



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

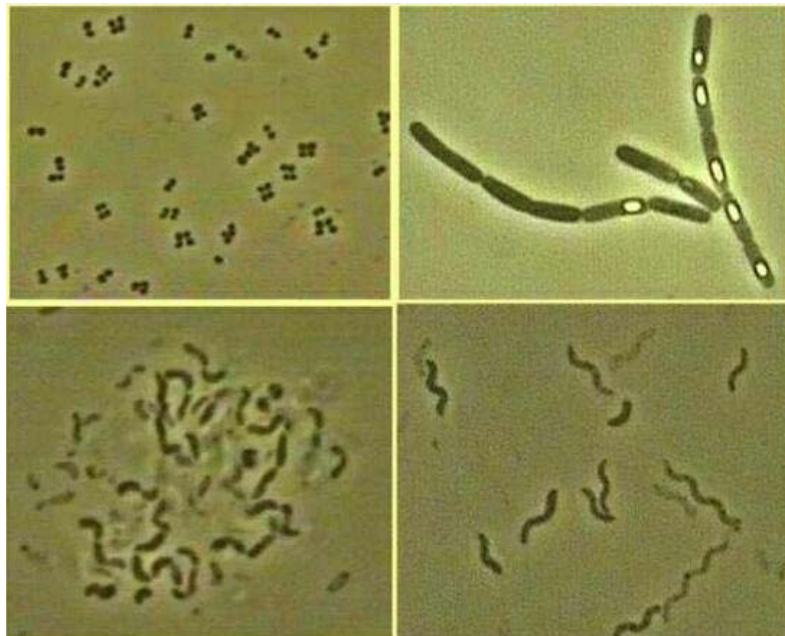
---

**ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ**  
**ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΩΝ ΜΕ ΑΥΤΗ**  
**ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΣΕ ΙΖΗΜΑΤΑ**  
**ΤΗΣ ΑΝΑΤΟΛΙΚΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΟΥ**

---

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΟΛΥΜΕΝΑΚΟΥ**



**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2005**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

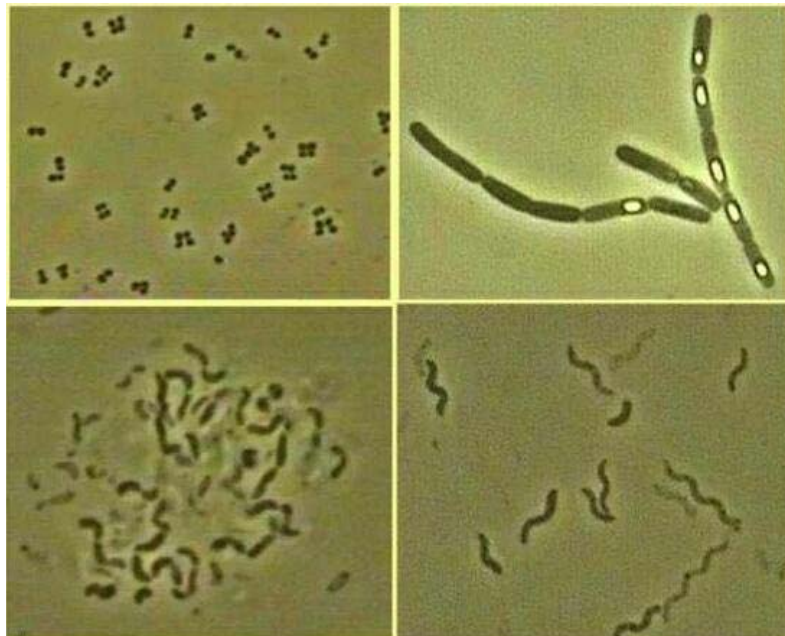
---

**ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ**  
**ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΩΝ ΜΕ ΑΥΤΗ**  
**ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΣΕ ΙΖΗΜΑΤΑ**  
**ΤΗΣ ΑΝΑΤΟΛΙΚΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΟΥ**

---

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΟΛΥΜΕΝΑΚΟΥ**



**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2005**

Η παρούσα μελέτη χρηματοδοτήθηκε από τα Ευρωπαϊκά Ερευνητικά Προγράμματα:  
**ADIOS** (EU - DG XII, EVK3 - 2000 - 00604): Atmospheric **D**eposition and **I**mpact  
of pollutants, key elements and nutrients on the **O**pen Mediterranean Sea.

**ANREC** (EU - DG XII, QLRT-2001-01216): Association of physical and biological  
processes acting on recruitment and post-recruitment of Anchovy

**BIODEEP** (EU - DG XII, EVK3 - 2000 - 22057): **BIO**technologies from the **DEEP**.

**CYCLOPS** (EU - DG XII, EVK3 - CT99 - 0009): **CYCL**ing **O**f **P**hosphoru**S** in the  
Mediterranean.

**INTERPOL** (EU - DG XII, EVK3 - 2000 - 00526): Impact of **N**atural and **T**rawling  
**E**vents on **R**esuspension, dispersion and fate of **POLL**utants

του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας Κρήτης (Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων  
Ερευνών, ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.),

από το **Υπουργείο Ανάπτυξης** (Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας) και  
από το **Συμβούλιο Έρευνας της Σουηδίας** (Swedish Research Council and the  
Swedish Research Council for Environment, Agricultural Sciences and Special  
Planning).

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του Ελληνικού Κέντρου  
Θαλασσίων Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. Γούρνες Πεδιάδος, Ηράκλειο Κρήτης), και στο  
Τμήμα Οικολογίας και Εξέλιξης του Πανεπιστημίου της Ουψάλας (Department of  
Ecology and Evolution, Evolutionary Biology Center, Uppsala University, Uppsala,  
Sweden) σε συνεργασία με το Εργαστήριο Περιβαλλοντικών Χημικών Διεργασιών  
του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης και με την υποστήριξη του  
Ι.Θ.Α.ΒΙ.Κ. (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.), του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών (πρόγραμμα  
Σωκράτης/Erasmus) και του Πανεπιστημίου Κρήτης.

© Παρασκευή Πολυμενάκου, 2005

Φώτο εξώφυλλου: Bacterial shape: cocci, rods, vibrio, spiral

Produced by Jim Deacon (Institute of Cell and Molecular Biology, The University of  
Edinburgh)

Source: <http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/shape.htm#composite>

*στην Οικογένεια μου*

### **Επιβλέπων Καθηγητής**

Ε. Γ. Στεφάνου (Καθηγητής Παν/μίου Κρήτης)

### **Συμβουλευτική Επιτροπή**

Ε. Γ. Στεφάνου (Καθηγητής Παν/μίου Κρήτης)

Δρ. Α. Τσελεπίδης (Διευθυντής Ερευνών ΕΛ.ΚΕ.ΘΕ.)

Ν. Μιχαλόπουλος (Καθηγητής Παν/μίου Κρήτης)

### **Εξεταστική επιτροπή**

Ε. Γ. Στεφάνου (Καθηγητής Παν/μίου Κρήτης)

Δρ. Α. Τσελεπίδης (Διευθυντής Ερευνών ΕΛ.ΚΕ.ΘΕ.)

Ν. Μιχαλόπουλος (Καθηγητής Παν/μίου Κρήτης)

Χ. Κατερινόπουλος (Καθηγητής Παν/μίου Κρήτης)

Δ. Γανωτάκης (Καθηγητής Παν/μίου Κρήτης)

Γ. Λυμπεράτος (Καθηγητής Παν/μίου Πατρών)

Γ. Χρόνης (Καθηγητής Παν/μίου Αιγαίου, Πρόεδρος ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.)

**Πρακτικό Δημόσιας Παρουσίασης και Εξέτασης της Διδακτορικής  
Διατριβής της Κυρίας Παρασκευής Πολυμενάκου Υποψήφιας  
Διδάκτορας του Τμήματος Χημείας**

Η επταμελής Εξεταστική Επιτροπή της Διδακτορικής Διατριβής του **Παρασκευής Πολυμενάκου** εκλήθη την Δευτέρα 11 Απριλίου 2005, να εξετάσει σύμφωνα με το Νόμο την υποστήριξη της διατριβής του υποψηφίου, με τίτλο:


**«Περιβαλλοντική Μελέτη της Βακτηριακής Ποικιλότητας και των  
Σχετιζόμενων με αυτή Μοριακών Δεικτών σε Ιζήματα της  
Ανατολικής Μεσογείου»**

Τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής, εκφράζουν ομόφωνα την πλήρη ικανοποίησή τους και συγχαίρουν την κυρία Πολυμενάκου για την υψηλή ποιότητα του περιεχομένου της διατριβής της. Τα ερευνητικά αποτελέσματα της εργασίας της Π. Πολυμενάκου είναι σημαντικά, πρωτότυπα και διευρύνουν το διεπιστημονικό πεδίο έρευνας Οργανικής Περιβαλλοντικής Χημείας και Θαλάσσιας Βιολογίας και το κυριότερο ανοίγουν σημαντικές προοπτικές για την διερεύνηση της λειτουργίας των θαλάσσιων βενθικών οικοσυστημάτων με τη συνδυαστική χρήση μοριακών τεχνικών και μοριακών περιβαλλοντικών δεικτών. Τα μέλη της Επιτροπής εκφράζουν επίσης την απόλυτη ικανοποίησή τους για την υψηλή ποιότητα της παρουσίασης και την ευρύτητα των γνώσεων της κυρίας Πολυμενάκου στο ευρύτερο πεδίο των Περιβαλλοντικών Φυσικών Επιστημών όπως διαφάνηκε κατά την διάρκεια της εξεταστικής διαδικασίας.

**Η Εξεταστική Επιτροπή προτείνει ομόφωνα την απονομή του τίτλου της Διδάκτορας και του Διπλώματος που, σύμφωνα με τον Νόμο, τον συνοδεύει στην Κυρία Παρασκευή Πολυμενάκου.**

**Τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής:**

**Ευριπίδης Γ. Στεφάνου**, Καθηγητής Παν/μίου Κρήτης (Επιστημονικός Υπεύθυνος)



**Νικόλαος Μιχαλόπουλος**, Καθηγητής Παν/μίου Κρήτης



**Γεράσιμος Λυμπεράτος**, Καθηγητής Παν/μίου Πατρών



**Δημήτρης Γανωτάκης**, Καθηγητής Παν/μίου Κρήτης



**Γεώργιος Χρόνης**, Καθηγητής Παν/μίου Αιγαίου\*

**Αναστάσιος Τσελεπίδης**, Διευθυντής Ερευνών Θαλάσσιας Βιολογίας του  
ΕΚΘΕ



**Χαράλαμπος Κατερινόπουλος**, Καθηγητής Παν/μίου Κρήτης



\* Ο Καθ. Γ. Χρόνης απουσίασε λόγω προσωπικού προβλήματος. Έστειλε γραπτώς την αξιολόγηση της Διατριβής και την θετική του γνώμη για την απονομή του τίτλου στην κ. Πολυμενάκου. Η γραπτή αξιολόγηση επισυνάπτεται

Ηράκλειο 11/05/2005



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ - ΓΕΝΙΚΗ ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.**  
ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ

Αξιότιμε Κύριε Πρόεδρε,

Θα ήθελα να σας ενημερώσω ότι για σοβαρούς οικογενειακούς λόγους αδυνατείω στην υποστήριξη της Διδακτορικής Διατριβής της κυρίας Πολυμενάκου, με θέμα «Περιβαλλοντική μελέτη της Βακτηριακής Ποικιλότητας σχετιζομένων με αυτή Μοριακών δεικτών σε Ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου»

Συναφώς, θέλω να σας γνωρίσω ότι μελέτησα την ως άνω διατριβή την οποία και ως μια διατριβή υψηλού επιπέδου, η οποία καλύπτει άριστα και τη γεωγραφική μεθοδολογική προσέγγιση των Βενθικών μικροβιακών κοινοτήτων σε διάφορα περιβάλλοντα.

Κατά συνέπεια σας δηλώνω ότι είμαι θετικός στην απονομή του τίτλου του Διδάκτορα κυρία Πολυμενάκου Παρασκευή, εκφράζοντας συγχρόνως και τα συγχαρίματα μου σε αυτήν για τη σημαντική συμβολή της στη γνώση της οικολογίας του Ανατολικής Μεσογείου.

Με εκτίμηση,

Καθ. Γεώργιος Θ. Χρόνης



## Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, στο Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών και στο τμήμα Οικολογίας και Εξέλιξης του Πανεπιστημίου της Ουψάλας στη Σουηδία υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. **Ευριπίδη Στεφάνου**.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, που μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω τη διδακτορική μου διατριβή καθώς και όλους εκείνους που συνέβαλαν στην προσπάθειά μου αυτή. Καταρχήν θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή κ. **Ευριπίδη Στεφάνου** για την άψογη συνεργασία του, την καθοδήγηση, την ενθάρρυνση μα πάνω από όλα για την αμέριστη εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την διάρκεια της συγκεκριμένης μελέτης.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή Ερευνών του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. κ. **Αναστάσιο Τσελεπίδη** για την απεριόριστη υποστήριξη και συμπαράστασή του καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια. Από την πρώτη στιγμή, όταν πρωτοήρθα στο Ι.ΘΑ.ΒΙ.Κ. (νυν ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.) το Σεπτέμβριο του 2001 μου πρότεινε και παράλληλα μου έδωσε την δυνατότητα και την ευκαιρία να πραγματοποιήσω τη διδακτορική μου διατριβή στον ευρέως αναπτυσσόμενο χώρο της Μικροβιακής Οικολογίας στηρίζοντας κάθε πρωτοβουλία και κάθε βήμα μου.

Ευχαριστώ τους καθηγητές κ. **Νίκο Μιχαλόπουλο**, κ. **Δημήτρη Γανωτάκη**, κ. **Χαράλαμπο Κατερινόπουλο** του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, τον καθηγητή κ. **Γεράσιμο Λυμπεράτο** από το Πανεπιστήμιο της Πάτρας, καθώς και τον καθηγητή κ. **Γεώργιο Χρόνη** και πρόεδρο του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. που δέχτηκαν αν συμμετάσχουν στην εξεταστική μου επιτροπή.

Καθοριστική για την εκπόνηση της διατριβής μου ήταν η συμβολή του Δρ. **Stefan Bertilsson** (Ερευνητή του Τμήματος Οικολογίας και Εξέλιξης του Πανεπιστημίου της Ουψάλας) τον οποίο ευχαριστώ θερμότατα για την εποικοδομητική συνεργασία του κατά την διάρκεια της παραμονής μου στην Σουηδία όπου και πραγματοποιήθηκε ένα σημαντικό μέρος της διατριβής, για τις ατέλειωτες συζητήσεις μας και τις υποδείξεις του καθώς και για την άψογη συνεργασία μας κατά την διάρκεια της συγγραφής των επιστημονικών εργασιών που προέκυψαν από την παρούσα διατριβή.

Θερμά ευχαριστώ όλο το προσωπικό του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. και ιδιαίτερα τους Δρ. **Νικόλαο Λαμπαδαρίου**, Δρ. **Στέλλα Ψαρρά**, **Θάλεια Πολυχρονάκη**, **Φώτη Πανταζόγλου**, **Δημήτρη Ποδάρα** και **Wanda Plaiti** για τη βοήθειά τους στις οκεανογραφικές αποστολές καθώς και για το ευχάριστο και φιλικό κλίμα που

δημιουργούν στον εργασιακό χώρο. Επίσης ευχαριστώ την **Ελένη Δαφνομήλη** και **Snezana Zivanovic** για τις αναλύσεις χλωροφυλλών και οργανικού άνθρακα που πραγματοποίησαν.

Ευχαριστώ τον καθηγητή **Lars Tranvik** του Τμήματος Οικολογίας και Εξέλιξης του Πανεπιστημίου της Ουψάλας για την πρόσκλησή του να πραγματοποιήσω μέρος της διατριβής μου στο εργαστήριό του υπό την επίβλεψη του Δρ. **Stefan Bertilsson** καθώς και όλα τα μέλη του Microbial Ecology Group στη Σουηδία αλλά ιδιαίτερα τους **Alexander Eiler**, **Lisa Nirell** (για την εκμάθηση του φυλογενετικού πακέτου ARB), Dr. **Eva Lindstrom** και **Silke Langeheder** (για τη βοήθειά τους στην τεχνική DGGE) και Dr. **Helmut Fischer**. Ευχαριστώ τον καθηγητή **Örjan Gustafsson** από το Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Περιβαλλοντικών Επιστημών του Πανεπιστημίου της Στοκχόλμης για την πολύτιμη βοήθειά του κατά τη διάρκεια παραμονής μου στη Σουηδία.

Οι ευχαριστίες μου όμως δεν σταματούν εδώ. Θέλω να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στους καπετάνιους και τα πληρώματα των Ωκεανογραφικών Πλοίων του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. «ΑΙΓΑΙΟ» και «ΦΙΛΙΑ» και του Ιταλικού Ωκεανογραφικού «URANIA» για την πολύτιμη βοήθειά τους κατά την διάρκεια των αποστολών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου τον διδάκτορα **Μανόλη Μανδαλάκη** για την αγάπη του, την ηθική του υποστήριξη καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του κατά τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την απεριόριστη ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου Νίκο και Μαρίνα και στα αδέρφια μου Ουρανία και Γιάννη για την αγάπη τους και την ηθική και υλική τους βοήθεια όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου. Αν και αναγκαστικά, λόγω των σπουδών μου και της εργασίας μου, ζω τόσα χρόνια μακριά τους η σκέψη μου και η καρδιά μου βρίσκεται κάθε στιγμή κοντά τους καθώς και στον τόπο που γεννήθηκα και μεγάλωσα, στην Τσακωνιά Κυνουρίας (Εξού έμοι από τα Τσακώνα, ντε ευχαριστούα πάσου).



**ΣΑΣ ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ ΠΟΛΥ!!!!**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγικά Στοιχεία</b> .....	5
1.1 Γενικά.....	5
1.2 Βακτηριακή ποικιλότητα.....	7
1.2.1 Τεχνικές γενετικής αποτύπωσης του γονιδίου 16S rRNA.....	7
1.2.2 Βιβλιοθήκες κλώνων του γονιδίου 16S rRNA.....	8
1.2.3 Ανάλυση των φωσφολιπιδίων (PLFA).....	10
1.2.4 Μικροοργανισμοί με ικανότητα αποικοδόμησης υδρογονανθράκων.....	11
1.3 Περιβαλλοντικές παράμετροι.....	12
1.3.1 Οξικές και ανοξικές συνθήκες.....	12
1.3.2 Οργανικός άνθρακας-βιοδιαθέσιμος και μη.....	14
1.3.3 Χλωροφύλλη <i>a</i> και φαιοχρωστικές.....	14
1.3.4 Οι δείκτες των κ-αλκανίων.....	15
1.4 Ανατολική Μεσόγειος.....	17
1.4.1 Κυκλοφορία υδάτινων μαζών στην Ανατολική Μεσόγειο.....	17
1.4.2 Η υποθαλάσσια οροσειρά της Μεσογείου.....	19
1.5 Στόχοι της μελέτης.....	22
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Πειραματικό Μέρος</b> .....	26
2.1 Περιοχές δειγματοληψίας.....	26
2.2 Δειγματοληψίες και βιογεωχημικές παράμετροι.....	28
2.3 Ρυθμοί στοιχειοποίησης του άνθρακα.....	29
2.4 Αναλύσεις DGGE και T-RFLP.....	29
2.5 Ανάλυση λιπιδίων.....	30
2.6 Κατασκευή βιβλιοθηκών κλώνων.....	31
2.7 Φυλογενετική ανάλυση.....	32
2.8 Βακτηριακή ποικιλότητα.....	32
2.9 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	33
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Αποτελέσματα και Συζήτηση</b> .....	34
<b>3.1 Μελέτη των μικροβιακών κοινωνιών σε ιζήματα της Ανατολικής</b>	

<b>Μεσογείου με τεχνικές αποτύπωσης.....</b>	<b>34</b>
3.1.1 Γεωχημικές παράμετροι.....	35
3.1.2 Ανάλυση των βακτηριακών κοινοτήτων βασισμένη στο γονίδιο 16S rRNA.....	36
3.1.3 Ανάλυση PLFA των μικροβιακών κοινοτήτων.....	39
3.1.4 Σύγκριση των διαφορετικών μεθόδων αποτύπωσης και συσχέτιση με τις περιβαλλοντικές παραμέτρους.....	41
3.1.5 Συζήτηση.....	42
<b>3.2 Μελέτη της σύστασης των μικροβιακών κοινοτήτων με ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA .....</b>	<b>47</b>
3.2.1 Γενικά.....	47
3.2.2 Ταξινομικές ομάδες και η κατανομή τους.....	48
3.2.3 Βακτηριακή ποικιλότητα.....	57
3.2.4 Διαφορές στη σύσταση των μικροβιακών κοινοτήτων μεταξύ των διαφορετικών σταθμών δειγματοληψίας.....	59
3.2.5 Αφθονία των ειδών – περιορισμοί και σύγκριση με βιβλιογραφικές αναφορές.....	63
<b>3.3 Μελέτη της αποικοδομητικής ικανότητας των μικροοργανισμών: στοιχειοποίηση του οργανικού άνθρακα και αποικοδόμηση αλειφατικών υδρογονανθράκων.....</b>	<b>66</b>
3.3.1 Βιογεωχημικός χαρακτηρισμός των ιζημάτων.....	67
3.3.2 Αλλαγές μετά την επώαση.....	74
3.3.3 Ρυθμοί στοιχειοποίησης και πηγές οργανικού άνθρακα.....	77
3.3.4 Σύσταση των βακτηριακών κοινοτήτων.....	79
3.3.5 Ενδείξεις για αποικοδόμηση υδρογονανθράκων.....	81
3.3.6 Ενδείξεις για καταπόνηση των βακτηριακών πληθυσμών λόγω έλλειψης τροφής.....	83
<b>3.4. Μελέτη της επίδρασης της αλατότητας και των οξειδοαναγωγικών συνθηκών στην κατανομή των μικροβιακών κοινοτήτων.....</b>	<b>85</b>
3.4.1 Χημικές παράμετροι.....	87
3.4.2 Κατανομή κ-αλκανίων.....	88
3.4.3 Σύσταση των μικροβιακών κοινοτήτων.....	94
3.4.4 Επίδραση των διαφορετικών οξικών/ανοξικών συνθηκών και	

επιπέδων αλατότητας.....	98
<b>3.5 Μελέτη της βιοδιαθεσιμότητας των πηγών C: επίδραση του στοιχειακού άνθρακα των ιζημάτων στην κατανομή των μικροβιακών κοινωνιών.....</b>	<b>101</b>
3.5.1 Χημικές παράμετροι.....	103
3.5.2 Ανθρωπογενείς και βιογενείς επιδράσεις.....	105
3.5.3 Σύσταση των μικροβιακών κοινωνιών.....	114
3.5.4 Επίδραση των υδρογονανθράκων.....	118
3.5.5 Επίδραση του μη αποικοδομήσιμου οργανικού υλικού.....	121
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Σύνθεση – Συμπεράσματα.....</b>	<b>124</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>135</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....</b>	<b>161</b>
<b>Paper I. Links between geographic location, environmental factors and microbial community composition in sediments of the eastern Mediterranean Sea.....</b>	
<b>Paper II. Bacterial community composition in sediments from the eastern Mediterranean Sea: a comparison of four 16S rDNA clone libraries.....</b>	
<b>Paper III. Study of the mineralization effect on the distribution of lipids in sediments from the Cretan Sea: Evidence for hydrocarbon degradation and starvation stress.....</b>	
<b>Paper IV. <i>n</i>-Alkanes and microbial community fatty acid profiling along a salinity and oxic/anoxic gradient in deep-sea sediments from the South Ionian Sea (Eastern Mediterranean).....</b>	
<b>Paper V. The effect of ‘black carbon’ on natural microbial communities in polluted and pristine sediments from the Eastern Mediterranean Sea: Implications on C pool bioavailability.....</b>	
<b>ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ</b>	



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Για την περιγραφή των βενθικών μικροβιακών κοινωνιών σε διαφορετικά περιβάλλοντα καθώς και των περιβαλλοντικών παραμέτρων που παίζουν πρωταρχικό ρόλο στη ρύθμιση των κατανομών τους συλλέχθηκαν δείγματα ιζημάτων από διάφορες περιοχές της Ανατολικής Μεσογείου (Θερμαϊκός Κόλπος, Κρητικό Πέλαγος, Θάλασσα της Λεβαντίνης, Θρακικό Πέλαγος, Κόλπος Αουγκούστα).

Η σύγκριση των μικροβιακών κοινωνιών από διαφορετικές περιβαλλοντικά περιοχές πραγματοποιήθηκε με τις τεχνικές γενετικής αποτύπωσης του γονιδίου 16S rRNA (DGGE, T-RFLP) καθώς και με την ανάλυση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων (PLFA). Η ανάλυση DGGE διαχώρισε τις μικροβιακές κοινωνίες της παραγωγικής περιοχής του Θερμαϊκού Κόλπου από τις ολιγοτροφικές περιοχές του Κρητικού, Νοτίου Ιονίου και Λεβαντίνης. Αντίθετα, η ανάλυση T-RFLP παρουσίασε σημαντικές διαφορές στη σύσταση των μικροβιακών κοινωνιών ανάλογα με το βάθος των σταθμών. Μεταξύ των περιβαλλοντικών παραμέτρων ο συνδυασμός των επιπέδων οργανικού άνθρακα και χλωροφύλλης  $\alpha$  φαίνεται να παίζει το μέγιστο ρόλο στη ρύθμιση των βακτηριακών κοινωνιών.

Η σύσταση των βακτηριακών κοινωνιών μελετήθηκε με τη κατασκευή μεγάλων βιβλιοθηκών κλώνων του γονιδίου 16S rRNA από ιζήματα που παρουσίασαν σημαντικές διαφορές ως προς το βάθος και τις χημικές παραμέτρους ενώ η συγκεκριμένη ανάλυση πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά σε οξικά ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου. Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι η πλειοψηφία των αλληλουχιών ομαδοποιούνταν κυρίως με *Gamma-*, *Alpha-*, και *Delta-Proteobacteria*, *Acidobacteria* / *Holophaga*, *Planctomycetes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia* καθώς και με την υποψήφια ομάδα OP8. Οι περισσότερες αλληλουχίες συνδέονταν με 16S rDNA φυλοτύπους που δεν έχουν καλλιεργηθεί στο εργαστήριο και με κλώνους από περιβάλλοντα πλούσια σε υδρογονάνθρακες, που διαθέτουν επίσης την ικανότητα είτε να αποικοδομούν οργανικούς ρυπαντές (π.χ. βενζόλιο) είτε να χρησιμοποιούν θείο ή αμμωνία στο μεταβολικό τους μονοπάτι. Η βιοποικιλότητα που υπολογίστηκε, παρουσιάστηκε ιδιαίτερα υψηλή με τιμές συγκρίσιμες των χερσαίων περιβαλλόντων.

Σε ένα επόμενο στάδιο, μελετήθηκε η επίδραση των διαδικασιών στοιχειοποίησης στην κατανομή των λιπιδίων σε τρεις σταθμούς κατά μήκος της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης. Η μείωση των διαγνωστικών λόγων των υδρογονανθράκων κατά την

περίοδο της επώασης αποτελούν ισχυρή ένδειξη για την παρουσία διαδικασιών αποικοδόμησης ενώ οι αλλαγές στις κατανομές των ελεύθερων λιπαρών οξέων έδειξαν ξεκάθαρα ότι οι μικροβιακές κοινωνίες των ιζημάτων της ολιγοτροφικής υφαλοκρηπίδας της Κρήτης περνούσαν σε κατάσταση ‘πείνας’. Για πρώτη φορά στην παγκόσμια βιβλιογραφία παρουσιάζονται δεδομένα αποικοδόμησης υδρογονανθράκων σε τόσο ολιγότροφο περιβάλλον καθώς οι μέχρι στιγμής σχετικές εργασίες περιορίζονται σε περιβάλλοντα έντονα ρυπασμένα.

Για τη μελέτη της επίδρασης της αλατότητας και των οξειδοαναγωγικών συνθηκών στη σύσταση των μικροβιακών κοινωνιών συλλέχθηκαν δείγματα ιζημάτων από τις βαθιές ανοξικές λεκάνες της Ανατολικής Μεσογείου (Bannock, L’Atalante, Urania και Discovery). Η ανάλυση των κ-αλκανίων έδειξε την παρουσία διαφορετικών πηγών οργανικού άνθρακα. Με την παρούσα εργασία δείξαμε ότι οι βενθικές μικροβιοκοινωνίες συνδέονται στενά με τις οξειδοαναγωγικές συνθήκες ενώ αντίθετα η αλατότητα δεν φάνηκε να παίζει κάποιο ρόλο στη ρύθμιση των μικροβιακών κοινωνιών υποδηλώνοντας ότι τα μικρόβια που ενδιααιτούν στα ιζήματα αυτά είναι πιθανότατα αλοανθεκτικά και όχι αλόφιλα.

Τέλος, για τη μελέτη της επίδρασης του μη αποικοδομήσιμου οργανικού υλικού στη βιοδιαθεσιμότητα των πηγών άνθρακα και κατ’ επέκταση στη σύσταση των βενθικών κοινωνικών συλλέχθηκαν δείγματα ιζημάτων από ρυπασμένες και μη περιοχές της Ανατολικής Μεσογείου. Με την εργασία αυτή δείξαμε ότι η συνεισφορά του μαύρου άνθρακα στη σύσταση του ολικού οργανικού άνθρακα είναι πολύ σημαντική. Η στατιστική ανάλυση των χημικών παραμέτρων έδειξε την ύπαρξη διαφορετικών τροφικών καταστάσεων μεταξύ των σταθμών δειγματοληψίας που ακολουθούν μια διαβάθμιση από τις πιο παραγωγικές και ρυπασμένες περιοχές του Κόλπου Αουγκούστα προς τις ‘καθαρές’ και φτωχές σε οργανικό άνθρακα περιοχές του Θρακικού Πελάγους. Με την παρούσα διατριβή, παρουσιάζονται για πρώτη φορά δεδομένα που στηρίζουν την άποψη ότι ο ‘στοιχειακός’ άνθρακας μπορεί να αποικοδομηθεί στο περιβάλλον καθώς μέχρι στιγμής είναι γνωστό ότι μπορεί να διασπαστεί μόνο σε πειράματα καλλιέργειών στο εργαστήριο. Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι η ποσότητα της μη αποικοδομήσιμης μορφής του οργανικού υλικού στα ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της δομής των βενθικών μικροβιοκοινωνιών καθώς επηρεάζει αρνητικά τη βιοδιαθεσιμότητα των πηγών άνθρακα και ενέργειας.



## ABSTRACT

In order to describe the benthic microbial communities in different environments and the associated environmental factors that control their distribution sediment samples were collected from various regions of the Eastern Mediterranean Sea (e.g. Thermaikos Gulf, Cretan Sea, Levantine Sea, Thracian Sea, Augusta Bay).

The bacterial community composition at selected stations was compared by parallel use of three fingerprinting methods: analysis of 16S rRNA gene fragment heterogeneity by denaturing gradient electrophoresis (DGGE), terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and analysis of phospholipid-linked fatty acid composition (PLFA). DGGE banding patterns showed a significant separation of sediment communities from the Northern, more productive waters of the Thermaikos Gulf and the oligotrophic waters of the Cretan, S. Ionian and Levantine Sea. T-RFLP analysis clearly separated the communities of deep sediments from their shallow counterparts. We could also correlate the community composition to environmental state variables such as sediment carbon content and chlorophyll *a*.

The regional variability of bacterial community composition and diversity was studied by comparative analysis of four large 16S rDNA clone libraries constructed from shallow and deep-sea sediment samples. The libraries were dominated by representatives of the *Gamma*-, *Delta*-, and *Alphaproteobacteria*, *Acidobacteria/Holophaga*, *Planctomycetes*, *Actinobacteria*, *Cytophaga*, *Verrucomicrobia* and the candidate division OP8. Most sequences clustered with uncultured 16S rDNA phylotypes from marine habitats, and many of the closest matches were clones from hydrocarbon seeps, benzene mineralizing consortia, sulfate-reducers, sulfur-oxidizers and ammonia oxidizers. All four communities were highly diverse and the estimated total sequence richness was found to be comparable to the estimates obtained from microbiota inhabiting terrestrial ecosystems.

In a next step, the effect of mineralization processes on lipids distribution was investigated along a bathymetric gradient over the continental margin of northern Crete. PLFA homologue profiles denoted that aerobic gram negative and sulfur oxidizing bacteria dominated microbial communities while the anaerobic, gram positive and sulfate reducing bacteria occurred only in traces. The estimated descriptive ratios of *n*-alkanes (NA), the sum of short chain NA (C<sub>15</sub>-C<sub>20</sub>) and of long chain NA (C<sub>21</sub>-C<sub>36</sub>) to 17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-C<sub>30</sub>-hopane before as well as after 2-month

incubation indicated the occurrence of hydrocarbon degradation processes whereas the increased ratios of saturated to unsaturated fatty acids indicated that bacterial communities starved at the end of the experiments.

The impact of salinity and oxic/anoxic conditions on microbial communities in brine sediments from the Eastern Mediterranean (Bannock, L'Atalante, Discovery and Urania basins) and in oxic sediments close to the brines was also quantified by PLFA analysis. *n*-Alkanes distributions revealed the occurrence of different pools of organic carbon originating either from terrestrial or marine source. The presence of a different microbial community between the oxic and anoxic stations was evident whereas salinity did not seem to play any significant role on microbial communities indicating that microbes inhabiting these sediments are probably halotolerant rather than halophilic.

Finally, in order to evaluate the effects of the refractory organic material and the different contamination levels on microbial community composition sediment samples were collected from polluted and pristine regions of the Eastern Mediterranean Sea. Black carbon was found to constitute a significant part of the sedimentary carbon pool, whereas the occurrence of a different trophic state between the sampling stations was evident following a gradient from the most productive and contaminated region of Augusta Bay to the organic carbon-poor and pristine sediments of Thracian Sea. The parallel increase on microbial abundances and aliphatic hydrocarbons indicated that microbial communities have developed the ability to degrade either naturally occurring aliphatic hydrocarbons or hydrocarbons derived from oil contamination. The results of this study demonstrated that the amount of refractory organic carbon in sediments has important implications on benthic microbial community structure by affecting the bioavailability of the sedimentary C pool whereas total organic carbon appeared to be important only at the organic-poor sediments.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγικά Στοιχεία

## 1.1 Γενικά

Οι μικροβιακές κοινωνίες των θαλασσιών ιζημάτων αποτελούν ιδανικά συστήματα για τη μελέτη των οικολογικών αρχών που διέπουν τα θαλάσσια οικοσυστήματα. Οι μικροοργανισμοί παίζουν έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην ανακύκλωση των γεωχημικών στοιχείων όπως ο άνθρακας, το θείο, το άζωτο και στην αποικοδόμηση και απομάκρυνση των οργανικών ρυπαντών. Όλες οι μεταβολικές διαδικασίες, όπως η αυτότροφη και ετερότροφη ανάπτυξη που συντελούνται κάτω από αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, καθώς και η χρήση των οργανικών και ανόργανων πηγών άνθρακα είναι ευρέως διαδεδομένες στο μικροβιακό κόσμο (Alexander, 1999; Boschker et al., 2001; Kieft et al., 1997; MacGillivray and Shiaris, 1994; White, 1994; White et al., 1983). Σε σύγκριση με τα μακροοικοσυστήματα, ο μικροβιακός πληθυσμός θεωρείται εύκολος στο χειρισμό του εφόσον ο χρόνος απόκρισής του σε περιβαλλοντικές αλλαγές (π.χ. με την είσοδο ξενοβιοτικών στο οικοσύστημα) είναι άμεσος (Muyzer, 1998).

Τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές εργασίες στο χώρο της μικροβιακής οικολογίας, οι οποίες όμως εστιάζονται κυρίως στην απομόνωση των μικροοργανισμών με βάση την ικανότητα ανάπτυξής τους σε συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες (Suzuki and DeLong, 2002). Στις περισσότερες εργασίες περιγραφής μικροβιακών κοινωνιών, χρησιμοποιούνται κυρίως καθαρές ή μικτές καλλιέργειες οι οποίες όμως αντιπροσωπεύουν ένα πολύ μικρό μέρος από τα ολικά βακτήρια που υπάρχουν στο περιβάλλον (Giovannoni et al., 1990, Ward et al. 1990a; 1990b) και επομένως δεν επαρκούν για το χαρακτηρισμό του μικροβιακού πληθυσμού που υπάρχει σε μια περιοχή (Amann et al., 1995). Στον πίνακα 1.1 παρουσιάζονται τα ιδιαίτερα χαμηλά ποσοστά ικανότητας καλλιέργειας των

**Πίνακας 1.1:** Ποσοστιαία δυνατότητα καλλιέργειας βακτηρίων σε διαφορετικά ενδιαιτήματα.

Ενδιαιτήμα	Ποσοστιαία δυνατότητα καλλιέργειας (%)
Θαλασσινό νερό	0.001-0.1
Γλυκό νερό	0.25
Μεσότροφη λίμνη	0.1-1
Μη ρυπασμένες εκβολές ποταμών	0.1-3
Δραστική λάσπη	1-15
Ιζήματα	0.25
Έδαφος	0.3

βακτηρίων σε διαφορετικά περιβάλλοντα.

