratory and acid–base physiology of the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, during air exposure: presence and function of a facultative lung. *Biol Bull* 203:42–50

Byrne, M. (1990). Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* from an exposed intertidal and a sheltered subtidal habitat on the west coast of Ireland. *Marine Biology*, 104(2), 275-289.

Byrne M., (1994). Ophiuroidea. In: Harrison FW, Chia FS (eds) *Microscopic anatomy of invertebrates, Echinodermata*, vol 14. Wiley-Liss Inc, New-York, pp 247–343.

Byrne M., (2011). Impact of ocean warming and ocean acidification on marine invertebrate life history stages: vulnerabilities and potential for persistence in a changing ocean. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review*, 49, 1-42.

Byrne M., (2012). Global change ecotoxicology: identification of early life history bottlenecks in marine invertebrates, variable species responses and variable experimental approaches. *Marine Environmental Research*, 76, 3-15.

Caldeira K., Wickett M.E., (2003). Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature* 425:365

Caldeira K., Wickett M.E., (2005). Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. *J Geophys Res.* doi:10.1029/2004JC002671



Calosi P., Rastrick S.P.S., Graziano M., Thomas S.C., Baggini C. et al., (2013a). Distribution of sea urchins living near shallow water CO<sub>2</sub> vents is dependent upon species acid–base and ionregulatory abilities. *Marine Pollution Bulletin*, 73, 470-484.

Calow P., (1981). Resource utilization and reproduction. pp. 245-270 . In: Townsend C . R. and P . Calow (eds .), *Physiological Ecology : An Evolutionary Approach to Resource Use* . Blackwell Science, Oxford, UK.

Caltagirone A., Francour P., Fernandez C., (1992). Formulation of an artificial diet for the rearing of the urchin *Paracentrotus lividus*: I. Comparison of different binding agents. *Echinoderm research 1991*, L. Scalera-Liaci & C. Canicatti (eds). 1992 Balkema, Rotterdam. ISBN 9054100494

Campbell A.C., Dart J.K., Head S.M., Ormond R.F.G., (1973). The feeding activity of *Echinostrephus molaris* (de Blainville) in the central Red Sea. *Mar. Behav. Physiol.*, 2: 155-169.

Campbell J., Evans R.D., (1987). Inorganic and organic ligand binding of Pb and Cd and resultant implications for bio-availability and variability. *Science of the Total Environment* 62, 219-227.

Caporaso J.G., Lauber C.L., Walters W.A., Berg-Lyons D., Lozupone C.A., Turnbaugh P.J., Fierer N., Knight R., (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement 1), 4516-4522.

Caporaso J.G., Lauber C.L., Walters W.A., Berg-Lyons D. et al., (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 6: 1621–1624.

Castro P., Huber M.E., (1992). *Marine Biology*. pp. 178-184.

Catarino A.I., Bauwens M., Dubois P., (2012). Acid–base balance and metabolic response of the sea urchin *Paracentrotus lividus* to different seawater pH and temperatures. *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2012) 19:2344–2353. DOI 10.1007/s11356-012-0743-1

Chen B.Y., Chen C.P., (1993). Reproduction and development of a Miniature Sand Dollar, *Sinaechinocyamus mai* (Echinodermata: Echinoidea). *Bull. Inst. Zool., Academia Sinica*, 32(2) : 100-110.

Cherbonnier G., (1956). Les Echinodermes de Tunisie. *Bull. Stat. ocean. Salammbou*, 53: 1-23.

Chia F.S., Xing J., (1996). Echinoderm coelomocytes. *Zoological Studies-Taipei*-35, 231-254.

Chinchón S., Auernheimer C., Alastuey A., Galí S., (2000). Accumulation of Pb and Zn in sea urchins plates and spines related to their different crystalline structure. *Mar Pol Bull* Vol. 40, No. 7, pp. 647-649.

Chiu S.T., (1985). Feeding biology of the short-spined sea urchin *Anthocidaris crassispina* (A. Agassiz) in Hong Kong. In: *Echinodermata* (B.F. Keegan & B.D.S. O'Connor eds.), A.A. Balkema Publ., Rotterdam : 223-232.

Christensen A.B., Nguyen H.D., Byrne M., (2011). Thermotolerance and the effects of hypercapnia on the metabolic rate of the ophiuroid *Ophionereis schayeri*: inferences for survivorship in a changing ocean. *J Exp Mar Biol Ecol.* doi:10.1016/j.jembe.2011.04.002

Clark D., Lamare M., Barber M., (2009). Response of sea urchin pluteus larvae (Echinodermata: Echinoidea) to reduced seawater pH: a comparison among a tropical, temperate, and a polar species. *Mar. Biol.* 156, 1125-1137.

Coffaro K.A., Hinegardner R.T., (1977). Immune response in the sea urchin *Lytechinus pictus*. *Science*, 197(4311), 1389-1390.

Conand C., Sloan N.A., (1989). World fisheries for echinoderms. *Mar. Invertebr. Fish.*, 647–663.

Cook E.J., Kelly M.S., (2007). Effect of variation in the protein value of the red macroalga *Palmaria palmata* on the feeding, growth and gonad composition of the sea urchins *Psammechinus miliaris* and *Paracentrotus lividus* (Echinodermata). *Aquaculture* 270 (2007) 207–217.

Cristescu M.E., (2014). From barcoding single individuals to metabarcoding biological communities: towards an integrative approach to the study of global biodiversity. *Trends in ecology & evolution*, 29(10), 566-571.

D’Silva C., (2016). The Role of Next Generation Sequencing in the Molecular Diagnosis and Treatment of Retinoblastoma. PhD thesis, Department of Medical Biophysics University of Toronto, p. 12-13.

Dance C., (1985). Contribution a l’étude des Echinoides réguliers du Parc National de Port-Cros: déplacements de *Paracentrotus lividus*, prédation de *Paracentrotus lividus* par *Marthasterias glacialis*, relation taille-poids chez *Sphaerechinus granularis*. Mem. Dipl. Et. approf. Ecol. medit., Univ. Aix-Marseille II, 80 pp.

Dance C., Savy S., (1987). Predation on *Paracentrotus lividus* by *Marthasterias glacialis* : An in situ experiment at Port-Cros (France, Mediterranean). *Posidonia Newsletter*, 1(2): 35-41.

Davies B.H., (1976). Carotenoids. In Goodwin TW (ed.), *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, 2. Academic Press, London: 38–165.

De Jong-Westman M., March B.E., Carefoot T.H., (1995a). The effect of different nutrient formulations in artificial diets on gonad growth in the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Can. J. Zool.* 73, 1495–1502.

De Ridder C., Foret T.W., (2001). Non-parasitic symbioses between echinoderms and bacteria. In: Lawrence JM, Jangoux M. (eds) *Echinoderm studies*, Vol 6. Balkema Publishers, Rotterdam, p 111–169.

Delmas P., (1992). Etude des populations de *Paracentrotus lividus* (Lam.) (Echinodermata : Echinoidea) soumises à une pollution complexe en Provence nord-occidentale: densités, structure, processus de détoxification (Zn, Cu, Pb, Cd, Fe) (Thèse Doct Univ Aix-Marseille III) (1992).

Diehl W.J., McEdward L., Proffitt E., Rosenberg V., Lawrence J.M., (1979). The response of *Luidia clathrata* (Echinodermata: Asteroidea) to hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A : 669-671.

Diehl W.J., (1986). Osmoregulation in echinoderms. *Comp. Biochem. Physiol.*, 84A(2) : 199-205.

Dix T.G., (1970a). Biology of *Evechinus chloroticus* (Echinoidea : Echinometridae) from different localities. 1. General. *NZ J. mar. Freshwat. Res.*, 4 : 91-116.

Dix T.G., (1970b). Biology of *Evechinus chloroticus* (Echinoidea : Echinometridae) from different localities. 3. Reproduction. *NZ J. mar. Freshwat. Res.*, 4 : 385-405.

DNeasy Blood & Tissue Handbook, Qiagen.

<https://www.qiagen.com/ca/resources/resourcedetail?id=6b09dfb8-6319-464d-996c-79e8c7045a50&lang=en>

Doney S.C., Fabry V.J., Feely R.A., Kleypas J.A., (2009). Ocean acidification: the other CO<sub>2</sub> problem. *Ann Rev Mar Sci* 1:169–192.

Dupont S., Thorndyke M., (2009). Ocean acidification and its impact on the early life-history stages of marine animals. *CIESM Monographs*, 36, 124 pp., 2009.

Dupont S., Olga-Martínez O., Thorndyke M., (2010). Impact of near-future ocean acidification on echinoderms. *Ecotoxicology* 19:449–462.

Dupont S., Dorey N., Stumpp M., Melzner F., Thorndyke M., (2012). Long-term and trans-life-cycle effects of exposure to ocean acidification in the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Marine Biology*, 160, 1835-1843.

Ebert T.A., (1998). An analysis of the importance of Allee effects in management of the red sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*. In R. Mooi & T. Telford (eds), *Echinoderma*: San Francisco. Rotterdam: Balkema. Pp. 619-627.

Ebling F.J., Hawkins A.D., Kitching J.A., Muntz L., Pratt V.M., (1966). The ecology of Ough Ine. XVI. Predation and diurnal migration in the *Paracentrotus* community. *J. anim. Ecol.*, 35 : 559-566.

Ellington W.R., (1982). Intermediary metabolism. In : *Echinoderm nutrition*, M. Jangoux & J.M. Lawrence (eds.), A.A. Balkema Publ., Rotterdam : 395-415.

Fabry V.J., Seibel B.A., Feely R.A., Orr J.C., (2008). Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES J Mar Sci* 65: 414–432.

FAO (1981). *Amino Acid Content of Food and Biological Data on Proteins*. Rome: FAO.

Farmanfarmaian A., (1966). The respiratory physiology of the echinoderms. In: Boolootian RA (ed) *Physiology of echinodermata*. Interscience Publishers, USA.

Feehan C.J., Scheibling R.E., (2014). Effects of sea urchin disease on coastal marine ecosystems. *Mar Biol* (2014) 161:1467–1485. DOI 10.1007/s00227-014-2452-4

Fenaux L., (1968). Maturation des gonades et cycle saisonnier des larves chez *A. lixula*, *P. lividus* et *P. microtuberculatus* (echinides) a Villefranche-Sur-Mer. *Vie Milieu* 13:1-52.