Ένα επιπλέον πρόβλημα σε μελέτες μικροβιακής οικολογίας αποτελεί η δυσκολία στον προσδιορισμό των βακτηριακών ειδών. Οι μικροοργανισμοί έχουν πολύ μικρό μέγεθος, και γενικά δεν έχουν εμφανή μορφολογικά χαρακτηριστικά για τη μελέτη της συστηματικής τους. Για τους παραπάνω λόγους, η μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας πραγματοποιείται σε ένα άλλο επίπεδο, το γενετικό. Για τον προσδιορισμό των μικροοργανισμών έχουν αναπτυχθεί μια σειρά από τεχνικές ανάλυσης του γενετικού υλικού και συγκεκριμένα ανάλυσης γονιδίων. Αν και, θεωρητικά, οποιοδήποτε γονίδιο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί, ωστόσο έχει βρεθεί ότι το γονίδιο του 16S rRNA αποτελεί έναν εξαιρετικό μοριακό δείκτη για τους εξής λόγους: 1. βρίσκεται σε όλους τους οργανισμούς 2. έχει συντηρημένες αλληλουχίες που επιτρέπουν το σχεδιασμό των κατάλληλων εκκινητών 3. περιέχει σημαντικό ποσό νουκλεοτιδικής πληροφορίας κατάλληλο για φυλογενετικές αναλύσεις και 4. αποτελεί ένα σημαντικό κυτταρικό συστατικό γεγονός που διευκολύνει την ανίχνευσή του (Muyzer, 1998).

Μια άλλη δυνατότητα που δίνει η χρήση των μοριακών τεχνικών είναι η μελέτη των μικροβιακών πληθυσμών που διαθέτουν ικανότητα αποικοδόμησης χημικών ουσιών με την απομόνωση και ανάγνωση του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο διοξυγενάση. Η χρήση της διοξυγενάσης αποτελεί το κρίσιμο στάδιο τροποποίησης των ξενοβιοτικών σε μορφές εύκολα αφομοιώσιμες από τους μικροοργανισμούς (Mesarch et al., 2000).

Μια άλλη στρατηγική μελέτης των μικροβιακών κοινωνιών είναι η ανάλυση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων ή PLFA (phospholipid linked fatty acids) (Guezennec and Fiala-Medioni, 1996; Rutters et al., 2002; White and Ringelberg, 1997). Η ανάλυση των λιπαρών οξέων, χρησιμοποιείται επίσης για την ταξινόμηση των βακτηριακών στελεχών. Τα λιπαρά οξέα προέρχονται κυρίως από μεμβράνες φωσφολιπιδίων και λιποπολυσακχάρων. Τα φωσφολιπίδια είναι γνωστό ότι υδρολύονται μέσα σε μερικές εβδομάδες μετά τον κυτταρικό θάνατο (White et al., 1979; Harvey et al., 1986), γεγονός που υποδεικνύει ότι η παρουσία τους στα ιζήματα αποτελεί ιδανικό δείκτη μελέτης της βιώσιμης βιομάζας (Rutters et al., 2002).

Για τη μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας καθώς και των περιβαλλοντικών παραγόντων που ρυθμίζουν την κατανομή τους, δεν έχει προς το παρόν πραγματοποιηθεί μοριακή ανάλυση των ιζημάτων στην ευρύτερη περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου ενώ οι μοναδικές εργασίες που αφορούν το μικροβιακό

πληθυσμό εστιάζονται κυρίως στην καταμέτρηση των βακτηρίων με χρήση μικροσκοπίου φθορισμού.

## **1.2 Βακτηριακή ποικιλότητα**

### *1.2.1 Τεχνικές γενετικής αποτύπωσης του γονιδίου 16S rRNA*

Η απομόνωση και η ανάγνωση του γονιδίου του 16S rRNA, χρησιμοποιείται ευρέως ως μοριακός δείκτης για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των βακτηριακών ειδών στο φυσιολογικό τους περιβάλλον καθώς και για τη μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγεται η χρονοβόρα διαδικασία της καλλιέργειας (Amann et al., 1995; Brinkhoff et al., 1999). Η ανάλυση αυτή αποτελεί τον ιδανικό τρόπο μελέτης της οικολογίας των θαλασσίων μικροοικοσυστημάτων (βακτήρια, ευκαρυωτικά, αρχαία) (Ferris et al., 1996; Friedrich, 2000; Harmsen et al., 1997; Kato et al., 1997; Lopez-Garcia et al., 2001; Nogi and Kato 1999; Nübel et al., 1996; Santegoeds et al., 1996; Staay et al., 2001; Tamegai et al., 1997; Wagner-Dobler et al., 1998; Yanagibayashi et al., 1999). Οι ευρέως διαδεδομένες τεχνικές που βασίζονται στην ανάγνωση του γονιδίου 16S rRNA, είναι οι εξής:

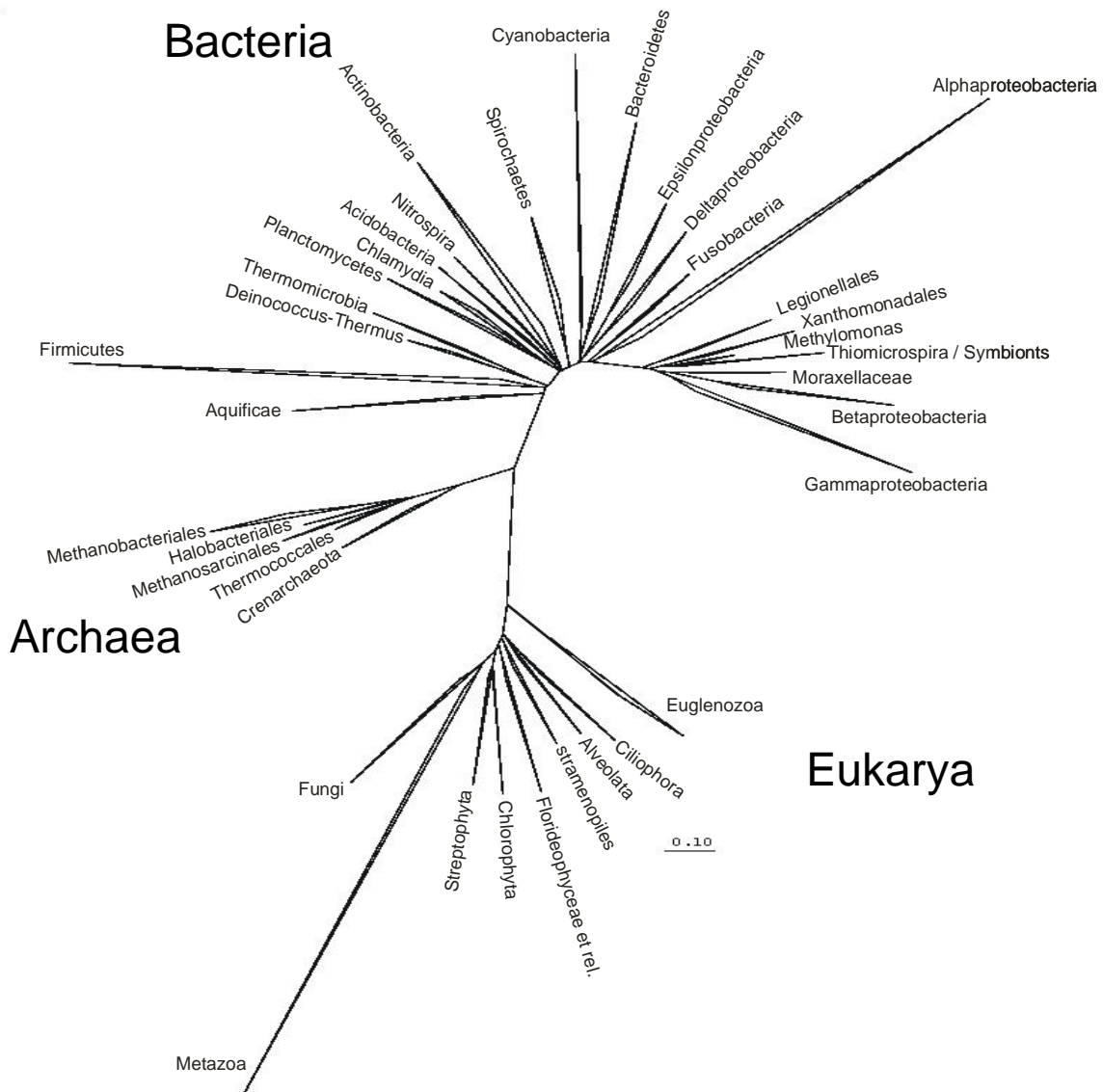
1. η μέθοδος “Πηκτής Ηλεκτροφόρησης Βαθμιδωτής Αποδιάταξης” (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis-DGGE),
2. η μέθοδος “Ακράιου Πολυμορφισμού Περιορισμένων Τμηματικών Αποστάσεων” (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism, T-RFLP)
3. η μέθοδος ανάλυσης βιβλιοθήκης κλώνων (Clone Library Analysis)

Η μέθοδος DGGE βασίζεται στον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό τμημάτων της διπλής έλικας του DNA και συγκεκριμένα στις διαφορές του σημείου τήξης μεταξύ των γενοτύπων (Muyzer et al., 1993). Η μέθοδος T-RFLP στηρίζεται στον πολλαπλασιασμό του γονιδίου του 16S rRNA με χρήση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών στους οποίους, μια φθορίζουσα ουσία βρίσκεται προσκολλημένη στο ένα άκρο τους, ενώ η επαναληψιμότητα και ακρίβεια της μεθόδου έχει αποδειχθεί σε πρόσφατες εργασίες (Clements et al., 1998; Liu et al., 1997; Moeseneder et al., 1999). Τα αποτελέσματα των μεθόδων ανάλυσης DGGE και T-RFLP του γονιδίου 16S rRNA, αντιπροσωπεύονται από τον αριθμό των διαφορετικών Λειτουργικών Ταξινομικών Μονάδων (Operational Taxonomic Units -OTUs), που υπάρχουν σε μία μικροβιακή κοινωνία. Οι Λειτουργικές Ταξινομικές Ομάδες είναι ένας αυθαίρετος όρος που ουσιαστικά αντιπροσωπεύει μια συγκεκριμένη βακτηριακή ομάδα και

χρησιμοποιείται ευρέως για το χαρακτηρισμό της βιοποικιλότητας. Θεωρητικά, κάθε OUT αντιστοιχεί σε ένα βακτηριακό είδος χωρίς να αποκλείεται το ενδεχόμενο και ένα δεύτερο βακτηριακό είδος να αντιστοιχεί στο συγκεκριμένο OUT ή από το ίδιο είδος να προέρχονται περισσότερα από ένα OUT. Ιδανικά, κάθε διακεκριμένη ζώνη που παρατηρείται στην πηκτή ηλεκτροφόρησης DGGE και κάθε μοναδικό τμήμα που παρατηρείται στα χρωματογραφήματα T-RFLP, αντιπροσωπεύουν ένα OTU στην βιοκοινωνία (Song et al., 2002).

### 1.2.2 Βιβλιοθήκες κλώνων του γονιδίου 16S rRNA

Η τρίτη μέθοδος της νουκλεοτιδικής ανάλυσης των κλωνοποιημένων γονιδίων του



**Σχήμα 1.1:** Το ‘Δέντρο της Ζωής’ βασισμένο σε πλήρεις αλληλουχίες του 16S rRNA όπου παρουσιάζονται οι βασικότερες ομάδες των Βακτηρίων, Αρχαίων και Ευκαρωτικών. Το δέντρο κατασκευάστηκε στο πρόγραμμα ARB (Strunk and Ludwig, 1996).

16S rRNA, αποτελεί το κυριότερο και ισχυρότερο εργαλείο για την εξερεύνηση της μικροβιακής ποικιλότητας στα περιβαλλοντικά δείγματα (Bowman and McCuaig, 2003; Nogales et al., 2001; von Wintzingerode et al., 1997). Ένας μεγάλος αριθμός αλληλουχιών έχουν κατατεθεί και δημοσιοποιηθεί σε βάσεις δεδομένων στις οποίες υπάρχει ελεύθερη πρόσβαση στο διαδίκτυο όπως η βιβλιοθήκη GenBank στο NCBI (Benson et al., 1997) και το Ribosomal Database Project (RDP, Michigan State University) (Maidak et al., 1997), είτε περιλαμβάνονται σε φυλογενετικά προγράμματα όπως το ARB Project (latin, "arbor"=tree) (Strunk and Ludwig, 1996). Ο Woese με τους συνεργάτες του το 1987 μελέτησαν τη βακτηριακή εξέλιξη με τη χρήση της αλληλουχίας του 16S rRNA (Woese et al., 1987). Το 'Δέντρο της Ζωής' (Tree of Life) όπως ονομάστηκε, περιλαμβάνει τρεις περιοχές: τα Βακτήρια (Ευβακτήρια), τα Αρχαία (Αρχαιοβακτήρια) και τα Ευκάρυα (Ευκαρυωτικά) (Σχήμα 1.1).

Αρκετές βιβλιοθήκες βακτηριακών κλώνων με ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA σε θαλάσσια ιζήματα έχουν κατασκευαστεί, εντούτοις οι περισσότερες από αυτές είναι μικρές σε μέγεθος, με αποτέλεσμα οι πληροφορίες που μπορούμε να αντλήσουμε για τη σύσταση των βακτηριακών κοινωνιών να είναι περιορισμένες (Boivin-Jahns et al., 1996; Bowman and McCuaig, 2003; Bowman et al., 2000; Gray et al., 1996; Li et al., 1999a, 1999b; Madrid et al., 2001; Ravensschlag et al., 1999; Teske et al., 2002; Urakawa et al., 1999). Οι εργασίες αυτές έδειξαν ότι τα βακτήρια που ενδιαιτούνται στα θαλάσσια ιζήματα συνδέονται φυλογενετικά με τα *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* και *Delta- Proteobacteria*, τα gram-θετικά βακτήρια (*Actinobacteria*, *Firmicutes*), τα *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) (φύλο: *Bacteroidetes*), *Planctomyces*, *Actinomyces*, και *Verrucomicrobia*.

Οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των οργανισμών που προκύπτουν με τη χρήση άλλων μοριακών δεικτών όπως την αλληλουχία του 23S rRNA, τον παράγοντα επιμήκυνσης EF-Tu, ή την υπομονάδα της ATPάσης, δίνουν παρόμοια φυλογενετικά δέντρα επιβεβαιώνοντας την εγκυρότητα της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι μέθοδοι που βασίζονται στην καλλιέργεια θεωρούνται ακατάλληλες και ανασφαλείς για την εκτίμηση της σύστασης των βακτηριακών κοινωνιών στο περιβάλλον, εφόσον το μεγαλύτερο μέρος των μικροβιοκοινωνιών (>99%) είναι αδύνατο να καλλιεργηθεί (Ringelberg et al., 1997; Stalley and Konopka, 1985). Εντούτοις, η σωστή εκτίμηση της δομής των μικροβιακών κοινωνιών είναι απαραίτητη για την ολοκληρωμένη μελέτη της οικολογίας τους, εφόσον κατέχουν τον

πρωταρχικό ρόλο στη ρύθμιση της τροφικής αλυσίδας. Τα βακτήρια στις περισσότερες περιπτώσεις έχουν μελετηθεί ως ‘μαύρα κουτιά’ χωρίς καμία επίγνωση της ταυτότητας των ειδών τους (Acinas et al., 1997) και επίσης ελάχιστες είναι οι γνώσεις μας για την κατανομή και τη λειτουργία τους στα ιζήματα.

Τα θαλάσσια ιζήματα μέσω κυρίως των μικροβιοκοινωνιών τους, παίζουν έναν πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κύκλου του άνθρακα και των θρεπτικών στον πλανήτη. Η οργανική ύλη που προέρχεται από τη πρωτογενή παραγωγή καθιζάνει στο θαλάσσιο βυθό, όπου το μεγαλύτερο ποσοστό της στοιχειοποιείται από τους μικροοργανισμούς. Η αναγωγή των θεικών ιόντων αποτελεί την κύρια μεταβολική διαδικασία στα θαλάσσια ιζήματα, που αντιστοιχεί σε ένα ποσοστό πάνω από το 50% στη στοιχειοποίηση του ολικού οργανικού άνθρακα. Τα βακτήρια που συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία (sulfate-reducing bacteria - SRB) αποτελούν μια πολύπλοκη φυσιολογική ομάδα οργανισμών που μπορούν να χρησιμοποιήσουν ένα μεγάλο εύρος πτητικών λιπαρών οξέων μεγάλης αλυσίδας, αλκοόλες ή αρωματικών οργανικών ουσιών ως πηγές άνθρακα και ενέργειας, αλλά εντούτοις δεν μπορούν να αποικοδομήσουν πολυσακχαρίτες άλλων πολυμερικών ουσιών. Ορισμένα βακτήρια αυτής της κατηγορίας δεν εξαρτώνται αποκλειστικά από την παρουσία θεικών ιόντων. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιήσουν και εναλλακτικούς δέκτες ηλεκτρονίων όπως για παράδειγμα Fe(III). (Ravenschlag et al., 2000). Οπότε, τα δεδομένα μικροβιακής ποικιλότητας είναι απαραίτητα τόσο για την κατανόηση των λειτουργικών και βιογεωγραφικών σχέσεων μεταξύ των μικροβιακών κοινωνιών (Staley and Gosink, 1999; Bowman and McCuaig, 2003) όσο και για τη βελτίωση των γνώσεών μας για το ρόλο που το βένθος παίζει στις ωκεάνιες διαδικασίες (Bowman and McCuaig, 2003).

### 1.2.3 Ανάλυση των φωσφολιπιδίων

Ο προσδιορισμός της δομής της μικροβιακής κοινωνίας *in situ* και ειδικά σε περιβάλλοντα όπου επικρατούν ακραίες συνθήκες (π.χ. ανοξικές λεκάνες υψηλής αλατότητας) αποτελεί μεγάλη πρόκληση στο χώρο της μικροβιακής οικολογίας λόγω των δυσκολιών στη διαδικασία απομόνωσης και καταμέτρησης των βακτηρίων (Rajendran et al., 1993). Για την αποφυγή τέτοιων προβλημάτων, εκτός από την ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA, έχει αναπτυχθεί επίσης η ανάλυση των χημικών συστατικών (π.χ. πολικών λιπαρών οξέων) των βακτηρίων. Τα λιπαρά οξέα προέρχονται κυρίως από τις μεμβράνες των φωσφολιπιδίων και των



λιποπολυσακχαριτών. Οι διάφορες μικροβιακές ομάδες παρουσιάζουν διαφορετική κατανομή των λιπαρών οξέων στην φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα τους (Bååth and Anderson, 2003; Guezennec and Fiala-Medioni, 1996; Rajendran et al., 1993). Στην παρούσα εργασία, επιλέξαμε τη μελέτη των φωσφολιπιδίων εφόσον σχετίζονται άμεσα με τη κατανομή των βακτηριακών πληθυσμών. Συγκεκριμένα, η μελέτη των φωσφολιπιδίων (phospholipid ester-linked fatty acids – PLFA) αποτελεί πολύτιμη πηγή πληροφοριών για την εκτίμηση και τον προσδιορισμό της βακτηριακής εισαγωγής στα ιζήματα (ποσοτικός προσδιορισμός βακτηρίων; Aries et al., 2001; White et al., 1998), καθώς αποικοδομούνται ταχύτατα μετά τον κυτταρικό θάνατο (Guezennec and Fiala-Medioni, 1996; White et al., 1979).

#### 1.2.4 Μικροοργανισμοί με ικανότητα αποικοδόμησης υδρογονανθράκων

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν οι μικροοργανισμοί που διαθέτουν την ικανότητα αποικοδόμησης οργανικών ρυπαντών. Οι οργανικές ουσίες βενζόλιο, τολουόλιο, ξυλόλιο, φαινόλη, ναφθαλένιο και διφαινύλιο ανήκουν σε μια ευρύτερη κατηγορία χημικών υποστρωμάτων για την οποία έχει αναφερθεί ένα τουλάχιστον μεταβολικό μονοπάτι αποικοδόμησής τους όπου συμμετέχει το ένζυμο 2,3 διοξυγενάση της κατεχόλης. Εντούτοις, η μελέτη των αντίστοιχων γονιδίων της 2,3 διοξυγενάση της κατεχόλης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βάση για τον ποιοτικό χαρακτηρισμό βακτηρίων που διαθέτουν αυτές τις καταβολικές ικανότητες (Mesarch et al., 2000).

Οι διοξυγενάσες της *meta*-διάσπασης ή οι 2,3 διοξυγενάσες της κατεχόλης όπως διαφορετικά ονομάζονται (catechol 2,3-dioxygenases C23DO) πιστεύεται ότι είναι πιο ικανές από τις αντίστοιχες διοξυγενάσες της *ortho*-διάσπασης στην αποικοδόμηση των αλκυλο-υποκατεστημένων αρωματικών υδρογονανθράκων όπως το ξυλόλιο (Bayly and Barbour, 1984; Cerniglia, 1984). Τα γονίδια C23DO διαθέτουν επίσης μια πολύ καλά χαρακτηριζόμενη φυλογενετική βάση που επιτρέπει το συστηματικό σχεδιασμό εξειδικευμένων εκκινητών της διοξυγενάσης (**dioxygenase-specific primers**). Η υποοικογένεια 1.2A της διοξυγενάσης συμμετέχει στην αποικοδόμηση του βενζολίου, τολουολίου, ξυλολίου (BTX), και ναφθαλενίου (Dagley, 1986; Eltis and Bolin, 1996).

Λόγω της υψηλής τοξικότητας και κινητικότητας τους στο περιβάλλον, η αντιμετώπισή τους αποτελεί σημείο αναφοράς σε διαδικασίες βιοεπιβίωσης σε σύγκριση με άλλα συστατικά του πετρελαίου. Η ικανότητα της εξειδικευμένης ανίχνευσης βακτηρίων που διαθέτουν ικανότητα αποικοδόμησης του BTX στο

περιβάλλον επιτρέπει την εκτίμηση του επιπέδου φυσικής εξασθένησης του ιζήματος (monitored natural attenuation - MNA). Η βιοεπιβίωση των θαλασσιών ιζημάτων είναι μια εναλλακτική μέθοδος, χαμηλού κόστους για το χειρισμό των ρυπασμένων εδαφών και των υπόγειων υδάτων. Η φυσική εξασθένηση είναι η μια μορφή της βιοεπιβίωσης όπου λαμβάνουν χώρα οι φυσικές διαδικασίες αποικοδόμησης των οργανικών ρυπαντών (U.S. Environmental Protection Agency, 1999). Οι διαδικασίες αυτές πραγματοποιούνται από τους μικροοργανισμούς (κυρίως βακτήρια), που διαθέτουν ικανότητα αποικοδόμησης των οργανικών ρυπαντών ακολουθώντας μια κύρια μεταβολική οδό (Mesarch et al., 2000).

Η χρήση των μοριακών γενετικών τεχνικών επιτρέπει στους ερευνητές τη μελέτη των μικροβιακών κοινωνιών με τη χρήση των κατάλληλα σχεδιασμένων εκκινητών για την απομόνωση των γονιδίων που τους ενδιαφέρουν. Η μελέτη της αποικοδομητικής ικανότητας των οργανικών ρυπαντών των θαλασσιών ιζημάτων με χρήση μοριακών τεχνικών, θεωρείται πιο έμπιστη από την αντίστοιχη διαδικασία καλλιέργειας των δειγμάτων παρουσίας οργανικών ρυπαντών (enrichment cultures).

Η πλειοψηφία των βακτηρίων που έχουν απομονωθεί χρησιμοποιούν κατά κανόνα το ένζυμο 2,3 διοξυγενάση της κατεχόλης για τη διάσπαση των ξενοβιοτικών ουσιών. Η ανίχνευση του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο αυτό αποτελεί πολύτιμο στοιχείο που θα χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την παρουσία βακτηρίων που διαθέτουν ικανότητα αποικοδόμησης οργανικών ρυπαντών σε θαλάσσια ιζήματα. Στην παρούσα εργασία έχουν σχεδιαστεί κατάλληλοι εκκινητές που θα χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση ενός τμήματος 238-bp του γονιδίου 2,3 διοξυγενάση της κατεχόλης (Mesarch et al., 2000).

### **1.3 Περιβαλλοντικές παράμετροι**

#### *1.3.1 Οξικές και ανοξικές συνθήκες*

Ο προσδιορισμός των όρων 'οξικές' και 'ανοξικές' συνθήκες είναι ιδιαίτερα πολύπλοκος λόγω του ότι η διαδικασία αναπνοής κάποιων μικροοργανισμών επηρεάζεται μόνο όταν η ποσότητα του διαθέσιμου οξυγόνου μειωθεί σημαντικά και πολλές φορές σε επίπεδα χαμηλότερα του ορίου ανίχνευσης του με τις κλασσικές μεθόδους προσδιορισμού. Για τους ζωολόγους και παλαιοντολόγους ο προσδιορισμός της 'αναερόβιωσης' είναι πολύ απλός, καθώς ο ρυθμός αναπνοής των ανώτερων ζώων μειώνεται όταν τα επίπεδα τιμών οξυγόνου μειώνονται στο 10% atm.sat. και πεθαίνουν σε τιμές οξυγόνου που μπορούν πολύ εύκολα να προσδιοριστούν (Fenchel

and Finlay, 1995). Οι γεωλόγοι χαρακτηρίζουν ένα περιβάλλον ως ‘αερόβιο’ όταν οι συγκεντρώσεις οξυγόνου είναι μεγαλύτερες από  $1 \text{ ml L}^{-1}$  ( $\sim 18\% \text{ atm.sat.}$ ), ως ‘δυσαιερόβιο’ ή ‘δυσοξικό’ όταν οι συγκεντρώσεις οξυγόνου κυμαίνονται μεταξύ  $0.1$  και  $1 \text{ ml L}^{-1}$  και ως ‘αζωικό’ σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Οι ζωοφυσιολόγοι χρησιμοποιούν τον όρο ‘υποξικές’ συνθήκες. Ο όρος ‘υποξικό’ ή hypoxic χρησιμοποιείται κυρίως για τους οργανισμούς, και περιγράφει την κατάσταση όπου το οξυγόνο βρίσκεται σε τέτοια επίπεδα συγκεντρώσεων που περιορίζει τον ρυθμό αναπνοής. Ο όρος ‘υποξικό’ ή suboxic χρησιμοποιείται κυρίως από τους γεωλόγους για την περιγραφή των θαλάσσιων ιζημάτων όπου απουσιάζει μεν το οξυγόνο αλλά ταυτόχρονα δεν μπορούν να πραγματοποιηθούν χημικές αναγωγικές διαδικασίες (Fenchel and Finlay, 1995).

Μέχρι πρόσφατα, οι μικροβιολόγοι χρησιμοποιούσαν τον όρο ‘σημείο Pasteur’ για να περιγράψουν την οριακή κατάσταση μεταξύ αερόβιας και αναερόβιας αναπνοής και είχαν θέσει ως όριο τιμή οξυγόνου ίση με  $1\% \text{ atm.sat.}$  Εντούτοις, το συγκεκριμένο όριο δεν καθιερώθηκε καθώς διαφέρει σημαντικά μεταξύ των μικροοργανισμών. Αρκετοί αναερόβιοι οργανισμοί μπορούν να επιβιώσουν σε ποσότητες οξυγόνου χαμηλότερες του  $0.1\% \text{ atm.sat.}$  (Fenchel and Finlay, 1995).

Τα θαλάσσια ιζήματα αποτελούν τα πιο συνηθισμένα περιβάλλοντα στα οποία επικρατούν ανοξικές συνθήκες. Με την εξαίρεση των ιζημάτων που αποτελούνται από υψηλό ποσοστό άμμου (Fenchel and Riedl, 1970) οι συνθήκες στα θαλάσσια περιβάλλοντα μετατρέπονται σε ανοξικές μετά από ένα συγκεκριμένο βάθος. Το βάθος στο οποίο γίνεται αυτή η μετατροπή εξαρτάται από την ποσότητα οξυγόνου που απαιτείται για την αναπνοή των οργανισμών (respiratory oxygen demand), από το φως και από τη διατάραξη των ιζημάτων (Fenchel and Finlay, 1995). Στα παράκτια περιβάλλοντα, οι οξειδοαναγωγικές συνθήκες των θαλάσσιων ιζημάτων μεταβάλλονται συνήθως εποχικά λόγω της μεταβολής του διαθέσιμου οξυγόνου (Beristain and Arnold, 1991; Mackin et al., 1991; Parker and O’Reily, 1991). Στις περιοχές που παρατηρείται έντονη διατάραξη των ιζημάτων λόγω των ανώτερων οργανισμών οι συνθήκες μεταβάλλονται πολύ συχνά (Aller, 1994). Στις υφαλοκρηπίδες ( $< 200 \text{ m}$ ), ένα ποσοστό  $50\%$  της πρωτογενούς παραγωγικότητας καταλήγει στο βυθό. Τυπικά, το βάθος στο οποίο οι οξικές συνθήκες μετατρέπονται σε ανοξικές βρίσκεται  $1-6 \text{ mm}$  κάτω από την επιφάνεια του ιζήματος (Jørgensen, 1983; Jørgensen and Revsbech, 1989). Στους ωκεανούς, η παραγωγικότητα είναι κατά πολύ μικρότερη, και μόνο το  $1\%$  της πρωτογενούς παραγωγικότητας των

επιφανειακών υδάτων καταλήγει στην επιφάνεια των ιζημάτων σε βάθη 5000-6000 m. Το μεγαλύτερο ποσοστό στοιχειοποιείται στην κολώνα του νερού. Συμπερασματικά, η ζώνη όπου επικρατούν οξικές συνθήκες στα ιζήματα των βαθιών θαλασσών είναι πιο μεγάλη (μέχρι 50 cm; Jørgensen, 1983).

Στην παρούσα εργασία, ο βαθμός οξικών και ανοξικών συνθηκών των υπό μελέτη οικοσυστημάτων προσδιορίστηκαν με τη χρήση οξειδοαναγωγικού ηλεκτροδίου. Γενικά, τιμές Eh υψηλότερες των 200 mV υποδηλώνουν την παρουσία ισχυρών οξικών συνθηκών ενώ τιμές Eh κοντά στο μηδέν αποτελούν ισχυρή ένδειξη για την παρουσία υποοξικών συνθηκών. Αντίθετα, αρνητικές τιμές Eh υποδεικνύουν την παρουσία ανοξικών συνθηκών.

### *1.3.2 Οργανικός άνθρακας –βιοδιαθέσιμος και μη*

Η μέτρηση του σωματιδιακού οργανικού άνθρακα μας δίνει μια εικόνα της ποσότητας τροφής (ζωντανής και νεκρής) που υπάρχει σε ένα οικοσύστημα. Σήμερα η τεχνική αυτή είναι ευρέως διαδεδομένη στη θαλάσσια βενθική οικολογία εντούτοις οι πληροφορίες που μπορούμε να αντλήσουμε για το παραγωγικό δυναμικό μιας περιοχής βασιζόμενη σε τέτοιου τύπου μετρήσεις μπορεί να είναι λανθασμένες (Gray, 1981; Lampadariou, 2001) καθώς ένα σημαντικό μέρος του οργανικού άνθρακα μπορεί να υφίσταται με τη μορφή αιθάλης η οποία όμως δεν είναι βιοδιαθέσιμη. Η αιθάλη ή διαφορετικά ‘στοιχειακός’ άνθρακας όπως ονομάζεται επιστημονικά (black carbon) είναι προϊόν καύσης της φυτικής ύλης (Middelburg et al., 1999). Η παγκόσμια παραγωγή ‘στοιχειακού’ άνθρακα όπως εκτιμήθηκε από τους Kulbusch and Crutzen (1995) κυμαίνεται μεταξύ 0.05-0.270 Gt yr<sup>-1</sup> και είναι συγκρίσιμη με τις ποσότητες σωματιδιακού οργανικού άνθρακα που εισάγονται στους ωκεανούς (0.17 Gt yr<sup>-1</sup>; Ludwig et al., 1996) καθώς και με το οργανικό υλικό που εναποτίθεται στα θαλάσσια ιζήματα (0.13-0.6 Gt yr<sup>-1</sup>; Berner, 1982; Middelburg et al., 1997). Οι τιμές αυτές δηλώνουν ξεκάθαρα ότι ο ‘στοιχειακός’ άνθρακας αποτελεί ένα σημαντικό ποσοστό του σωματιδιακού οργανικού υλικού των ιζημάτων και ο υπολογισμός του καθίσταται αναγκαίος για τον προσδιορισμό του βιοδιαθέσιμου οργανικού υλικού. Προηγούμενες εργασίες έχουν δείξει άλλωστε ότι η κατανομή του ‘στοιχειακού’ άνθρακα μπορεί να επηρεάσει τη βιοδιαθεσιμότητα των οργανικών ουσιών στο περιβάλλον (Gustafsson et al., 1997; 1998; Middelburg et al., 1999).

### *1.3.3 Χλωροφύλλη α και φαιοχρωστικές*

Μια δεύτερη μέθοδος εκτίμησης της διαθέσιμης τροφής στο ίζημα είναι η χλωροφύλλη  $\alpha$  καθώς και το συνολικό άθροισμα της χλωροφύλλης  $\alpha$  και των διάφορων φαιοχρωστικών (φαιοφυτίνη, φαιοφορβίνη) που υπάρχουν στο ίζημα. Η χλωροφύλλη  $\alpha$  αποτελεί ένα ιδανικό δείκτη προσδιορισμού της φυτικής βιομάζας στα θαλάσσια περιβάλλοντα. Το άθροισμα της χλωροφύλλης και των φαιοχρωστικών εκφράζει το ισοδύναμο χλωροπλαστικών χρωστικών (Chloroplastic Pigment Equivalents of CPE) και μας δίνει μια ένδειξη συνολικής ποσότητας πρόσφατης και παλαιότερης φυτικής βιομάζας (Basford and Eleftheriou, 1988; Tselepidis, 1992; Lampadariou, 2001).

#### *1.3.4 Οι δείκτες των κ-αλκανίων*

Ως μοριακοί δείκτες, ορίζονται οι οργανικές ενώσεις των οποίων η βασική χημική δομή είναι χαρακτηριστική των βιογενών και ανθρωπογενών πηγών προέλευσής τους. Σύμφωνα με τον παραπάνω ορισμό, οι ενώσεις αυτές κατά την έκθεσή τους στο περιβάλλον, παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στους διάφορους παράγοντες που επιφέρουν δομικές μετατροπές στην οργανική ύλη, παραμένοντας χημικά αναλλοίωτες, ενώ όταν υπόκεινται σε αλλαγές ο δομικός τους σκελετός παραμένει αναγνωρίσιμος. Συχνά, επειδή οι δομικές αυτές αλλαγές είναι ενδεικτικές των διεργασιών μετατροπής, οι μοριακοί δείκτες παρέχουν πληροφορίες ως προς το είδος των διεργασιών. Διακρίνουμε τα ακόλουθα είδη μοριακών δεικτών: 1. τους μοριακούς δείκτες που υποδεικνύουν τις πηγές προέλευσης της οργανικής ύλης, 2. τους μοριακούς δείκτες που υποδεικνύουν τις διεργασίες μετατροπής της οργανικής ύλης κατά την έκθεσή της στο περιβάλλον, και 3. τους παλαιοκλιματικούς μοριακούς δείκτες, που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των κλιματικών και βιογεωχημικών αλλαγών που πραγματοποιήθηκαν κατά τις διάφορες περιόδους της γεωλογικής χρονικής κλίμακας (Γώγου, 1998).

Ένας σημαντικός αριθμός οργανικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται ως μοριακοί βιοδείκτες ανήκουν στην κατηγορία των λιπιδίων. Λιπίδια ονομάζονται οι ενώσεις βιογενούς προέλευσης που δεν είναι ευδιάλυτες στο νερό, ενώ διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες (π.χ. χλωροφόρμιο, εξάνιο, τολουόλιο, διχλωρομεθάνιο, ακετόνη). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν απλές οργανικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους, όπως τα κ-αλκάνια, οι κ-αλκοόλες, τα κ-αλκανοϊκά οξέα κ.α., καθώς και σύνθετες, όπως οι εστέρες των κηρών, τα τριγλυκερίδια, τα φωσφολιπίδια, οι στεροειδείς αιθέρες και εστέρες, τα γλυκολιπίδια και οι λιποπρωτεΐνες (Γώγου, 1998).

Η συστηματική μελέτη των μοριακών δεικτών στηρίζεται σε μια σειρά από παραμέτρους, που χρησιμοποιούνται στην Οργανική Γεωχημεία για την αποκρυπτογράφηση των πηγών προέλευσης της οργανικής ύλης στα περιβαλλοντικά δείγματα. Για τη μελέτη της προέλευσης των κ-αλκανίων, των κ-αλκαναλών, των αλκαν-2-ονών, των κ-αλκανολών και των κ-αλκανοικών οξέων στα περιβαλλοντικά δείγματα, χρησιμοποιείται ο «Δείκτης Προτίμησης Αριθμού Ατόμων Άνθρακα» (Carbon Preference Index - CPI), ο οποίος ορίζεται ως εξής:

$$CPI = \frac{1}{2} \left[ \frac{\sum_{i=1}^z n_{o(e)}}{\sum_{i=1}^{z-1} n_{e(o)}} + \frac{\sum_{i=1}^z n_{o(e)}}{\sum_{i=1}^{z+1} n_{o(e)}} \right]$$

όπου  $n_o$ : συγκέντρωση των ατόμων άνθρακα με μονό\* (ζυγό\*\*) αριθμό

και  $n_e$ : συγκέντρωση των κ-αλκανίων με ζυγό\* (μονό\*\*) αριθμό ατόμων άνθρακα

Τα διαγνωστικά κριτήρια (λόγοι ή αθροίσματα των συγκεντρώσεων χαρακτηριστικών ενώσεων ή ομάδας ενώσεων), δίνουν σημαντικές πληροφορίες για τη προέλευση και τις μετατροπές που υφίστανται οι βιογενείς και ανθρωπογενείς οργανικές ενώσεις (Simoneit, 1999).

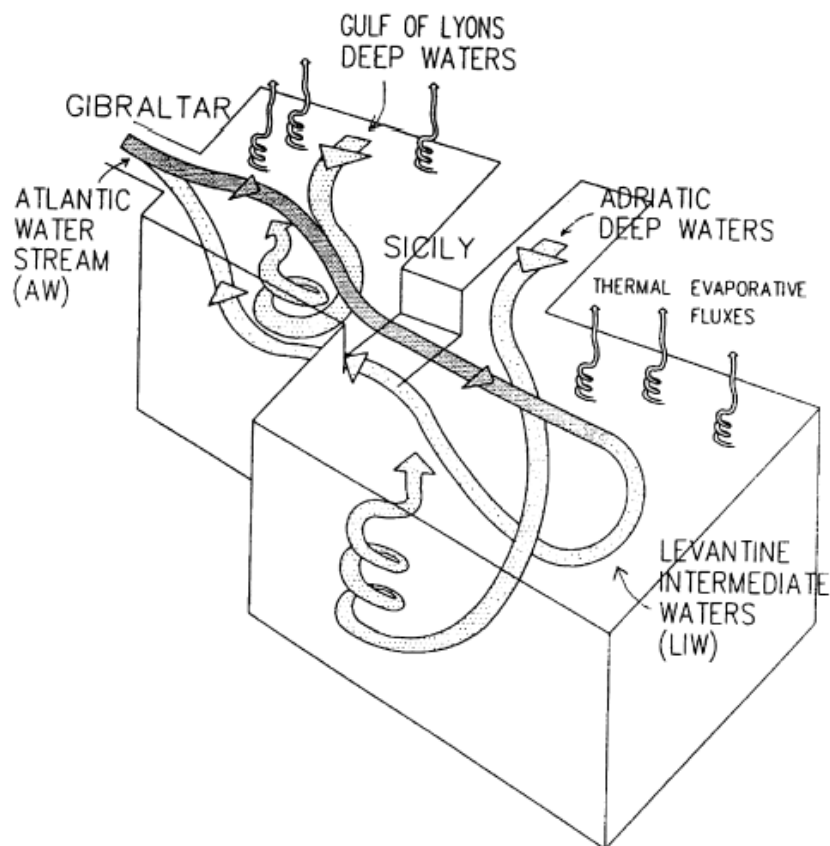
Η ανάλυση της μικροβιακής σύστασης των ιζημάτων δε μας δίνει πληροφορίες για τις πιθανές πηγές προέλευσης των μικροοργανισμών ώστε να είναι εφικτή η ερμηνεία της κοινής παρουσίας βακτηριακών γενών στα διαφορετικά οικοσυστήματα. Εντούτοις, η ανάλυση των μοριακών βιοδεικτών των υδρογονανθράκων, αποτελεί πολύτιμη πηγή πληροφοριών για τη προέλευση του οργανικού υλικού στα ιζήματα καθώς επίσης για τη μελέτη των διαγενετικών διεργασιών που πραγματοποιούνται (Wilson et al., 2001; Gogou et al., 1998).

Η τύχη των οργανικών ενώσεων βιογενούς και ανθρωπογενούς προέλευσης που εισάγονται στο θαλάσσιο περιβάλλον μέσω των ποταμών ή της ατμοσφαιρικής εναπόθεσης, συνδέεται άμεσα με τις διεργασίες της παραγωγής, μεταφοράς και εναπόθεσης του αυτόχθονου οργανικού υλικού στο θαλάσσιο περιβάλλον.

## 1.4 Ανατολική Μεσόγειος

### 1.4.1 Κυκλοφορία υδάτινων μαζών στην Ανατολική Μεσόγειο

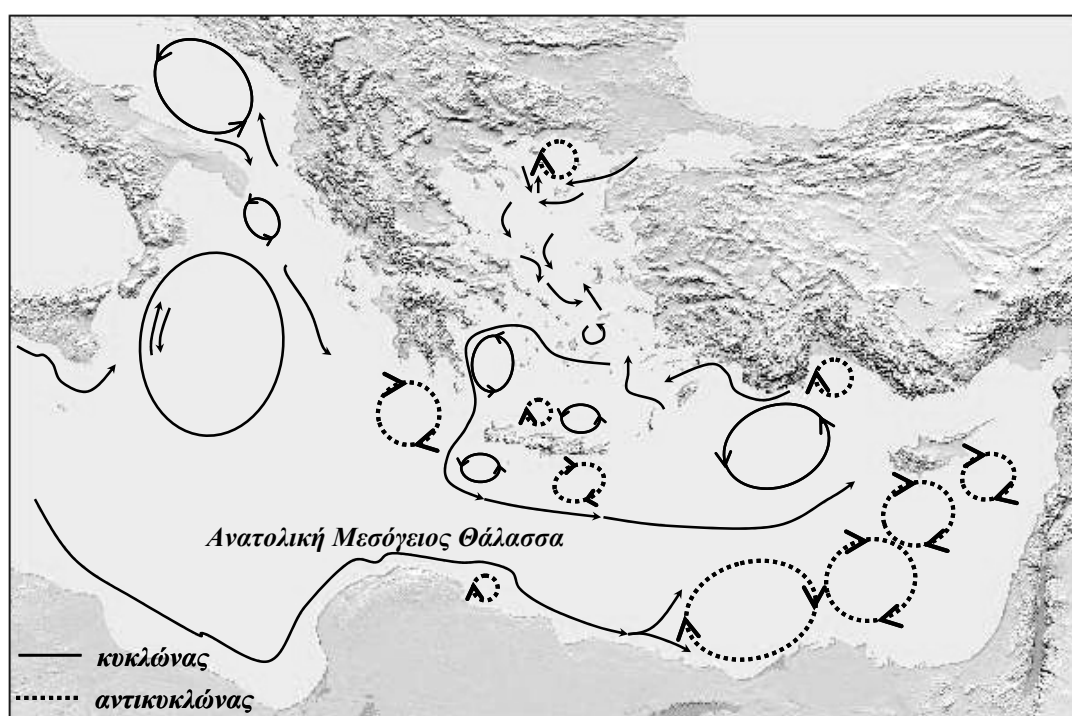
Η Μεσόγειος Θάλασσα αποτελεί ένα ημίκλειστο σύστημα που επικοινωνεί με τον Ατλαντικό Ωκεανό μέσω του ισθμού του Γιβραλτάρ. Οι χαμηλής αλατότητας υδάτινες μάζες του Ατλαντικού Ωκεανού εισέρχονται από το επιφανειακό στρώμα του ισθμού, διαπερνούν όλη τη Μεσόγειο, κατευθύνονται προς τη θάλασσα της Λεβαντίνης όπου στην πορεία αλλοιώνονται τα χαρα-κτηριστικά τους ύστερα από ανάμιξη με άλλες υδάτινες μάζες και κατόπιν εξέρχονται από το ίδιο σημείο μέσω του κατώτερου στρώματος (Σχήμα 1.2) (Lascaratos et al., 1999). Η Ανατολική λεκάνη της Μεσογείου παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς αποτελεί ένα ιδανικό περιβάλλον όπου οι μελέτες που αφορούν τη δομή και λειτουργία της είναι περιορισμένες. Η Ανατολική Μεσόγειος θεωρείται από τις πιο ολιγοτροφικές περιοχές του κόσμου με σημαντικά χαμηλές τιμές θρεπτικών ενώ αντίθετα με άλλες περιοχές, ο φώσφορος αποτελεί το περιοριστικό παράγοντα ανάπτυξης του φυτοπλαγκτού (Ignatiades, 1969; Krom, 1991; Tselepides et al., 2000).



**Σχήμα 1.2:** Αναπαράσταση της ανακύκλωσης των υδάτινων μαζών στην Ανατολική Μεσόγειο (πηγή: Lascaratos et al., 1999).

Τα υδρογραφικά χαρακτηριστικά καθώς και η επιφανειακή κυκλοφορία των υδάτων της Ανατολικής Μεσογείου έχουν μελετηθεί εκτεταμένα τα τελευταία 15 χρόνια (Malanotte-Rizzoli and Hecht, 1988; Malanotte-Rizzoli et al., 1997; Theocharis et al., 1993; Theocharis et al., 2002) χαρακτηρίζοντας τη συγκεκριμένη περιοχή ως ένα σχεδόν τέλειο σύστημα επαναλαμβανόμενης κυκλοφορίας υδάτινων μαζών (Theocharis et al., 1999; 2002) (Σχήμα 1.3).

Η θάλασσα της Αδριατικής συνεισφέρει σημαντικά στο σχηματισμό των βαθιών νερών στις λεκάνες του Ιονίου και της Λεβαντίνης, ενώ οι υδάτινες μάζες που προέρχονται από τη λεκάνη της Λεβαντίνης επηρεάζουν σημαντικά τη κυκλοφορία στο Αιγαίο Πέλαγος. Εντούτοις, και το Αιγαίο αποτελεί δευτερογενής πηγή υδάτινων μαζών που επηρεάζει κυρίως το Κρητικό Πέλαγος (Σχήμα 1.3).



Σχήμα 1.3: Αναπαράσταση της ανακύκλωσης των υδάτινων μαζών στην Ανατολική Μεσόγειο Θάλασσα (πηγή: Horton et al., 1997; Theocharis et al., 1999; 2002).

Το Αιγαίο Πέλαγος αποτελεί τη βόρειο-ανατολικότερη επέκταση της Μεσογείου Θάλασσας στο οποίο κάθε χρόνο εισρέουν σημαντικές ποσότητες γλυκών υδάτων από τους ποταμούς, ενώ επίσης επηρεάζεται σημαντικά από τα χαμηλής αλατότητας νερά της Μαύρης Θάλασσας, που εισέρχονται στο βόρειο τμήμα του από τα στενά των Δαρδανελίων (Poulos et al., 1997). Η κυκλοφορία των υδάτων ελέγχεται κυρίως από τα καιρικά φαινόμενα της περιοχής με κυριότερο χαρακτηριστικό τους δυνατούς βόρειους ανέμους καθώς και από τη πολύπλοκη



γεωμορφολογική κατανομή του Αιγαίου (Poulos et al., 1997). Κατά κανόνα η κυκλοφορία των επιφανειακών υδάτων, ενσωματώνεται σε ένα περιστροφικό σύστημα με φορά αντίθετη των δεικτών του ρολογιού στη διάρκεια του χειμώνα, ενώ το καλοκαίρι η μετακίνηση των υδάτινων μαζών πραγματοποιείται προς τα Νότια. Η θερμοκρασία των επιφανειακών υδάτων ποικίλει ανάλογα με την εποχή με μέσες τιμές που δεν ξεπερνούν τους 8°C στο βόρειο τμήμα κατά τη διάρκεια του χειμώνα, και τους 26°C στα νότια κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού. Οι τιμές αλατότητας ποικίλουν από 31.0 psu στις βόρειες περιοχές έως 39.0 psu στις νότιες, παρουσιάζοντας τις μέγιστες διαφορές τους κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού ενώ το χειμώνα οι κατανομές των τιμών εμφανίζουν μια σχετική ομοιομορφία (Poulos et al., 1997) (Σχήμα 1.3).

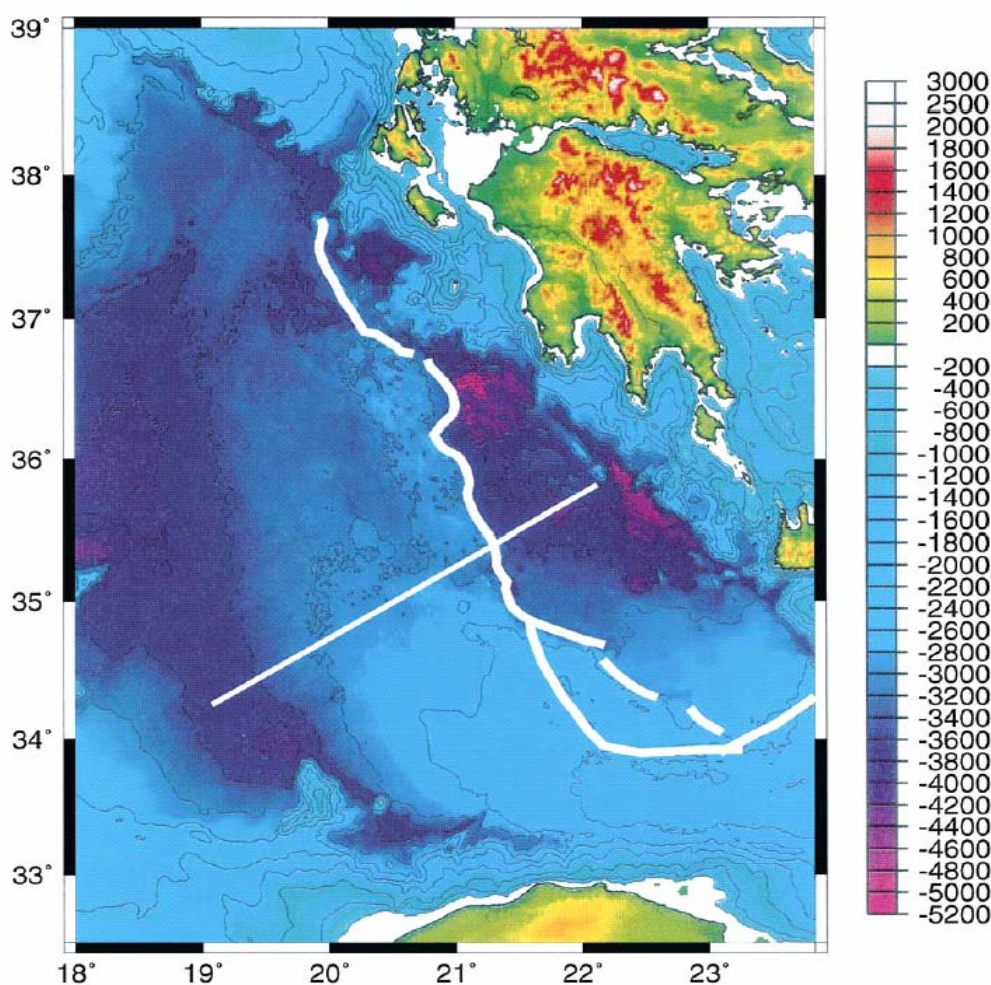
#### *1.4.2 Η υποθαλάσσια οροσειρά της Μεσογείου*

Εκτός από την έντονη υδρογραφία που χαρα-κτηρίζει την Ανατολική Μεσόγειο ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η οροσειρά της Μεσογείου στην περιοχή του Ιονίου Πελάγους που ανακαλύφθηκε το 1963 από τους Heezen και Ewing. Μετά το 1963 ένας μεγάλος αριθμός εργασιών επικεντρώθηκε στη μελέτη της τεκτονικής και σεισμικότητας της συγκεκριμένης περιοχής (Σχήμα 1.4) (Emery et al., 1966; Rabinowitz and Ryan, 1970; Le Pichon et al., 1982; Ryan et al., 1982; Truffert et al., 1993; Lallemand et al., 1994; Le Pichon et al., 2002). Η υποθαλάσσια οροσειρά της Ανατολικής Μεσογείου χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ενός μεγάλου αριθμού διαφορετικών περιβαλλόντων ηφαιστειογενούς προέλευσης (Σχήμα 1.5A; Medinaut/Medineth Shipboard Scientific Parties, 2000) και ανοξικών βαθιών λεκανών υψηλής αλατότητας (Σχήμα 1.5B; Rimoldi et al., 1996). Κύριο χαρακτηριστικό των περιοχών αυτών όπου επικρατούν ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες είναι η παραγωγή μεθανίου σε ιδιαίτερα υψηλές ποσότητες γεγονός που καθιστά την Ανατολική Μεσόγειο ως ιδιαίτερα σημαντική περιοχή παραγωγής βιογενών αερίων (Charlou et al., 2003) (Σχήμα 1.5).

Μετά το 1983 στην υποθαλάσσια οροσειρά της Μεσογείου ανακαλύφθηκαν λεκάνες με υψηλά επίπεδα αλατότητας και έντονες ανοξικές συνθήκες (Σχήμα 1.5) (De Lange and ten Haven, 1983; Jongsma et al., 1983; Camerlenghi and Cita 1987)

Θαλάσσιες ανοξικές λεκάνες υψηλής αλατότητας έχουν επίσης ανακαλυφθεί στην Ερυθρά Θάλασσα (Kebrit Deep, Shaban Deep, Atlantis II Deep; Eder et al., 2001) και στον Κόλπο του Μεξικό (Orca basin; Shokes et al., 1977). Στην Ανατολική Μεσόγειο

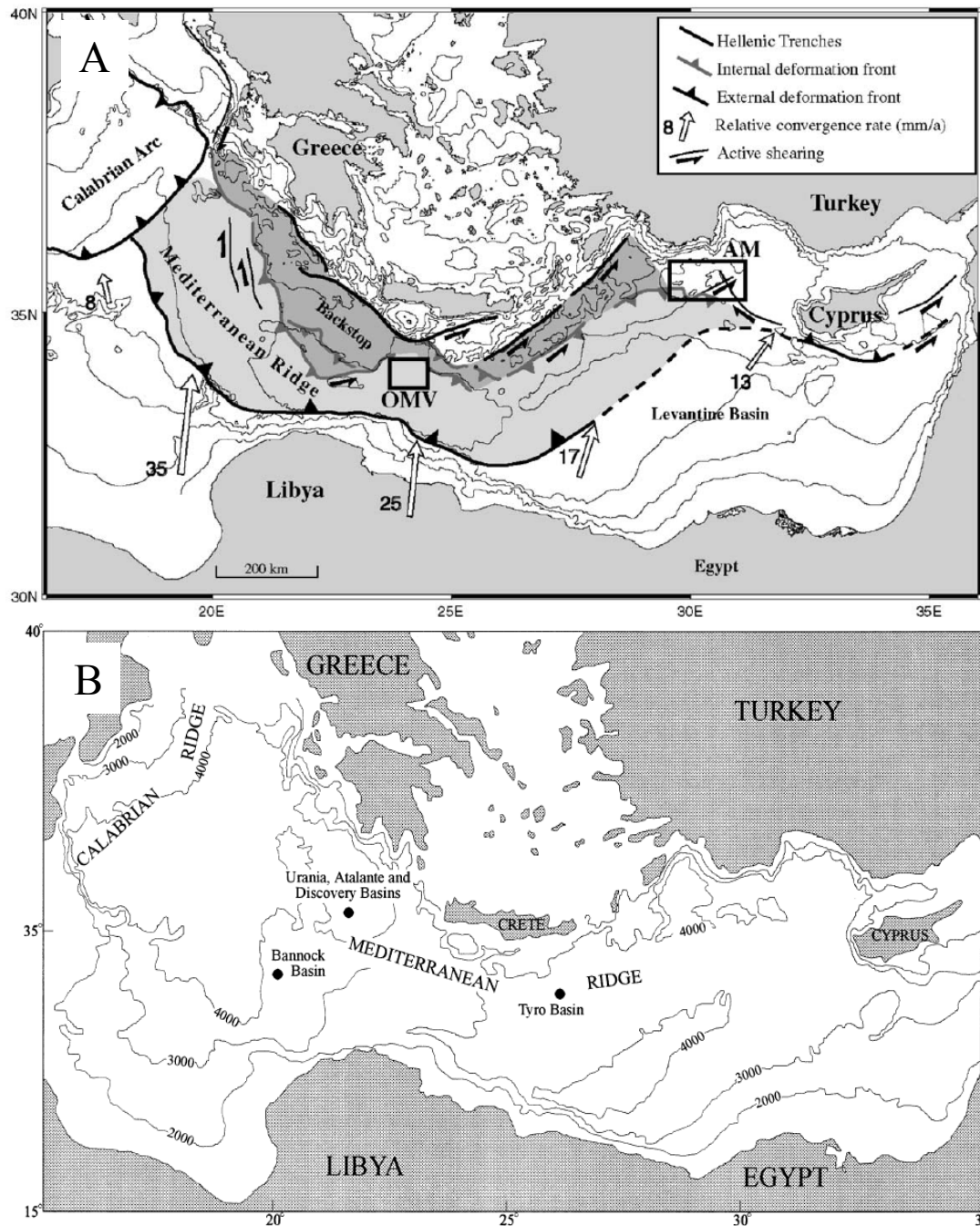
οι ανοξικές λεκάνες Urania, L'Atalante και Tyro (Σχήμα 1.5) που ανακαλύφθηκαν στα τέλη του 1993- αρχές 1994, βρίσκονται Νότια της Κρήτης (Medriff consortium, 1995; Corselli et al., 1996; Vengosh et al., 1998; Wallmann et al., 2002). Η λεκάνη Bannock που επίσης περιέχει νερό υψηλής αλατότητας (De Lange et al., 1990; Vengosh et al., 1998) βρίσκεται κοντά στην αβυσσική ζώνη στο νοτιότερο σημείο της οροσειράς της Μεσογείου (Schijf et al., 1995).



**Σχήμα 1.4:** Τοπογραφικός χάρτης της περιοχής του Ιονίου Πελάγους όπου φαίνεται η οροσειρά της Μεσογείου (Le Pichon et al., 2002).

Μέχρι στιγμής, δύο είναι οι κύριες θεωρίες προέλευσης των ανοξικών λεκανών στην Ανατολική Μεσόγειο. Σύμφωνα με την πρώτη θεωρία, η οποία είναι και η επικρατούσα, οι ανοξικές λεκάνες σχηματίστηκαν μετά την Κρίση Αλμυρότητας του Μεσσηνίου (πριν 5 εκατομμύρια έτη), κατά την οποία διακόπηκε η επικοινωνία της Μεσογείου θάλασσας με τον Ατλαντικό Ωκεανό. Ως συνέπεια, η αλατότητα των νερών της Μεσογείου αυξήθηκε με αποτέλεσμα την εναπόθεση των σχηματιζόμενων εβαποριτών. Κατά τη γεωλογική περίοδο του Πλειόκαινου, η επικοινωνία μεταξύ

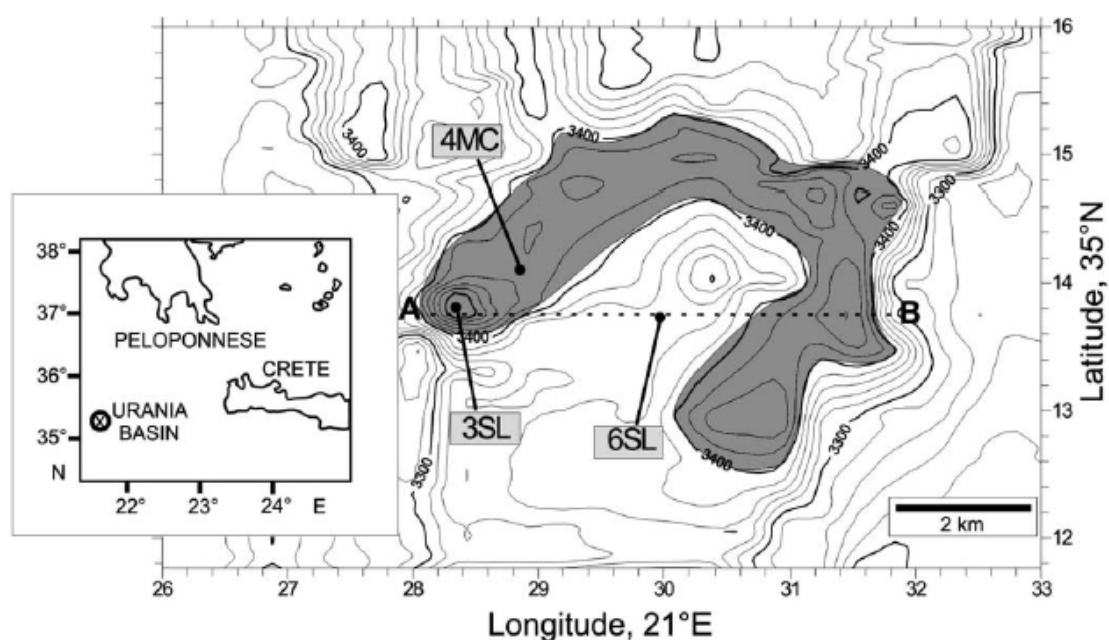
Μεσογείου και Ατλαντικού Ωκεανού αποκαταστάθηκε και η διαδικασία ιζηματοπόθεσης συνεχίστηκε.



**Σχήμα 1.5:** Χάρτες της Ανατολικής Μεσογείου όπου παρουσιάζονται A) η θέση της υποθαλάσσιας οροσειράς της Μεσογείου και η ηφαιστειογενής περιοχή Olimpi (Medinaut/Medineth Shipboard Scientific Parties, 2000) και B) οι γεωγραφικές θέσεις των ανοξικών λεκανών (Rimoldi et al., 1996).

Οι εκτεταμένες διεργασίες σύγκρουσης των τεκτονικών πλακών της Αφρικής και της Ευρώπης (Bregant et al., 1990; Camerlenghi, 1990; Vengosh et al., 1998; Sass et al., 2001) είχαν ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση των εβαποριτών ηλικίας 5-8 εκατομμυρίων ετών (Messinian evaporates) (Schijf et al., 1995) και την

επαναδιάλυσή τους στο θαλασσίνο νερό σχηματίζοντας στρώματα λεκανών υψηλής αλατότητας (Bregant et al., 1990; Camerlenghi et al., 1990; Vengosh et al., 1998; Sass et al., 2001). Σύμφωνα με τη δεύτερη θεωρία ο σχηματισμός των ανοξικών λεκανών πραγματοποιήθηκε όταν κατά την περίοδο της έντονης ξήρανσης της Ανατολικής Μεσογείου οι σχηματιζόμενοι υδρατμοί παγιδεύτηκαν στα ιζήματα και κατόπιν τροποποιήθηκαν με μια σειρά διαγενετικών διαδικασιών (Vengosh et al., 1994).



**Σχήμα 1.6:** Βαθυμετρικός χάρτης της λεκάνης Urania στην Ανατολική Μεσόγειο (Hübner et al., 2003).

Το μέγεθος των ανοξικών λεκανών στην Ανατολική Μεσόγειο είναι ιδιαίτερα περιορισμένο (το μήκος δεν ξεπερνά τα 5km). Εντούτοις, παρουσιάζουν μεγάλη διαφοροποίηση τόσο στο βαθμό αλατότητας όσο και στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό (Vengosh et al., 1998). Η λεκάνη Urania έχει μελετηθεί εκτεταμένα ως προς την χημική της σύσταση (Hübner, 2002). Το στοιχείο θείο (S) αποτελεί το βασικότερο συστατικό της με συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ 6.5-18.9% ανά ξηρή μάζα ιζήματος (Hübner, 2002). Στο Σχήμα 1.6 παρουσιάζεται ο βαθυμετρικός χάρτης της λεκάνης Urania (Hübner et al., 2003).

Συμπερασματικά, η Ανατολική Μεσόγειος αποτελεί ένα πολύπλοκο σύστημα τόσο από υδρογραφικής όσο και από γεωμορφολογικής άποψης. Κατ' επέκταση η κατανομή των θρεπτικών αλάτων επηρεάζει την πρωτογενή παραγωγικότητα η οποία με τη σειρά της ρυθμίζει την κατανομή του οργανικού υλικού στο πυθμένα των θαλασσών και συνεπώς τη κατανομή των βενθικών μικροβιοκοινωνιών.

## 1.5 Στόχοι της Μελέτης

Αν και η μελέτη της κατανομής των βενθικών μικροβιακών κοινωνιών σε σχέση με τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν είναι μεγάλης σημασίας για την κατανόηση των οικολογικών αρχών των οικοσυστημάτων ο αριθμός των σχετικών εργασιών στην Ανατολική Μεσόγειο είναι ιδιαίτερα περιορισμένος. Πρώτοι, οι Boetius και συνεργάτες (1996) μελέτησαν τη σχέση της μικροβιακής βιομάζας και ενζυματικής δραστηριότητας με τη βιοδιαθεσιμότητα της τροφής σε μια σειρά βαθιών σταθμών από τη Θάλασσα της Λεβαντίνης μέχρι το Νότιο Ιόνιο Πέλαγος (Boetius et al., 1996). Στη συνέχεια, οι Danovaro και συνεργάτες (2000) σε εργασία που πραγματοποιήθηκε στην υφαλοκρηπίδα της Κρήτης έδειξαν ότι η βακτηριακή αφθονία σχεδόν τριπλασιάζεται όταν αυξάνεται η ποσότητα των πρωτεϊνών στο ίζημα δηλώνοντας ότι οι βενθικές μικροβιοκοινωνίες του Κρητικού Πελάγους περιορίζονται κυρίως από την ποιότητα και όχι από την ποσότητα του οργανικού υλικού που εναποτίθεται στο ίζημα. Οι Bianchi και συνεργάτες (2003) παρουσιάζοντας δεδομένα βακτηριακής αφθονίας και δραστηριότητας από τις υφαλοκρηπίδες του Βορείου και Νοτίου Αιγαίου επιβεβαίωσαν τη δραστική αποικοδόμηση του οργανικού υλικού στα πρώιμα στάδια ιζηματοπόθεσης καθώς η βακτηριακή δραστηριότητα συσχετιζόταν σημαντικά με τα επίπεδα οργανικού άνθρακα και αζώτου μόνο στα επιφανειακά ιζήματα των περιοχών. Επίσης, δεδομένα βακτηριακής αφθονίας και δραστηριότητας καταγράφηκαν στα πλαίσια του προγράμματος INTERPOL σε τρεις εποχές στον Θερμαϊκό Κόλπο με απώτερο σκοπό τη μελέτη της επίδρασης της διατάραξης των ιζημάτων που προκαλούνται από τα αλιευτικά μέσα στη σύσταση και δραστηριότητα των μικροβιακών κοινωνιών των θαλασσιών ιζημάτων (Polymenakou et al., 2005b).

Τα δεδομένα βακτηριακής ποικιλότητας με μοριακές τεχνικές για τα ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου είναι ελάχιστα και προέρχονται από την περιοχή της υδροθερμικής πηγής της Μήλου (Brinkhoff et al., 1999; Sievert et al., 1999; 2000) και από σαπροπηλούς που συλλέχθηκαν νοτιοανατολικά της Κρήτης (Coolen et al., 2002).

Βασικός στόχος της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της σύστασης και κατανομής των μικροβιακών κοινωνιών σε ιζήματα από βιογεωχημικά διαφορετικές περιοχές της Ανατολικής Μεσογείου με τεχνικές ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA και των φωσφολιπιδίων καθώς και των περιβαλλοντικών παραγόντων που ρυθμίζουν την κατανομή τους

Οι βασικοί στόχοι της παρούσας διατριβής είναι:

1. Η ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση της σύνθεσης των βακτηριακών κοινωνιών σε ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου δίνοντας έμφαση στις βαθιές θάλασσες
2. Ο εντοπισμός βακτηριακών ομάδων που παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των βιογεωχημικών κύκλων
3. Ο εντοπισμός των περιβαλλοντικών παραγόντων που καθορίζουν τη κατανομή των μικροβιακών κοινωνιών
4. Η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τον ολιγοτροφικό χαρακτήρα της Ανατολικής Μεσογείου, τη βιοποικιλότητα και την ικανότητα φυσικής βιοεπιαναφοράς

Τα επιμέρους επιστημονικά ερωτήματα που προκύπτουν και θέτουμε έχουν ως εξής:

1. Το βάθος επηρεάζει τη σύσταση των μικροβιακών κοινωνιών?
2. Πώς επηρεάζονται οι μικροβιακές κοινωνίες από το βαθμό περιβαλλοντικής ρύπανσης σε περιοχές της Ανατολικής Μεσογείου;
3. Η κατανομή των μικροβιακών κοινωνιών διαφοροποιείται σε περιοχές που παρουσιάζουν ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. διαβάθμιση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης και της αλατότητας);
4. Ποιοι είναι οι σημαντικότεροι περιβαλλοντικοί παράγοντες που ελέγχουν την κατανομή των μικροβιακών κοινωνιών;
5. Ποια συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν σχετικά με το ρόλο του έντονα ολιγοτροφικού χαρακτήρα της Ανατολικής Μεσογείου στη ρύθμιση της δομής και λειτουργίας των βακτηριακών πληθυσμών;

Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν μια σειρά από διαφορετικές περιοχές στην Ανατολική Μεσόγειο, που διαφέρουν ως προς τα περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά τους (π.χ. ανοξικά και οξικά περιβάλλοντα) και το βαθμό των ανθρωπογενών επιρροών (π.χ. πετρελαϊκή ρύπανση). Τα πολύπλοκα υδρογραφικά, γεωμορφολογικά και ατμοσφαιρικά χαρακτηριστικά των περιοχών αυτών επηρεάζουν όχι μόνο τη χημική σύσταση των ιζημάτων αλλά και τη σύσταση των τοπικών μικροβιακών κοινωνιών. Ένας μεγάλος αριθμός δειγμάτων συλλέχθηκε από το Βόρειο Αιγαίο (Θερμαϊκός Κόλπος, Θρακικό Πέλαγος), το Κρητικό Πέλαγος, το Νότιο Ιόνιο Πέλαγος (από φυσιολογικά περιβάλλοντα καθώς και από τις Ανοξικές Λεκάνες Urania, L'Atalante, Discovery, Bannock), τη Θάλασσα της Λεβαντίνης και τον Κόλπο της Αουγκούστα στη Σικελία. Η παρούσα διατριβή έχει διαρθρωθεί σε

επιμέρους ενότητες ολοκληρωμένων επιστημονικών εργασιών που περιλαμβάνουν τη συγκριτική μελέτη της σύστασης των μικροβιακών κοινωνιών στα ιζήματα με τεχνικές γενετικής αποτύπωσης και ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA, τη μελέτη της αποικοδομητικής τους ικανότητας καθώς και της επίδρασης των αβιοτικών παραμέτρων (όπως οξειδοαναγωγικές συνθήκες, αλατότητα και στοιχειακός άνθρακας) στην κατανομή τους σε διαφορετικά περιβάλλοντα (Κεφάλαιο 3). Οι επιμέρους ενότητες έχουν διαρθρωθεί ως εξής:

1. Μελέτη των μικροβιακών κοινωνιών σε ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου με τεχνικές αποτύπωσης.
2. Μελέτη της σύστασης μικροβιακών κοινωνιών με ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA.
3. Μελέτη της αποικοδομητικής ικανότητας των μικροοργανισμών: στοιχειοποίηση του οργανικού άνθρακα και αποικοδόμηση αλειφατικών υδρογονανθράκων.
4. Μελέτη της επίδρασης της αλατότητας και των οξειδοαναγωγικών συνθηκών στην κατανομή των μικροβιακών κοινωνιών.
5. Μελέτη της βιοδιαθεσιμότητας των πηγών C: επίδραση του στοιχειακού άνθρακα των ιζημάτων στην κατανομή των μικροβιακών κοινωνιών.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Πειραματικό Μέρος

### 2.1 Περιοχές δειγματοληψίας

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια των Ευρωπαϊκών Προγραμμάτων INTERPOL, ADIOS, CYCLOPS, ANREC & BIODEEP του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας Κρήτης (νυν Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών Κρήτης).

*2.1.1 Θερμαϊκός Κόλπος.* Οι σταθμοί που επιλέχθηκαν σχηματίζουν μια διατομή με κατεύθυνση από το βόρειο προς το νότιο τμήμα στις δυτικές ακτές του κόλπου. Οι συγκεκριμένοι σταθμοί δέχονται έντονες επιρροές τόσο από τη βιομηχανική ζώνη της περιοχής της Θεσσαλονίκης, όσο και από εισροές ποταμών που χρησιμοποιούνται για τη λειτουργία υδροηλεκτρικών εργοστασίων. Τα βάθη των σταθμών κυμαίνονται από 33 έως 86 m (Σχήμα 2.1).