Fenaux L., Malara G., Cellario C., Charra R., Palazzoli T., (1977). Evolution des constituants biochimiques des principaux compartiments de l'oursin *Arbacia lixula* (L.) au cours d'un cycle sexuel et effets d'un jeune de courte duree au cours de la maturation sexuelle. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 28 : 17-30.

Fenaux L., (1980-81). Cycles saisonniers de reproduction et croissance larvaire chez les echinodermes. *Oceanis*, 6(3) : 277-307.

Ferguson J.C., (1990). Hyperosmotic properties of the fluids of the perivisceral coelom and water vascular system of starfish kept under stable conditions. *Comp Biochem Physiol A* 95:245-248.

Fernandez C., (1989). Contribution a l'elaboration des bases scientifiques de l'aquaculture de l'oursin violet *Paracentrotus lividus* (Lamarck). Mem. M.S.T. Val. Ress. Nat., Univ. Corse, Fr.: 1-40.

Fernandez C., (1990). Recherches preliminaires a la mise en place d'un pilote d'aquaculture de l'oursin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) dans un etang corse. Mem. Dipl. Et. Approf. Oceanogr., Univ. Aix-Marseille II, Fr., 1-60.

Fernandez C., (1996). Croissance et nutrition de *Paracentrotus lividus* dans le cadre d'un projet aquacole avec alimentation artificielle. Thèse de doctorat, Université de Corse, 278 pp.

Fernandez C., (1997). Effect of diet on the biochemical composition of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) under natural and rearing conditions (Effect of diet on biochemical composition of urchins). *Comp Biochem. Physiol.* Vol. 118A. No. 4, pp. 1377-1384, 1997.

Fernandez C., Boudouresque C.F., (1998). Evaluating artificial diets for small *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea). *Echinoderms: San Francisco*, Mooi & Telford (eds) © 1998 Balkema, Rotterdam.

Fernandez C., Pergent G., (1998). Effect of different formulated diets and rearing conditions on growth parameters in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Journal of Shellfish Research*, Vol. 17, No . 5, 1571-1581, 1998.

Field J.G., (1972). Some observations on the release of dissolved organic carbon by the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Limnol. Oceanogr.*, 17(5) : 759-761.

Forcucci D., Lawrence J.M., (1986). Effect of low salinity on the activity, feeding, growth and absorption efficiency of *Luidia clathrata* (Echinodermata: Asteroidea). *Mar. Biol.*, 92(3) : 315-321.

Frantzis A., Berton J.F., Maggiore F., (1988). Relations trophiques entre les oursins *Arbacia lixula* et *Paracentrotus lividus* (Echinoidea Regularia) et le phytobenthos infralittoral superficiel dans la baie de Port-Cros (Var, France). *Trav. sci. Parc natl. Port-Cros*, 14 : 81-140.

Frantzis A., (1988). Relations trophiques entre les oursins *Arbacia lixula* et *Paracentrotus lividus* (Echinoidea, Regularia) et le phytobenthos infralittoral superficiel dans la baie de Port-Cros (Var, France). Mem. DEA Ocean. biol., Univ. Aix-Marseille II, 56 pp.

Frantzis A., (1992). Etude experimentale des niveaux de consommation et d'utilisation des macrophytes et des detritus derives par deux invertebres benthiques: *Paracentrotus lividus* (Echinoide, herbivore) et *Abra ovata* (Bivalve, depositivore). These Doct. 3eme cycle Oceanogr. Biol., Univ. Aix-Marseille II, 319 pp.

Frantzis A., Gremare A., (1992). Ingestion, absorption, and growth rates of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) fed different macrophytes. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 95 : 169-183.

Fox H.M., (1924). The spawning of echinoids. *Proc. Camb. phil. Soc. biol. Sci.*, 1 : 71-74.

Fuji A., (1960). Studies on the biology of the sea urchin. II. Size at first maturity and sexuality of two sea urchins, *Strongylocentrotus nudus* and *S. intermedius*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 11 : 43-48.

Fuji A., (1962). Studies on the biology of the sea urchin. V. Food consumption of *Strongylocentrotus intermedius*. *Jap. J. Ecol.*, 12 : 181-186.

Fuji A., (1967). Ecological studies on the growth and food consumption of Japanese common littoral sea urchin, *Strongylocentrotus intermedius* (A. Agassiz). *Mem. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 15 : 83-160.

Galasko G., Hora J., Toubé T., Weedon B., Andre D., Barbier M., Lederer E., Villanueva V., (1969). Carotenoids and related compounds. Part XXII. Allenic carotenoids in sea urchins. *J Chem Soci C*: 1264–1265.

Gamble J.C., (1966). Some observations on the behaviour of two regular echinoids. *Symp. of Underwater Assoc., Malta 1965*, Lythgoe & Woods (eds.) : 47-50.

Gamble J.C., (1967). Ecological studies on *Paracentrotus lividus* (Lmk.). *Rep. Underwater Assoc. Malta 1966-1967*, : 85-88.

Garama D., Bremer P., Carne A., (2012). Extraction and analysis of carotenoids from the New Zealand sea urchin *Evechinus chloroticus* gonads. *Acta Biochimica Polonica*. Vol. 59, No 1/2012, 83-85.

Gattuso J.P., Hansson L., (2011). Ocean acidification: history and background. In *Ocean Acidification*, ed. J-P Gattuso, L Hansson, pp. 1–20. New York: Oxford Univ. Press.

George S.B., Lawrence J.M., Lawrence A.L., Smiley J., Plank L., (2001). Carotenoids in the adult diet enhance egg and juvenile production in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Aquaculture* 199–2001. 353–369.

Gibson J., Shokralla S., Porter T.M., King I., van Konyneburg S., Janzen D.H., ... & Hajibabaei M., (2014). Simultaneous assessment of the macrobiome and microbiome in a bulk sample of tropical arthropods through DNA metasytematics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(22), 8007-8012.

- Gilles K., Pearse J.S., (1986). Disease in sea urchins *Strongylocentrotus purpuratus*. experimental infection and bacterial virulence. *Dis. aquat Org.* 1: 105-114.
- Girard D., Clemente S., Toledo-Guedes K., Brito A., Hernandez J.C., (2012). A mass mortality of subtropical intertidal populations of the sea urchin *Paracentrotus lividus*: analysis of potential links with environmental conditions. *Mar Ecol* 33:377–385.
- Glynn P.W., Wellington G.M., Birkeland C., (1979). Coral reef growth in the Galapagos: Limitation by sea urchins. *Science* 203: 48-49.
- Goebel N., Barker M.F., (1998). Artificial diets supplemented with carotenoid pigments as feeds for sea urchins. In: Mooi, R., Telford, M. (Eds.), *Echinoderms*. Balkema, San Francisco, pp. 667– 672.
- González M.L., Perez M. C., Lopez D.A., Pino C.A., (1993). Effect of algal diet on the energy available for growth of juvenile sea urchin *Loxechinus albus* (Molina, 1782). *Aquaculture* 115 :87-95 .
- González M.L., Caride B., Lamas A., Taboada C., (2001). Nutritive value of protein from sea urchin, and its effects on intestinal leucine aminopeptidase and intestinal and hepatic gamma-glutamyltranspeptidase, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 52:3, 219-224, DOI: 10.1080/09637480020027000-3-3.
- Gooding R.A., Harley C.D.G., Tang E., (2009). Elevated water temperature and carbon dioxide concentration increase the growth of a keystone echinoderm. *PNAS* 106:9316–9321.
- Goodwin T.W., (1984). *Animals*, (2nd ed.). *The Biochemistry of the Carotenoids*, vol. II. Chapman & Hall, New York.
- Greenway M., (1976). The grazing of *Thalassia testudinum* in Kingston Harbour, Jamaica. *Aquatic Botany*, 2 : 117-126.
- Greenwood P.J., (1980). Growth, respiration and tentative energy budgets for two populations of the sea urchin *Parechinus angulosus* (Leske). *Est. Coast. mar. Sci.*, 10: 347-367.
- Griffiths M., (1966). The carotenoids of the eggs and embryos of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev. Biol.* 13, 296– 309.
- Griffiths M., Perrot P., (1976). Seasonal changes in the carotenoids of the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 55, 435–441.
- Grosjean Ph., Spirlet C., Jangoux M., (1996). Experimental study of growth in the echinoid *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata). *J Exp Mar Biol Ecol* 201:173–184.
- Grosjean Ph., Spirlet C., Gosselin P., Vaïtilingon D., Jangoux M., (1998). Land-based, closed-cycle echiniculture of *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinoidea: Echinodermata): a long-term experiment at a pilot scale. *J Shellfish Res* 17:1523–1531
- Grosjean P., Spirlet C., Jangoux M., (1998). Closed-circuit cultivation of the edible sea urchin *Paracentrotus lividus* : optimization of somatic growth through the control of abiotic environment . p . 673 . In : R. Mooi and M . Telford (eds .) . *Echinoderms* : San Francisco . Balkema, Rotterdam.

Gross P.S., Al-Sharif W.Z., Clow L.A., Smith L.C., (1999). Echinoderm immunity and the evolution of the complement system. *Developmental and Comparative Immunology* 23 (1999) 429-442.

Gross P.S., Clow L.A., Smith L.C., (2000). SpC3, the complement homologue from the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, is expressed in two subpopulations of the phagocytic coelomocytes. *Immunogenetics*, 51(12), 1034-1044.

Guerinot M.L., Patriquin D.G., (1981). The association of N<sub>2</sub>-fixing bacteria with sea-urchins. *Mar. Biol.* 62, 197-207.

Guettaf M., San Martin G.A., (1995). Etude de la variabilite de l'indice gonadique de l'oursin comestible *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) en Mediterranee nord-occidentale. *Vie Milieu* 45, 129-137.

Guppy M., Withers P., (1999). Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. *Biol Rev* 74:1-40.

Gutierrez J.G., Otsu I.V., (1975). Periodicidad en las variaciones biometricas de *Loxechinus albus* Molina. *Rev. Biol. mar. Valparaiso*, 15(2) : 179-199.

Hagen N.T., (2000). Echinoderm culture. In R.R. Stickney (ed), *Encyclopedia of aquaculture*: 47-253. New York: Wiley-Interscience.