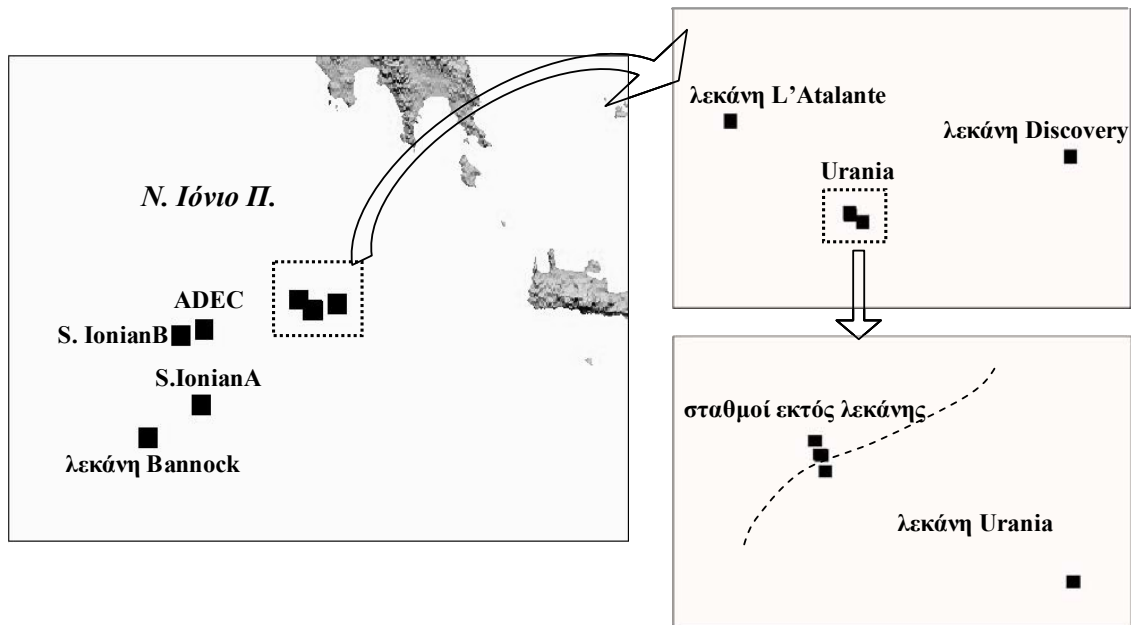
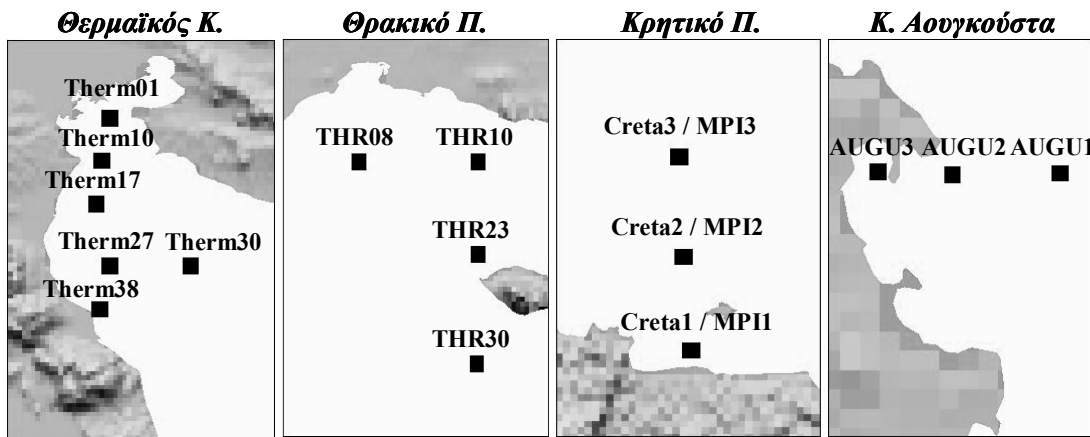
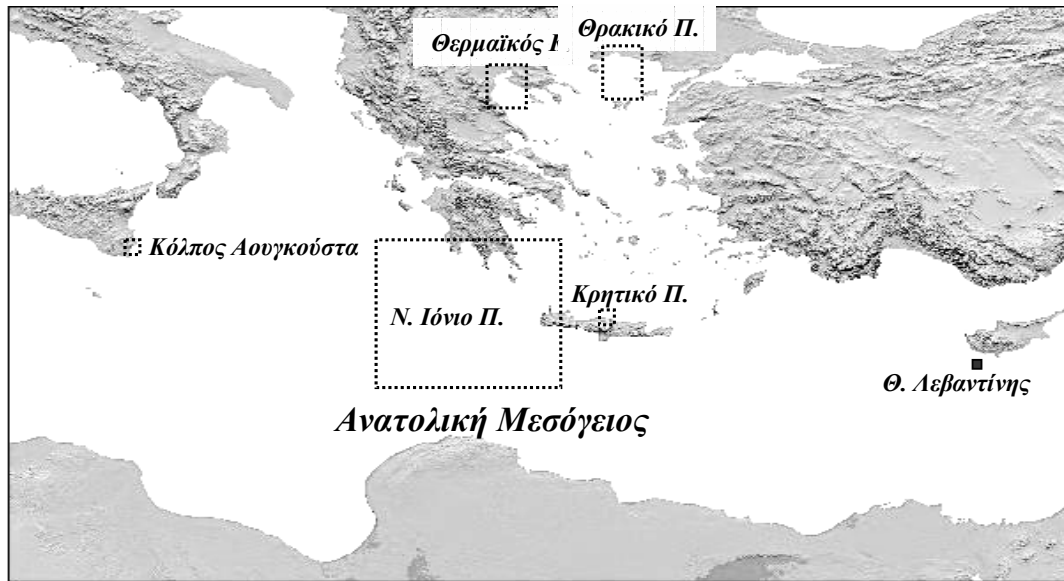
*2.1.2. Κρητικό Πέλαγος.* Οι σταθμοί που επιλέχθηκαν σχηματίζουν μια διατομή που ξεκινάει από το κόλπο του Ηρακλείου στην αρχή της υφαλοκρηπίδας με  $1.5^\circ$  κλίση (Creta1, 100 m), συνεχίζει στη πιο απότομη περιοχή με κλίση  $2^\circ$ - $4^\circ$  (Creta2, 617 m) και επεκτείνεται πέραν της υφαλοκρηπίδας (Creta3, 1494 m). Τα πειράματα επώασης που περιγράφονται στο Κεφάλαιο 3.3 πραγματοποιήθηκαν στους ίδιους σταθμούς (οι σταθμοί στο Κεφ. 3.3 παρουσιάζονται αντίστοιχα ως MPI1, MPI2 και MPI3) (Σχήμα 2.1).

*2.1.3. Θρακικό Πέλαγος.* Τα βάθη των σταθμών που επιλέχθηκαν κυμαίνονται από 52 έως 223 m, ενώ δείγματα συλλέχθηκαν από το επιφανειακό (0-1 cm) και από ένα βαθύτερο στρώμα των ιζημάτων (8-10 cm) (Σχήμα 2.1).

*2.1.4. Κόλπος της Αουγκούστα (ΝΑ Σικελία).* Ο κόλπος της Αουγκούστα χαρακτηρίζεται από υψηλές ποσότητες πετρελαϊκών υδρογονανθράκων λόγω των έντονων ανθρωπογενών επιρροών από τη βιομηχανική ζώνη της περιοχής όπως μας ενημέρωσαν οι συνεργάτες μας από το Ερευνητικό Κέντρο CNRS της Ιταλίας κατά τη διάρκεια της ωκεανογραφικής αποστολής του προγράμματος BIODEEP. Οι σταθμοί που επιλέχθηκαν σχηματίζουν μια διατομή που ξεκινάει από το λιμάνι (AUGU3) και επεκτείνεται μέχρι το βάθος των 1700 m (AUGU1) (Σχήμα 2.1).

*2.1.5. Θάλασσα της Λεβαντίνης.* Ο σταθμός που επιλέχθηκε βρίσκεται νότια της Κύπρου σε βάθος 1780 m, και κοντά στο υποθαλάσσιο βουνό Ερατοσθένης (Σχήμα 2.1).





Σχήμα 2.1: Γεωγραφικός χάρτης των δειγματοληπτικών σταθμών.

2.1.6. Νότιο Ιόνιο. Οι δειγματοληψίες στο Νότιο Ιόνιο Πέλαγος πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια των ερευνητικών προγραμμάτων ADIOS και BIODEEP. Στους σταθμούς

S.IonianA, S.IonianB, και ADEC τα ιζήματα έχουν οξικό χαρακτήρα και τα βάθη τους κυμαίνονται από 2790 έως 2860 m. Στα πλαίσια του προγράμματος BIODEEP συλλέχθηκαν δείγματα από τις ανοξικές βαθιές λεκάνες Bannock, L'Atalante, Discovery και Urania. Τα βάθη των λεκανών φτάνουν ως τα 3532 m. Το χαρακτηριστικό αυτών των λεκανών εκτός από τον ανοξικό τους χαρακτήρα είναι τα ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα αλατότητας με τιμές έως 380 psu στην περίπτωση της λεκάνης Discovery. Στη λεκάνη Urania, συλλέχθηκαν επίσης δείγματα κοντά στα όρια αλλαγής του ανοξικού και οξικού χαρακτήρα των ιζημάτων (Σχήμα 2.1).

## 2.2 Δειγματοληψίες και βιογεωχημικές παράμετροι

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν με τα ερευνητικά σκάφη Αιγαίο (ΕΛΚΕΘΕ/Ελλάδα), Φιλία (ΕΛΚΕΘΕ/Ελλάδα) και Ουράνια (CNRS/Ιταλία). Οι δειγματολήπτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

1. ο πολλαπλός πυρηνολήπτης Bowers & Connelly (8 πυρηνολήπτες, i.d. 9.0 cm) (Barnet et al., 1984) που επιτρέπει τη συλλογή αδιατάραχτων δειγμάτων και
2. ο δειγματολήπτης USNEL Boxcorer που χρησιμοποιήθηκε μόνο για τη συλλογή των δειγμάτων S.IonianA, S.IonianB, και ADEC.

Τα δείγματα από το κόλπο του Θερμαϊκού συλλέχθηκαν το Φεβρουάριο του 2002, από τη θάλασσα της Λεβαντίνης το Μάιο του 2002, από το Κρητικό Πέλαγος τον Ιούλιο του 2002, από το Νότιο Ιόνιο το Νοέμβριο του 2001, από το Θρακικό Πέλαγος το Σεπτέμβριο του 2003 και από τις ανοξικές λεκάνες Bannock, Discovery, Urania, L'Atalante του Νότιου Ιονίου και από το κόλπο της Αουγκούστα (Σικελία) το Νοέμβριο του 2003.

Οι μετρήσεις του οξειδοαναγωγικού δυναμικού πραγματοποιήθηκαν με χρήση βαθμονομημένου οξειδωτικού ηλεκτροδίου (Mettler Toledo, Switzerland). Τα επίπεδα αλατότητας προσδιορίστηκαν με τη χρήση διαθλασίμετρου χειρός (Atago, Tokyo, Japan) ύστερα από φυγοκέντρηση των δειγμάτων σε μικρή ταχύτητα. Οι συγκεντρώσεις χλωροφυλλών προσδιορίστηκαν φθορομετρικά, με χρήση του φθορόμετρου Turner TD-700. Οι συγκεντρώσεις φαιοφυτινών προσδιορίστηκαν ύστερα από επεξεργασία του δείγματος με διάλυμα 0.1N HCl. Το ισοδύναμο χλωροπλαστικών χρωστικών υπολογίστηκε ως το άθροισμα των συγκεντρώσεων χλωροφύλλης και φαιοφυτινών (Lorenzen and Jeffrey, 1980; Yentsch and Menzel, 1963). Για τις αναλύσεις του ολικού οργανικού άνθρακα και αζώτου στα ιζήματα

εφαρμόστηκε η μέθοδος που έχει περιγραφεί από του Hedges και Stern (Hedges and Stern, 1984), με χρήση του Αναλυτή Perkin Elmer CHN 2400. Οι συγκεντρώσεις 'στοιχειακού' άνθρακα προσδιορίστηκαν ακολουθώντας τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Gustafsson και συνεργάτες (1997) σύμφωνα με την οποία τα δείγματα οξειδώνονται στους 375°C για 24 h παρουσία οξυγόνου.

### **2.3 Ρυθμοί στοιχειοποίησης του οργανικού άνθρακα**

Οι ρυθμοί στοιχειοποίησης του άνθρακα υπολογίστηκαν μετρώντας την ποσότητα CO<sub>2</sub> που παράχθηκε κατά τη διάρκεια των επώσεων των ιζημάτων (Dauwe et al., 2001). Περίπου 20 ml φρέσκου υλικού μεταφέρθηκαν σε σκοτεινά γυάλινα μπουκάλια επώσεων στα οποία προστέθηκαν επίσης 10 ml προ-φιλτραρισμένου θαλασσινού νερού. Τα δείγματα επεξεργάστηκαν με συνθετικό αέρα (N<sub>2</sub>:O<sub>2</sub>, 80:20) για τη διατήρηση των οξικών συνθηκών κατά την διάρκεια των επώσεων και την απομάκρυνση πιθανών υπολειμμάτων CO<sub>2</sub>. Για περίοδο διάρκειας 2 μηνών οι επώσεις πραγματοποιήθηκαν σε ειδικό θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας (*in situ* θερμοκρασίας) και ανακινούνταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Οι συγκεντρώσεις CO<sub>2</sub> στον κενό χώρο των μπουκαλιών προσδιορίστηκαν σε αέριο χρωματογράφο 5890 Hewlett Packard συνδεδεμένο με ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας και χρωματογραφική κολώνα τύπου Carboxen 100G (30×0.53 mm, Supelco). Η ανάκτηση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα HP3365 series II Chemstation (version A.03.01). Οι καμπύλες βαθμονόμησης για τον ποσοτικό προσδιορισμό του CO<sub>2</sub> υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας υπερκαθαρό αέριο CarbonDioxide (Messer, product Nr. 1527). Μετά το τέλος των επώσεων προσδιορίστηκαν επίσης οι τιμές pH. Οι ποσότητες CO<sub>2</sub> υπολογίστηκαν αθροίζοντας τις συγκεντρώσεις της αέριας και διαλυτής φάσης του αερίου. Οι ρυθμοί στοιχειοποίησης εκφράστηκαν σε μονάδες nmol CO<sub>2</sub> (ml ιζήματος)<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>.

### **2.4 Αναλύσεις DGGE και T-RFLP**

Για την εκχύλιση του βακτηριακού DNA από τα ιζήματα χρησιμοποιήθηκε 0.5 g υλικού και εφαρμόστηκε το ειδικά σχεδιασμένο FastDNA-Spin Kit for Soil (Q-BIOgene, Carlsbad, CA) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή με την εξαίρεση ότι η κυτταρική λύση πραγματοποιήθηκε μηχανικά με χρήση του μηχανήματος Mini-Beadbeater (Biospec products, Bartlesville OK).

Για τη μέθοδο DGGE η απομόνωση του γονιδίου του 16S rRNA, πραγματοποιήθηκε με χρήση των εκκινητών 357FGC και 518R όπως περιγράφεται από τους Sekiguchi και συνεργάτες (2002). Όλη η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται λεπτομερώς σε πρόσφατη εργασία (Sekiguchi et al., 2002).

Για τη μέθοδο T-RFLP, η απομόνωση του γονιδίου του 16S rRNA πραγματοποιήθηκε με χρήση των εκκινητών 27f, σημασμένο με τη φθορίζουσα ουσία hexachlorofluorescein (Vergin et al., 1998), και 519r (Lane et al., 1985). Κατόπιν ακολούθησε πέψη των προϊόντων της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης με τους παραπάνω εκκινητές, με τα περιοριστικά ένζυμα *HaeIII*, *HhaI* και *RsaI* στους 37°C, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Invitrogen, Carlsbad, CA). Το μέγεθος των τμημάτων που παρήχθησαν με τη πέψη προσδιορίστηκε στο μηχάνημα ABI 3700, 96-capillary sequencer μετά από προσθήκη του δείκτη <500bp ROX-labelled (Applied Biosystems) στο κάθε δείγμα.. Η ανάκτηση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα GeneScanView 1.1/4 (C.R.I.B.I., University of Padova).

## 2.5 Ανάλυση λιπιδίων

Η εκχύλιση και απομόνωση των κ-αλκανίων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Gogou και συνεργάτες (Gogou et al., 1998).

Τα ολικά λιπίδια από προζυγισμένα και εξαχνωμένα δείγματα ιζημάτων (Freeze-Drier-Refrigerant R502) εκχυλίστηκαν με τη τροποποιημένη μέθοδο των Bligh και Dyer χρησιμοποιώντας μίγμα χλωροφθορίου/μεθανόλης/φωσφορικού διαλύματος (2:1:0.8 v/v) (Bligh and Dyer, 1959). Η διαδικασία για το διαχωρισμό των φωσφολιπιδίων από τα υπόλοιπα λιπίδια και τη μετεστεροποίησής τους σε μεθυλεστέρες περιγράφεται αναλυτικά σε πρόσφατη εργασία (Smoot and Findlay, 2001).

Στην περίπτωση του Κεφαλαίου 3.3 οι διαφορετικές κατηγορίες λιπιδίων ανακτήθηκαν ακολουθώντας τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Rütters και συνεργάτες (2002). Τα κλάσματα των αλειφατικών υδρογονανθράκων, διγλυκεριδίων, ελεύθερων λιπαρών οξέων και γλυκολιπιδίων αναλύθηκαν περαιτέρω. Τα κλάσματα των διγλυκεριδίων και γλυκολιπιδίων μετεστεροποιήθηκαν με τη μέθοδο της αλκαλικής μεθανόλυσης (Smoot and Findlay, 2001) ενώ το κλάσμα των ελεύθερων λιπαρών οξέων με τη χρήση διαζωμεθανίου.

Οι αναλύσεις των κ-αλκανίων και των υπόλοιπων κλασμάτων των λιπιδίων πραγματοποιήθηκαν σε Αέριο Χρωματογράφο συνδεδεμένο με Φασματοόμετρο Μαζών (GC/MS) Hewlett Packard Model 6890 GC και τριχοειδή στήλη (HP-5 MS with 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness, 30 m $\times$ 0.25 mm I.D.). Το αέριο ήλιο χρησιμοποιήθηκε ως το φέρον αέριο. Οι χρωματογραφικές συνθήκες ήταν οι ακόλουθες: (θερμοκρασιακό πρόγραμμα για το διαχωρισμό των κ-αλκανίων): θερμοκρασία εισαγωγέα 270°C; Θερμοκρασιακό πρόγραμμα, 70°C (1 min), 70-150°C (10°C/min), 150-290°C (5°C/min), και 290°C (30 min). Θερμοκρασιακό πρόγραμμα για το διαχωρισμό των φωσφολιπιδίων, ελεύθερων λιπαρών οξέων, διγλυκεριδίων και γλυκολιπιδίων που έχουν μετατραπεί στη μορφή των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων: θερμοκρασία εισαγωγέα 270°C; Θερμοκρασιακό πρόγραμμα, 70°C (1 min), 70-140°C (10°C/min), 140-240°C (4°C/min), και 240°C (30 min). Ο ποιοτικός προσδιορισμός των κ-αλκανίων πραγματοποιήθηκε με σύγκριση των χρόνων έκλουσης με αυτών πρότυπων διαλυμάτων της εταιρείας Polyscience και των λιπαρών οξέων με τους χρόνους έκλουσης των πρότυπων διαλυμάτων της εταιρείας Supelco (FAME Mix, Supelco). Ο ποσοτικός προσδιορισμός των κ-αλκανίων και των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων πραγματοποιήθηκε αντίστοιχα με τη χρήση των εσωτερικών πρότυπων διαλυμάτων 1-γλωροεξαδεκάνιο και μεθυλεστέρα του νοναδεκανοϊκού οξέος.

## 2.6 Κατασκευή βιβλιοθηκών κλώνων

Οι ρηχοί σταθμοί Therm01, Therm30 από το Θερμαϊκό Κόλπο, και Creta1 από το Κρητικό Πέλαγος και ο βαθύς σταθμός S.Ionian-A από το Νότιο Ιόνιο Πέλαγος επιλέχθηκαν για φυλογενετική ανάλυση. Για την κατασκευή βιβλιοθήκης κλώνων η απομόνωση του γονιδίου του 16S rRNA πραγματοποιήθηκε με χρήση των εκκινητών 27f τροποποιημένο για την ανάκτηση των γονιδίων των *Planctomycetales* (5'-AGRGTTTGATCMTGGCTCAG-3') (Vergin et al., 1998) και 1492r (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991). Οι συνθήκες PCR σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να περιοριστούν οι πιθανότητες σφαλμάτων κατά τον πολλαπλασιασμό των γονιδίων (Polz and Cavanaugh, 1998; von Wintzingerode et al., 1997). Για τη διαδικασία της κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε το πακέτο TOPO TA Cloning<sup>®</sup> kit (Version M) και εφαρμόστηκε ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή (Invitrogen Ltd, 3 Fountain Drive, Inchinnan Business Park, Paisley PA4 9RF, UK). Για κάθε μια από τις τέσσερις βιβλιοθήκες που κατασκευάστηκαν 200 θετικοί κλώνοι

απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση. Από αυτούς συνολικά 228 και για τις τέσσερις βιβλιοθήκες επιλέχθηκαν για προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας στο αναλυτή ABI 3700 96-capillary sequencer (Applied Biosystems). 9 από αυτές πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, 10 από αυτές αναγνωρίστηκαν ως χίμαιρες χρησιμοποιώντας το λογισμικό πρόγραμμα Chimera Check που περιλαμβάνεται στο Ribosomal Database Project II (Michigan State University) (Maidak et al., 2001), και δύο αναγνωρίστηκαν ως αλληλουχίες κυτταρικών οργάνων χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων Genbank και το λειτουργικό εργαλείο σύγκρισης BLAST (Basic Local Alignments Tool) (Altschul et al., 1997). Οι εναπομείναντες 207 αλληλουχίες (63 από το σταθμό Therm01, 45 από το σταθμό Therm30, 49 από το σταθμό Creta1 και 50 από το σταθμό S.IonianA), χρησιμοποιήθηκαν για φυλογενετική ανάλυση. Και οι 207 αλληλουχίες που προήλθαν με την παρούσα εργασία έχουν κατατεθεί στη βάση δεδομένων Genbank με αριθμούς πρόσβασης AY533880-AY534086.

## 2.7 Φυλογενετική Ανάλυση

Όλες οι αλληλουχίες εισήχθησαν στο λογισμικό πακέτο ARB Version 2.5b (Technical University of Munich, διαθέσιμο σε περιβάλλον Linux ή Macintosh) (Strunk and Ludwig, 1996). Η ευθυγράμμιση των αλληλουχιών με τις συγγενικά κοντινές αλληλουχίες της βάσης δεδομένων πραγματοποιήθηκε για κάθε αλληλουχία ξεχωριστά. Τα φυλογενετικά δέντρα κατασκευάστηκαν εφαρμόζοντας τις μεθόδους Maximum Likelihood (Felsenstein, 1981), Neighbour-Joining με τη διορθωτική μέθοδο απόστασης Jukes-Cantor, και Maximum Parsimony, που περιλαμβάνονται όλες στο πακέτο ARB. Η αυτοδυναμία των φυλογενετικών δέντρων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο maximum parsimony που περιλαμβάνεται στο ίδιο πακέτο (Felsenstein, 1985; Strunk and Ludwig, 1996).

## 2.8 Βακτηριακή ποικιλότητα

Για τον προσδιορισμό της βακτηριακής ποικιλότητας χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα των διαφορετικών λειτουργικών ταξινομικών μονάδων για κάθε βιβλιοθήκη κλώνων, και εφαρμόστηκε το πακέτο ανάλυσης Rarefaction calculator (<http://www2.biology.ualberta.ca/jbrzusto/rarefact.php>). Η βακτηριακή ποικιλότητα υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση Chao, (1984):  $S^*_1 = S_{obs} + (a^2/2b)$  όπου  $S_{obs}$  είναι ο αριθμός των 16S rDNA,  $a$  είναι ο αριθμός των κλώνων που προσδιορίστηκαν

μόνο μια φορά και  $b$  είναι ο αριθμός των κλώνων που προσδιορίστηκαν δύο φορές. Οι τυπικές αποκλίσεις (SD) υπολογίστηκαν σύμφωνα με την εξίσωση  $SD = b[(a/(4b))^4 + (a/b)^3 + (a/2b)^2]$ .

## 2.9 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

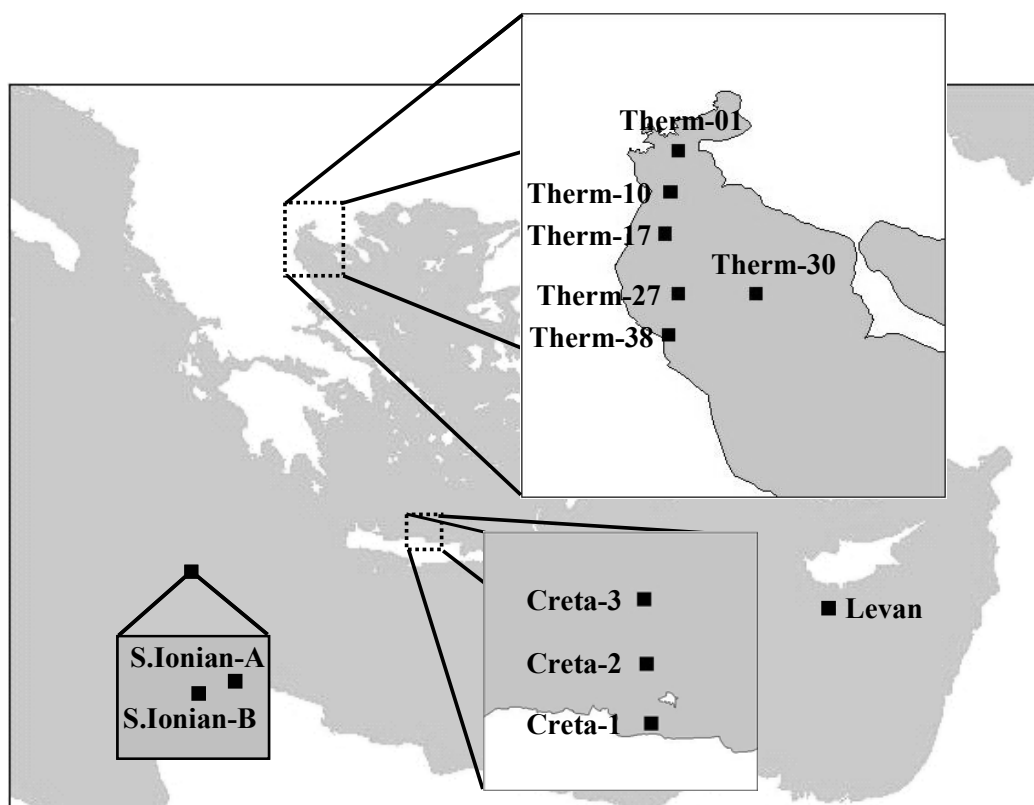
Για τα δεδομένα DGGE και T-RFLP οι ομοιότητες μεταξύ των σταθμών υπολογίστηκαν σύμφωνα με την εξίσωση Sorensen όπως περιγράφεται από τη Lindström, (1998):  $S = 2 J / (N_A + N_B)$ , όπου  $J$  είναι ο αριθμός των κοινών ζωνών στην πηκτή DGGE ή ο αριθμός των κοινών περιοριστικών τμημάτων στα χρωματογραφήματα T-RFLP μεταξύ των δειγμάτων A και B, και  $N_A$  και  $N_B$  είναι ο αριθμός των ολικών ζωνών αντίστοιχα στα δείγματα A και B. Οι τιμές ομοιοτήτων που προέκυψαν από τις συγκεκριμένες μεθόδους χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή δένδρογραμμάτων χρησιμοποιώντας την ανάλυση κατάταξης που περιλαμβάνεται στο πρόγραμμα Primer 5.2.2.

Η στατιστική μέθοδος Ανάλυση Πρωταρχικών Συνιστωσών (principal component analysis - PCA) ακολουθήθηκε για την επεξεργασία των δεδομένων που ανακτήθηκαν με τις διάφορες μεθόδους. Η μέθοδος PCA εφαρμόστηκε με χρήση των λογισμικού πακέτου PRIMER 5.2.2 (Plymouth Routines In Multivariate Ecological Research). Ανάλογα με τις απαιτήσεις των επιμέρους κεφαλαίων χρησιμοποιήθηκαν είτε η ανάλυση κατάταξης είτε η ανάλυση πρωταρχικών συνιστωσών για την στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

### 3.1. Μελέτη των μικροβιακών κοινωνιών σε ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου με τεχνικές αποτύπωσης

Σκοπός του συγκεκριμένου Κεφαλαίου ήταν η σύγκριση της σύστασης των μικροβιακών κοινωνιών σε ένα μεγάλο εύρος ιζημάτων της Ανατολικής Μεσογείου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από το Θερμαϊκό Κόλπο, το Κρητικό Πέλαγος, το Νότιο Ιόνιο και τη Θάλασσα της Λεβαντίνης (Σχήμα 3.1.1) και εφαρμόστηκαν οι μοριακές τεχνικές γενετικής αποτύπωσης DGGE και T-RFLP, καθώς και η κλασική μέθοδος ανάλυσης των φωσφολιπιδίων. Στόχος μας ήταν η τελική επιλογή συγκεκριμένων δειγμάτων που παρουσιάζουν διαφοροποίηση σε ότι αφορά τη μικροβιακή τους σύσταση για την κατασκευή βιβλιοθηκών κλώνων. Η εφαρμογή της τελευταίας μεθόδου σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων αντενδείκνυται λόγω του ιδιαίτερα υψηλού κόστους και χρόνου ανάλυσης.



Σχήμα 3.1.1: Χάρτης σταθμών δειγματοληψίας.



### 3.1.1 Γεωχημικές παράμετροι

**Πίνακας 3.1.1:** Περιβαλλοντικές παράμετροι των επιφανειακών ιζημάτων.

Σταθμοί	Βάθος (m)	Eh (mV)	Χλωροφύλλη-α		Οργανικός άνθρακας		Φωσφολιπίδια ng/g	Πετρελαϊκοί H/C ng/g	κ-αλκάνια ng/g
			μg/g	stdev	%	stdev			
Therm-01	30	348	7.68	2.75	1.47	0.12	2261	17856	3313
Therm-10	41	292	4.95	0.70	1.04	0.02	1491	1479	387
Therm-17	55	416	4.64	0.39	0.97	0.02	2714	2892	1181
Therm-27	64	359	4.88	0.97	0.94	0.07	2294	846	234
Therm-38	51	405	3.02	0.27	1.01	0.04	1945	2001	1095
Therm-30	86	375	1.22	0.07	0.53	0.04	219	1516	399
Creta-1	100	nd	0.32	0.06	0.45	nd	623	670	147
Creta-2	617	nd	0.06	0.02	0.48	nd	524	939	105
Creta-3	1494	nd	0.02	0.00	0.42	nd	1238	449	130
S.Ionian-A	2790	303	0.05	0.02	0.79	0.07	129	1916	650
S.Ionian-B	2860	277	0.03	0.00	0.78	0.02	96	1876	617
Levan	1780	nd	0.01	0.00	0.38	nd	106	619	280

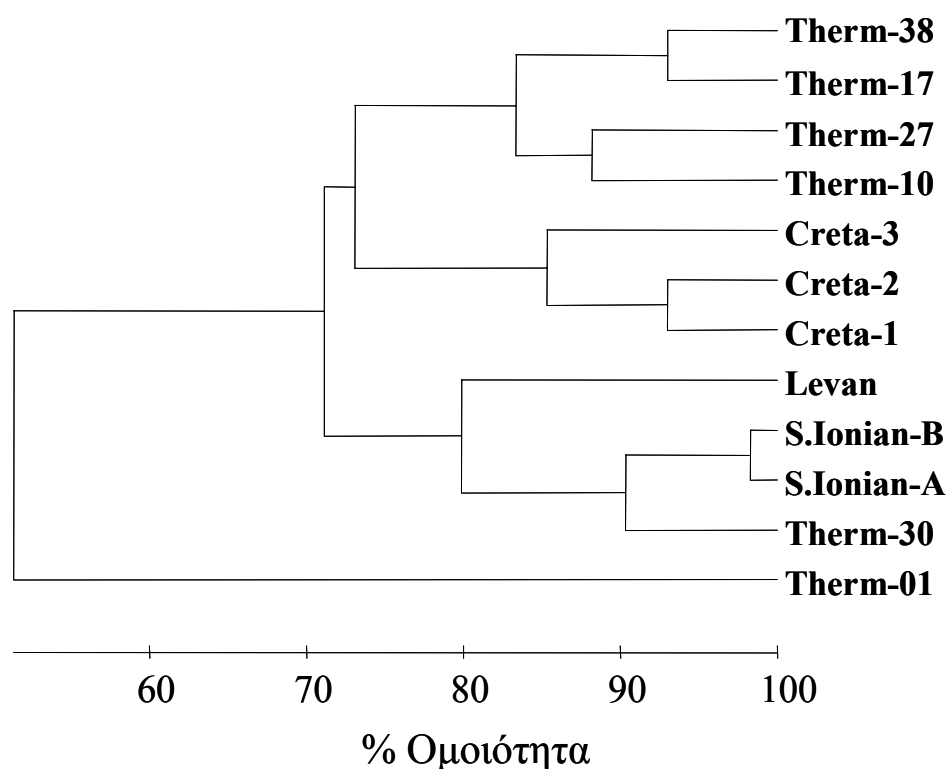
<sup>a</sup> nd: δεν έχουν προσδιοριστεί

stdev: τυπική απόκλιση

Οι γεωχημικές παράμετροι των ιζημάτων που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.1. Οι θετικές και ιδιαίτερα υψηλές τιμές οξειδοαναγωγικού δυναμικού (292-416 mV; Πίνακας 3.1.1), υποδεικνύουν ότι οι αερόβιες μεταβολικές διαδικασίες κυριαρχούν στις μικροβιακές κοινότητες. Οι συγκεντρώσεις χλωροφύλλης *a* και οργανικού άνθρακα διαφοροποιούνται από περιοχή σε περιοχή ενώ η μεταξύ τους συσχέτιση παρουσιάζεται σημαντική ( $r^2 = 0.79$ ,  $n=12$ ). Η συγκέντρωση χλωροφύλλης *a* ήταν υψηλότερη στα δείγματα από το Θερμαϊκό Κόλπο καθώς και στο ρηχό σταθμό του Κρητικού Πελάγους (βάθος  $\leq 100$  m) ενώ τα επίπεδα οργανικού άνθρακα παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές τους στο Θερμαϊκό Κόλπο και στους βαθείς σταθμούς του Νοτίου Ιονίου Πελάγους.

Οι συγκεντρώσεις φωσφολιπιδίων ήταν επίσης υψηλότερες στους ρηχούς σταθμούς του Θερμαϊκού Κόλπου ( $\leq 51$  m) με τιμές μεταξύ 1491 και 2714 ng g<sup>-1</sup> (Πίνακας 3.1.1). Οι συγκεντρώσεις φωσφολιπιδίων στο Κρητικό Πέλαγος κυμάνθηκαν από 524 έως 1238 ng g<sup>-1</sup> (Πίνακας 3.1.1) ενώ ιδιαίτερα χαμηλές τιμές (< 219 ng g<sup>-1</sup>) καταγράφηκαν στο Νότιο Ιόνιο, στην περιοχή της Λεβαντίνης καθώς και στο βαθύτερο σταθμό (86 m) του Θερμαϊκού Κόλπου (Πίνακας 3.1.1). Οι συγκεντρώσεις τόσο των πετρελαϊκών υδρογονανθράκων όσο και των κ-αλκανίων παρουσίασαν τις μέγιστες τιμές τους στον πιο ρηχό σταθμό του Θερμαϊκού Κόλπου. (Therm-01; 17856 ng g<sup>-1</sup> και 3313 ng g<sup>-1</sup> αντίστοιχα). Ο σταθμός αυτός βρίσκεται πολύ κοντά στην αστική περιοχή του κόλπου της Θεσσαλονίκης (Σχήμα 3.1.2) και χαρακτηρίζεται από έντονες ανθρωπογενείς επιρροές τόσο από το λιμάνι και την κοντινή βιομηχανική ζώνη της Θεσσαλονίκης όσο και από τις εκροές ποταμών που χρησιμοποιούνται για τη λειτουργία υδροηλεκτρικών σταθμών (Karageorgis and

Αναγνωστού, 2001). Οι συγκεντρώσεις των πετρελαϊκών υδρογονανθράκων και κ-αλκανίων στην περιοχή της Λεβαντίνης και στο Κρητικό Πέλαγος κυμάνθησαν από 449–939 ng g<sup>-1</sup> έως 105–280 ng g<sup>-1</sup> αντίστοιχα (Πίνακας 3.1.1).