Guzman H.M., Gimenez C.E., (1992). Contamination of coral reefs by heavy metals along the Caribbean Coast of Central America. *Marine Pollution Bulletin* 24, 544-561.

Hall-Spencer J.M., Rodolfo-Metalpa R., Martin S., Ransome E., Fine M. et al., (2008). Volcanic carbon dioxide vents show ecosystem effects of ocean acidification. *Nature*, 454, 96-99.

Hamann O., (1887). Beitrage zur Histologie der Echinodermen. 3. Die Echiniden. *Z. Naturw. Jena*, 21 : 1-176.

Harding G.C., Drinkwater K.F., Wass W.P., (1983). Factors influencing the size of American lobster (*Homarus americanus*) stocks along the Atlantic coast of Nova Scotia, Gulf of St. Lawrence, and Gulf of Maine: a new synthesis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 40 : 168-184.

Harmelin J.G., Bouchon C., Hone J.S., (1981). Impact de la pollution sur la distribution des echinodermes des substrats durs en Provence (Mediterranee Nord-occidentale). *Tethys*, 10(1) : 13-36.

Harris L.G., Tyrell M.C., Williams C.T., Sisson C.G., Chavanich S., Chester C.M., (2001). Declining sea urchin recruitment in the Gulf of Maine: Is overharvesting to blame? In M. Barker (ed), *Echinoderms 2000*. Rotterdam: Balkema. Pp. 439-444.

Harvell D., Jordan-Dahlgren E., Merkel S., Rosenberg E., Raymundo L., Smith G., Weil E., Willis B., (2007). Coral disease, environmental drivers, and the balance between coral and microbial associates. *Oceanography* 20:172-195.

Hávardsson B., Imsland A.K., Christiansen R., (1999). The effect of astaxanthin in feed and environmental temperature on carotenoid concentration in the gonads of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* Müller. *Journal of the World Aquaculture Society*, 30(2), 208-218.

Healthy Eating <http://healthbenefitsofeating.com/sea-food/health-benefits-of-eating-sea-urchin/128/>

Heisler M., (1989). Interactions between gas exchange, metabolism, and ion transport in animals: an overview. *Can J Zool* 67:2923–2935

Hereu B., Linares C., Sala E., Garrabou J., Garcia-Rubies A., Diaz D., Zabala M., (2012). Multiple processes regulate long-term population dynamics of sea urchins on Mediterranean rocky reefs. *PLoS ONE* 7:E36901

Hiestand W., (1940). Oxygen consumption of *Thyone briareus* (Holothuroidea) as a function of oxygen tension and hydrogen ion concentration of surrounding medium. *Trans Wis Acad Sci Arts Lett* 32:167–174.

Hilmi N., Allemand D., Dupont S., Safa A., Haraldsson G. et al., (2012). Towards improved socio-economic assessments of ocean acidification's impacts. *Marine Biology*, 160, 1773-1787.

Himmelman J.H., (1984). Urchin feeding and macroalgal distribution in Newfoundland, Eastern Canada. *Canad. Naturalist*, 3(4) : 337-348.

Himmelman J.H., Guderley H., Vignault G., Drouin G., Wells P.G., (1984). Response of the sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*, to reduced salinities: importance of size, acclimation, and interpopulation differences. *Can J Zool* 62:1015–1021

Höbaus E., Fenaux L., Hignette M., (1981). Premières observations sur les lésions provoquées par une maladie affectant le test des oursins en Méditerranée occidentale. - Rapp. P.-v. Réunion. *Comm int. Explor. scient. Mer Méditerran.* 27, 221-222.

Hofmann G.E., Todgham A.E., (2010). Living in the now: physiological mechanisms to tolerate a rapidly changing environment. *Annu Rev Physiol* 72:127–145

Hofmann G.E., Barry J.P., Edmunds P.J., Gates R.D., Hutchins D.A., Klinger T., Sewell M.A., (2010). The effect of ocean acidification on calcifying organisms in marine ecosystems: an organism to ecosystem perspective. *Annu Rev Physiol* 41:127–147

Holland L.Z., Giese A.C., Phillips J.H., (1967). Studies on the perivisceral coelomic fluid protein concentration during seasonal and nutritional changes in the purple sea urchin. *Comp Biochem Physiol* 21:361–371

Holland N.D., Neilson K.H., (1978). The fine structure of the echinoderm cuticle and the subcuticular associated bacteria of echinoderms. - *Acta Zoot.*, Stockh. 59, 169-185.

Hora J., Toubé T.P., Weedon B.C.L., (1970). Carotenoids and related compounds. Part XXVII. Conversion of fucoxanthin into paracentrone. *J Chem Soc C*: 241–242.

Hughes A D., Kelly M.S., Barnes D.K., Catarino A.I., Black K.D., (2006). The dual functions of sea urchin gonads are reflected in the temporal variations of their biochemistry. *Marine Biology*, 148(4), 789-798.

Hyman L.H., (1955). *Echinodermata-The Invertebrates*. Vol. IV, Mc Graw Hill, New York, 763 pp.

IPCC, (2007). *Climate Change 2007: the fourth assessment report of the IPCC*. Cambridge University Press, Cambridge. ISBN 0521705975

Jangoux M., (1982). Excretion. In : *Echinoderm nutrition*, M. Jangoux & J.M. Lawrence (eds.), A.A. Balkema Publ., Rotterdam : 437-445.



- Jangoux M., (1984). Diseases of echinoderms. *Helgoländer Meeresunters.* 37, 207-216.
- Jangoux M., Maes P., (1987). Les épizooties chez les oursins réguliers (Echinodermata). C.F. Boudouresque (Ed.), Proceedings of the Colloque International sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles, GIS Posidonie Publ., Marseille, France (1987), pp. 299–307.
- Jangoux M., (1990). Diseases of Echinodermata. O. Kinne (Ed.), Diseases of Marine Animals, vol. 3, Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany (1990), pp. 439–567.
- Jobling M., (1994). Biotic factors and growth performance. In: Jobling, M. (Ed.), Fish Bioenergetics. Fish and Fisheries Series, vol. 13. Chapman and Hall, pp. 155–201.
- Ji Y., Ashton L., Pedley S.M., Edwards D.P., Tang Y., Nakamura A., ... & Larsen T.H., (2013). Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. *Ecology letters*, 16(10), 1245-1257.
- Johansen K., Vadas R.L., (1967). Oxygen uptake and responses to respiratory stress in sea urchins. *Biol. Bull.* 132 (1), 16–22.
- Johnson P.T., (1969a). The coelomic elements of sea urchins (*Strongylocentrotus*) I. The normal coelomocytes; their morphology and dynamics in hanging drops. *Journal of invertebrate pathology*, 13(1), 25-41.
- Johnson, P. T. (1969c). The coelomic elements of sea urchins (*Strongylocentrotus*) III. In vitro reaction to bacteria. *Journal of Invertebrate Pathology*, 13(1), 421N155-5462.
- Johnson P.T., (1970a). Studies on unhealthy-appearing urchins from Whites Point. *Kelp habitat improvement project annual report*, 1971.
- Johnson P.T., (1970b). Studies on diseased urchins from Point Loma. *Kelp habitat improvement project annual report*, 71, 82-90.
- Johnson P.T., (1971). Studies on diseased urchins from Point Loma. - A. Rep. Calif. Inst. Technol., Pasadena 1970-1971, 82-90.
- Johnson V.R., Russell B.D., Fabricius K.E., Brownlee C., Hall-Spencer J.M., (2012). Temperate and tropical brown macroalgae thrive, despite decalcification, along natural CO<sub>2</sub> gradients. *Global Change Biology*, 18, 2792-2803.
- Jones G.M., Hebda A.J., Scheibling R.E., Miller R.J., (1985). Histopathology of the disease causing mass mortality of sea urchins (*Strongylocentrotus droebachiensis*) in Nova Scotia. *J. invert. Pathol.* 45, 260-271.
- Kalam Azad A., Pearce C.M., McKinlet R.S., (2011). Effects of diet and temperature on ingestion, absorption, assimilation, gonad yield, and gonad quality of the purple sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*). *Aquaculture* 317 (2011) 187–196.
- Karlson R., (1978). Predation and space utilization pattern in a marine epifaunal community. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 31 : 225-239.
- Karp R.D., Coffaro K.A., (1982). Cellular defense systems of the Echinodermata. In *Phylogeny and Ontogeny* (pp. 257-282). Springer US.

- Katharios P., Papadaki M., Ternengo S., Kantham P.K., Zeri C., Petraki P.E., Divanach P., (2011). Chronic ulcerative dermatopathy in cultured marine fishes. Comparative study in sharpnose sea bream, *Diplodus puntazzo* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 2011, 34, 459–474. doi:10.1111/j.1365-2761.2011.01257.x.
- Kawakami T., Tsushima M., Katabami Y., Mine M., Ishida A., Matsuno T., (1998). Effect of b,b-carotene, b-echinenone, astaxanthin, fucoxanthin, vitamin A and vitamin E on the biological defense of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 226 (1998) 165 – 174.
- Keesing J.K., Hall K.C., (1998). Review of the status of world sea urchin fisheries points to opportunities for aquaculture. *Journal of Shellfish Research* 17: 1597-1604.
- Keesing J.K., (2013). *Heliocidaris erythrogramma*. In: *Sea Urchins: Biology and Ecology*, 3<sup>rd</sup> edn (ed. Lawrence JM), pp. 369–412. Academic Press, San Diego.
- Kelly M.S., (2000). The reproductive cycle of the sea urchin *Psammechinus miliaris* (Gmelin) (Echinodermata: Echinoidea) in a Scottish sea loch. *Journal of the Marine Biological Association of the U.K.* 80: 1597-1604.
- Kelly M.S., Brodie C.C., McKenzie J.D., (1998). Somatic and gonadal growth of the sea urchin *Psammechinus miliaris* (Gmelin) maintained in polyculture with the Atlantic salmon. *Journal of Shellfish Research* 17: 1557-1562.
- Kelly M.S., Owen P.V., Pantazis P., (2001). The commercial potential of the common sea urchin *Echinus esculentus* from the west coast of Scotland. *Hydrobiologia* 465: 85-94.
- Kempf M., (1962). Recherches d'écologie comparee sur *Paracentrotus lividus* et *Arbacia lixula*. *Rec. Trav. Sta. mar. Endoume*, 25(39) : 47-116.
- Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., Glöckner F.O., (2012). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*, 41(1), e1-e1.
- Klinger T.S., (1982). Feeding rates of *Lytechinus variegatus* Lamarck (Echinodermata: Echinoidea) on differing physiognomies of an artificial food of uniform composition. International Echinoderms Conference, Tampa Bay. In *Echinoderms: Proceedings of the International Conference, Tampa Bay*, AA Balkema Press, Rotterdam (pp. 29-32) J.M. Lawrence, ed. (A.A.Balkema, Rotterdam, 1982).
- Klinger T.S., Lawrence J.M., Lawrence A.L., (1994). Digestive characteristics of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea) fed prepared feeds. *J. World aquaculture Soc.* 25 (4) : 489-496.
- Klinger T.S., Lawrence, J.M., Lawrence A.L., (1997). Gonad and somatic production of *Strongylocentrotus droebachiensis* fed manufactured feeds. *Bull. Aquacul. Assoc. Canada*, 1, 35-37.
- Knoepffler-Peguy M., Boudouresque C.F., Dance C., (1987). Compte rendu d'une experience sur les preferanda alimentaires de *Paracentrotus lividus* (Echinoidea) a Banyuls-sur-mer. In: *Colloque international sur Paracentrotus lividus et les oursins comestibles*, C.F. Boudouresque ed., GIS Posidonie Publ., Marseille : 59-64.
- Kobayashi N., (1992b). Spawning periodicity of sea urchins at Seto. IV. *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Publ. Seto mar. biol. Lab.*, 35(6): 335-345.

- Koehler R., (1893). Recherches sur les echinides des cotes de Provence. Ann. Mus. Hist. nat., Marseille, 1(3) : 1-160.
- Kolbert C.P., Persing D.H., (1999). Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. Current Opinion in Microbiology. 2 (3): 299–305. doi:10.1016/S1369-5274(99)80052-6.
- Kozich J.J., Westcott S.L., Baxter N.T., Highlander S., Schloss P.D., (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing.
- Kroeker K.J., Kordas R.L., Crim R.N., Singh G.G., (2010). Meta-analysis reveals negative yet variable effects of ocean acidification on marine organisms. Ecol Lett 13:1419–1434
- Krumbein W.E., Van Der Pers J.N.C., (1974). Diving investigations on biodeterioration by sea-urchins in the rocky sublittoral of Helgoland. Helgolander Wiss. Meeresunters 26: 1-17.
- Kudriavtsev I.V., Polevshchikov A.V., (2003). Comparative immunological analysis of echinoderm cellular and humoral defense factors. *Zhurnal obshchei biologii*, 65(3), 218-231.
- Kurihara H., (2008). Effects of CO<sub>2</sub>-driven ocean acidification on the early developmental stages of invertebrates. Mar Ecol Prog Ser 373:275–284.
- Kurihara H., Shimode S., Shirayama Y., (2004). Sub-lethal effects of elevated concentration of CO<sub>2</sub> on planktonic copepods and sea urchins. J. Oceanogr. 60, 743–750.
- Kurihara H., Shirayama Y., (2004). Effects of increased atmospheric CO<sub>2</sub> on sea urchin early development. Mar. Ecol. Prog. Ser. 274, 161–169.
- Lane J.M., Lawrence J.M., (1979). The effect of size, temperature, oxygen level and nutritional condition on oxygen uptake in the sand dollar, *Mellita quinquiesperforata*. Biol. Bull. 157, 275–287.
- Lawrence J.M., (1975). On the relationships between marine plants and sea urchins. Oceanogr. mar. Biol. ann. Rev., 13 : 213-286.
- Lawrence J.M., (1982). Digestion. In : *Echinoderm nutrition*, M. Jangoux & J.M. Lawrence (eds.), A.A. Balkema Publ., Rotterdam : 283-316.
- Lawrence J.M., Lane J.M., (1982). The utilization of nutrients by postmetamorphic echinoderms. In : *Echinoderm nutrition*, M. Jangoux & J.M. Lawrence (eds.), A.A. Balkema Publ., Rotterdam : 331-371.
- Lawrence J.M., (1985). The energetic echinoderm. In: *Echinodermata* (B.F. Keegan & B.D.S. O'Connor eds.), A.A. Balkema Publ., Rotterdam : 47-67.
- Lawrence J.M., (1987). Echinodermata. In: *Animal energetics.2*. T.J. Pandian & F.J. Vernberg (eds.), Academic Press, Florida : 229-231.
- Lawrence J.M., Regis M.B., Delmas P., Gras G., Klinger T., (1989). The effect of quality of food on feeding and digestion in *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea). *Mar. Behav. Physiol.* 15: 137-144.
- Lawrence J.M., (1990). The effect of stress and disturbance on echinoderms. Zool. Sci. 7: 17–28.

Lawrence J.M., Fenaux L., Corre M.C., Lawrence A., (1991). The effect of quantity and quality of prepared diets on production in *Paracentrotus lividus* (Echinodermata : Echinoidea). In L. Scalera-Liaci & C. Canicatti (eds), Echinoderm Research 1991: 107-110. Rotterdam: Balkema.

Lawrence J.M., Olave S., Otaiza R., Lawrence A.L., Bustos E., (1995). A comparison of gonad production in *Loxechinus albus* (Echinodermata: Echinoidea) fed algae and prepared feeds. Am. Zool. 35, 109A.

Lawrence J.M., Olave S., Otaiza R., Lawrence A.L., Bustos E., (1997). Enhancement of gonad production in the sea urchin *Loxechinus albus* in Chile fed extruded feeds. J. World Aquacult. Soc. 28, 91-96.

Lawrence J.M., (2001). Edible Sea Urchins: *Biology and Ecology*. Elsevier, Amsterdam.

Lazarevic V., Whiteson K., Huse S., Hernandez D., Farinelli L., Østerås M., ... & François P., (2009). Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. *Journal of microbiological methods*, 79(3), 266-271.

Lebrato M., Iglesias-Rodriguez D., Feely R.A. et al., (2010). Global contribution of echinoderms to the marine carbon cycle: CaCO<sub>3</sub> budget and benthic compartments. *Ecological Monographs*, 80, 441-467.

Le Direac'h J.P., (1987). La peche des oursins en Mediterranee: historique, technique, legislation, production. Colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles, Boudouresque C.F. edit., GIS Posidonie publ., Marseille, Fr.: 335-362.

Le Direac'h J.P., Boudouresque C.F., Antolic B., Kocatas A., Panayotidis P., Pancucci A., Semroud R., Span A., Zaouali J., Zavodnic D., (1987). Rapport sur l'exploitation des oursins en Mediterranee. Colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles, Boudouresque C.F. edit., GIS Posidonie publ., Marseille, Fr.: 329-334.

Le Gall P., (1987). La peche des oursins en Bretagne. In Boudouresque, C. F. (ed.), Colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles. GIS Posidonie publ. Marseille: 311-324.

Le Gall P., Bucaille D., (1987). Interet d'un elevage intensif de l'oursin violet *Paracentrotus lividus*. Colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles, Boudouresque C.F. edit., GIS Posidonie publ., Marseille, Fr.: 399-405.

Le Gall P., (1989). L'Echinoculture. In: *Aquaculture*, G. Barnabe (ed.), Tec.& Doc. Publ., Paris, Vol. 1 : 476-491.

Le Gall P., Bucaille D., Dutot P., (1989). Resistance aux variations de salinite chez *Paracentrotus* et *Psammechinus*. *Vie marine*, Fr., 10: 83-84.

Le Gall P., Bucaille D., Grassin J.B., (1990). Influence de la temperature sur la croissance de deux oursins comestibles, *Paracentrotus lividus* et *Psammechinus miliaris* . pp. 183-188 . In : C. De Ridder, P. Dubois, H . Lahaye and M . Jangoux (eds .) . Echinoderm Research. Balkema . Rotterdam.

Leighton D.L., (1968). A comparative study of food selection and nutrition in the abalone *Haliotis rufescens* Swainson, and the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson). PhD Diss., Univ. California, San Diego, 197pp.

Leighton D.L., (1971). Grazing activities of benthic invertebrates in southern California kelp beds. *Nova Hedwigia* (Suppl.), 32 : 421-453.

Leighton P., (1995). Contributions towards the development of echinoculture in North Atlantic waters with particular reference to *Paracentrotus lividus* (Lamarck). PhD thesis, National University of Ireland, Galway.

Lessios H.A., (1985). Annual reproductive periodicity in eight echinoid species on the Caribbean coast of Panama. In: *Echinodermata* (B.F. Keegan & B.D.S. O'Connor eds.), A.A. Balkema Publ., Rotterdam : 303-311.

Levitan D.R., (1989). Density-dependent size regulation in *Diadema antillarum*: effects on fecundity and survivorship. *Ecology*, 70(5) : 1414-1424.

Lewis J.B., (1958). The biology of the tropical sea urchin, *Tripneustes esculentus* Leske in Barbados, British West Indies. *Can. J. Zool.*, 36 : 607-621.

Lewis J.B., (1964). Feeding and digestion in the tropical sea urchin *Diadema antillarum* Philippi. *Can. J. Zool.*, 42 : 549-557.

Lewis J.B., (1968). Comparative respiration of tropical echinoids. *Comp. Biochem. Physiol.*, 24 : 649-652.

Lilly G.R., (1975). The influence of diet on growth and bioenergetics of the tropical sea urchin, *Tripneustes ventricosus*. Ph.D. Thesis, Memorial University of Newfoundland. 216 pp.

Lilly G.R., (1978). The influence of diet on the oxygen uptake of the sea urchins, *Tripneustes ventricosus* and *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 62A. pp 463-470.

Liu H., Kelly M.S., Cook E.J., Black K.D., Orr H., Zhu J.X., Dong S.L., (2007). The effect of diet type on growth and fatty-acid composition of sea urchin larvae, I *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata). *Aquaculture* 264, 263–278.

Live Strong <http://www.livestrong.com/article/318753-nutritional-facts-of-a-sea-urchin/>

Liyana-Pathirana C., Shahidi F., Whittick A., Hooper R., (2002). Effect of season and artificial diet on amino acids and nucleic acids in gonads of green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 133(2), 389-398.