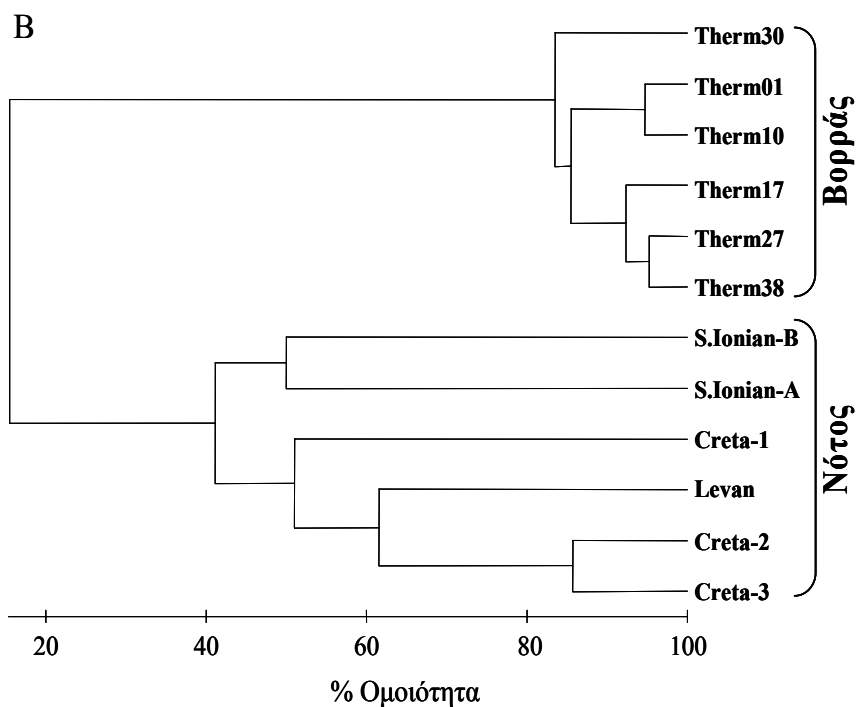
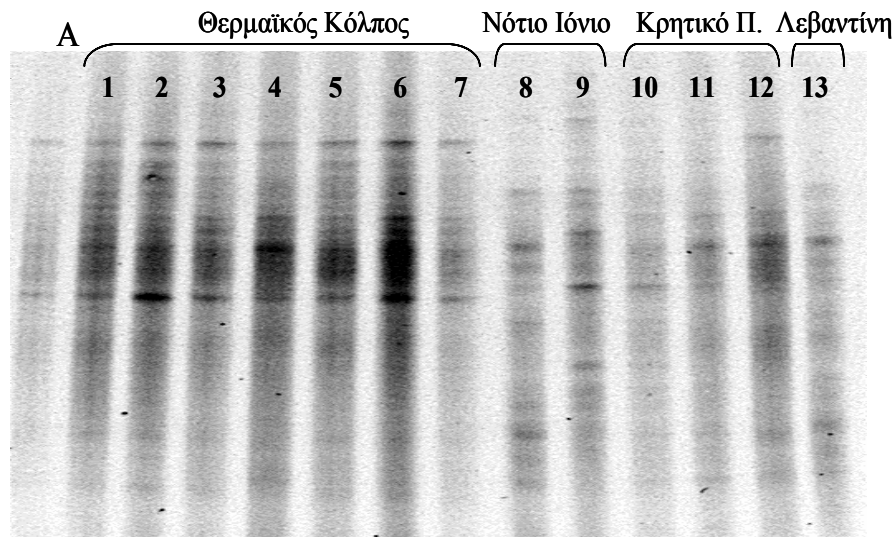


**Σχήμα 3.1.2:** Δενδρόγραμμα κατάταξης των σταθμών δειγματοληψίας βασισμένο στη σύγκριση των περιβαλλοντικών παραμέτρων (χλωροφύλλη α, οργανικός άνθρακας, φωσφολιπίδια, πετρελαϊκοί υδρογονάνθρακες (H/C), κ-αλκάνια).

Για τη σύγκριση των διαφορετικών περιβαλλοντικών παραμέτρων μεταξύ των δειγμάτων εφαρμόστηκε η μέθοδος ανάλυσης κατάταξης (hierarchical cluster analysis), τα αποτελέσματα της οποίας διαχωρίζουν το σταθμό Therm-01 από όλους τους υπόλοιπους σταθμούς. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή τα δείγματα που ομαδοποιούνται προέρχονται από το Κρητικό Πέλαγος και από το Νότιο Ιόνιο ενώ ο βαθύς σταθμός του Θερμαϊκού Κόλπου (Therm-30) διαχωρίζεται από τους πιο ρηχούς σταθμούς της συγκεκριμένης περιοχής (Σχήμα 3.1.2).

### 3.1.2 Ανάλυση των βακτηριακών κοινοτήτων βασισμένη στο γονίδιο 16S rRNA

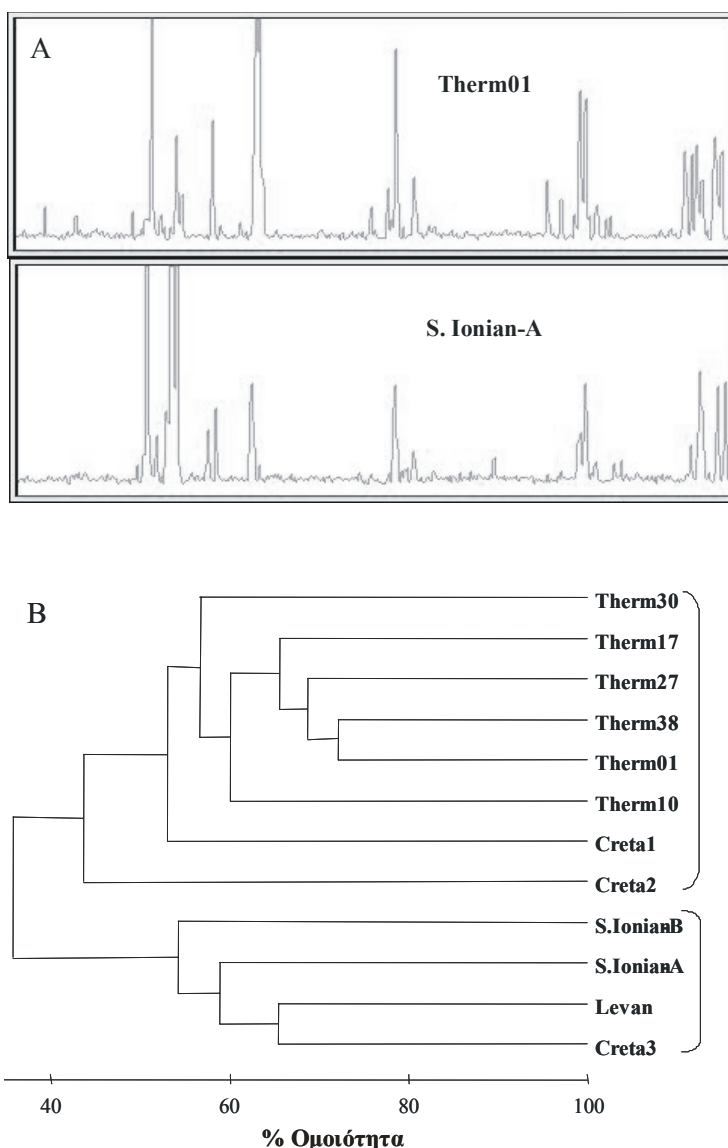
Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός τεχνικών που δεν βασίζονται στις καλλιέργειες αλλά στην γενετική ποικιλότητα γενετικών δεικτών (marker genes) όπως το γονίδιο του 16S rRNA (Amann et al., 1995). Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκαν οι μέθοδοι ανάλυσης DGGE και T-RFLP του γονιδίου 16S rRNA.



**Σχήμα 3.1.3:** Α) Φωτογραφία της πηκτής DGGE. 1-Therm01; 2-Therm10; 3-Therm17; 4-Therm30; 5-Therm38; 6-Therm27 7-αντίγραφο του Therm17; 8-S.Ionian-A; 9-S.Ionian-B; 10-Creta-3; 11-Creta-2; 12-Creta-1; 13, Levan. Β) Δενδρόγραμμα ανάλυσης κατάταξης βασισμένο στα δεδομένα DGGE.

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου γενετικής αποτύπωσης DGGE ελέγχθηκε με τη σύγκριση των μοντέλων απεικόνισης ζωνών πηκτής DGGE μεταξύ δύο δειγμάτων που συλλέχθηκαν από τον ίδιο σταθμό (Therm17; replicate samples). Η μεταξύ τους σύγκριση έδειξε ότι οι ευδιάκριτες ζώνες που εμφανίζονται στα δύο δείγματα (Σχήμα 3.1.3Α, κολώνες 3 και 7) παρουσιάζουν 75% ομοιότητα εφόσον 2 ζώνες απουσιάζουν από την κολώνα 7 λόγω της μικρότερης ποσότητας προϊόντος PCR που φορτώθηκε στην πηκτή DGGE. Με την ανάλυση αυτή, κάθε δείγμα εμφάνισε 5 με 11 ευδιάκριτες

ζώνες στην πηκτή DGGE (Σχήμα 3.1.3A). Οι βακτηριακές κοινότητες στους σταθμούς του Θερμαϊκού κόλπου παρουσιάζουν ομοιότητα 78% (Σχήμα 3.1.3B). Οι σταθμοί της Λεβαντίνης και του Κρητικού Πελάγους ομαδοποιούνται και διακρίνονται από τους επιβαρημένους σε πετρελαϊκούς υδρογονάνθρακες σταθμούς του Νοτίου Ιονίου, δηλώνοντας ότι τα επίπεδα πετρελαϊκών υδρογονανθράκων παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της σύστασης των βακτηριακών κοινοτήτων (Σχήμα 3.1.3B).



**Σχήμα 3.1.4:** (A) Χαρακτηριστικό πρότυπο κατανομής των δεδομένων T-RFLP του 16S rRNA με χρήση του ενζύμου *HhaI* ιζημάτων από την Ανατολική Μεσόγειο. (B) Δενδρόγραμμα ανάλυσης κατάταξης βασισμένο στην ομοιότητα των προτύπων κατανομής των T-RFLP με τα ένζυμα *HhaI* και *HaeIII*.

Είναι πολύ πιθανό, ο αριθμός των μεταβλητών rRNA σε κάθε κολώνα να είναι κατά πολύ μεγαλύτερος από τον αριθμό των 5 με 11 ευδιάκριτων ζωνών που παρατηρήσαμε. Η μέθοδος ανάλυσης βιβλιοθήκης κλώνων του γονιδίου 16S rRNA έδειξε ότι ο αριθμός των 16S rRNA τμημάτων ξεπερνάει τις 100 μεταβλητές (βλ.

Κεφάλαιο 3.2; Polymenakou et al., 2005b). Η διαφοροποίηση αυτή οφείλεται είτε στην αδυναμία της πηκτής DGGE να διαχωρίσει τα 16S rRNA τμήματα είτε στη μικρή ποσότητα PCR προϊόντος που είχε ως αποτέλεσμα κάποιες ζώνες να μην είναι ορατές με γυμνό μάτι.

Η εφαρμογή της μεθόδου ανάλυσης κατάταξης βασισμένη στην ομοιότητα των πρότυπων κατανομής των δεδομένων T-RFLP έδειξε ότι τα περιβαλλοντικά δείγματα κατατάσσονται με διαφορετικό τρόπο ανάλογα με το περιοριστικό ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε. Η χρήση του περιοριστικού ενζύμου *RsaI* είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός μικρού αριθμού (μέσος όρος 23) τελικών περιοριστικών τμημάτων (terminal restrictions fragments - TRFs) με πολύ μικρή επικάλυψη. Για το λόγο αυτό τα δεδομένα αυτά κρίθηκαν ως ανεπαρκή και δε χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση. Αντίθετα η χρήση των περιοριστικού ενζύμου *HaeIII* είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός μεγάλου αριθμού (μέσος όρος 71) τελικών περιοριστικών τμημάτων που καθιστούσαν όμως την περαιτέρω επεξεργασία των δεδομένων ιδιαίτερα δύσκολη και χρονοβόρα. Παρόμοια αποτελέσματα (ιδιαίτερα υψηλός αριθμός τμημάτων μετά από πέψη με το ένζυμο *HaeIII*) έχουν επίσης αναφερθεί σε προηγούμενη μελέτη (Clement et al., 1998). Η χρήση του τρίτου ενζύμου *HhaI* είχε ως αποτελέσματα την παραγωγή 15 και 51 περιοριστικών τμημάτων (μέσος όρος 33), αριθμός ιδιαίτερα ικανοποιητικός για την περαιτέρω επεξεργασία των δεδομένων.

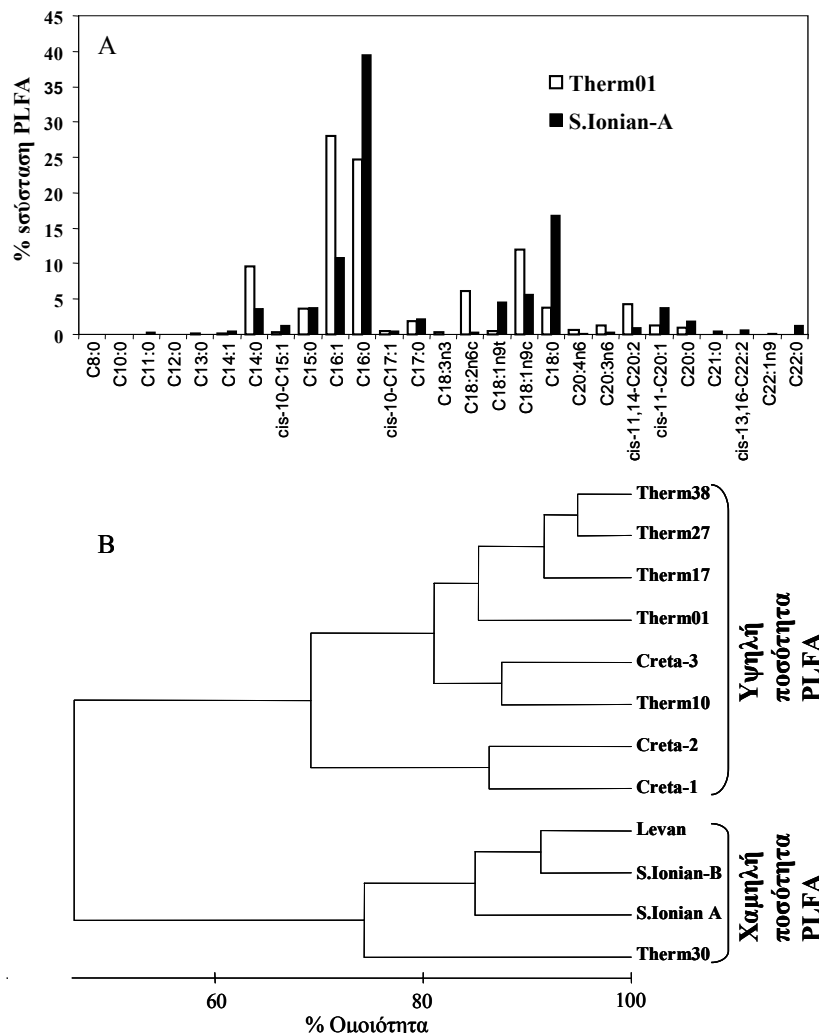
Με τη χρήση του ενζύμου *HaeIII* τα αποτελέσματα ανάλυσης κατάταξης ήταν παρόμοια με αυτά του ενζύμου *HhaI* (συντελεστής συσχέτισης μεταξύ των αποτελεσμάτων των ενζύμων *HhaI* και *HaeIII*:0.81;  $n = 12$  δείγματα;  $P < 0.001$ ). Η συσχέτιση αυτή επιβεβαιώνει την επαναληψιμότητα της μεθόδου T-RFLP. Τα δεδομένα ομοιότητας με τη χρήση και των δύο ενζύμων χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της μήτρας ομοιότητας (similarity matrix) που παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.1.4B.

Η μέθοδος ανάλυσης κατάταξης με τη μέθοδο γενετικής αποτύπωσης T-RFLP ομαδοποίησε τους σταθμούς με βάση το βάθος τους. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει όλους τους ρηχούς σταθμούς ( $\leq 617$  m βάθος) ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει τους σταθμούς των βαθιών δειγμάτων ( $\geq 1494$  m βάθος) (Σχήμα 3.1.4B).

### 3.1.3 Ανάλυση PLFA των μικροβιακών κοινωνιών

Η ανάλυση της σύστασης των φωσφολιπιδίων (PLFA) σε θαλάσσια ιζήματα παρέχει πολύ σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη δομή των μικροβιακών κοινωνιών

καθώς ορισμένα φωσφολιπίδια αποτελούν τα χαρακτηριστικά συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης συγκεκριμένων βακτηριακών ομάδων ενώ η ολική ποσότητα φωσφολιπιδίων αντιστοιχεί σε ποσότητα συνολικής μικροβιακής βιομάζας (Aries et al., 2001, White et al., 1998; White et al., 1997; Zhang, 2002).



**Σχήμα 3.1.5:** (A) Χαρακτηριστικά πρότυπα κατανομής των δεδομένων PLFA στα επιφανειακά ιζήματα δύο σταθμών δειγματοληψίας (Therm01, S.Ionian A). (B) Δενδρόγραμμα ανάλυσης κατάταξης των προτύπων κατανομής των PLFA.

Τα πιο άφθονα κορεσμένα λιπαρά οξέα ήταν τα C<sub>14:0</sub>, C<sub>15:0</sub>, C<sub>16:0</sub> και C<sub>18:0</sub> ενώ τα πιο άφθονα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα ήταν τα C<sub>15:1</sub>, C<sub>16:1</sub> και C<sub>18:1</sub> (Σχήμα 3.1.5A). Αντίθετα τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα ήταν σε ιδιαίτερα χαμηλές ποσότητες δηλώνοντας την ελάχιστη συνεισφορά των μικροευκαρυωτικών οργανισμών στη σύσταση της συνολικής ζωντανής μικροβιακής κοινότητας. Οι συγκεντρώσεις φωσφολιπιδίων κυμάνθηκαν από 96 έως 2294 ng g<sup>-1</sup> (ξηρού βάρους ιζήματος; Πίνακας 3.1.1) ενώ οι χαμηλότερες τιμές καταγράφηκαν στους τρεις βαθείς σταθμούς. Οι τιμές αυτές ήταν σχεδόν τρεις φορές μικρότερες από αντίστοιχες τιμές

φωσφολιπιδίων διαφορετικών περιβαλλόντων πιθανότατα λόγω των μικρών συγκεντρώσεων οργανικού άνθρακα (Bowman et al., 2003; Guezennec and Fiala-Medioni, 1996).

Τα επίπεδα συγκέντρωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων C<sub>20</sub> και C<sub>22</sub> (PUFA), τα οποία χρησιμοποιούνται ως δείκτες εύκολα αποικοδομήσιμου οργανικού υλικού (Bowman et al., 2003), κυμάνθηκαν από 28 έως 165 ng g<sup>-1</sup> για τους 5 ρηχούς σταθμούς του Θερμαϊκού Κόλπου καθώς και για όλους τους σταθμούς της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης. Αντίθετα, οι καταγεγραμμένες τιμές των παραπάνω οξέων στους βαθείς σταθμούς του Νοτίου Ιονίου καθώς και στο βαθύ σταθμό του Θερμαϊκού Κόλπου ήταν ιδιαίτερα χαμηλές και κοντά στο όριο ανίχνευσης (2.5 – 7.9 ng g<sup>-1</sup>; Πίνακας 3.1.1). Ανεξάρτητα από αυτές τις μικροδιαφορές, τα πρότυπα κατανομής των φωσφολιπιδίων δε διέφεραν ιδιαίτερα από σταθμό σε σταθμό (Σχήμα 3.1.5A). Επομένως, η μέθοδος ανάλυσης κατάταξης εφαρμόστηκε και σε αυτήν την περίπτωση με σκοπό το διαχωρισμό των περιβαλλοντικών δειγμάτων με βάση τόσο την ποσότητα όσο και τη σύσταση των φωσφολιπιδίων (Σχήμα 3.1.5B). Σύμφωνα με την ανάλυση αυτή, η ομοιότητα μεταξύ των σταθμών του Θερμαϊκού κόλπου παρουσιάζεται ιδιαίτερα υψηλή (95% ομοιότητα μεταξύ των σταθμών Therm27 και Therm38) ενώ η μικρότερη καταγράφηκε μεταξύ των σταθμών του Νοτίου Ιονίου και του Θερμαϊκού (31% ομοιότητα μεταξύ των σταθμών S.Ionian-B και Therm17) (Σχήμα 3.1.5B). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης κατάταξης των φωσφολιπιδίων διαχωρίζουν τους σταθμούς με βάση το βάθος τους και τη γεωγραφική τους θέση καθώς οι βαθείς σταθμοί στο Νότο χαρακτηρίζονται από χαμηλή μικροβιακή βιομάζα ενώ οι ρηχοί σταθμοί στο Βορρά από υψηλές ποσότητες φωσφολιπιδίων (Σχήμα 3.1.5B).

### 3.1.4 Σύγκριση των διαφορετικών μεθόδων αποτύπωσης και συσχέτιση με τις περιβαλλοντικές παραμέτρους

**Πίνακας 3.1.2:** Συντελεστές συσχέτισης Spearman με την ανάλυση 'Δεύτερου Σταδίου'. Οι τιμές P και Rho παρουσιάζονται με πλάγιους χαρακτήρες.

Συντελεστής συσχέτισης Spearman / P / Rho			
Ανάλυση 'Δεύτερου Σταδίου'	DGGE	T-RFLP	PLFA
Περιβαλλοντικές παράμετροι	<b>0.617</b> / <i>0.06/0.233</i>	<b>0.546</b> / <i>0.09/0.009</i>	<b>0.755</b> / <i>&lt;0.001/0.511</i>
DGGE		<b>0.760</b> / <i>&lt;0.001/0.519</i>	<b>0.617</b> / <i>0.06/0.233</i>
T-RFLP			<b>0.693</b> / <i>&lt;0.001/0.386</i>

Για να εξετάσουμε το βαθμό ομοιότητας των διαφορετικών μεθόδων αποτύπωσης DGGE, T-RFLP και PLFA μεταξύ τους καθώς και με τις περιβαλλοντικές παραμέτρους χρησιμοποιήσαμε τις εσωτερικές συσχετίσεις (inter-matrix correlations) ως βάση δεδομένων για την ανάλυση ομοιότητας ‘δεύτερου σταδίου’ (‘second stage’ analysis of similarity) (Πίνακας 3.1.2). Η συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων αποτύπωσης DGGE και T-RFLP που βασίζονται στην PCR ήταν ιδιαίτερα υψηλή (0.760,  $P < 0.001$ ; Πίνακας 3.1.2). Η μέθοδος αποτύπωσης PLFA συσχετίζεται σημαντικά με τις περιβαλλοντικές παραμέτρους (0.755,  $P < 0.001$ ; Πίνακας 3.1.2) καθώς και με τη μέθοδο T-RFLP (0.693,  $P < 0.001$ ; Πίνακας 3.1.2) ενώ αντίθετα οι συσχετίσεις μεταξύ των βιογεωχημικών παραμέτρων και των μεθόδων αποτύπωσης DGGE και T-RFLP δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (0.617,  $P < 0.06$  και 0.540,  $P < 0.09$  αντίστοιχα; Πίνακας 3.1.2).

**Πίνακας 3.1.3:** Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης BIOENV των μεθόδων αποτύπωσης DGGE, T-RFLP και PLFA. Στον πίνακα παρουσιάζονται επίσης οι υψηλότεροι συντελεστές συσχέτισης της κάθε μεθόδου με τις περιβαλλοντικές παραμέτρους.

	DGGE	T-RFLP	PLFA
<b>Ανάλυση 'BIOENV'</b>			
Μεταβλητή 1	<i>οργανικός άνθρακας</i>	<i>οργανικός άνθρακας</i>	<i>οργανικός άνθρακας</i>
Μεταβλητή 2	<i>χλωροφύλλη α</i>	<i>χλωροφύλλη α</i>	<i>χλωροφύλλη α</i>
Μεταβλητή 3	-	<i>βάθος</i>	<i>PLFA</i>
Υψηλότερος Συντελεστής Συσχέτισης	<b>0.747</b>	<b>0.820</b>	<b>0.983</b>

Σύμφωνα με τους Clarke και Ainsworth (1993), οι περιβαλλοντικές παράμετροι χρησιμοποιήθηκαν ως βάση δεδομένων για την ανάλυση BIOENV χωρίς καμιά περαιτέρω τροποποίηση. Ο υψηλότερος συντελεστής συσχέτισης Spearman με τα δεδομένα της μεθόδου DGGE ( $R=0.747$ ; Πίνακας 3.1.3) προέκυψε για τις μεταβλητές του οργανικού άνθρακα και της χλωροφύλλης α, ενώ το βάθος και η συγκέντρωση φωσφολιπιδίων προέκυψαν ως επιπλέον μεταβλητές από τη χρήση των μεθόδων T-RFLP και PLFA (Πίνακας 3.1.3). Τα αποτελέσματα αυτά τονίζουν τη σημασία της ποσότητας και ποιότητας του διαθέσιμου οργανικού υλικού στη ρύθμιση των μικροβιακών κοινωνιών.

### 3.1.5 Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια, έχουν αναπτυχθεί και εφαρμοστεί σε ένα μεγάλο αριθμό θαλασσιών ιζημάτων με σκοπό τη μελέτη των μικροβιακών κοινωνιών, ένας



σημαντικός αριθμός τεχνικών που δε βασίζονται στην καλλιέργεια. Οι τεχνικές αυτές δίνουν το πλεονέκτημα μελέτης των βακτηρίων που δεν μπορούν να καλλιεργηθούν με τις κλασικές τεχνικές αν και αποτελούν ένα πολύ μεγάλο ποσοστό της μικροβιακής κοινότητας (Amann and Ludwig, 2000; Amann et al., 1995; Koizumi et al., 2003). Η εφαρμογή των μεθόδων αποτύπωσης των μικροβιακών κοινωσιών, όπως αυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο για τη μελέτη των περιβαλλοντικών επιπτώσεων στη σύσταση των μικροβιακών κοινωσιών. Ο αριθμός των εργασιών που περιλαμβάνουν την παράλληλη εφαρμογή διαφορετικών τεχνικών αποτύπωσης είναι πολύ περιορισμένος (Balkwill et al., 1998; Bowman et al., 2003; Casamayor et al., 2002; Flynn et al., 2000; Massana and Jürgens, 2003; Moeseneder et al., 1999; Muyzer, 1999).

Στην παρούσα εργασία, εφαρμόσαμε τρεις διαφορετικές τεχνικές αποτύπωσης DGGE, T-RFLP και PLFA ανάλυση, με σκοπό να συγκρίνουμε τις μικροβιακές κοινότητες σε ένα μεγάλο αριθμό ιζημάτων από την Ανατολική Μεσόγειο που διαφέρουν ως προς τα περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά τους. Στις κατανομές των φωσφολιπιδίων, η μεγαλύτερη αφθονία των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, δηλώνει ότι τα αερόβια gram-αρνητικά βακτήρια κυριαρχούν στις μικροβιακές κοινότητες των ιζημάτων της Ανατολικής Μεσογείου (Guezennec and Fiala-Medioni, 1996). Το αποτέλεσμα αυτό είναι αναμενόμενο δεδομένου ότι τα ιζήματα που αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν οξικά με ιδιαίτερα υψηλές τιμές οξειδοαναγωγικού δυναμικού. Οι σχετικά χαμηλές ποσότητες φωσφολιπιδίων που καταγράφηκαν στους βαθείς σταθμούς πιθανότατα οφείλονται στη χαμηλή διαθεσιμότητα θρεπτικών αλάτων που γενικά χαρακτηρίζει την Ανατολική Μεσόγειο (Ignatiades, 1969; Krom et al., 1991; Tselipides et al., 2000) και που έχει ως συνέπεια την χαμηλή πρωτογενή παραγωγικότητα και κατά επέκταση την περιορισμένη αποθήκευση οργανικού υλικού στο ίζημα. Οι σταθμοί του Θερμαϊκού Κόλπου χαρακτηρίζονται από το μικρό τους βάθος, τις υψηλές τιμές χλωροφύλλης *a* και οργανικού άνθρακα που καταγράφηκαν σε σχέση με άλλες περιοχές και τις σχετικά υψηλές ποσότητες πετρελαϊκών υδρογονανθράκων. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης DGGE δηλώνουν ότι οι μικροβιακές κοινότητες αυτών των ιζημάτων του Θερμαϊκού Κόλπου διαφέρουν από όλες τις άλλες περιοχές. Επίσης, με την T-RFLP τεχνική οι τέσσερις πιο βαθείς σταθμοί (> 1494 m) ξεκάθαρα διαχωρίζονται από τους πιο ρηχούς. Ο λόγος για το διαφορετικό αποτέλεσμα της ανάλυσης κατάταξης μεταξύ των δύο μεθόδων δεν είναι προφανής. Μία πιθανή ερμηνεία είναι η περιορισμένη αναλυτική και διαχωριστική

ικανότητα της μεθόδου DGGE που έχει ως αποτέλεσμα τη παραγωγή μικρού αριθμού ζωνών σε αντίθεση με το μεγάλο αριθμό κορυφών που εμφανίζονται στα χρωματογραφήματα της τεχνικής T-RFLP (1.5–8 φορές μεγαλύτερος). Μία δεύτερη εναλλακτική ερμηνεία είναι η υψηλότερη διαχωριστική ικανότητα καθώς και ευαισθησία του οργάνου που είναι εξοπλισμένο με ανιχνευτή φθορισμού και χρησιμοποιείται για την τεχνική T-RFLP. Η υψηλή ευαισθησία του συγκεκριμένου οργάνου έχει ως αποτέλεσμα την ανίχνευση ριβότυπων χαμηλής αφθονίας που όμως δεν είναι δυνατό να γίνονται ορατοί με γυμνό μάτι στην πηκτή DGGE (Moeseneder et al., 1999).

Η ανάλυση κατάταξης των φωσφολιπιδίων (PLFA) ομαδοποίησε το βαθύ σταθμό από τον Θερμαϊκό Κόλπο (Therm 30) με τους βαθείς σταθμούς του Νοτίου Ιονίου και της Λεβαντίνης. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με την ανάλυση κατάταξης των περιβαλλοντικών παραμέτρων εφόσον και σε αυτήν την περίπτωση ο σταθμός Therm30 ομαδοποιείται με τους βαθείς σταθμούς του Νοτίου Ιονίου, της Λεβαντίνης και της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης. Η ομαδοποίηση αυτή πιθανότατα οφείλεται στα χαμηλά επίπεδα χλωροφύλλης *a*, οργανικού άνθρακα και ολικών φωσφολιπιδίων που μετρήθηκαν στα ιζήματα αυτά.

Η συγκεκριμένη διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε στο σταθμό Therm30 ως προς τους υπόλοιπους σταθμούς του Θερμαϊκού Κόλπου πιθανότατα οφείλεται στην γεωμορφολογική πολυπλοκότητα και τοπογραφία της περιοχής (Karageorgis and Anagnostou, 2001; Poulos et al., 2000). Τα ιζήματα της συγκεκριμένης περιοχής αποτελούνται κυρίως από σωματίδια πολύ μικρής διαμέτρου (κυρίως λασπώδης) ενώ όσο μετακινούμαστε προς τα Ανατολικά (σταθμός Therm30) η περιεκτικότητα σε χοντρόκοκκο υλικό αυξάνεται και η άμμος αποτελεί το κυρίαρχο συστατικό των ιζημάτων (> 70 %) τα οποία είναι πλούσια σε βαρέα μέταλλα (Karageorgis and Anagnostou, 2001).

Η υφαλοκρηπίδα της Κρήτης, χαρακτηρίζεται επίσης από πολύπλοκη γεωμορφολογία και κυρίαρχες υδρογραφικές συνθήκες (Chronis et al., 2000; Tselepides et al., 2000). Ο σταθμός Creta-1 βρίσκεται στην αρχή της υφαλοκρηπίδας ενώ οι σταθμοί Creta-2 και Creta-3 βρίσκονται στην απότομη πλαγιά και στη βάση της υφαλοκρηπίδας, αντίστοιχα. Ο σταθμός Creta-3, επίσης, λόγω της τοπογραφίας του είναι σχετικά απομακρυσμένος από χερσαίες επιρροές (Chronis et al., 2000; Gogou et al., 2000; Tselepides et al., 2000). Η κυκλοφορία των υδάτων στο Κρητικό Πέλαγος χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός διπόλου (με αντικυκλώνα στα

Δυτικά και κυκλώνα στα Ανατολικά) το οποίο λειτουργεί σαν αντλία για τη μεταφορά βαθύτερων στρωμάτων νερού προς την επιφάνεια. Ταυτόχρονα, οι θαλάσσιες αυτές μάζες μεταφέρονται προς την υφαλοκρηπίδα της Κρήτης και επηρεάζουν τις βενθικές κοινωνίες κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού (την εποχή όπου τα δείγματα συλλέχθηκαν) (Baloroulos et al., 1999; Tselipides et al., 2000). Οι γεωγραφικές διαφορές των τριών σταθμών της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης σε συνδυασμό με τα πολύπλοκα υδρογραφικά φαινόμενα που επικρατούν στην περιοχή (Tselipides et al., 2000), μπορούν να εξηγήσουν την παρατηρούμενη διακύμανση στη σύσταση των μικροβιακών κοινωνιών (Σχήματα 3.1.3, 3.1.4, 3.1.5) ανεξάρτητα από την περιορισμένη γεωγραφική κατανομή αυτών των σταθμών (Σχήμα 3.1.1). Τα αποτελέσματα των μεθόδων ανάλυσης κατάταξης τόσο των βιογεωχημικών παραμέτρων όσο και των συγκεντρώσεων των φωσφολιπιδίων τοποθετούν όλους τους σταθμούς της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης μαζί με τους παράκτιους σταθμούς του Θερμαϊκού Κόλπου. Αντίθετα η ανάλυση DGGE ομαδοποιεί τους σταθμούς της Κρήτης με τους σταθμούς του Νοτίου Ιονίου και της Λεβαντίνης. Φυσικά, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο η εποχή της δειγματοληψίας να παίζει σημαντικό ρόλο στη κατανομή των μικροβιακών κοινωνιών καθώς επίσης και στις διακυμάνσεις των βιοχημικών χαρακτηριστικών των ιζημάτων. Εντούτοις, ο παράγοντας εποχή δε θεωρείται ιδιαίτερα σημαντικός στις περιπτώσεις των βαθιών σταθμών της Λεβαντίνης, του Νοτίου Ιονίου και της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης (χειμώνας) καθώς και στο ρηχό σταθμό της Κρήτης (καλοκαίρι).

Οι συντελεστές συσχέτισης που υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ανάλυσης BIOENV ήταν ιδιαίτερα υψηλοί δηλώνοντας ότι οι μικροβιακές κοινωνίες συσχετίζονται σημαντικά με τις μετρούμενες περιβαλλοντικές παραμέτρους (Πίνακας 3.1.3). Μεταξύ αυτών, ο συνδυασμός των επιπέδων οργανικού άνθρακα και χλωροφύλλης *a* φαίνεται ότι παίζει το μέγιστο ρόλο στη ρύθμιση των βακτηριακών κοινωνιών εφόσον όλες οι διαφορετικές τεχνικές αποτύπωσης παρουσίαζαν τις υψηλότερες συσχετίσεις όταν οι περιβαλλοντικές παράμετροι περιλαμβάνονταν στην ανάλυση. Επιπλέον το βάθος (T-RFLP) και η μικροβιακή βιομάζα (PLFA) φαίνεται να συνεισφέρουν κατά ένα βαθμό στην ρύθμιση των βακτηριακών κοινωνιών.