Lowe E.F., Lawrence J.M., (1976). Absorption efficiencies of *Lytechinus variegatus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea) for selected marine plants. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 21 : 223-234.

Lozano J., Galera J., López S., Turon X., Palacín C., Morera G., (1995). Biological cycles and recruitment of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats. *Marine Ecology Progress Series* Vol. 122, No. 1/3 (June 15 1995), pp. 179-191.

Lumingas L.J.L., (1994). La plasticité chez l'oursin *Sphaerechinus granularis* en rade de Brest (Bretagne, France) . Thèse Doct. Océanol . Biol ., Univ . Bretagne Occidentale, Brest. 193 pp .

Maggiore F., Berthon J.F., Boudouresque C.F., Lawrence J.M., (1987). Données préliminaires sur les relations entre *Paracentrotus lividus*, *Arbacia lixula* et le phytobenthos dans la baie de Port-Cros (Var, France, Méditerranée). In: *Colloque international sur Paracentrotus lividus et les oursins comestibles*, C.F. Boudouresque ed., GIS Posidonie Publ., Marseille : 65-82.

- Maes P., Jangoux M., (1984). The bald-sea-urchin disease: a biopathological approach. - *Helgoländer Meeresunters.* 37, 217-224.
- Maes P., Jangoux M., (1985). The bald-sea-urchin disease: a bacterial infection. *Proc. 5th Intl Echinoderm Conf.*, Galway, 24-29 Sept., 1984, p. 313-314.
- Maes P., Jangoux M., Fenaux L., (1986). La maladie de "oursin-chauve". ultrastructure des lesions et caracterization de leur pigmentation. *Annls Inst, océanogr.*, Paris 62: 37-45.
- Mao D.P., Zhou Q., Chen C.Y., Quan Z.X., (2012). Coverage evaluation of universal bacterial primers using the metagenomic datasets. *BMC microbiology*, 12(1), 66.
- Martin S., Richier S., Pedrotti M.L., Dupont S., Castejon C. et al., (2011). Early development and molecular plasticity in the Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus* exposed to CO<sub>2</sub>-driven acidification. *Journal of Experimental Biology*, 214, 1357-1368.
- Matsuno T., Hirao S., (1989). Marine carotenoids. In: Ackman, R.G. (Ed.), *Marine Biogenic Lipids, Fats and Oils*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 251–388.
- Matsuno T., Tsushima T., (2001). Carotenoids in sea urchins. In: Lawrence, J.M. (Ed.), *Edible sea urchins: Biology and Ecology*. Amsterdam, Elsevier, pp. 115–138.
- McBride S.C., Pinnix W.D., Lawrence J.M., Lawrence A.L., Mulligan T.M., (1997). The effect of temperature on production of gonads by the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus* fed natural and prepared diets. *J. World Aquac. Soc.* 28, 357– 365.
- McBride S.C., Lawrence J.M., Lawrence A.L., Mulligan T.J., (1999). Ingestion, absorption, and gonad production of adult *Strongylocentrotus franciscanus* fed different rations of a prepared diet. *J. World Aquac. Soc.* 30 (3), 364–370.
- McBride S.C., Price R.J., Tom P.D., Lawrence J.M., Lawrence A.D., (2004). Comparison of gonad quality factors: color, hardness and resilience, of *Strongylocentrotus franciscanus* between sea urchins fed prepared feed or algal diets and sea urchins harvested from the Northern California fishery. *Aquaculture* 233, 405–422.
- McClintock J.B., Klinger T.S., Lawrence J.M., (1982). Feeding preferences of echinoids for plant and animal food models. *Bulletin of Marine Science*, 32(1): 365-369.
- McClintock J.B., Amsler M.O., Angus R.A., Challener R.C., Schram J.B. et al., (2011). The Mg-Calcite composition of Antarctic echinoderms: important implications for predicting the impacts of ocean acidification. *Journal of Geology*, 119, 457-466.
- McLaughlin G., Kelly M.S., (2001). Effect of artificial diets containing carotenoid-rich microalgae on gonad growth and colour in the sea urchin *Psammechinus miliaris* (Gmelin). *J. Shellfish Res.* 20 (1), 377– 382.
- McPherson B.F., (1968). Feeding and oxygen uptake of the tropical sea urchin *Eucidaris tribuloides*. *Biol. Bull.*, 135 : 308-321.
- Melzner F., Gutowska M.A., Langenbuch M., Dupont S., Lucassen M., Thorndyke M.C., Bleich M., Pörtner H-O., (2009). Physiological basis for high CO<sub>2</sub> tolerance in marine ectothermic animals: preadaptation through lifestyle and ontogeny? *Biogeosciences* 6: 2313–2331.

- Menager V., (1994). Comportement alimentaire de *Paracentrotus lividus* en presence de *Caulerpa taxifolia*: ration alimentaire et taux d'absorption. Dipl. Etud. Appr. Oceanol., Univ. Aix Marseille II, 51 pp. + 2 Annexe.
- Micael J., Alves M.J., Costa A.C., Jones M.B., (2009). Exploitation and conservation of echinoderms. *Oceanog Mar Biol* 47: 191–208.
- Michaelidis B., Ouzounis C., Palaras A., Pörtner H., (2005). Effects of long-term moderate hypercapnia on acid-base balance and growth rate in marine mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Ecol Prog Ser* 293: 109–118.
- Miles H., Widdicombe S., Spicer J.I., Hall-Spencer J., (2007). Effects of anthropogenic seawater acidification on acid–base balance in the sea urchin *Psammechinus miliaris*. *Mar Pollut Bull* 54: 89–96.
- Miller R.J., Mann K.H., (1973). Ecological energetics of the seaweed zone in a marine bay on the Atlantic coast of Canada. III. Energy transformation by sea urchins. *Mar. Biol.*, 18 : 99-114.
- Miller R.J., Colodey A.C., (1983). Widespread mass mortalities of the green sea urchin in Nova Scotia, Canada. - *Mar. Biol.* 73, 263-267.
- Millott N., (1975). The photosensitivity of echinoids. *Adv. mar. Biol.*, 13: 1-52.
- Monroy A., Monroy-Oddo A, De Nicola M., (1951). The carotenoid pigments during early development of the egg of the sea urchin *Paracentrotus lividus*.
- Moore H.B., Jutare T., Bauer J.C., Jones J.A., (1963 $\alpha$ ). The biology of *Lytechinus variegatus*. *Bull. mar. Sci.*, 13 : 23-53.
- Moore H.B., Jutare T., Jones J.A., McPherson B.F., Roper C.F.E., (1963 $\beta$ ). A contribution to the biology of *Tripneustes esculentus*. *Bull. mar. Sci.*, 13 : 267-281.
- Moore H.B., McPherson B.F., (1965). A contribution to the study of productivity of the urchins *Tripneustes esculentus* and *Lytechinus variegatus*. *Bull. mar. Sci.*, 15(4) : 855-871.
- Moore H.B., (1966). Ecology of echinoids. In: R.A. Boolootian (ed.), *Physiology of Echinodermata*, Interscience Publ., New York : 73-85.
- Morris S., Taylor A.C., (1983). Diurnal and seasonal variation in physicochemical conditions within intertidal rock pools. *Estuar Coast Shelf Sci* 17: 339–355.
- Morse J.W., Andersson A.J., Mackenzie F.T., (2006). Initial responses of carbonate-rich shelf sediments to rising atmospheric pCO<sub>2</sub> and “ocean acidification”: Role of high Mg-calcites. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70, 5814-5830.
- Mortensen Th., (1943a). A Monograph of the Echinoidea. III.2. Camarodonta 1. C.A. Reitzel Publ., Copenaghen, 553 pp.
- Mortensen Th., (1928). A Monograph of the Echinoidea. I. Cidaroidea. C.A. Reitzel Publ., Copenaghen, 446 pp.

- Mortensen T., Rosevinge L.K., (1934). Sur une algue cyanophycée, *Dactylococcopsis echini* n. sp., parasite darts un oursin. - Blot. Meddr 11 (7), 1-10.
- Mortensen T., (1943b). A Monograph of the Echinoidea. III.3. Camarodonta 2. C.A. Reitzel Publ., Copenhagen, 446 pp.
- Moulin L., Catarino A.I., Claessens T., Dubois P., (2011). Effects of seawater acidification on early development of the intertidal sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck 1816). Mar Pol Bul 62 (2011) 48–54.
- Muntz L., Ebling F.J., Kitching J.A., (1965). The ecology of Lough Ine. XVI. Predatory of large crabs. *J. Anim. Ecol.*, 34 : 315-329.
- Muus K., (1981). Density and growth of juvenile *Amphiura filiformis* (Ophiuroidea) in the Oresund. *Ophelia* 20:153–168
- Nedelec H., Verlaque M., Diapoulis A., (1981). Preliminary data on *Posidonia* consumption by *Paracentrotus lividus* in Corsica (France). *Rapp. Comm. int. Mer Medit.*, 27(2): 203-204.
- Nedelec H., (1982). Ethologie alimentaire de *Paracentrotus lividus* dans la baie de Galeria (Corse) et son impact sur les peuplement phytobenthique. These Doct cycle, Oceanogr. biol., Univ. Aix Marseille II : 1-175 pp.
- Nedelec H., Verlaque M., Dallot S., (1983). Note preliminaire sur les fluctuations de l'activite trophique de *Paracentrotus lividus* dans l'herbier de Posidonies. *Rapp. Comm. int. Mer Medit.*, 28(3): 153-155.
- Neill S.R., Larkum H., (1965). Ecology of some echinoderms in Maltese waters. *Symp. of Underwater Assoc.*, Malta 1965, Lythgoe & Woods (eds.) : 251-258.
- Nichols D., Barker M.F., (1984). A comparative study of reproductive and nutritional periodicities in two populations of *Asterias rubens*. (Echinodermata: Asteroidea) from the English Channel. *J. mar. biol. Ass. U. K.*, 64: 471-484.
- Nichols D., Bishop G., Sime A., (1985). Reproductive and Nutritional Periodicities in Populations of the European Sea-Urchin, *Echinus Esculentus* (Echinodermata: Echinoidea) from the English Channel. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 65(1), 203-220. doi:10.1017/S0025315400060914
- Niell F.X., Pastor R., (1973). Relaciones troficas de *Paracentrotus lividus* (Lmk.) en la zona litoral. *Invest. Pesq.* 37 (1) :1-7.
- Noga E.J., (1996). Fish Disease: Diagnosis and Treatment. Mosby- Year Book, Inc., St, Louis, Missouri.
- Noga E.J., (2000). Skin ulcers in fish: Pfiesteria and other etiologies. *Toxicologic Pathology* 28, 807–823.
- O'Connor C., Riley G., Bloom D., (1976). Reproductive periodicities of the echinoids of the Solitary Islands in the light of some ecological variables - II.: superficial and histological changes in the gonads of *Centrostephanus rodgersii* (Clark), *Phyllacanthus parvispinus*



(Tenison-Woods), *Heliocidaris tuberculata* (Clark), and *Tripneustes gratilla* (Linneus), and their relevance to aquaculture. *Thalassia Jugosl.*, 12(1): 245-267.

O'Connor C., Mulley J.C., (1977). Temperature effects on periodicity and embryology, with observations on the population genetics, of the aquacultural echinoid *Heliocidaris tuberculata*. *Aquaculture*, 12 : 99-114.

O'Donnell M.J., Todgham A.E., Sewell M.A., Hammond L.M., Ruggiero K. *et al.*, (2009). Ocean acidification alters skeletogenesis and gene expression in larval sea urchins. *Marine Ecology Progress Series*, 398, 157-171.

Olivi G., (1792). *Zoologia Adriatica*. Bassano, 334 pp.

Orr J.C., Fabry V.J., Aumont O., Bopp L., Doney S.C., Feely R.A., Gnanadesikan A., Gruber N., Ishida A., Joos F., Key R.M., Lindsay K., Maier-Reimer E., Matear R., Monfray P., Mouchet A., Najjar R.G., Plattner G.K., Rodgers K.B., Sabine C.L., Sarmiento J.L., Schlitzer R., Slater R.D., Totterdell I.J., Weirig M.F., Yamanaka Y., Yool A., (2005). Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature* 437: 681–686.

Orset S., Young A.J., (2000). Low light promotes synthesis of 9-cis  $\beta$ -carotene in the microalga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* 122, 609–617.

Orton J.H., (1914). Preliminary account of a contribution to an evaluation of the sea. *J.Mar. Biol. Ass. UK*, 10(2) : 312-336.

Orton J.H., (1920). Sea temperature, breeding and distribution in marine animals. *J.Mar. Biol. Ass. UK*, 12 : 339-366.

Pace N.R., (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 734–740.

Pagano G., Cipollaro M., Corsale G., Esposito A., Ragucci E., Giordano G.G., (1985). PH-induced changes in mitotic and developmental patterns in sea urchin embryogenesis. I. Exposure of embryos. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 5, 101–112.

Pagett R.M., (1980). Tolerance to brackish water by Ophiuroids with special reference to a Scottish sea Loch, Loch Etive. In: *Echinoderms: Present and Past*, M. Jangoux (ed.), A.A. Balkema Publ., Rotterdam : 223-229.

Palacin G., Giribet G., Carner S., Dantart L., Turon X., (1998). Low densities of sea urchins influence the structure of algal assemblages in the western Mediterranean. *Journal of Sea Research*, 39, 281-290

Pancer Z., Rast J.P., Davidson E.H., (1999). Origins of immunity: transcription factors and homologues of effector genes of the vertebrate immune system expressed in sea urchin coelomocytes. *Immunogenetics*, 49(9), 773-786.

Pancer Z., (2000). Dynamic expression of multiple scavenger receptor cysteine-rich genes in coelomocytes of the purple sea urchin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(24), 13156-13161.

Pancucci-Papadopoulou M.A., (1996). Fauna Graeciae. Echinodermata. Hellenic Zoological Society Ed., 162 pp.

Pane E., Barry J., (2007). Extracellular acid–base regulation during shortterm hypercapnia is effective in a shallow-water crab, but ineffective in a deep-sea crab. *Mar Ecol Prog Ser* 334: 1-9.

Pastor R., (1971). Distribucion del erizo de mar, *Paracantrotus lividus* (Lmk), en la Ria de Vigo. *Publ. Tec. De la D.G.P.M. Madrid* 9: 255-270.

Pearce C.M., Daggett T.L., Robinson S.M.C., (2002). Effect of protein source ratio and protein concentration in prepared diets on gonad yield and quality of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture* 214 (2002) 307–332.

Pearce C.M., Daggett T.L., Robinson S.M.C., (2002). Effect of binder type and concentration on prepared feed stability and gonad yield and quality of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture* 205 (2002) 301– 323.

Pearce C.M., Daggett T.L., Robinson S.M.C., (2003). Effects of starch type, macroalgal meal source, and  $\beta$ -carotene on gonad yield and quality of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachinensis* (Muller), fed prepared diets. *J. Shellfish Res.* 22 (1), 505– 519.

Pearce C.M., Daggett T.L., Robinson S.M.C., (2004). Effect of urchin size and diet on gonad yield and quality in the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Aquaculture* 233, 337–367.

Pearse J.S., (1968). Patterns of reproductive periodicities in four species of Indo-Pacific echinoderms. *Proc. Ind. Acad. Sci.*, 67 : 247-279.

Pearse J.S., Costa D.P., Yellin M.B., Agegian C.R., (1977). Localized mass mortality of red sea urchin, *Strongylocentrotus franciscanus*, near Santa Cruz, California. - *Fish. Bull. U. S.* 75, 645-648.

Pearse J.S., Hines A.H., (1979). Expansion of a central California kelp forest following the mass mortality of sea urchins. - *Mar. Biol.* 51, 83-91.

Pearse J.S., Cameron R.A., (1991). Echinodermata: Echinoidea. In: *Reproduction of marine invertebrates. Vol 6: Echinoderms and lophophorates.* Boxwood Press , Pacific Grove, CA, pp. 513-662.

Percy M.A., (1972). Thermal adaptation in the boreo-arctic echinoid *Strongylocentrotus droebachiensis* (O. F. Muller, 1776). I. Seasonal acclimatization of respiration. *Physiol. Zool.* 45 (4), 277–289.

Percy J.A., (1973). Thermal adaptation in the boreo-arctic echinoid *Strongylocentrotus droebachiensis* (O.F. Muller, 1776). II. Seasonal acclimatization and urchin activity. *Physiol. Zool.*, 46 : 129-138.

Pereira F., Carneiro J., Matthiesen R., van Asch B., Pinto N., Gusmão L., Amorim A., (2010). Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences. *Nucleic Acids Research.* 38 (22): e203. doi:10.1093/nar/gkq865.

Pespeni M., Sanford E., Gaylord B., Hill T.M., Hoffelt J.D. et al., (2013). Evolutionary change during experimental ocean acidification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 6937-6942.

Phillips K., Hamid N., Silcock P., Sewell M.A., Barker M., Weaver A., Then S., Delahunty C., Bremer P., (2010). Effect of manufactured diets on the yield, biochemical composition and sensory quality of *Evechinus chloroticus* sea urchin gonads. *Aquaculture* 308 (2010) 49–59.

Plank L.R., Lawrence J.M., Lawrence A.L., Olvera R., (2002). The effect of dietary carotenoids on gonad production and carotenoid profiles in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *J. World Aquac. Soc.* 33 (2), 127– 137.

Plytycz B., Seljelid R., (1993). Bacterial clearance by the sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Dev Comp Immunol* 1993;17: 283-289.

Politi Y., Arad T., Klein E., Weiner S., Addadi L., (2004). Sea Urchin Spine Calcite Forms via a Transient Amorphous Calcium Carbonate Phase. *Science*, 306 (5699), 161-1164.

Pommier T., Canbäch B., Riemann L., Boström H., Simu K., Lundberg P., Tunlid A., Hagström A., (2007). Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. *Mol. Ecol.* 16, 867–880.

Pörtner H-O., (2008). Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: a physiologist's view. *Mar Ecol Prog Ser* 373: 203–217.

PowerSoil DNA Isolation Kit, Mo Bio.

<https://mobio.com/media/wysiwyg/pdfs/protocols/12888.pdf>

Powis de Tenbossche T., (1978). Comportement alimentaire et structures digestives de *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea). *Unpubl. Mem.*, Université Libre de Bruxelles, 82 pp.

Price A.R.G., (1982). Western Arabian Gulf Echinoderms in high salinity waters and the occurrence of dwarfism. *J. Nat. History*, 16 : 519-527.

Propp M.V., (1977). Ecology of the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* of the Barents Sea: metabolism and regulation of abundance. *Mar. Biol.*, Vladivostok, 1 : 39-51.

Raven J., Caldeira K., Elderfield H., Hoegh-Guldberg O., Liss P., et al. (2005). Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide. Policy Document 12/05, The Royal Society, London.

Regis M.B., Peres J.M. Gras G., (1986). Données préliminaires sur l'exploitation de la ressource: *Paracentrotus lividus* (Lmck) dans le Quartier Maritime de Marseille. *Vie mar.* 7: 41-60.

Regis M.B., (1978). Croissance de deux Echinoides du golfe de Marseille (*Paracentrotus lividus* LMK et *Arbacia lixula* L.). Aspects écologiques de la microstructure du squelette et de l'évolution des indices physiologiques. These Fac. Sc. Techn. Saint-Jerome. Marseille, 221 p., 19 pl.

Regis M.B., (1979a). Particularites microstructurales du squelette de *Paracentrotus lividus* et *Arbacia lixula* : Rapports avec l'ecologie de ces echinoides. *Mar. Biol.*, 54 : 373-382.

Regis M.B., (1979b). Analyse des fluctuations des indices physiologiques chez deux echinoides (*Paracentrotus lividus* (Lmck) et *Arbacia Lixula* L.) du Golfe de Marseille. *Tethys* 9:167-181.

Reipschläger A., Pörtner H-O., (1996). Metabolic depression during environmental stress: the role of extracellular versus intracellular pH in *Sipunculus nudus*. *J Exp Biol* 199:1801–1807

Reverberi G., (1967). *Introduzione all'embriologia sperimentale*. Feltrinelli ed., Milano, 407 pp.