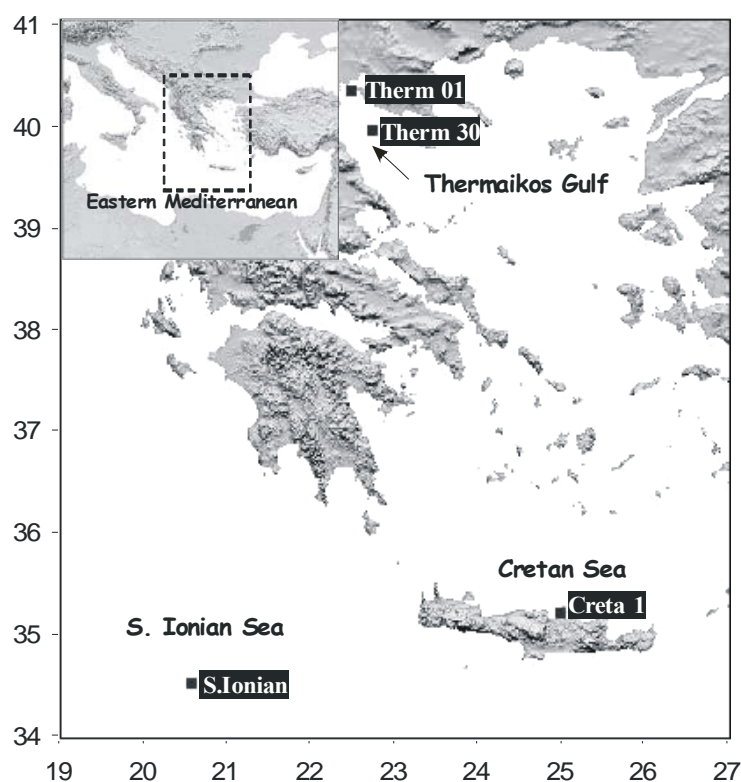
Όλες οι μέθοδοι αποτύπωσης που εφαρμόζονται ως τώρα για την μελέτη των μικροβιακών κοινωνιών έχουν και τα μειονεκτήματά τους αναφορικά με την ανίχνευση όλων των συστατικών που υπάρχουν στις πολύπλοκες βακτηριακές κοινωνίες στη φύση. Με την παρούσα εργασία, δείξαμε ότι η χρήση μίας και μόνο

τεχνικής αποτύπωσης για την συγκριτική μελέτη των βακτηριακών κοινωνιών μεταξύ διαφορετικών ζημάτων είναι ανεπαρκής εφόσον διαφορετικές τεχνικές μπορούν να δώσουν και διαφορετικά αποτελέσματα. Δεν μπορούμε να πούμε με βεβαιότητα ποια από τις τεχνικές που εφαρμόσαμε στην παρούσα εργασία (DGGE, T-RFLP, PLFA) αποτελεί την πιο ασφαλή λύση για την περιγραφή πολύπλοκων βενθικών βακτηριακών κοινωνιών. Εντούτοις δείξαμε ότι η παράλληλη εφαρμογή διαφορετικών τεχνικών μπορεί να προσφέρει πολύτιμες και πιο ασφαλείς πληροφορίες στη μελέτη της σύστασης των μικροβιακών κοινωνιών.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

### 3.2 Μελέτη της σύστασης των μικροβιακών κοινοτήτων με ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η μελέτη της σύστασης των βακτηριακών κοινοτήτων με την κατασκευή βιβλιοθηκών κλώνων του γονιδίου 16S rRNA. Με βάση τα αποτελέσματα της προηγούμενης εργασίας επιλέχθηκαν οι σταθμοί Therm01, Therm30, Creta-1 και S.Ionian-A (Σχήμα 3.2.1). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των τεχνικών αποτύπωσης DGGE, T-RFLP και PLFA οι περιοχές του Θερμαϊκού Κόλπου, του Νοτίου Ιονίου και της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης παρουσιάζουν διαφοροποίηση σε ότι αφορά τη μικροβιακή τους σύσταση ενώ οι σταθμοί εντός του Θερμαϊκού Κόλπου (Therm01 και Therm30) είναι αρκετά όμοιοι. Οι τελευταίοι δύο σταθμοί επιλέχθηκαν για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα ομοιότητας μεταξύ των σταθμών του Θερμαϊκού Κόλπου του Κεφαλαίου 3.1.



Σχήμα 3.2.1: Χάρτης σταθμών δειγματοληψίας.

#### 3.2.1 Γενικά

Οι σταθμοί που επιλέχθηκαν για τη συγκεκριμένη μελέτη παρουσιάζουν πολλές διαφορές στις περιβαλλοντικές παραμέτρους τους (Σχήμα 3.2.1; Πίνακες 3.2.1, 3.2.2). Τα βάθη των σταθμών δειγματοληψίας κυμαίνονται από 30-100 m για τον Θερμαϊκό

Κόλπο και την υφαλοκρηπίδα της Κρήτης ενώ το δείγμα από το Νότιο Ιόνιο συλλέχθηκε από το βάθος των 2790 m. Οι συγκεντρώσεις χλωροφύλλης *a*, οργανικού άνθρακα, πετρελαϊκών υδρογονανθράκων (H/C) και κ-αλκανίων ήταν υψηλότερες στο σταθμό Therm01 (7.68  $\mu\text{g g}^{-1}$ , 1.47 %, 17.86  $\mu\text{g g}^{-1}$  και 3.31  $\mu\text{g g}^{-1}$  αντίστοιχα) ενώ οι χαμηλότερες τιμές καταγράφηκαν στον σταθμό Creta-1 (0.32  $\mu\text{g g}^{-1}$ , 0.45 %, 0.67  $\mu\text{g g}^{-1}$  και 0.15  $\mu\text{g g}^{-1}$ , αντίστοιχα) (Πίνακας 3.2.1).

**Πίνακας 3.2.1:** Περιβαλλοντικοί παράμετροι των σταθμών δειγματοληψίας.

	<b>Therm01</b>	<b>Therm30</b>	<b>Creta1</b>	<b>S.Ionian</b>
<b>Περιοχή</b>	Θερμαϊκός Κόλπος	Θερμαϊκός Κόλπος	Κρητικό Πέλαγος	Νότιο Ιόνιο
<b>Χαρακτηρισμός</b>	ρηχός μεσότροφος	ρηχός μεσότροφος	ρηχός ολιγότροφος	βαθύς ολιγότροφος
<b>Χλωροφύλλη-<i>a</i> (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>	7.68 ± 2.75	1.22 ± 0.07	0.32 ± 0.06	0.05 ± 0.001
<b>Οργανικός άνθρακας (%)</b>	1.47 ± 0.12	0.53 ± 0.04	0.45 ± 0.06	0.79 ± 0.07
<b>Πετρελαϊκοί H/C (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>	17.86	1.52	0.67	1.92
<b>κ-αλκάνια (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>	3.31	0.39	0.15	0.65
<b>φωσφολιπίδια (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>	2.26	0.22	0.62	0.13

### 3.2.2 Ταξινομικές ομάδες και η κατανομή τους

**Πίνακας 3.2.2:** Σύγκριση μεταξύ του αριθμού των κλώνων, του αριθμού των φυλοτύπων, της εκτιμώμενης αφθονίας της αλληλουχίας και της κάλυψης μεγάλων βιβλιοθηκών κλώνων 16S rDNA για βακτήρια ιζημάτων. Τα βάθη των ιζημάτων, ο αριθμός των διαφορετικών δειγμάτων, η διαδικασία αποτύπωσης RFLP, η αφθονία των ειδών Chao-1 και η κάλυψη των βιβλιοθηκών παρουσιάζονται στον πίνακα. Η κάλυψη υπολογίστηκε διαιρώντας τον αριθμό των μοναδικών φυλοτύπων που βρέθηκαν με την τεχνική RFLP προς τον ολικό αριθμό αφθονίας ειδών που υπολογίστηκε με τη διαδικασία Chao-1.

Περιοχή δειγματοληψίας	Βάθος	Αριθμός σταθμών	Αριθμός κλώνων	Αριθμός φυλοτύπων	Περιοριστικά ένζυμα	Αφθονία ειδών	% Κάλυψη	Πηγή δεδομένων
<i>Παρούσα μελέτη</i>								
<b>Θερμαϊκός Κόλπος-Therm01</b>	30 m	1	94	80	HhaI/HaeIII	440	18.2	παρούσα μελέτη
<b>Θερμαϊκός Κόλπος-Therm30</b>	86 m	1	190	165	HhaI/HaeIII	958	17.2	παρούσα μελέτη
<b>Κρητικό Π.-Creta1</b>	100 m	1	190	152	HhaI/HaeIII	478	31.8	παρούσα μελέτη
<b>Νότιο Ιόνιο-S.Ionian</b>	2790 m	1	190	171	HhaI/HaeIII	1306	13.1	παρούσα μελέτη
<i>Προηγούμενες μελέτες</i>								
<b>Continental Shelf, Antarctica</b>	761 m	3	1046	496	-	4350	~22.6-35.6	Bowman, 2003
<b>E. Antarctica, Vestfolds Hills</b>	παράκτια	6	555	202	NciI/RsaI/HinI	-	~15-36	Bowman, 2000
<b>Arctic Ocean, Spitsbergen</b>	παράκτια	1	353	140	HaeIII	-	71.95	Ravenschlag, 1999
<b>Deep Sea sediments</b>	1159-6379 m	7	149	75	RsaI/MspI	-	-	Li, 1999
<b>French Guiana, S. America</b>	παράκτια	1	96	63	HinI/HaeIII/DdeI/HhaI	-	-	Madrid, 2001
<b>Sagami Bay, Japan</b>	1159 m	1	77	57	HhaI/RsaI/HaeIII	~126	45	Urakawa, 1999
<b>Sagami Bay, Japan</b>	1516 m	1	62	17	HhaI/RsaI/HaeIII	~21	84	Urakawa, 1999
<b>Tokyo Bay, Japan</b>	43 m	1	58	21	HhaI/RsaI/HaeIII	~29	74	Urakawa, 1999

Και οι τέσσερις βακτηριακές βιβλιοθήκες κλώνων 16S rDNA χαρακτηρίζονται από υψηλή ποικιλότητα και περιλαμβάνουν νουκλεοτιδικές αλληλουχίες στενά

συνδεδεμένες με τις πιο γνωστές κλάσεις και τα πιο διαδεδομένα φύλα που έχουν αναφερθεί στα ιζήματα (Πίνακας 3.2.3). Μεταξύ των 207 βακτηριακών 16S rDNA αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν για φυλογενετική ανάλυση, το 37% παρουσίασαν 92% ομοιότητα με βακτηριακά στελέχη που μπορούν να καλλιεργηθούν. Οι υπόλοιποι 131 κλώνοι δεν συνδέονταν στενά με βακτηριακά στελέχη που μπορούν να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο (< 97% ομοιότητα αλληλουχιών). Η σύγκριση των 207 αλληλουχιών ανά ζεύγη έδειξε υψηλή ετερογένεια καθώς 153 από τις αλληλουχίες εμφάνισαν ομοιότητα < 86% με οποιαδήποτε από τις 206 αλληλουχίες ή με οποιαδήποτε από τις αλληλουχίες που έχουν δημοσιευτεί στη βάση δεδομένων Genbank. Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι η πλειοψηφία των αλληλουχιών ομαδοποιούνταν κυρίως με *Gamma-*, *Alpha-*, και *Delta- Proteobacteria*, *Holophaga / Acidobacteria*, *Planctomycetales*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia* καθώς και με την υποψήφια ομάδα OP8 (candidate division OP8). Επίσης, ένας περιορισμένος αριθμός κλώνων (<4 ανά ομάδα) ήταν στενά συνδεδεμένος με *Betaproteobacteria*, *Nitrospirae*, *Chloroflexi* (green non sulfur bacteria), *Spirochaetales*, *Chlamydiae*, *Firmicutes* και με την υποψήφια ομάδα OP11 (candidate division OP11). Εφτά κλώνοι δεν συνδέονταν με καμία από τις γνωστές βακτηριακές ομάδες (Σχήμα 3.2.2).

**Πίνακας 3.2.3:** Κατανομή των 16S rDNA φυλοτύπων για τις βιβλιοθήκες κλώνων των ιζημάτων Therm01, Therm30, Creta1 και S.Ionian και υπολογισμοί για όλη την Ανατολική Μεσόγειο.

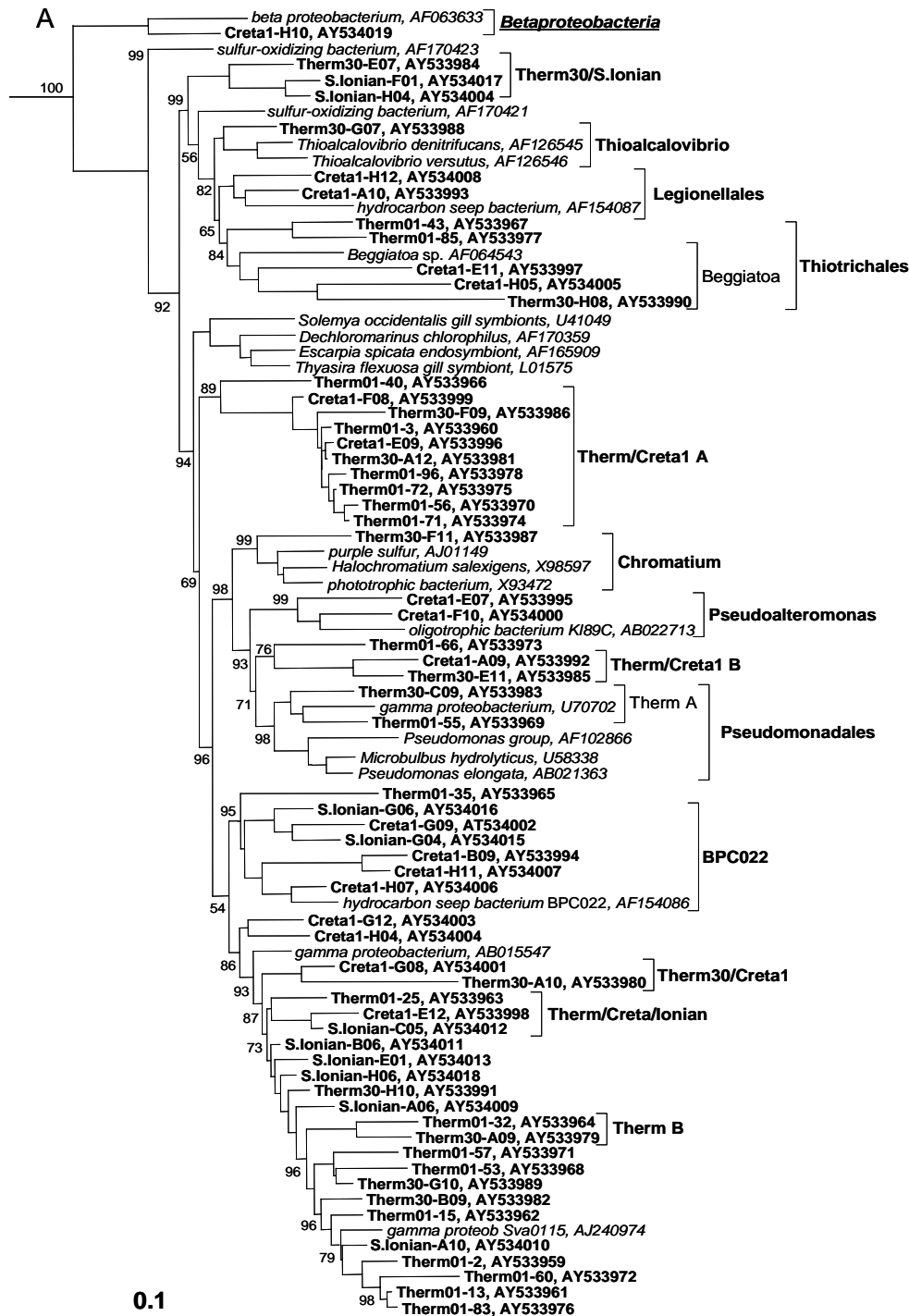
Ταξινόμικές ομάδες	% φυλοτύπων στις βιβλιοθήκες κλώνων				υπολογισμοί για όλες τις βιβλιοθήκες Ανατολική Μεσόγειος
	Therm01	Therm30	Creta1	S.Ionian	
<i>Beta- Gamma- Proteobacteria</i>	31.7	28.9	36.7	20.0	29.5
<i>Deltaproteobacteria</i>	23.8	17.8	12.2	12.0	16.9
<i>Acidobacteria</i>	11.1	15.6	12.2	24.0	15.5
<i>Planctomycetes</i>	7.9	13.3	10.2	14.0	11.1
<i>Alphaproteobacteria</i>	3.2	8.9	8.2	4.0	5.8
<i>Bacteroidetes</i>	4.8	4.4	2.0	2.0	3.4
<i>Actinobacteria</i>	3.2	4.4	2.0	4.0	3.4
<i>Verrucomicrobia</i>	0.0	2.2	6.1	4.0	2.9
Green nonsulfur bacteria	3.2	0.0	0.0	4.0	1.9
<i>Nitrospira</i>	0.0	0.0	6.1	2.0	1.9
<i>Chlamydiae</i>	0.0	2.2	2.0	0.0	1.0
<i>Firmicutes</i>	1.6	0.0	0.0	0.0	0.5
<i>Spirochaetes</i>	1.6	0.0	0.0	0.0	0.5
OP8 group	1.6	0.0	2.0	2.0	1.5
OP11 group	3.2	0.0	0.0	0.0	1.0
Nonaffiliated groups	3.2	2.2	0.0	8.0	3.4

Τα *Gamma*proteobacteria ήταν τα πιο άφθονα μεταξύ και των τεσσάρων βιβλιοθηκών κλώνων αντιπροσωπεύοντας το 31.7, 28.9, 36.7 και 20% του συνολικού αριθμού των κλώνων για τις βιβλιοθήκες Therm01, Therm30, Creta1 και S.Ionian, αντίστοιχα (Πίνακας 3.2.3). 13 αλληλουχίες συνδέονταν στενά με γνωστές

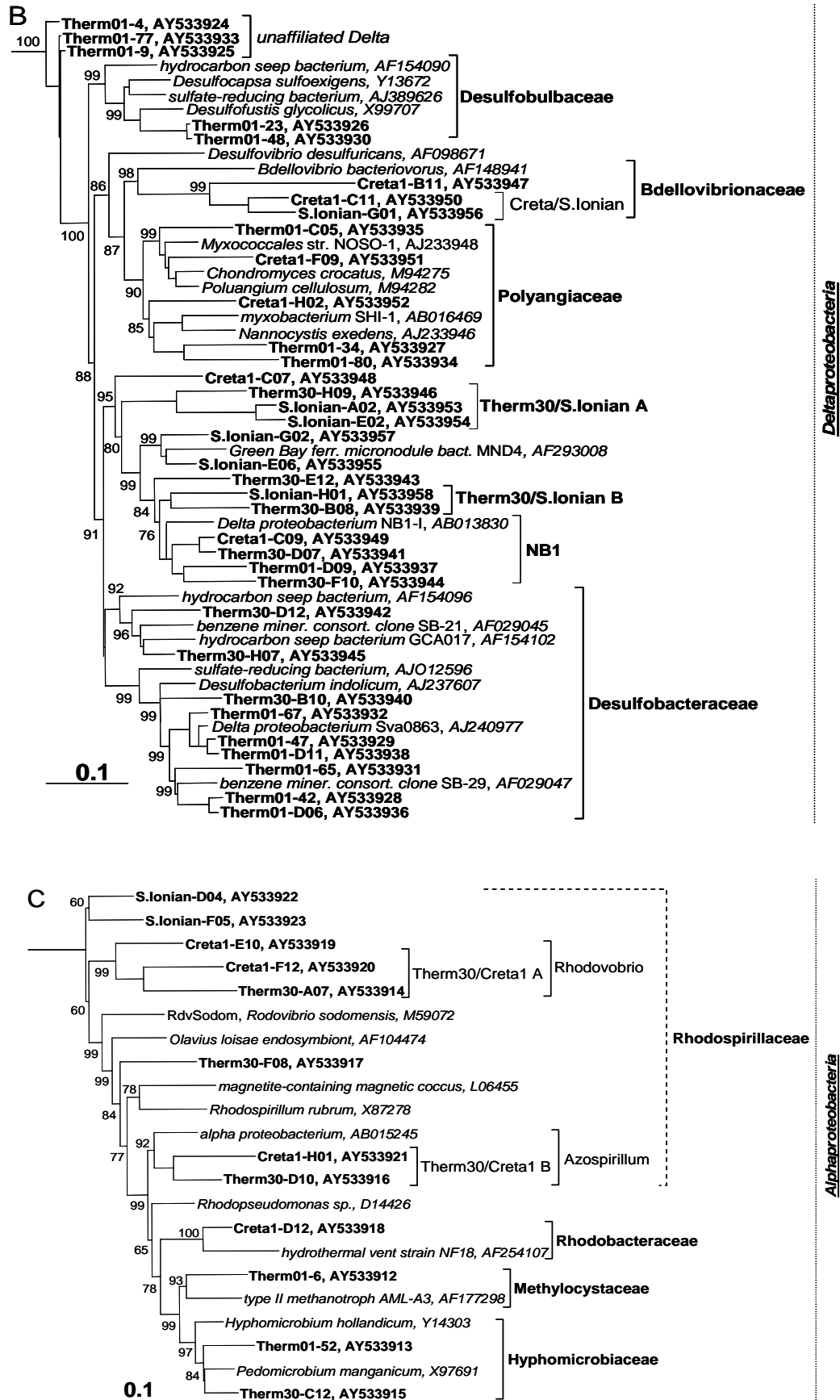
φυλογενετικές ομάδες που περιέχουν αντιπροσώπους με δυνατότητα καλλιέργειας στο εργαστήριο όπως *Thioalcalovibrio*, *Legionellales*, *Thiotrichales*, *Chromatium*, *Pseudoalteromonas* και *Pseudomonadales* (Σχήμα 3.2.2). 27 αλληλουχίες ομαδοποιούνταν σε ομάδες με άλλες αλληλουχίες που προήλθαν με μεθόδους που δεν βασίζονται στις καλλιέργειες (Σχήμα 3.2.2; Πίνακας 3.2.3). Αλληλουχίες που συνδέονταν στενά με τις φυλογενετικές ομάδες *Legionellales* και *Pseudoalteromonas* βρέθηκαν μόνο στη βιβλιοθήκη από την υφαλοκρηπίδα της Κρήτης, ενώ οι ομάδες *Thioalcalovibrio* και *Chromatium* βρέθηκαν μόνο στη βιβλιοθήκη κλώνων Therm30. Η βιβλιοθήκη κλώνων που κατασκευάστηκε από το βαθύ σταθμό του Νοτίου Ιονίου δεν περιείχε αλληλουχίες στενά συνδεδεμένες με γνωστές φυλογενετικές ομάδες που περιέχουν αντιπροσώπους με δυνατότητα καλλιέργειας στο εργαστήριο (Σχήμα 3.2.2). Οι αλληλουχίες που ομαδοποιούνταν με *Thioalcalovibrio* ήταν στενά συνδεδεμένες με τα γνωστά βακτηριακά στελέχη *Thioalcalovibrio denitrificans* και *Thioalcalovibrio versutus* που διαθέτουν την ικανότητα να οξειδώνουν θείο (sulfur-oxidizers). Επίσης οι αλληλουχίες που συνδέονταν με την φυλογενετική ομάδα *Legionellales* καθώς και με την ομάδα BPC022 σχετίζονται με αλληλουχίες που προέρχονταν από ιζήματα πλούσια σε υδρογονάνθρακες (Σχήμα 3.2.2). Τα μέλη της ομάδας *Thiotrichales* συνδέονταν στενά με το βακτηριακό στέλεχος *Beggiatoa* sp., ενώ μόνο ένας κλώνος ανήκε στην ομάδα *Betaproteobacteria* (Σχήμα 3.2.2).

Ένα ποσοστό 16.9% των κλώνων συνδεόταν στενά με την ομάδα *Deltaproteobacteria* και ομαδοποιούταν κυρίως σε 4 οικογένειες (*Desulfobulbaceae*, *Bdellovibrionaceae*, *Polyangiaceae* και *Desulfobacteraceae*) που περιέχουν αντιπροσώπους με δυνατότητα καλλιέργειας (Σχήμα 3.2.2; Πίνακας 3.2.3). Τρεις αλληλουχίες που ήταν στενά συνδεδεμένες μεταξύ τους από την βιβλιοθήκη Therm01 αναγνωρίστηκαν ως *Deltaproteobacteria* αλλά δεν συνδέονταν στενά με καμία γνωστή φυλογενετική ομάδα. Χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων Genbank βρήκαμε ότι ο πιο συγγενής εκπρόσωπος (94% ομοιότητα) ήταν ο ακαλλιέργητος κλώνος *Deltaproteobacterium* Sva0103 που έχει προέλθει από βιβλιοθήκη ιζήματος της Αρκτικής (Phillips et al., 1999). Μία ομάδα (Creta/S.Ionian) παρατηρήθηκε μέσα στην φυλογενετική ομάδα *Bdellovibrionaceae* με ομοιότητα μεταξύ των αλληλουχιών 93%. Τρεις επιπλέον ομάδες με ομοιότητες μεταξύ των αλληλουχιών μεγαλύτερες από 86% (Therm30/S.Ionian A, Therm30/S.Ionian B, NB1) παρατηρήθηκαν επίσης να σχετίζονται με τις φυλογενετικές ομάδες *Polyangiaceae* και *Desulfobacteraceae* (Σχήμα 3.2.2; Πίνακας 3.2.3).



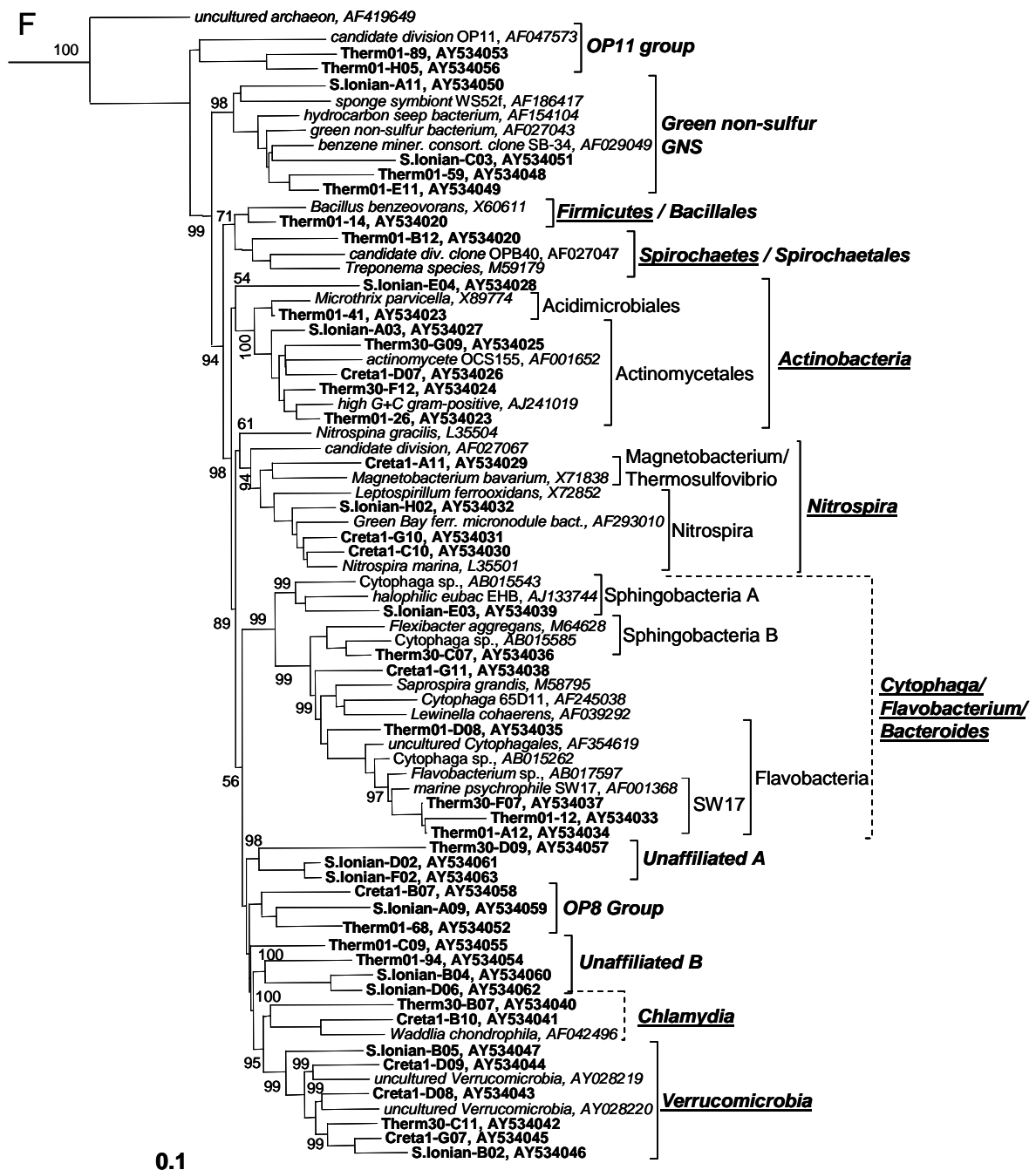


**Σχήμα 3.2.2:** Φυλογενετικό δέντρο μέγιστης πιθανότητας 16S rDNA όπου φαίνονται οι θέσεις των φυλοτύπων που συνδέονται με A) *Beta-* και *Gamma- Proteobacteria*, B) *Deltaproteobacteria*, C) *Alphaproteobacteria*, D) *Holophaga/Acidobacteria*, E) *Planctomycetales* και F) *Green nonsulfur bacteria*, *Firmicutes*, *Spirochaetales*, *Actinobacteria*, *Nitrospirae*, *Bacteroidetes*, *Chlamydiae*, *Verrucomicrobia*, τις υπονήφιες ομάδες OP8 and OP11 των βιβλιοθήκων κλώνων (*Therm01*, *Therm30*, *Creta1* και *S.Ionian*) που κατασκευάστηκαν από ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου. Οι τιμές στις διακλαδώσεις δηλώνουν την αυτοδυναμία των ομάδων. Τιμές κάτω του 50% δεν παρουσιάζονται στο σχήμα. Η αναλογία 0.1 δηλώνει 10% διαφορά νουκλεοτιδίου ανά μία θέση 16S rRNA.



Σχήμα 3.2.2: Συνέχεια.





Σχήμα 3.2.2: Συνέχεια

Οι αλληλουχίες που ομαδοποιούνται με την φυλογενετική ομάδα *Desulfobulbaceae* συνδέονται στενά με βακτήρια που προέρχονται από περιβάλλοντα πλούσια σε υδρογονάνθρακες καθώς και με τα βακτηριακά στελέχη *Desulfocapsa sulfoxigens* και *Desulfofustis glycolicus*. Επίσης, αρκετές από τις αλληλουχίες συνδέονται στενά με βακτήρια που διαθέτουν την ικανότητα να ανάγουν θείο. Οι εκπρόσωποι της οικογένειας *Desulfobacteraceae* που προέρχονται από τις βιβλιοθήκες του Θερμαϊκού Κόλπου, συνδέονται στενά με βακτήρια που

προέρχονταν από περιβάλλοντα πλούσια σε υδρογονάνθρακες, με βακτήρια που διαθέτουν ικανότητα στοιχειοποίησης του βενζολίου καθώς και με το βακτηριακό στέλεχος *Desulfobacterium indolicum* (Σχήμα 3.2.2).

Ένα ποσοστό 5.8% των συνολικών 207 κλώνων συνδεόταν στενά με τα *Alphaproteobacteria* (Πίνακας 3.2.3). Οι περισσότεροι από τους κλώνους ομαδοποιούνταν σε τέσσερις οικογένειες (Σχήμα 3.2.2). Όλοι οι σταθμοί δειγματοληψίας με εξαίρεση τον πιο παραγωγικό σταθμό του Θερμαϊκού Κόλπου (Therm01: Πίνακας 3.2.1) περιείχαν αλληλουχίες στενά συνδεδεμένες με την οικογένεια *Rhodospirillaceae* ενώ 5 κλώνοι ομαδοποιούνταν στα χαρακτηριστικά γένη *Rhodovibrio* και *Azospirillum* της οικογένειας αυτής (Σχήμα 3.2.2). Οι περισσότεροι από τους υπόλοιπους κλώνους ομαδοποιούνταν με τις οικογένειες *Hyphomicrobiaceae*, *Rhodobacteraceae* και *Methylocystaceae* (Σχήμα 3.2.2).

Ο αριθμός των αλληλουχιών που συνδεόταν με τη φυλογενετική ομάδα *Holophaga/Acidobacteria* ήταν ιδιαίτερα υψηλός και στις τέσσερις βιβλιοθήκες (Πίνακας 3.2.3). Στις βιβλιοθήκες κλώνων Therm01, Therm30 και Creta1 τα ποσοστά των αλληλουχιών που συνδέονταν με αυτήν την ομάδα κυμάνθηκαν από 11 έως 16 % ενώ στο βαθύ σταθμό του Νοτίου Ιονίου το ποσοστό ανερχόταν στο 24% (Πίνακας 3.2.3). Η συγκεκριμένη φυλογενετική ομάδα πρωτοαναγνωρίστηκε ως καινούργιο φύλο των βακτηρίων στα τέλη του 1990 και σχετίζεται με τα φύλα *Planctomycetes* και *Chlamydia* (Ludwig et al., 1997).

Στο συγκεκριμένο φύλο αναγνωρίστηκαν τρεις υποομάδες (clusters). Οι δυο από αυτές (Therm30/S.Ionian A και Therm30/S.Ionian B) παρουσίασαν ομοιότητα >89% στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες καθώς η τρίτη υποομάδα Therm01/S.Ionian παρουσίασε ομοιότητα >86% (Σχήμα 3.2.2; Πίνακας 3.2.4). Εντούτοις, καμία από τις συγκεκριμένες υποομάδες δεν σχετίστηκε με βακτήρια που έχουν καλλιεργηθεί στο εργαστήριο αλλά αντίθετα συνδέονταν στενά με αρκετές αλληλουχίες από βαθιά θαλάσσια περιβάλλοντα καθώς και από περιβάλλοντα πλούσια σε υδρογονάνθρακες (Σχήμα 3.2.2).

Ένα ποσοστό 11.1% των συνολικών 207 αλληλουχιών συνδεόταν στενά με την τάξη *Planctomycetales* (7.9, 13.3, 10.2 και 14% για τις βιβλιοθήκες Therm01, Therm30, Creta1 και S. Ionian, αντίστοιχα; Πίνακας 3.2.3). Η ποικιλότητα των αλληλουχιών μέσα σε αυτήν την ομάδα ήταν ιδιαίτερα υψηλή ενώ αναγνωρίστηκαν τρεις νέες υποομάδες (Therm01/Creta1, DSP26, και Therm30/S.Ionian), με ομοιότητα μεταξύ των αλληλουχιών μεγαλύτερη του 86% (Σχήμα 3.2.2; Πίνακας 3.2.4).

Ένα πολύ μικρό ποσοστό από τις συνολικά 207 αλληλουχίες (3.4%; Πίνακας 3.2.3) συνδεόταν στενά με το φύλο *Bacteroidetes*. Τέσσερις διαφορετικοί φυλότυποι από τις βιβλιοθήκες του Θερμαϊκού Κόλπου ομαδοποιούνταν με τη φυλογενετική ομάδα *Flavobacteria* ενώ τρεις από αυτούς σχετίζονταν στενά με το βακτηριακό στέλεχος SW17 (>94% ομοιότητα αλληλουχιών; Σχήμα 3.2.2). Ένας κλώνος από τη βιβλιοθήκη του Νοτίου Ιονίου σχετίστηκε με ένα αλόφιλο βακτήριο (halophilic eubacterium EHB) ενώ τρεις φυλότυποι ομαδοποιήθηκαν με κλώνους της ομάδας *Cytophaga* που προέρχονταν από την ψυχρή και βαθύτερη περιοχή του κόσμου στην Ιαπωνία (Japan Trench; Accession no: AB015585, AB015262) καθώς και από τον Κόλπο της Suruga (Accession no: AB015543) (Li et al., 1999a, b).

Οι αριθμοί των κλώνων που σχετίζονταν με τις φυλογενετικές ομάδες *Verrucomicrobia*, Green non-sulfur bacteria (*Chloroflexi*), *Nitrospirae*, *Chlamydiae*, και *Spirochaetales*, ήταν ιδιαίτερα χαμηλές και στις τέσσερις βιβλιοθήκες (από 0.5 έως 2.9 % των συνολικών αλληλουχιών; Πίνακας 3.2.3). Οι κλώνοι που σχετίζονταν με την φυλογενετική ομάδα *Verrucomicrobia* προήλθαν μόνο από τις τρεις βιβλιοθήκες Therm30, Creta1 και S. Ionian. Οι συγκεκριμένοι κλώνοι συνδέονταν στενά με 16S rDNA κλώνους που προέρχονταν από δείγμα βακτηριοπλαγκτού του Αρκτικού Ωκεανού (Bano and Hollibaugh, 2002) (Σχήμα 3.2.2). Οι αλληλουχίες που συνδέονταν στενά με την τάξη *Nitrospirae* προέρχονταν από τις βιβλιοθήκες κλώνων Creta1 και S. Ionian και ομαδοποιούνταν με τα γένη *Magnetobacterium* ή *Nitrospirae* (Σχήμα 3.2.2).