Rico V., (1989). Contribution a l'etude des preferenda alimentaire et du comportement moteur de l'oursin regulier *Paracentrotus lividus*. Mem. Dipl. Et. Approve. Oceanogr., Univ. Aix-Marseille II, Fr., 1-49.

Rico V., Caltagirone A., Fernandez C., (1990). Comportement de *Paracentrotus lividus*: quelques exemples de budget temps. *Rapp. Comm. int. Mer Medit.*, 32(1) : 38.

Ries J.B., Cohen A.L., McCorkle D.C., (2009). Marine calcifiers exhibit mixed responses to CO<sub>2</sub>-induced ocean acidification. *Geology* 37:1131–1134.

Roaf H.E., (1909). Contributions to the physiology of marine invertebrates. *J. Physiol.*, 39 : 438-452.

Roberts-Regan D.L., Scheibling R.E., Jellet J.F., (1988). Natural and experimentally induced lesions of the body wall of the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Dis. Aquat. Org.* Vol. 5: 51-62, 1988.

Robinson S.M.C., Colborne L., (1998). Roe enhancement trials of the green sea urchin using an artificial food source. In: Moo, R., Telford, M. (Eds.), *Proceedings of the 9th International Echinoderm Conference, San Francisco, 1996*. Balkema, Rotterdam, pp. 803.

Robinson S.M.C., Castell J.S., Kennedy E.J., (2002). Developing suitable colour in the gonads of cultured green sea urchins (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Aquaculture* 206, 289–303.

Roller R.A., Stickle W.B., (1993). Effects of temperature and salinity acclimation of adults on larval survival, physiology, and early development of *Lytechinus variegates* (Echinodermata: Echinoidea). *Mar. Biol.* 116:583-591.

Rosecchi E. (1987). L'alimentation de *Diplodus sargus*, *Diplodus vulgaris* et *Sparus aurata* (Pisces, Sparidae) dans le golfe du Lion et les lagunes littorales. *Rev. Trav. Inst. Peches marit.*, 49(3 et 4): 125-141.

Rumrill S.S., Pearse J.S., (1985). Contrasting reproductive periodicities among north-eastern Pacific ophiuroids. In: *Echinodermata* (B.F. Keegan & B.D.S. O'Connor eds.), A.A. Balkema Publ., Rotterdam : 633-638.

Sabourin T.D., Stickle W.B., (1981). Effects of salinity on respiration and nitrogen excretion in two species of echinoderms. *Mar Biol* 65:91–99.

Sala E., Zabala M., (1996). Fish predation and the structure of the sea urchin *Paracentrotus lividus* populations in the NW Mediterranean. *Mar Ecol Prog Ser*, Vol. 140: 71-81.

Sala E., Boudouresque C.F., Harmelin-Vivien M., (1998). Fishing, trophic cascades and the structure of algal assemblages; evaluation of an old but untested paradigm. *Oikos* 82:425–439.

Sammarco P.W., Levinton J.S., Cogden J., (1974). Grazing and control of a coral reef community structure by *Diadema antillarum* Philippi (Echinodermata: Echinoidea): a preliminary study. *J. mar. Res.*, 15 : 47-53.

San Martin G., (1986). Contribution a l'étude du comportement trophique de l'échinoïde *Paracentrotus lividus* dans l'Etang de Thau (Herault). Dipl. Etud. Appr. Oeanol., Univ. Aix Marseille II : 42 pp.

San Martin G., (1987). Comportement alimentaire de *Paracentrotus lividus* (Lmk) (Echinodermata: Echinidae) dans l'Etang de Thau (Herault, France). In: *Colloque international sur Paracentrotus lividus et les oursins comestibles*, C.F. Boudouresque ed., GIS Posidonie Publ., Marseille : 37-57.

San Martin G., (1995). Contribution à la gestion des stocks d'oursins: étude des populations et transplantations de *Paracentrotus lividus* à Marseille (France, Méditerranée) et production de *Loxechinus albus* à Chiloe (Chili, Pacifique). Ph.D. Thesis, Université d'Aix-Marseille II, Marseille, 166 pp.

Savy S., (1987). Les prédateurs de *Paracentrotus lividus* (Echinodermata). In: Colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles, C.F. Boudouresque ed., GIS Posidonie Publ., Marseille : 413-423.

Scheibling R.E., Stephenson R.L., (1984). Mass mortality of *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinodermata: Echinoidea) off Nova Scotia, Canada. *Marine Biology* 78, 153-164 (1984).

Schiedt K., Liaaen-Jensen S., (1995). Isolation and Analysis, Chapter 5 in *Carotenoids Vol. 1 A: Isolation and Analysis*, 1995 Birkhäuser verlag Basel, 81-84.

Schmalenberger A., Schwieger F., Tebbe C.C., (2001). Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3557-3563.

Scott P.J.B., (1990). Chronic pollution recorded in coral skeletons in Hong Kong. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 139, 51-64.

Seibel B.A., Walsh P.J., (2003). Biological impacts of deep-sea carbon dioxide injection inferred from indices of physiological performance. *J Exp Biol* 206:641–650

Stickle W.B., Diehl W.J., (1987). Effects of salinity on echinoderms. In: Jangoux M, Lawrence JM (eds) *Echinoderm studies*, vol 2. A.A. Balkema, Rotterdam

Serrao E., (1988). Contribucao para conhecimento de la distribucao e cartografia dos ouricos (Echinoidea) a Norte do Cabo Espichel. *Recursos faunisticos marinhos Portugeses II*: 1-80.

Shepherd S.A., Boudouresque C.F., (1979). A preliminary note on the movement of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Trav. sci. Parc nation. Port-Cros*, 5: 155-158.

- Sheppard Brennan H., Soars N., Dworjanyn S.A., Davis A.R., Byrne M., (2010). Impact of ocean warming and ocean acidification on larval development and calcification in the sea urchin *Tripneustes gratilla*. PLoS ONE, 5, e11372.
- Shick J.M., (1983). Respiratory gas exchange in Echinoderms. In : *Echinoderm studies*, Vol.1., M. Jangoux & J.M. Lawrence (eds.), A.A. Balkema Publ., Rotterdam, 1983: 67-110.
- Shina A., Gross J., Lifshitz A., (1978). Carotenoids of the invertebrates of the Red Sea (Eilat Shore): II. Carotenoid pigments in the gonads of the sea urchin *Tripneustes gratilla* (Echinodermata). *Comp. Biochem. Physiol.* 61B, 123– 128.
- Shirayama Y., Thornton H., (2005). Effect of increased atmospheric CO<sub>2</sub> on shallow water marine benthos. *J Geophys Res C* 110: 1–7.
- Shirley T.C., Stickle W.B., (1982a). Responses of *Leptasterias hexactis* (Echinodermata: Asteroidea) to low salinity. 1. Survival, activity, feeding, growth and absorption efficiency. *Mar. Biol.*, 69(2) : 147-154.
- Shirley T.C., Stickle W.B., (1982b). Responses of *Leptasterias hexactis* (Echinodermata: Asteroidea) to low salinity. 2. Nitrogen metabolism, respiration and energy budget. *Mar. Biol.*, 69(2) : 155-163.
- Shpigel M., McBride S.C., Marciano S., Ron S., Ben-Amotz A., (2005). Improving gonad colour and somatic index in the European sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture* 245 (2005) : 101– 109.
- Shumway S.E., (1977). The effects of fluctuating salinities on four species of asteroids echinoderms. *Comp. Biochem. Physiol.*, 58A(2) : 177-179.
- Siikavuopio S.I., Dale T., Mortensen A., (2006). The effects of stocking density on gonad growth, survival and feed intake of adult green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Aquaculture* 262 (2007): 78–85.
- Siikavuopio S., Mortensen A., Dale T., Foss A., (2007). Effects of carbon dioxide exposure on feed intake and gonad growth in green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture* 266:97–101.
- Siikavuopio S.I., Mortensen A., (2008). Effects of body weight and temperature on feed intake, gonad growth and oxygen consumption in green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Development* 281:77–82.
- Sivertsen K., (2004). Harvestable Sea Urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* resources along the Norwegian Coast. In J. Lawrence & O. Guzman (eds), *Sea Urchins: Fisheries and Aquaculture*. Pennsylvania: DEStech publications pp.85.
- Sköld M., Rosenberg R., (1996). Arm regeneration frequency in eight species of ophiuroidea (Echinodermata) from European sea areas. *J Sea Res* 35:353–362.
- Smith V., (1981). The echinoderms. In: Ratcliffe, N., Rowley, A. (Eds.), *Invertebrate Blood Cell*. Academic Press, New York, pp. 513–562.
- Smith L.C., Chang L., Britten R.J., Davidson E.H., (1996). Sea urchin genes expressed in activated coelomocytes are identified by expressed sequence tags. Complement homologues and other putative immune response genes suggest immune system homology within the deuterostomes. *The Journal of Immunology*, 156(2), 593-602.

- Snodderly D.M., (1995). Evidence for protection against age related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1448–1461.
- Southward A., Southward E., (1975). Endangered urchins. *New Scientist.* 10: 70-72.
- Spirlet C., Grosjean P., Jangoux M., (1998b). Reproductive cycle of the echinoid *Paracentrotus lividus*: analysis by means of the maturity index. *Invert. Reprod. Develop.* 34, 69-81.
- Spirlet C., Grosjean P., Jangoux M., (2001). Cultivation of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) on extruded feeds: digestive efficiency, somatic and gonadal growth. *Aquaculture Nutrition* 2001, 7: 91-99
- Stancyk S.E., Shaffer P.L., (1977). The salinity tolerance of *Ophiothrix angulata* (Say) (Echinodermata: Ophiuroidea) in latitudinally separate populations. *J.Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 29(1) : 35-43.
- Stott F.C., (1955). The food canal of the sea-urchin *Echinus esculentus* and its functions. *Proc. zool. Soc. Lond.*, 125 : 63-86.
- Strathmann R.R., (1981). The role of spines in preventing structural damage to echinoid tests. *Paleobiology*, 7, 400–406.
- Suzuki T., (1990). Tecnología de las proteínas de pescado y krill, pp. 144–188. Zaragoza: Acribia.
- Symonds R.C., Kelly M.S., Caris-Veyrat C., Young A.J., (2007). Carotenoids in the sea urchin *Paracentrotus lividus*: Occurrence of 9'-cis-echinenone as the dominant carotenoid in gonad colour determination. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 148 (2007) 432–444.
- Symonds R., Kelly M., Suckling C., Young A., (2009). Carotenoids in the gonad and gut of the edible sea urchin *Psammechinus miliaris*. *Aquaculture* 288: 120–125.
- Talbot T., Lawrence J.M., (2002). The effect of salinity on respiration, excretion, regeneration and production in *Ophiophragmus filograneus* (Echinodermata: Ophiuroidea). *J Exp Mar Biol Ecol* 275:1–14.
- Taberlet P., Coissac E., Pompanon F., Brochmann C., Willerslev E.,(2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular ecology*, 21(8), 2045-2050.
- Tajima K., Hirano T., Shimizu M., Ezura Y., (1997a). Isolation and pathogenicity of the causative bacterium of spotting disease of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Fish. Sci.* 63 (2), 249–252.
- Taylor H.R., Harris W.E., (2012). An emergent science on the brink of irrelevance: a review of the past 8 years of DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 12(3), 377-388.
- Tertschnig W.P., (1989). Predation on the sea urchin *Paracentrotus lividus* by the spider crab *Maia crispata*. In: *Echinoderm: living and fossils* (Regis, M.B., A.Segui, C. Frasson P. Escoubet & A. Riva eds.), *Vie Marine* Vol HS, 10 : 95-103.

Thorson G., (1936). The larval development, growth and metabolism of Arctic marine bottom invertebrates compared with those of other seas. *Medd. Gronland* 100, 1-155.

Tortonese E., (1958). Bionomia marina della regione costiera fra Punta della Chiappa e Portofino (Riviera Ligure di Levante). *Arch. Ocean. Limnol. Venezia*, XI(2) : 167-210.

Tortonese E., (1965). Fauna d'Italia. Echinodermata. Ediz. Calderini, Bologna, 422 pp.

Tortonese E., Vadon C., (1987). Oursins et Holothuries (Echinoderes). Fiches d'identification des especes pou les besoins de la pèche, Vol. I, Mediterranee-mer Noire, pp.715- 739. FAO, Rome

Traer K., (1980). The consumption of *Posidonia oceanica* Delile by echinoids at the Isle of Ischia. In: *Echinoderms: Present and Past* (Jangoux, M. ed.), Balkema, Rotterdam, pp. 241-244.

Tringe S.G., Hugenholtz P., (2008). A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Curr Opin Microbiol* 11:442–446.

Truchot J.P., Duhamel-Jouve A., (1980). Oxygen and carbon dioxide in the marine intertidal environment: diurnal and tidal changes in rockpools. *Respir Physiol* 39:241–254.

Trudgill S.T., Smart P.L., Friederich H., Crabtree R.W., (1987). Bioerosion of intertidal limestone, Co Clare, Eire-1: *Paracentrotus lividus*. *Mar. Geol.*, 74(1-2) : 85-98.

Tsushima M., Matsuno T., (1990). Comparative biochemical studies of carotenoids in sea-urchins—I. *Comp. Biochem. Physiol.* 96B, 801– 810.

Tsushima M., Kawakami T., Matsuno T., (1993). Metabolism of carotenoids in sea-urchin *Pseudocentrotus depressus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B, 737–741.

Tsushima M., Byrne M., Amemiya S., Matsuno T., (1995). Comparative biochemical studies of carotenoids in sea urchins: III. Relationship between developmental mode and carotenoids in the Australian echinoids *Heliocidaris erythrogramma* and *H. tuberculata* and a comparison with Japanese species. *Comp. Biochem. Physiol.* 110B, 719– 723.

Tsushima M., Kawakami T., Mine M., Matsuno T., (1997). The role of carotenoids in development in sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. *Invert. Reprod. Develop.* 32 (2), 149–153.

Tsushima M., (2006). Carotenoids in sea urchins. In: Lawrence, J.M. (Ed.) *Biology and Ecology of Edible Sea Urchins*. Elsevier.

Tuwo A., Conand C., (1992). Reproductive Biology of the Holothurian *Holothuria forskali* (Echinodermata). *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 72: 745-758.

Ulbricht R.J., Pritchard A.W., (1972). Effects of temperature on metabolic rate of sea urchins. *Biol. Bull.* 142 (No1), 178–185.

Unuma T., (2002). Gonadal growth and its relationship to aquaculture in sea urchins. In: Yukio, Y., Matranga, V., Smolenicka, Z. (Eds.), *The Sea Urchin: From Basic Biology to Aquaculture*. A.A. Balkema Publishers, The Netherlands, pp. 115– 128.

Unuma T., Nakamura A., Yamano K., Yokota Y., (2010). The sea urchin major yolk protein is synthesized mainly in the gut inner epithelium and the gonadal nutritive phagocytes before and during gametogenesis. *Mol Rep Dev* 77: 59–68.



Urgorri V., Reborada P., Troncoso J.S., (1994). Dispersion, demografía y producción gonadal de una población de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). Memoria final de resultados del P.I. FEUGA, University Santiago de Compostela.

Vadas R.L., (1977). Preferential feeding: an optimization strategy in sea-urchins. *Ecol. Monogr.*, 47 : 337-371.

Vadas R.L., Beal B., Dowling T., Fegley J.C., (2000). Experimental field tests of natural algal diets on gonad index and quality in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*: a case for rapid summer production in post-spawned animals. *Aquaculture*, 182(1), 115-135.

Verlaque M., Nedelec H., (1983a). Note préliminaire sur les relations biotiques *Paracentrotus lividus* (Lmk.) et herbier de Posidonies. *Rapp. Comm. int. Mer Médit.*, 28(3) : 157-158.

Verlaque M., Nedelec H., (1983b). Biology of *Paracentrotus lividus* (Lamarck) on rocky bottoms in Corsica (Mediterranean, France) : diet of adults [sea urchin, phytobentos, grazing]. *Vie et Milieu*, 33(3/4) : 191-201.

Verlaque M., (1987). Relations entre *Paracentrotus lividus* (Lmk.) et le phytobenthos de Méditerranée occidentale. In C.F. Boudouresque (ed), *Colloque international sur Paracentrotus lividus et les oursins comestibles*: 5-36, Marseille : GIS Posidonie.

Vernberg F.J., (1981). Benthic Macrofauna. In: *Functional Adaptations of Marine Organisms*, F.J. Vernberg & W.B. Vernberg (eds), Academic Press : 179-220.

Vidolin D., Santos-Gouveia I.A., Freire C.A., (2007). Differences in ion regulation in the sea urchins *Lytechinus variegatus* and *Arbacia lixula* (Echinodermata: Echinoidea). *J Mar Biol Ass UK* 87:769–775

Watts A., Scheibling R.E., Marsh A.G, McClintock J.B., (1983). Induction of aberrant ray numbers in *Echinaster* sp. (Echinodermata: Asteroidea) by high salinity. *Fla. Sci.*, 46(2) : 125-127.

Walker C.W., Lesser M.P., (1998). Manipulation of food and photoperiod promotes out-of-season gametogenesis in the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*: implications for aquaculture. *Mar. Biol.* 132, 663– 676.

Wardlaw A.C., Unkles S.E., (1978). Bactericidal activity of coelomic fluid from the sea urchin *Echinus esculentus*. - *J. invertebr. Pathol.* 32, 25-34.

Watts A., Lawrence J.M., (1986). Seasonal effects of temperature and salinity on the organismal activity of the seastar *Luidia clathrata* (Say) (Echinodermata: Asteroidea). *Mar. Behav. Physiol.*, 12(3) : 161-169.

Watts S.A., Boettger S.A., McClintock J.B., Lawrence J.M., (1998). Gonad production in the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Lamarck) fed prepared diets. *J. Shellfish Res.* 17 (5), 1591– 1595.

Wikipedia [http://en.wikipedia.org/wiki/Sea\\_urchin](http://en.wikipedia.org/wiki/Sea_urchin)

WebMD <http://www.webmd.com/healthy-aging/omega-3-fatty-acids-fact-sheet>

Webster S.K., Giese A.C., (1975). Oxygen consumption of the purple sea urchin with special reference to the reproductive cycle. *Biol. Bull.*, 148 : 165-180.

Whiteley N.M., Scott J.L., Breeze S.J., McCann L., (2001). Effects of water salinity on acid–base balance in decapod crustaceans. *J Exp Biol* 204:1003–1011.

Wolfe K., Dworjanyn S.A., Byrne M., (2013). Effects of ocean warming and acidification on survival, growth and skeletal development in the early benthic juvenile sea urchin (*Heliocidaris erythrogramma*). *Global Change Biology* (2013) 19, 2698–2707, doi: 10.1111/gcb.12249

Wood H.L., Spicer J.I., Widdicombe S., (2008). Ocean acidification may increase calcification rates—but at a cost. *Proc R Soc B* 275:1767–1773

Wood H.L., Spicer J.I., Lowe D.M., Widdicombe S., (2010). Interaction of ocean acidification and temperature; the high cost of survival in the brittlestar *Ophiura ophiura*. *Mar Biol* 157:2001–2013

Wood H.L., Spicer J.I., Kendall M.A., Lowe D.M., Widdicombe S., (2011). Ocean warming and acidification; implications for the Arctic brittlestar *Ophiecten sericeum*. *Polar Biol.* doi:10.1007/s00300-011-0963-8

Yui M., Bayne C., (1983). Echinoderm immunology: bacterial clearance by the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Biol Bull* 1983; 165: 473-85.

Zavodnik D., (1979). Cruises of the research vessel «Vila Velebita» in the Kvarner region of the Adriatic Sea. XX. Echinodermata. *Thalassia Jugosl.*, 15(3/4) : 289-312.

Zavodnik D., (1987). Synopsis on the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) in the Adriatic Sea. In: *Colloque international sur Paracentrotus lividus et les oursins comestibles*, C.F. Boudouresque ed., GIS Posidonie Publ., Marseille : 221-240.

Zeebe R.E., Zachos J.C., Caldeira K., Tyrrell T., (2008). Oceans: carbon emissions and acidification. *Science* 321:51– 52.

Zeebe R.E., (2012). History of seawater carbonate chemistry, atmospheric CO<sub>2</sub>, and ocean acidification. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 40, 141-165.