Δύο κλώνοι που προέρχονταν από τις βιβλιοθήκες του Θερμαϊκού Κόλπου και της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης συνδέονταν στενά με την τάξη *Chlamydiales*, και ένας μόνο κλώνος που προερχόταν από την βιβλιοθήκη του Θερμαϊκού Κόλπου συνδεόταν στενά με την τάξη *Spirochaetales* (Σχήμα 3.2.2). Επίσης, ένας περιορισμένος αριθμός αλληλουχιών ομαδοποιούνταν με υποψήφιες φυλογενετικές ομάδες (candidate divisions) π.χ. ένα ποσοστό μικρότερο του 1.5% των συνολικών κλώνων συνδεόταν με τις υποψήφιες φυλογενετικές ομάδες OP8 και OP11 (Σχήμα 3.2.2).

Και οι τέσσερις βιβλιοθήκες κλώνων περιείχαν αλληλουχίες που συνδέονταν στενά με το φύλο *Actinobacteria* (2-4.4 %; gram-θετικά βακτήρια με υψηλή περιεκτικότητα σε GC). Η ομάδα αυτή περιέχει μέλη των *Acidimicrobiales* και *Actinomycetales* (Σχήμα 3.2.2). Ένας μόνο κλώνος από την πιο επιβαρημένη περιοχή του Θερμαϊκού Κόλπου (Therm01) συνδεόταν στενά με την τάξη *Acidimicrobiales*, και συγκεκριμένα με το νηματοειδές βακτήριο '*Microthrix parvicella*'. Οι

περισσότερες από τις αλληλουχίες του φύλου *Actinobacteria* συνδέονταν στενά με την τάξη *Actinomycetales* και συγκεκριμένα με έναν κλώνο προερχόμενο από ανοξικά ιζήματα του Αρκτικού Ωκεανού (Accession no: AJ241019) (Ravenschlag et al., 1999). Μία μόνο αλληλουχία της βιβλιοθήκης Therm01 ομαδοποιούταν με το φύλο *Firmicutes* (gram-θετικά βακτήρια χαμηλής περιεκτικότητας σε GC) και σχετιζόταν με το βακτήριο *Bacillus benzeovorans* (Pichinoty et al., 1984) (Σχήμα 3.2.2).

**Πίνακας 3.2.4:** Παρουσίαση των 16S rDNA βακτηριακών υποομάδων που προσδιορίστηκαν στην παρούσα εργασία. Στον πίνακα παρουσιάζονται επίσης οι αριθμοί των αλληλουχιών κάθε υποδιαίρεσης και για κάθε βιβλιοθήκη.

Όνομασία υποομάδας	Υποδιαίρεση	Therm01	Therm30	Creta1	S.Ionian	Ομοιότητα εντός υποομάδας %
<b>Therm30/Creta1</b>	<i>Gamma</i> proteobacteria		1	1		>99
<b>Therm B</b>	<i>Gamma</i> proteobacteria	1	1			>96
<b>Therm/Creta1 B</b>	<i>Gamma</i> proteobacteria		1	1		>96
<b>Therm/Creta1/Ionian</b>	<i>Gamma</i> proteobacteria	1		1	1	>93
<b>Therm/Creta1 A</b>	<i>Gamma</i> proteobacteria	5	2	2		>93
<b>Therm30/S.Ionian</b>	<i>Gamma</i> proteobacteria		1		2	>92
<b>BPC022</b>	<i>Gamma</i> proteobacteria			4	2	>86
<b>Therm30/S.Ionian B</b>	<i>Delta</i> proteobacteria		1		1	>87
<b>NB1</b>	<i>Delta</i> proteobacteria	1	2	1		>86
<b>Therm30/S.Ionian A</b>	<i>Delta</i> proteobacteria		1		2	>86
<b>Therm30/S.Ionian B</b>	<i>Acidobacteria</i>		1		1	>93
<b>Therm30/S.Ionian A</b>	<i>Acidobacteria</i>		1		2	>89
<b>Therm01/S.Ionian</b>	<i>Acidobacteria</i>	1			4	>86
<b>DSP26</b>	<i>Planctomycetes</i>	2		1		>94
<b>Therm30/S.Ionian</b>	<i>Planctomycetes</i>		1		1	>93
<b>Therm01/Creta1</b>	<i>Planctomycetes</i>	1		1		>86

### 3.2.3 Βακτηριακή ποικιλότητα

Η αφθονία και η συχνότητα των 16S rDNA φυλοτύπων εκτιμήθηκε με την εφαρμογή της τεχνικής αποτύπωσης RFLP. Ο αριθμός των κλώνων που επιλέχθηκε για τη συγκεκριμένη ανάλυση κυμάνθηκε μεταξύ 94 και 190 για κάθε μια από τις τέσσερις βιβλιοθήκες κλώνων. Στην παρούσα εργασία, η σύγκριση μεταξύ των προτύπων κατανομής των RFLP για κάθε βιβλιοθήκη ήταν δυνατή εφόσον ο αριθμός των κλώνων δε ξεπερνούσε τους 190. Αντίθετα, η προσπάθεια σύγκρισης των προτύπων κατανομής των RFLP μεταξύ των διαφορετικών βιβλιοθηκών κρίθηκε ιδιαίτερα δύσκολη και ατυχής λόγω του μεγάλου αριθμού κλώνων (664 κλώνοι). Για το λόγο αυτό, ήταν εφικτός ο υπολογισμός της αφθονίας των ειδών για κάθε βιβλιοθήκη κλώνων ξεχωριστά αλλά όχι και για το συνδυασμό των βιβλιοθηκών. Μεταξύ των 94 κλώνων που εξετάστηκαν από τη βιβλιοθήκη Therm01 αναγνωρίστηκαν 80 διαφορετικά OTUs (δηλαδή διαφορετικών προτύπων κατανομής των RFLP) ενώ για τις βιβλιοθήκες Therm30, Creta1 και S.Ionian από τους 190 κλώνους

αναγνωρίστηκαν 165, 152 και 171 διαφορετικά OTUs. Η αφθονία των ειδών για κάθε περιβάλλον εκτιμήθηκε με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος Chao-1 και παρουσιάστηκε ιδιαίτερα υψηλή για τις βιβλιοθήκες του Νοτίου Ιονίου και του σταθμού Therm30 του Θερμαϊκού Κόλπου ( $1,306 \pm 187$  και  $958 \pm 134$  OTUs αντίστοιχα). Οι αφθονίες των ειδών για τις βιβλιοθήκες Therm01 και Creta1 κυμάνθηκαν αντίστοιχα από  $440 \pm 88$  έως  $478 \pm 60$  OTUs (Πίνακας 3.2.2). Εντούτοις, οι παραπάνω υπολογισμοί της αφθονίας των ειδών δεν είναι τόσο ακριβείς καθώς ο αριθμός των κλώνων που επιλέξαμε αντιπροσωπεύει ένα πολύ μικρό ποσοστό των συνολικών 16S rDNAs αλληλουχιών που υπάρχουν στις βιβλιοθήκες κλώνων. Το γεγονός αυτό είναι προφανές αν εξετάσουμε τις καμπύλες αραιώσης (rarefaction curves) των βιβλιοθηκών (Σχήμα 3.2.3). Οι σχεδόν γραμμικές καμπύλες αραιώσης υποδηλώνουν ότι οι αφθονίες που υπολογίστηκαν παραπάνω υποεκτιμούν την πραγματική βακτηριακή ποικιλότητα των ιζημάτων της Ανατολικής Μεσογείου και ότι στην πραγματικότητα ο αριθμός των βακτηριακών ειδών είναι κατά πολύ πιο υψηλός (Σχήμα 3.2.3).

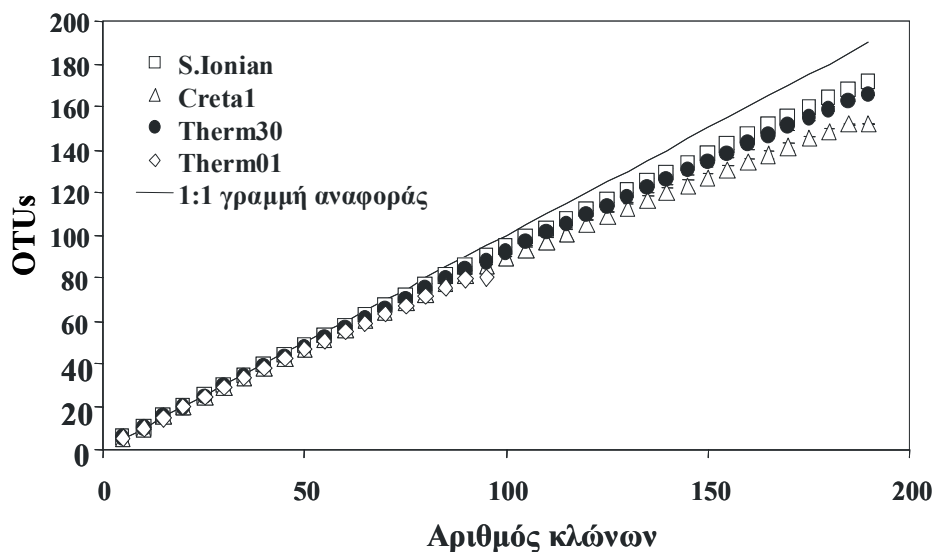
**Πίνακας 3.2.5:** Σύγκριση των ομοιοτήτων μεταξύ των 16S rDNA βιβλιοθηκών κλώνων Therm01, Therm10, Creta1 και S.Ionian, βασισμένη στην παρουσία/απουσία κοινών φυλοτύπων. Οι φυλότυποι καθορίστηκαν ως προς το ποσοστό ομοιότητας μεταξύ των αλληλουχιών (99%, 98% και 97%). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε για τον συνολικό αριθμό των κλώνων και για την υποδιαίρεση *Gammaproteobacteria*. Η ομοιότητα μεταξύ των βακτηριακών κοινωνιών υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση  $D_x = N_{xy}/(N_x + N_y)$  όπου  $N_x$  και  $N_y$  είναι ο αριθμός των φυλοτύπων στα δείγματα x και y, αντίστοιχα και  $N_{xy}$  είναι ο αριθμός των κοινών φυλοτύπων.

Ομοιότητα των βακτηριακών κοινωνιών σε ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου								
Σταθμοί	Therm01		Therm30		Creta1		S.Ionian	
	συνολικά	<i>Gammaproteobacteria</i>	συνολικά	<i>Gammaproteobacteria</i>	συνολικά	<i>Gammaproteobacteria</i>	συνολικά	<i>Gammaproteobacteria</i>
>99%	Therm01						0	0
	Therm30		0.037	0.121	0.036	0.108	0.021	0.087
	Creta1				0.043	0.133	0	0
	S.Ionian							
>98%	Therm01		0.074	0.182	0.036	0.108	0	0
	Therm30				0.043	0.133	0.021	0.087
	Creta1						0.020	0
	S.Ionian							
>97%	Therm01		0.130	0.364	0.054	0.162	0	0
	Therm30				0.096	0.233	0.053	0.217
	Creta1						0.020	0
	S.Ionian							

Εφόσον η εφαρμογή της τεχνικής αποτύπωσης RFLP για τον υπολογισμό της βακτηριακής ποικιλότητας κρίθηκε ανεπαρκής για τα πλούσια σε ποικιλότητα ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου συγκρίναμε επίσης τη σύσταση των βακτηριακών κοινωνιών μεταξύ των τεσσάρων δειγμάτων με φυλογενετική ανάλυση της ομοιότητας των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των κλώνων (Σχήμα 3.2.2). Για τη σύγκριση της ετερογένειας μεταξύ των αλληλουχιών χρησιμοποιήσαμε τρία επίπεδα



ανάλυσης: 99%, 98% και 97% ομοιότητα μεταξύ των αλληλουχιών για τον καθορισμό ενός φυλότυπου (Πίνακας 3.2.5). Η μέγιστη τιμή ομοιότητας καταγράφηκε μεταξύ των σταθμών του Θερμαϊκού Κόλπου (Πίνακας 3.2.5). Όταν το 97% της ομοιότητας μεταξύ των αλληλουχιών τέθηκε ως βάση για τον καθορισμό του φυλότυπου η ομοιότητα μεταξύ των σταθμών του Θερμαϊκού Κόλπου ήταν μόλις 13% ενώ καμία ομοιότητα δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των βιβλιοθηκών Therm01 και S.Ionian Sea γεγονός που τονίζει το μέγεθος της βακτηριακής βιοποικιλότητας στα περιβάλλοντα αυτά. Η ομοιότητα των βακτηριακών κοινωνιών μεταξύ των σταθμών μειώνεται καθώς ο βαθμός ομοιότητας για τον καθορισμό του φυλότυπου αυξάνεται στο 98% ενώ στο 99% γίνεται σχεδόν μηδενική (2 – 4% επικάλυψη; Πίνακας 3.2.5). Ένα ποσοστό μεγαλύτερο του 78% των βακτηριακών κλώνων που παρουσιάζουν ομοιότητα μεγαλύτερη του 97% με τους άλλους κλώνους συνδεόταν στενά με τα *Gammaproteobacteria*. Κατά συνέπεια, η ομοιότητα μεταξύ των βακτηριακών κοινωνιών που ανήκουν σε αυτήν την φυλογενετική ομάδα είναι σαφώς μεγαλύτερη (Πίνακας 3.2.5). Η μεγαλύτερη ομοιότητα στα *Gammaproteobacteria* (36%) παρατηρήθηκε μεταξύ των σταθμών του Θερμαϊκού Κόλπου (Πίνακας 3.2.5).



**Σχήμα 3.2.3:** Ανάλυση αραιώσης (rarefaction analysis) της ετερογένειας των 16S rDNA αλληλουχιών στις βιβλιοθήκες κλώνων που (Therm01, Therm30, Creta1 και S.Ionian) κατασκευάστηκαν από ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου.

### 3.2.4 Διαφορές στη σύσταση των μικροβιακών κοινωνιών μεταξύ των διαφορετικών περιοχών δειγματοληψίας

Εκτός από την παρούσα εργασία, στην επιστημονική βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί μόνο τρεις εργασίες με βιβλιοθήκες κλώνων βακτηριακών κοινωνιών από δείγματα

ιζημάτων που περιέχουν πάνω από 100 κλώνους (Πίνακας 3.2.2). Οι συγκεκριμένες εργασίες έχουν πραγματοποιηθεί στα ψυχρά παράκτια ιζήματα του Αρκτικού Ωκεανού (Ravenschlag et al., 1999), στην υφαλοκρηπίδα της Ανταρκτικής (Bowman and McCuaig, 2003) και στις ανοξικές λεκάνες της Ανατολικής Ανταρκτικής (Bowman et al., 2000). Επομένως, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις παραπάνω εργασίες είναι σχεδόν απίθανο να έχουν εφαρμογή στην Ανατολική Μεσόγειο που χαρακτηρίζεται κατά κανόνα από την κυκλοφορία θερμών θαλάσσιων μαζών.

Οι επικρατούσες ταξινομικές ομάδες και των τεσσάρων βιβλιοθηκών κλώνων ήταν *Gamma-* και *Deltaproteobacteria*, *Holophaga/Acidobacteria* και *Planctomycetales*. Τα *Gammaproteobacteria* ήταν πολύ πιο άφθονα στους τρεις ρηχούς σταθμούς σε αντίθεση με το βαθύ και χαμηλής περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη σταθμό του Νοτίου Ιονίου. Το γεγονός αυτό δηλώνει ότι η ύπαρξη της συγκεκριμένης ομάδας πιθανότατα να σχετίζεται με την εισαγωγή στο ιζήμα φρέσκου οργανικού υλικού και/ή πελαγικών βακτηρίων από την εύρωτη ζώνη. Η τελευταία εξήγηση θεωρείται απίθανη εφόσον καμία από τις αλληλουχίες των βιβλιοθηκών μας δεν σχετίστηκε φυλογενετικά με χαρακτηριστικούς φυλότυπους των θαλάσσιων επιφανειών νερών όπως *Cyanobacteria*, *Roseobacter*, SAR11, 116 και 86 (Giovannoni and Rappé, 2000). Επίσης, η πιθανότητα το βάθος των σταθμών δειγματοληψίας να παίζει ρόλο ως ρυθμιστής των μικροβιακών κοινωνιών εξαιρείται καθώς οι Li και συνεργάτες βρήκαν ότι τα *Gammaproteobacteria* επικρατούν και σε βάθη μεγαλύτερα των 6000 m (Li et al., 1999a, b). Η συγκεκριμένη φυλογενετική ομάδα (*Gammaproteobacteria*) έχει βρεθεί επίσης να είναι η πιο άφθονη σε μεγάλες βιβλιοθήκες κλώνων που κατασκευάστηκαν από την υφαλοκρηπίδα της Ανταρκτικής (Bowman and McCuaig, 2003) καθώς και από ιζήματα του Αρκτικού Ωκεανού (Ravenschlag et al., 1999). Αντίθετα στα ανοξικά ιζήματα της Ανατολικής Ανταρκτικής οι κλώνοι που βρέθηκαν να ομαδοποιούνται με τα *Gammaproteobacteria* ήταν ελάχιστοι (Bowman et al., 2000). Στην παρούσα εργασία, η πλειοψηφία των κλώνων ομαδοποιούταν σε 7 υποομάδες (clusters) βακτηρίων που δεν έχουν καλλιεργηθεί στο εργαστήριο (Πίνακας 3.2.3, Σχήμα 3.2.2). Αρκετοί επίσης κλώνοι σχετίζονταν στενά με βακτηριακές ομάδες που περιέχουν βακτηριακά στελέχη που έχουν καλλιεργηθεί και που η φυσιολογία τους συνδέεται με διαδικασίες κλειδιά στη ρύθμιση των βιογεωχημικών κύκλων (π.χ. *Beggiatoa*, *Thioalcalovibrio*, *Pseudomonas*, *Chromatium*). Τα βακτηριακά είδη *Thioalcalovibrio versutus* και

*Thioalcalovibrio denitrificans* ανήκουν σε μία ομάδα βακτηρίων που χαρακτηρίζονται ως υποχρεωτικά αλκαλόφιλα και χημειολιθοαυτότροφα ενώ διαθέτουν την ικανότητα να οξειδώνουν θείο (Sorokin et al., 2001). Μία αλληλουχία από το βαθύ σταθμό του Θερμαϊκού Κόλπου (Therm30) συνδεόταν στενά με τους παραπάνω οργανισμούς (Σχήμα 3.2.2). Από το συγκεκριμένο σταθμό, μία δεύτερη αλληλουχία συνδεόταν με το είδος *Halochromatium salexigens*, το οποίο είναι ένα χαρακτηριστικό φωτότροφο θαλάσσιο βακτήριο θείου (Imhoff et al., 1998).

Τα *Deltaproteobacteria* ήταν ιδιαίτερα άφθονα και στις τέσσερις βιβλιοθήκες κλώνων της Ανατολικής Μεσογείου και οι περισσότεροι κλώνοι συνδέονταν στενά με τα βακτήρια των οικογενειών *Desulfobulbaceae* and *Desulfobacteraceae* που διαθέτουν την ικανότητα να ανάγουν θείο κατά τις μεταβολικές τους διεργασίες (Finster et al., 1998; Friedrich et al., 1996). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η παραπάνω λειτουργική ομάδα είναι ευρέως διαδεδομένη στα θαλάσσια ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου. Οι αλληλουχίες που σχετίζονταν με την οικογένεια *Desulfobacteraceae* προήλθαν μόνο από τις δύο βιβλιοθήκες του Θερμαϊκού Κόλπου, δείχνοντας πιθανότατα ότι η συγκεκριμένη οικογένεια συνδέεται κυρίως με πιο παραγωγικά ιζήματα. Επιπλέον, βακτήρια του γένους *Desulfobacterium* είναι πολύ σημαντικά σε διαδικασίες βιοεπιαναφοράς καθώς αρκετά μέλη του διαθέτουν την ικανότητα να αποικοδομούν ένα μεγάλο εύρος αρωματικών ουσιών (ρυπαντών) μέσω του μεταβολικού μονοπατιού διάσπασης της κατεχόλης (Harms et al., 1999; Morasch et al., 2001).

Τα *Mycobacteria* βρέθηκαν κυρίως στις βιβλιοθήκες από τους ρηχούς σταθμούς (Therm01 και Creta1). Τα βακτήρια αυτά, χαρακτηρίζονται συνήθως από ανθεκτικότητα σε περιβάλλοντα χαμηλής αλατότητας και η παρουσία τους στα θαλάσσια περιβάλλοντα πιστεύεται ότι σχετίζεται με την εισαγωγή οργανικού υλικού χερσαίας προέλευσης (Ravenschlag et al., 1999; Reichenbach and Dworkin, 1992). Αυτό που είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι ότι το ποσοστό των κλώνων που συνδέονται στενά με τα *Deltaproteobacteria* παρουσίασε αυξητική τάση με το βάθος (Therm01 > Therm30 > Creta1), ενώ εμφάνισε στατιστικά σημαντική συσχέτιση τόσο με τα επίπεδα οργανικού άνθρακα ( $r^2=0.84$ ,  $n=3$ ) όσο και με τις συγκεντρώσεις πετρελαϊκών υδρογονανθράκων ( $r^2=0.82$ ,  $n=3$ ).

Τα *Alphaproteobacteria* είναι γνωστά ότι αφθονούν στις πελαγικές βακτηριακές κοινωνίες (κοίτα Giovannoni and Rappé, 2000) αλλά επίσης βρίσκονται και σε αρκετά θαλάσσια ιζήματα (Bowman and McCuaig, 2003; Bowman et al., 2000;

Ravenschlag et al., 1999). Ο οικολογικός ρόλος της συγκεκριμένης κατηγορίας βακτηρίων δεν είναι ιδιαίτερα γνωστός καθώς ο αριθμός των στελεχών που έχουν απομονωθεί και καλλιεργηθεί στο εργαστήριο είναι περιορισμένος. Εντούτοις, οι κλώνοι από τις βιβλιοθήκες της Ανατολικής Μεσογείου που συνδέονταν με τα *Alphaproteobacteria* ομαδοποιούνταν σε τέσσερις οικογένειες με βακτήρια που έχουν καλλιεργηθεί. Ένας φυλότυπος από το σταθμό Therm01 συνδεόταν με την οικογένεια *Methylocystaceae* (μεθανότροφα τύπου II) που παίζει ρόλο κλειδί στη ρύθμιση του κύκλου του άνθρακα και επίσης είναι γνωστή για την ικανότητα των μελών της να αποικοδομούν ξενοβιοτικούς ρυπαντές (Giovannoni and Rappé, 2000; Gullledge et al., 2001). Επίσης, τα μέλη της οικογένειας *Hyphomicrobiaceae* είναι μεθυλότροφα και κατά κανόνα χρησιμοποιούν τις ουσίες C1 ως πηγές άνθρακα και ενέργειας (Green, 1992). Οι συγκεκριμένοι οργανισμοί αναπτύσσονται συνήθως κάτω από οξικές συνθήκες, εναλλακτικά όμως μπορούν να χρησιμοποιήσουν νιτρικά, μαγγάνιο και σίδηρο ως τελικούς δέκτες ηλεκτρονίων (Kuenen and Bos, 1987; Moore, 1981). Οι βιβλιοθήκες από τις δύο περιοχές με τα υψηλότερα επίπεδα πετρελαϊκών υδρογονανθράκων (Therm01 και S.Ionian) περιείχαν έναν περιορισμένο αριθμό αλληλουχιών που σχετιζόταν με τα *Alphaproteobacterian* (αντίστοιχα 3.2 και 4% των συνολικών αλληλουχιών). Αντίθετα, η συχνότητα των αντίστοιχων αλληλουχιών των βιβλιοθηκών από τις περιοχές με τα χαμηλότερα επίπεδα πετρελαϊκών υδρογονανθράκων ήταν αρκετά υψηλότερη (Creta1, 8.2%, και Therm30, 8.9%).

Ο σταθμός Therm01 χαρακτηρίζεται από έντονες ανθρωπογενείς επιρροές από το λιμάνι της Θεσσαλονίκης καθώς και από την εισροή μεγάλης μάζας νερών από ποταμούς που χρησιμοποιούνται για τη λειτουργία υδροηλεκτρικών σταθμών της περιοχής (Karageorgis and Anagnostou, 2001). Αντίθετα, ο βαθύς σταθμός του Νοτίου Ιονίου που χαρακτηρίζεται από επίσης υψηλές συγκεντρώσεις υδρογονανθράκων επηρεάζεται κυρίως από τις θαλάσσιες μάζες της Αδριατικής και της Λεβαντίνης (Malanotte-Rizzoli et al., 1997). Οι ιδιαίτερα χαμηλές αφθονίες των κλώνων της ομάδας *Alphaproteobacteria* που καταγράφηκαν για τους παραπάνω δύο σταθμούς σε σύγκριση με τους σταθμούς Creta1 και Therm30 αποτελούν ένδειξη ότι τα επίπεδα υδρογονανθράκων στο περιβάλλον πιθανότατα επηρεάζουν την κατανομή της κλάσης *Alphaproteobacteria* στα ιζήματα. Επίσης, κλώνοι σχετιζόμενοι με το φύλο *Verrucomicrobia* δεν βρέθηκαν στον επιβαρημένο με υδρογονάνθρακες σταθμό Therm01 γεγονός που υποδηλώνει ότι η ομάδα αυτή πιθανότατα να επηρεάζεται εξίσου από ανθρωπογενείς επιρροές (Πίνακας 3.2.3, Σχήμα 3.2.2).

Αρκετές επίσης διαφορές στη σύσταση των βακτηριακών κοινοτήτων καταγράφηκαν με βάση το βάθος των δειγματοληπτικών σταθμών. Για παράδειγμα, το ποσοστό των κλώνων που συνδέονταν με γνωστά βακτήρια που έχουν απομονωθεί και καλλιεργηθεί στο εργαστήριο ήταν αρκετά μικρότερο στο βαθύ σταθμό του Νοτίου Ιονίου (22%) σε σύγκριση με τους ρηχούς σταθμούς (38-42%). Κατά ανάλογο τρόπο η συχνότητα των κλώνων από το σταθμό του Νοτίου Ιονίου που συνδέονταν με βακτήρια που δεν έχουν καλλιεργηθεί ήταν κατά πολύ υψηλότερος π.χ. Therm30/S.Ionian και S.Ionian/Creta1 στην κλάση *Gammaproteobacteria*; Therm01/S.Ionian και Therm30/S.IonianA στο φύλο *Acidobacteria* και Therm01/Creta1 στο φύλο *Planctomycetales* (Πίνακας 3.2.4). Επιπλέον, ένα μεγάλο ποσοστό των αλληλουχιών (24%) από το Νότιο Ιόνιο συνδέονταν στενά με την πρόσφατα χαρακτηρισμένη ομάδα *Holophaga/Acidobacteria*, η οποία όμως σχεδόν απουσίαζε από τους υπόλοιπους τρεις σταθμούς (Πίνακας 3.2.3). Οι παραπάνω διαφορές που καταγράφηκαν μεταξύ των ρηχών και του βαθύ σταθμού επιβεβαιώνονται και από την συγκριτική μελέτη των μικροβιακών κοινοτήτων (Κεφαλαίο 3.1) όπου η μέθοδος αποτύπωσης T-RFLP εφαρμόστηκε για την σύγκριση των βακτηριακών κοινοτήτων μεταξύ 12 διαφορετικών σταθμών της Ανατολικής Μεσογείου (Polymenakou et al., 2005a; Κεφάλαιο 3.1). Οι κλώνοι που συνδέονταν στενά με τα φύλα *Planctomycetales* και *Bacteroidetes* προέρχονταν και από τις τέσσερις βιβλιοθήκες της Ανατολικής Μεσογείου (Πίνακας 3.2.3, Σχήμα 3.2.2). Οι συγκεκριμένες φυλογενετικές ομάδες έχουν καταγραφεί και σε προηγούμενες εργασίες μεγάλων 16S rDNA βιβλιοθηκών (Bowman and McCuaig, 2003; Bowman et al., 2000; Ravenschlag et al., 1999).

### **3.2.5 Αφθονία των ειδών – περιορισμοί και σύγκριση με βιβλιογραφικές αναφορές**

Σε προηγούμενη εργασία, οι Torsvik και συνεργάτες (1998) εφάρμοσαν την κινητική επανασύνδεσης DNA:DNA (DNA:DNA reassociation kinetics) με σκοπό να εκτιμήσουν την πολυπλοκότητα του βακτηριακού γενώματος σε διάφορα περιβάλλοντα. Η συγκεκριμένη εργασία έδειξε ότι οι βακτηριακές κοινότητες των απομακρυσμένων περιβαλλόντων χαρακτηρίζονται από υψηλή πολυπλοκότητα γενώματος με τιμές συγκρίσιμες των χερσαίων περιβαλλόντων (~11.400 σχετικά με ~8.800 ισοδύναμα γενώματος) (Torsvik et al., 1998; Torsvik et al., 2002). Εκτός από την υψηλή βακτηριακή ποικιλότητα που χαρακτηρίζει τις βακτηριακές κοινότητες των

ιζημάτων ένα δεύτερο χαρακτηριστικό τους είναι ότι κατά κανόνα αποτελούνται από πληθυσμούς μη καλλιεργήσιμους (Bowman et al., 2000). Κατά κανόνα, τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη των τεχνικών που δεν βασίζονται στην καλλιέργεια των δειγμάτων τα τελευταία χρόνια έπαιξε έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην μελέτη τόσο της ποικιλότητας όσο και της κατανομής των οργανισμών στο περιβάλλον. Όπως και με τις άλλες μεθόδους που βασίζονται στην τεχνική PCR, η κατασκευή βιβλιοθηκών κλώνων 16S rDNA χαρακτηρίζεται από μεθοδολογικούς περιορισμούς που πιθανότατα επηρεάζουν την κατανομή των φυλοτύπων στη βιβλιοθήκη σε σχέση με το την κατανομή τους στο φυσικό περιβάλλον (von Wintzingerode et al., 1997). Με την τεχνική PCR διάφορα τυχαία γεγονότα που συνήθως συμβαίνουν στους πρώτους κύκλους της διαδικασίας (Suzuki and Giovannoni, 1996; Wagner et al., 1994) καθώς και ο επιλεκτικός πολλαπλασιασμός κάποιων αλληλουχιών (Morasch et al., 2001) φαίνεται να επηρεάζουν το τελικό αποτέλεσμα. Σύμφωνα με τα παραπάνω μπορούμε να υποθέσουμε ότι η ποσοτική κατανομή των φυλοτύπων στις βιβλιοθήκες που κατασκευάσαμε από τα ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου δεν αντιπροσωπεύει απόλυτα την κατανομή τους στο φυσικό περιβάλλον ακόμα και αν προσπαθήσαμε στο εργαστήριο να περιορίσουμε τα μειονεκτήματα της μεθόδου με την επανάληψη των αντιδράσεων PCR και με τον περιορισμό του αριθμού των κύκλων. Αυτό βέβαια είναι αναμενόμενο αν αναλογιστούμε ότι ο αριθμός των οπερονίων rRNA σε ένα βακτηριακό κύτταρο μπορεί να κυμανθεί μεταξύ 1 και 15 (Acinas et al., 2004). Παρόλα αυτά, με τον περιορισμό του αριθμού των κύκλων στην PCR μπορεί να αποφευχθεί ο σχηματισμός ‘χίμαιρων’ και μεταλλαγών που μπορεί να προκληθούν από τα λάθη του ενζύμου της πολυμεράσης Taq (Thompson et al., 2002).

Στην παρούσα εργασία, εφαρμόσαμε την τεχνική αποτύπωσης RFLP χρησιμοποιώντας τα περιοριστικά ένζυμα *HhaI* και *HaeIII* για να εκτιμήσουμε την αφθονία των ειδών σε κάθε βιβλιοθήκη. Η συγκεκριμένη τεχνική με 1 έως 4 περιοριστικά ένζυμα, συνήθως χρησιμοποιείται για την μελέτη μεγάλων βιβλιοθηκών κλώνων με σκοπό την επιλογή συγκεκριμένων κλώνων των οποίων οι αλληλουχίες θα αναλυθούν περαιτέρω φυλογενετικά. Πρόσφατη εργασία έδειξε ότι η παράλληλη χρήση 4 περιοριστικών ενζύμων μπορεί να διαχωρίσει καλύτερα τις αλληλουχίες που είναι κατά 98% όμοιες (Moyer, 2001). Κατά συνέπεια, οι δικόι μας υπολογισμοί αφθονίας ειδών που κυμαίνονται μεταξύ 440 και 1306 φυλοτύπων μπορούν να θεωρηθούν ως οι μικρότεροι δυνατοί και συνεπώς η πραγματική αφθονία βρίσκεται σε πολύ υψηλότερα επίπεδα. Ένας άλλος παράγοντας που πιθανότατα να επηρεάζει

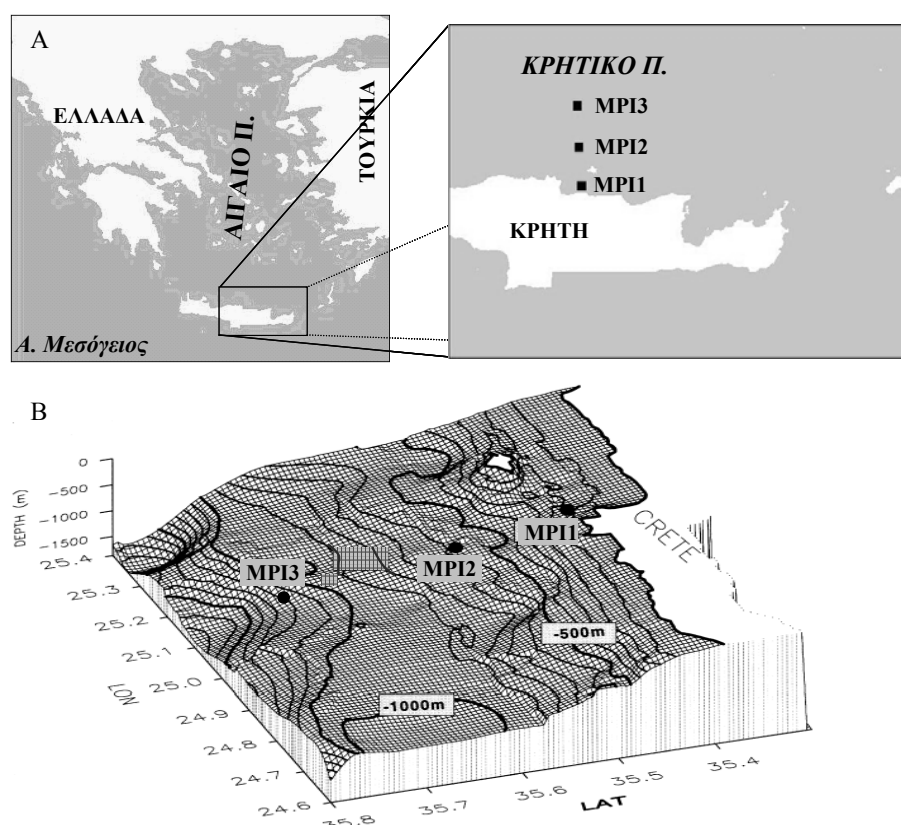
την εκτιμώμενη αφθονία ειδών είναι ο καθορισμός του όρου ‘φυλότυπος’ ή ‘OTUs’ που συνήθως διαφέρει μεταξύ των εργασιών (Πίνακας 3.2.4). Μία προηγούμενη εργασία, στην οποία επίσης κατασκευάστηκαν βιβλιοθήκες κλώνων του γονιδίου 16S rRNA, έδειξε ότι οι βακτηριακές κοινότητες των θαλάσσιων ιζημάτων παρουσιάζουν υψηλή ποικιλότητα (Bowman and McCuaig, 2003). Η αφθονία των ειδών που υπολογίστηκε στατιστικά στα συγκεκριμένα ιζήματα ήταν ιδιαίτερα υψηλή και ίση με 4350 βακτηριακούς φυλοτύπους με ποσοστό επικάλυψης που κυμάνθηκε μεταξύ 23 και 36% (Bowman and McCuaig, 2003).

Η υψηλή αφθονία των ειδών που υπολογίστηκε για όλα τα ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου δείχνει ότι χιλιάδες κλώνοι πρέπει να αναλυθούν για την εκτίμηση της πραγματικής βακτηριακής ποικιλότητας της περιοχής. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει την υποψία ότι οι μέχρι στιγμής βιβλιοθήκες κλώνων που έχουν κατασκευαστεί από δείγματα ιζημάτων αντιπροσωπεύουν ουσιαστικά ένα πολύ μικρό ποσοστό των βακτηρίων. Αυτό που πρέπει να τονίσουμε ώστε να συνειδητοποιήσουμε το μέγεθος της βακτηριακής ποικιλότητας των ιζημάτων της Ανατολικής Μεσογείου είναι ότι κανένας κοινός κλώνος δεν εντοπίστηκε μεταξύ των τεσσάρων διαφορετικών βιβλιοθηκών. Όταν θέσαμε ως βάση το ποσοστό ομοιότητας μεταξύ των αλληλουχιών να είναι 99% για τον ορισμό του φυλοτύπου, βρήκαμε μόνο 6 αλληλουχίες κοινές μεταξύ των διαφορετικών βιβλιοθηκών αλλά όχι και μεταξύ των σταθμών του Θερμαϊκού Κόλπου (Therm01 και Therm30) (Πίνακας 3.2.5). Η πιθανότητα δύο διαφορετικά δείγματα να έχουν 0% επικάλυψη εξαρτάται κατά κανόνα από το μέγεθος του αρχικού δείγματος. Η ιδιαίτερα χαμηλή ομοιότητα που παρατηρήθηκε μεταξύ των τεσσάρων διαφορετικών δειγμάτων της Ανατολικής Μεσογείου σε ότι αφορά τη βακτηριακή τους σύσταση πιθανότατα οφείλεται είτε στην τοπική διαφοροποίηση των βακτηριακών κοινοτήτων είτε στην υπερβολικά υψηλή βακτηριακή ποικιλότητα είτε τέλος και στο συνδυασμό των δύο παραπάνω περιπτώσεων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

### 3.3 Μελέτη της αποικοδομητικής ικανότητας των μικροοργανισμών: στοιχειοποίηση του οργανικού άνθρακα και αποικοδόμηση υδρογονανθράκων

Η ποιότητα καθώς και η ποσότητα του οργανικού υλικού στα επιφανειακά στρώματα των ιζημάτων εξαρτάται κυρίως από τις εναποθέσεις υλικού διαφορετικής προέλευσης. Το οργανικό υλικό που καθιζάνει προέρχεται είτε από τους θαλάσσιους μικροοργανισμούς (π.χ. φύκη, πρωτόζωα, βακτήρια, αρχαία), είτε από το ζωοπλαγκτόν είτε από χερσαία φυτά (Postma et al., 1988; Rütters et al., 2002a; Volkman et al., 2000). Τα ιζήματα μπορούν να χαρακτηριστούν ως οι τελικοί αποδέκτες του αυτόχθονου και αλλόχθονου οργανικού υλικού (Fabiano and Danovaro 1994; Gogou et al., 2004). Επίσης, η εισαγωγή του οργανικού υλικού στα ιζήματα εξαρτάται από τις διαδικασίες μικροβιακής αποικοδόμησης που πραγματοποιούνται κατά την διάρκεια της διαγένεσης στην κολώνα του νερού καθώς και στα επιφανειακά στρώματα των ιζημάτων (Teese et al., 1998). Η στοιχειοποίηση



**Σχήμα 3.3.1:** A) Χάρτης σταθμών δειγματοληψίας από την υφαλοκρηπίδα της Κρήτης B) Βαθυμετρικός χάρτης της υπό μελέτης περιοχής (προερχόμενος από Chronis et al., 2000).

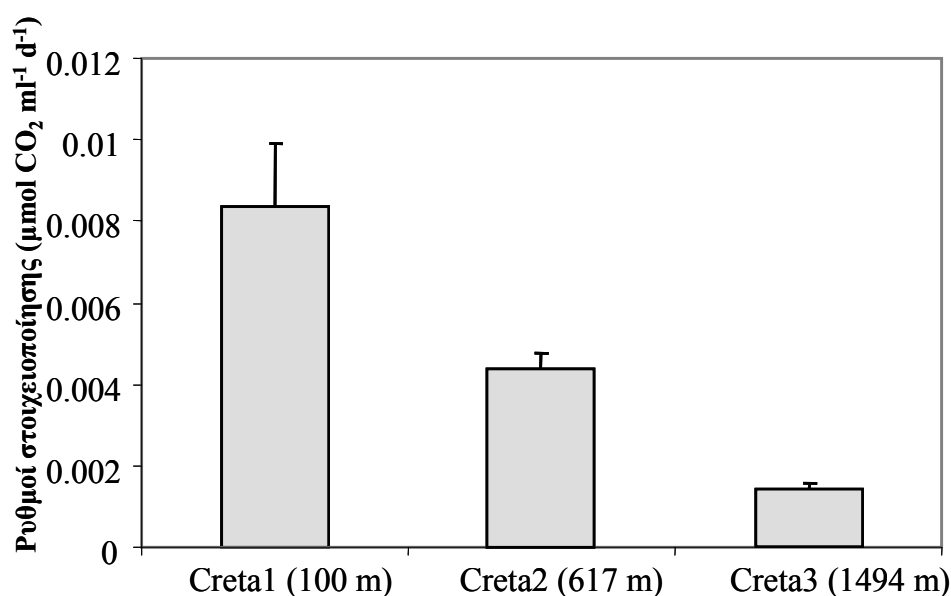
του οργανικού υλικού εξαρτάται από την αποικοδόμηση ουσιών διαφόρων κατηγοριών οι οποίες διαφέρουν ως προς τον ρυθμό αποικοδόμησης. Για παράδειγμα,



τα λιπίδια είναι πιο ανθεκτικά σε διαδικασίες αποικοδόμησης από ότι οι υδρογονάνθρακες και οι πρωτεΐνες και για το λόγο αυτό διατηρούνται στα ιζήματα (Teese et al., 1998). Εντούτοις, οι γνώσεις μας για την τύχη των διαφορετικών κατηγοριών λιπιδίων στα ιζήματα και συγκεκριμένα στα βαθιά θαλάσσια οικοσυστήματα είναι περιορισμένες επειδή γνωρίζουμε λίγα σχετικά με τις διαδικασίες στοιχειοποίησης καθώς και των μικροβιακών κοινωνιών που συμμετέχουν σε αυτές. Η παρούσα εργασία σχεδιάστηκε για να μελετήσουμε την επίδραση των διαδικασιών στοιχειοποίησης στη λιπιδική σύσταση (αλειφατικοί υδρογονάνθρακες, διγλυκερίδια, γλυκολιπίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα) σε τρεις σταθμούς κατά μήκος της υφαλοκρηπίδα της Κρήτης (Ανατολική Μεσόγειος) (Σχήμα 3.3.1). Επίσης η σύσταση των μικροβιακών κοινωνιών μελετήθηκε με την ανάλυση των φωσφολιπιδίων.

### 3.3.1 Βιογεωχημικός χαρακτηρισμός των ιζημάτων

*Ρυθμοί στοιχειοποίησης.* Οι ρυθμοί στοιχειοποίησης του οργανικού άνθρακα κυμάνθηκαν μεταξύ 2-8.5  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , με τη μέγιστη καταγραφόμενη τιμή στο ρηχό σταθμό MPI1 και την ελάχιστη στο βαθύ σταθμό MPI3 (Σχήμα 3.3.2). Οι τιμές οργανικού άνθρακα ήταν παρόμοιες και στους τρεις σταθμούς (4.5, 4.8 και 4.2  $\text{mg g}^{-1}$  στους σταθμούς MPI1, MPI2 και MPI3, αντίστοιχα) και ήταν συγκρίσιμες με τις τιμές που είχαν καταγραφεί σε προηγούμενη εργασία στην ίδια περιοχή (3.0-8.2  $\text{mg g}^{-1}$ ; Gogou et al., 2000) καθώς και με επίπεδα οργανικού άνθρακα που έχουν καταγραφεί στην Νοτιοδυτική Μεσόγειο (3.8-14.7  $\text{mg g}^{-1}$ ; Bouloubassi et al., 1997).



Σχήμα 3.3.2: Ρυθμοί στοιχειοποίησης του οργανικού άνθρακα στους σταθμούς δειγματοληψίας.

Οι συγκεντρώσεις οργανικού άνθρακα μπορεί να ποικίλουν στα διάφορα περιβάλλοντα λόγω των διαφορετικών προελεύσεων τους καθώς και των διαφορετικών επιπέδων ανόργανου υλικού (Gogou et al., 2000). Για το λόγο αυτό και όπως περιγράφεται από τους Gogou et al. (2000), υπολογίσαμε τις συγκεντρώσεις των αλειφατικών υδρογονανθράκων και ως προς τα επίπεδα οργανικού άνθρακα σε κάθε σταθμό ( $\mu\text{g g}^{-1}$  οργανικού άνθρακα).

**Πίνακας 3.3.1:** Συγκεντρώσεις και διαγνωστικοί λόγοι των αλειφατικών υδρογονανθράκων και των ελεύθερων λιπαρών οξέων στα ιζήματα της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης πριν και μετά τους 2-μήνες επώασης.

AHC: ολική συγκέντρωση των αλειφατικών υδρογονανθράκων; NA: συγκέντρωση των κ-αλκανίων; CPI: δείκτης προτίμησης αριθμού ατόμων άνθρακα για τα κ-αλκάνια  $C_{21}$  έως  $C_{36}$ ;  $\Sigma(C_{16:1}, C_{18:1}, C_{20:1})$ : άθροισμα των συγκεντρώσεων των κ-αλκενίων  $C_{16:1}$ ,  $C_{18:1}$  και  $C_{20:1}$ ; UCM: μίγμα μη διαχωριζόμενων ουσιών;  $C_{30}H$ : το οπάνιο 17 $\alpha(H)$ ,21 $\beta(H)$ - $C_{30}$ -hopane;  $\Sigma(C_{15}-C_{20})$ : άθροισμα των συγκεντρώσεων των κ-αλκανίων  $C_{15}$  έως  $C_{20}$ ;  $\Sigma(C_{21}-C_{36})$ : άθροισμα των συγκεντρώσεων των κ-αλκανίων  $C_{21}$  έως  $C_{36}$ ; SFFA: κορεσμένα ελεύθερα λιπαρά οξέα; MUFFA; μονοακόρεστα ελεύθερα λιπαρά οξέα; PUFFA; πολυακόρεστα ελεύθερα λιπαρά οξέα.

Σταθμοί Δειγματοληψίας	MPI1			MPI2			MPI3		
	<i>t</i> =0 d	<i>t</i> =60 d	αποικ.(%)	<i>t</i> =0 d	<i>t</i> =60 d	αποικ.(%)	<i>t</i> =0 d	<i>t</i> =60 d	αποικ.(%)
<i>Αλειφατικοί υδρογονάνθρακες</i>									
AHC ( $\text{ng g}^{-1}$ )	4323.1	3573.7	17	2986.9	2041.6	32	2107.4	2117.2	n.d.
NA ( $\text{ng g}^{-1}$ )	241.3	219.4	9	123.2	139.3	n.d.	157.9	137.6	n.d.
petrogenic/biogenic	0.18	0.07	n.d.	0.21	0.19	n.d.	0.10	0.14	n.d.
CPI ( $C_{21} - C_{36}$ )	2.8	3.8		2.6	3.3		3.6	4.2	
$\Sigma(C_{16:1}, C_{18:1}, C_{20:1})$ ( $\text{ng g}^{-1}$ )	34.2	0.0	100	9.3	0.0	100	8.4	0.0	100
NA / $C_{30}H$	29.8	23.2	22	23.8	20.2	15	64.8	22.5	65
$\Sigma(C_{15}-C_{20}) / C_{30}H$	2.4	0.5	79	2.0	1.5	25	2.4	1.3	48
$\Sigma(C_{21}-C_{36}) / C_{30}H$	24.5	21.1	14	21.1	17.5	17	56.5	19.4	66
UCM ( $\text{ng g}^{-1}$ )	4081.8	3354.3	18	2863.7	1902.3	34	1949.5	1979.6	n.d.
UCM / $C_{30}H$	504.4	355.5	30	554.1	276.4	50	799.3	323.9	59
<i>Ελεύθερα Λιπαρά Οξέα</i>									
Συνολικά ( $\text{ng g}^{-1}$ )	4633.3	2956.0	36	3995.3	3086.7	23	915.0	942.5	n.d.
SFFA ( $\text{ng g}^{-1}$ )	2949.2	2275.3	23	2848.0	2638.4	7	682.9	754.6	n.d.
MUFFA ( $\text{ng g}^{-1}$ )	1503.1	611.2	59	895.9	398.4	56	208.9	154.5	26
PUFFA ( $\text{ng g}^{-1}$ )	181.0	69.5	62	251.3	49.9	80	23.2	33.4	n.d.
$C_{16:1} / C_{16:0}$	0.9	0.06	n.d.	0.33	0.11	n.d.	0.4	0.1	n.d.
$C_{18:1} / C_{18:0}$	1.4	0.91	n.d.	1.29	0.68	n.d.	1.2	1.5	n.d.

*Αλειφατικοί υδρογονάνθρακες (AHC).* Το κλάσμα των αλειφατικών υδρογονανθράκων αποτελούνταν από κ-αλκάνια και ένα μίγμα ‘Μη Διαχωριζόμενων Ουσιών’ (unresolved complex mixture ή UCM). Οι απόλυτες (AHC) και κανονικοποιημένες ως προς τον οργανικό άνθρακα τιμές των αλειφατικών υδρογονανθράκων κυμάνθηκαν μεταξύ 2107.4 – 4323.1  $\text{ng g}^{-1}$  (Πίνακας 3.3.1) και 501.8 – 960.7  $\text{ng g}^{-1}$ , αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές ήταν συγκρίσιμες με τιμές που έχουν καταγραφεί για τον Βορειοδυτικό Ατλαντικό ωκεανό (1.3 – 7.5  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; Farrington and Tripp, 1977) και πολύ χαμηλότερες με τις αντίστοιχες τιμές στην Μαύρη Θάλασσα (10-150  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; Wakeham 1996). Οι συγκεντρώσεις κ-αλκανίων (μήκος ανθρακικής αλυσίδας μεταξύ  $C_{15}$  και  $C_{40}$ ) ήταν χαμηλές σε όλους τους σταθμούς (NA: 123.2 –

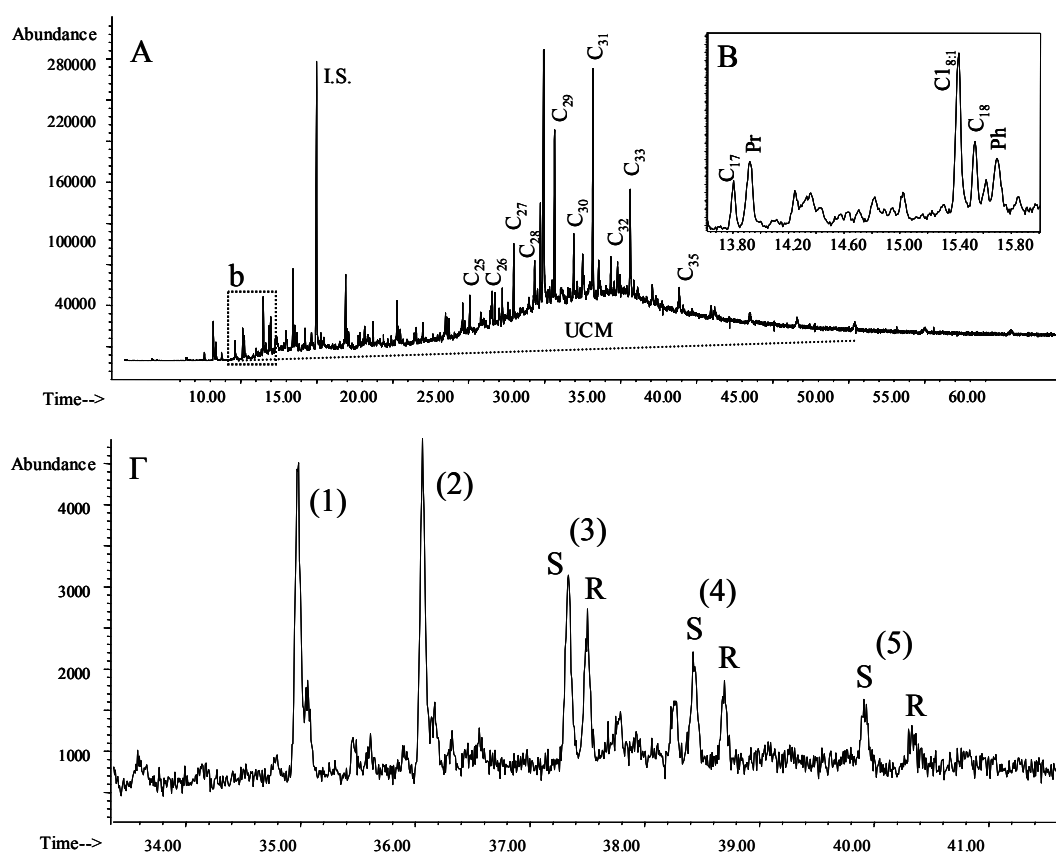
241.3 ng g<sup>-1</sup>; Πίνακας 3.3.1) και συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες τιμές στην Νότια Κασπία Θάλασσα (0.5 μg g<sup>-1</sup>; Tolosa et al., 2004) καθώς και με τα νησιά του Ατλαντικού ωκεανού South Orkney (0.4 μg g<sup>-1</sup>; Cripps, 1994). Οι κανονικοποιημένες ως προς τον οργανικό άνθρακα τιμές των κ-αλκανίων ήταν 53.6 μg g<sup>-1</sup>, 25.7 μg g<sup>-1</sup> και 37.6 μg g<sup>-1</sup> στους σταθμούς MPI1, MPI2 και MPI3, αντίστοιχα. Τα κ-αλκένια C<sub>16:1</sub>, C<sub>18:1</sub> και C<sub>20:1</sub> ανιχνεύθηκαν και στους τρεις σταθμούς πριν την έναρξη των επωάσεων με τιμές που κυμάνθηκαν μεταξύ 8.4 - 34.2 ng g<sup>-1</sup> (Πίνακας 3.3.1). Τα κ-αλκάνια με μεγάλο αριθμό ατόμων άνθρακα στην αλυσίδα τους παρουσίασαν σε όλους τους σταθμούς τις υψηλότερες συγκεντρώσεις (Σ(C<sub>21</sub>-C<sub>36</sub>), Σχήματα 3.3.3Α, Γ). Τα συγκεκριμένα αλκάνια χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του 'Δείκτη Προτίμησης Αριθμού Ατόμων Άνθρακα' ή CPI. Οι τιμές CPI (λόγος μονών προς ζυγών ατόμων άνθρακα) είναι πολύ σημαντικές για τον προσδιορισμό της προέλευσης των κ-αλκανίων (Simoneit, 1999). Στην παρούσα εργασία, για τον υπολογισμό των τιμών CPI χρησιμοποιήθηκε η εξής εξίσωση:

$$CPI = \frac{\sum(C_{21}-C_{35})}{\sum(C_{22}-C_{36})}$$

Οι υδρογονάνθρακες που προέρχονται από τη φύση παρουσιάζουν τιμές CPI > 1. Αντίθετα, τιμές CPI ίσες ή χαμηλότερες της μονάδας αποτελούν ισχυρή ένδειξη ότι οι υδρογονάνθρακες προέρχονται από ανθρωπογενείς δραστηριότητες (Simoneit, 1999). Οι τιμές CPI των ιζημάτων της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης κυμάνθηκαν μεταξύ 2.6 – 3.6, με τη μέγιστη καταγραφόμενη τιμή στον βαθύ σταθμό (Πίνακας 3.3.1). Το άθροισμα των συγκεντρώσεων των τριών πιο άφθονων χερσαίων κ-αλκανίων (C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub> και C<sub>31</sub>) ήταν υψηλότερο στο ρηχό σταθμό MPI1 (104.6 ng g<sup>-1</sup>) τονίζοντας την συνεισφορά του χερσαίου οργανικού υλικού στη σύσταση των ιζημάτων της περιοχής. Εντούτοις, οι συγκεκριμένες τιμές ήταν κατά πολύ χαμηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές που έχουν καταγραφεί σε παράκτιους σταθμούς στην Νοτιοδυτική Μεσόγειο θάλασσα που χαρακτηρίζονται από εισροές ποταμών (2.0-12.9 μg g<sup>-1</sup>; Bouloubassi et al., 1997). Οι κανονικοποιημένες, ως προς τον οργανικό άνθρακα συγκεντρώσεις των τριών πιο άφθονων κ-αλκανίων (Ter/OC; 23.2, 12.9 και 17.8 μg g<sup>-1</sup> στους σταθμούς MPI1, MPI2 και MPI3, αντίστοιχα), ήταν επίσης υψηλότερες στο ρηχό σταθμό MPI1. Υψηλές τιμές χερσαίων κ-αλκανίων καταγράφηκαν στο βαθύ σταθμό (Πίνακας 3.3.1) υποδηλώνοντας ότι στην άκρη της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης επικρατούν διαδικασίες διατάραξης του ιζήματος (Σχήμα 3.3.1) όπως

εξάλλου έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες εργασίες (Chronis et al., 2000; Gogou et al., 2000).

Τα κ-αλκάνια με μικρή ανθρακική αλυσίδα ( $C_{15} - C_{20}$ ) βρίσκονταν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις ( $14.3 - 54.0 \text{ ng g}^{-1}$  ξηρής μάζας ιζήματος). Το άθροισμα των συγκεντρώσεων των τριών χαρακτηριστικών κ-αλκανίων θαλάσσιας προέλευσης  $C_{15}$ ,  $C_{17}$  and  $C_{19}$  καθώς και των κανονικοποιημένων ως προς τον οργανικό άνθρακα συγκεντρώσεων (Mar/OC; 1.6, 0.5 και  $0.4 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  στους σταθμούς MPI1, MPI2 και MPI3, αντίστοιχα) παρουσίασαν μειωμένες τιμές στον βαθύ σταθμό MPI3 ενώ η υψηλότερη τιμή του χαρακτηριστικού δείκτη των θαλασσιών φυκών  $C_{17}$  (Blumer et al., 1971) καταγράφηκε στο ρηχό σταθμό MPI1.



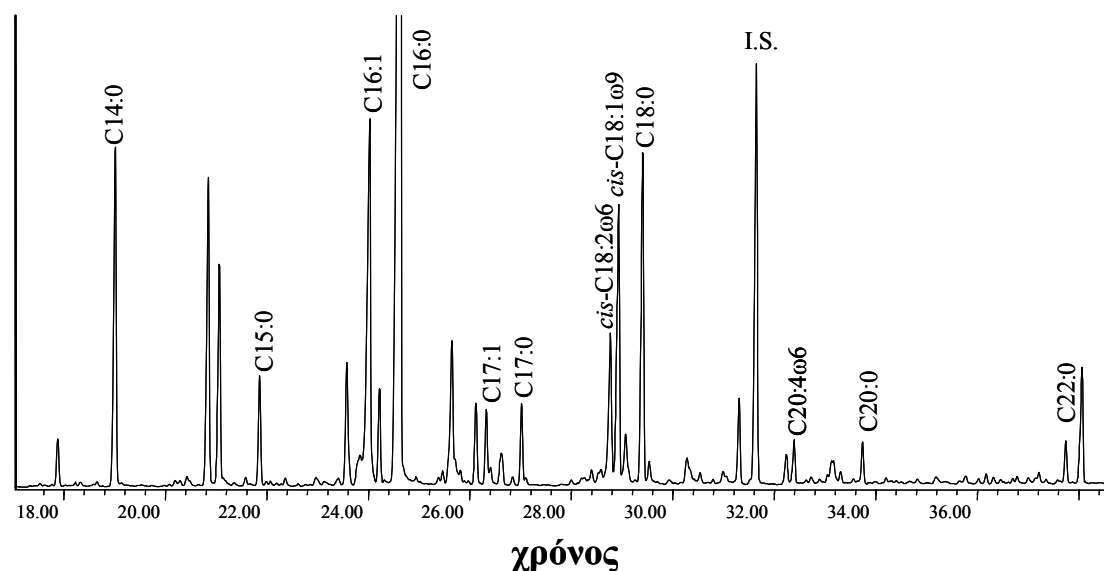
**Σχήμα 3.3.3:** Α) Χαρακτηριστικό αέριο χρωματογράφημα του κλάσματος των αλειφατικών υδρογονανθράκων στο σταθμό MPI1 πριν την έναρξη των επωάσεων. Β) Τμήμα αέριου χρωματογραφήματος που φαίνονται οι ισοπρενοειδείς υδρογονάνθρακες πριστάνιο και φυτάνιο. Γ) Χρωματογράφημα ιόντων των οπανίων που προσδιορίστηκαν στα ιζήματα της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης; (1)  $17\alpha(H),21\beta(H)-C_{29}$ -norhopane ( $C_{29}H_{50}$ ); (2)  $17\alpha(H),21\beta(H)-C_{30}$ -hopane ( $C_{30}H_{52}$ ); (3)  $17\alpha(H),21\beta(H)$ -homohopane ( $C_{31}H_{54}$ , 22S and 22R); (4)  $17\alpha(H),21\beta(H)$ -bishomohopane ( $C_{32}H_{56}$ , 22S and 22R); (5)  $17\alpha(H),21\beta(H)$ -trishomohopane ( $C_{33}H_{58}$ , 22S and 22R).

Η καμπύλη που παρατηρήθηκε στα χρωματογραφήματα των αλειφατικών υδρογονανθράκων μεταξύ των κ-αλκανίων  $C_{15}$  έως  $C_{36}$  (Σχήμα 3.3.3Α) υποδηλώνει την παρουσία του ‘Μίγματος Μη Διαχωριζόμενων Ουσιών’ (Unresolved Complex Mixture ή UCM) στα δείγματα (Gogou et al., 2000). Το UCM ήταν το πιο σημαντικό

συστατικό στο κλάσμα των αλειφατικών υδρογονανθράκων (88 – 93%, Πίνακας 3.3.2) ενώ μια πρόσφατη εργασία έχει δείξει ότι αποτελείται από διακλαδωμένα αλκάνια, κυκλοαλκάνια, μονοαρωματικά, ναφθαλένια καθώς και από πολυαρωματικούς υδρογονάνθρακες (Frysiner et al., 2003). Οι υψηλές συγκεντρώσεις UCM που καταγράφηκαν στα δείγματα από την υφαλοκρηπίδα της Κρήτης (1949.5 – 4081.8 ng g<sup>-1</sup>) αποτελούν ισχυρή ένδειξη χρόνιας περιβαλλοντικής ρύπανσης στην συγκεκριμένη περιοχή. Πάρα ταύτα, τα επίπεδα των καταγραφόμενων τιμών ήταν πολύ χαμηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα σε παράκτιες (7-488 μg g<sup>-1</sup>; Tolosa et al., 1996) καθώς και σε απομακρυσμένες περιοχές της Βορειοδυτικής Μεσογείου (7-13 μg g<sup>-1</sup>; Tolosa et al., 1996). Οι ισοπρενοειδείς υδρογονάνθρακες πριστάνιο (pristine) και φυτάνιο (phytane) (Σχήματα 3.3.3A, B) ανιχνεύτηκαν σε όλα τα δείγματα. Ένα μεγάλο εύρος βιοδεικτών χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια για τον χαρακτηρισμό του ακατέργαστου πετρελαίου ως κύρια αιτία περιβαλλοντικής ρύπανσης. Οι συγκεκριμένοι βιοδείκτες περιλαμβάνουν, τα τρικυκλικά, τετρακυκλικά και πεντακυκλικά τερπάνια που η κατανομή τους διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών ειδών πετρελαίου (Wang et al., 1999). Στην παρούσα εργασία, μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε τα πεντακυκλικά τερπάνια (οπάνια) με ανθρακική αλυσίδα C<sub>29</sub>-C<sub>33</sub>. Ο προσδιορισμός των οπανίων πραγματοποιήθηκε κυρίως με βάση το φάσμα μάζας τους καθώς και τον χρόνο έκλουσης στα αέρια χρωματογραφήματα. Στο σχήμα 3.3.3Γ παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα ιόντων (m / z 191) οπανίων. Η ομόλογη σειρά των οπανίων με αριθμό ατόμων άνθρακα ≥ C<sub>29</sub> βρίσκεται με την μορφή της θερμοδυναμικά σταθερής δομής 17α(H), 21β(H) ενώ τα οπάνια με αριθμό ατόμων άνθρακα μεταξύ C<sub>31</sub>-C<sub>33</sub> βρίσκονται με τη μορφή των επιμερών 22S και 22R (Σχήμα 3.3.3Γ).

*Ανάλυση των φωσφολιπιδίων.* Για τη μελέτη της σύστασης των μικροβιακών κοινωσιών ακολουθήσαμε την τεχνική ανάλυσης των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων (PLFA) που χρησιμοποιείται ευρέως για την περιγραφή των μικροβίων που είτε διαθέτουν ικανότητα καλλιέργειας στο εργαστήριο είτε όχι (Balkwill et al., 1998). Οι συγκεντρώσεις των PLFA στα περιβαλλοντικά δείγματα κυμάνθησαν μεταξύ 0.5 – 1.4 μg g<sup>-1</sup> ξηρής μάζας ιζήματος (Πίνακας 3.3.2). Βασίζόμενοι στις δημοσιευμένες τιμές για το βακτήριο *Escherichia coli* όπου 5.9 × 10<sup>12</sup> κύτταρα αντιστοιχούν σε 1 g (Stratford, 1977), ενώ 1 g βακτηρίων περιλαμβάνει 100 μmol PLFA (White et al., 1979), μπορέσαμε να προσδιορίσουμε τον αριθμό

βακτηρίων ανά γραμμάριο ξηρής μάζας ιζήματος. Οι υπολογιζόμενες κυτταρικές αφθονίες κυμάνθηκαν μεταξύ  $1.17$  και  $2.99 \times 10^8$  κύτταρα  $g^{-1}$  ξηρής μάζας ιζήματος (Πίνακας 3.3.2). Το εύρος των λιπαρών οξέων που ανιχνεύθηκαν στο κλάσμα των φωσφολιπιδίων κυμάνθηκε μεταξύ  $C_{8:0}$  και  $C_{22:0}$  (Σχήμα 3.3.5; Πίνακας 3.3.2). Τα λιπαρά οξέα των φωσφολιπιδίων περιελάμβαναν δυο διαφορετικές ομόλογες σειρές: τα κορεσμένα κ-αλκανοϊκά οξέα (κορεσμένα λιπαρά οξέα ή SFA, Πίνακας 3.3.1) που διαχωρίζονταν στα λιπαρά οξέα με ζυγό αριθμό ατόμων άνθρακα (ESFA, Πίνακας 3.3.2) και στα λιπαρά οξέα με μονό αριθμό ατόμων άνθρακα (OSFA, Πίνακας 3.3.2) και στα κ-αλκενοϊκά οξέα (ακόρεστα λιπαρά οξέα ή UFA, Πίνακας 3.3.2) που διαχωρίζονταν στα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA, Πίνακας 3.3.2) και στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA, Πίνακας 3.3.2). Τα κυριότερα βακτηριακά



**Σχήμα 3.3.4:** Χαρακτηριστικό αέριο χρωματογράφημα του κλάσματος των φωσφολιπιδίων στο σταθμό MPI1 πριν την επώαση.

λιπαρά οξέα που ανιχνεύθηκαν ήταν τα  $C_{16:1}$ ,  $C_{16:0}$ ,  $C_{18:1}$  και  $C_{18:0}$  (Σχήμα 3.3.4; Πίνακας 3.3.2).

Τόσο τα κορεσμένα όσο και τα ακόρεστα λιπαρά οξέα παρουσίασαν παρόμοια κατανομή στο μήκος της ανθρακικής τους αλυσίδας σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν (Σχήμα 3.3.4; Πίνακας 3.3.2). Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα με ζυγό αριθμό ατόμων άνθρακα ( $47.5 \pm 7.6$  % στο MPI1,  $54.0 \pm 12.2$  % στο MPI2 και  $51.3 \pm 9.8$  % στο MPI3; Πίνακας 3.3.2) ήταν πιο άφθονα από τα κορεσμένα λιπαρά οξέα με μονό αριθμό ατόμων άνθρακα ( $3.1 \pm 2.2$  % στο MPI1,  $8.9 \pm 5.0$  % στο MPI2,  $4.7 \pm 2.1$  % στο MPI3; Πίνακας 3.3.2) υποδηλώνοντας ταυτόχρονα ότι η συνεισφορά των θαλάσσιων οργανισμών (πλαγκτονικών και μικροβιακών) στη σύσταση των ιζημάτων ήταν σημαντική (Eglinton and Hamilton, 1967; Gogou et al., 2004).

**Πίνακας 3.3.2:** Συγκεντρώσεις φωσφολιπιδίων που προσδιορίστηκαν στα ιζήματα της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης πριν την έναρξη των επωάσεων.

SFA: κορεσμένα λιπαρά οξέα; ESFA: κορεσμένα λιπαρά οξέα με ζυγό αριθμό ατόμων άνθρακα; OSFA: κορεσμένα λιπαρά οξέα με μονό αριθμό ατόμων άνθρακα; MUFA: μονοακόρεστα λιπαρά οξέα; PUFA; πολυακόρεστα λιπαρά οξέα; *sd*: τυπική απόκλιση. Ο λόγος *trans/cis* υπολογίστηκε για το μονοακόρεστο λιπαρό οξύ C<sub>18:1ω9</sub>. Οι βακτηριακές αφθονίες σε κύτταρα g<sup>-1</sup> ξηρής μάζας ιζήματος υπολογίστηκαν με βάση τον παράγοντα μετατροπής του βακτηρίου *E.coli* όπως περιγράφεται σε προηγούμενες εργασίες (Statford, 1977; White et al., 1979).

Φωσφολιπίδια	MPI1		MPI2		MPI3	
	μέσος όρος	<i>sd</i>	μέσος όρος	<i>sd</i>	μέσος όρος	<i>sd</i>
Συνολικά (ng g <sup>-1</sup> )	644.2	155.6	537.7	154.1	1368.7	312.5
SFA %	50.6	9.8	62.9	7.2	56.0	11.9
ESFA %	47.5	7.6	54.0	12.2	51.3	9.8
OSFA %	3.1	2.2	8.9	5	4.7	2.1
MUFA %	46.3	12.2	30.0	7.5	40.3	8.5
PUFA %	3.1	2.1	7.0	4	3.7	2.4
<i>trans/cis</i> λόγος	1.6	0.5	0.9	0.2	0.9	0.2
× 10 <sup>8</sup> (κύτταρα g <sup>-1</sup> )	1.4		1.2		2.9	
Κατανομή (ng g <sup>-1</sup> )						
C <sub>8:0</sub>	0.1	0.1	-		-	
C <sub>10:0</sub>	0.4	0.3	0.9	0.4	0.1	0.1
C <sub>11:0</sub>	1.0	0.7	-		1.6	2
C <sub>12:0</sub>	3.4	2.3	3.1	2.9	2.4	2.1
C <sub>13:0</sub>	0.7	0.7	0.5	0.7	1.4	1.3
C <sub>14:1</sub>	2.1	1.3	1.7	0.2	0.6	0.5
C <sub>14:0</sub>	48.4	4.8	34.7	7.7	134.9	25.1
<i>cis</i> -10-C <sub>15:1</sub>	4.1	1.8	7.1	3.5	2.5	1.7
C <sub>15:0</sub>	11.3	8.9	37.3	16.9	34.0	11.9
C <sub>16:1</sub>	218.2	48.2	77.8	21.4	364.8	62.5
C <sub>16:0</sub>	208.1	27.7	181.7	35.9	492.1	86.4
<i>cis</i> -10-C <sub>17:1</sub>	1.1	0.8	9.4	0.8	4.1	2.9
C <sub>17:0</sub>	5.9	3.5	6.9	6.6	19.6	6.1
C <sub>18:3ω3</sub>	0.2	0.4	1.7	0.2	6.4	8.2
<i>cis</i> -C <sub>18:2ω6</sub>	3.6	2.3	1.8	0.3	11.4	6
<i>trans</i> -C <sub>18:1ω9</sub>	31.0	6.7	25.7	5	68.7	19.1
<i>cis</i> -C <sub>18:1ω9</sub>	19.8	11.8	29.7	1.7	74.1	1.3
C <sub>18:0</sub>	37.4	11.6	51.1	1.7	58.5	14.7
C <sub>20:4ω6</sub>	3.2	1.4	1.3	0.7	7.7	1.7
C <sub>20:3ω6</sub>	1.4	0.8	6.5	1.1	1.8	2.6
<i>cis</i> -11,14-C <sub>20:2</sub>	9.4	8	15.9	8	19.9	10.8
<i>cis</i> -11-C <sub>20:1</sub>	18.3	6.6	8.3	6.9	36.5	28
C <sub>20:0</sub>	4.6	0.5	5.0	3.8	10.9	1.3
C <sub>21:0</sub>	1.1	0.4	3.3	2.5	7.2	7.1
<i>cis</i> -13,16-C <sub>22:2</sub>	2.2	0.9	10.5	11.4	3.6	3.9
C <sub>22:1ω9</sub>	3.7	1.6	1.9	0.6	0.7	0.7
C <sub>22:0</sub>	3.9	1.5	14.0	13	3.2	4.5

Τα ποσοστά των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων κυμάνθηκαν μεταξύ  $30.0 \pm 7.5$  % στο σταθμό MPI2 και  $46.3 \pm 12.2$  % στο σταθμό MPI1 (Πίνακας 3.3.2). Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ήταν ιδιαίτερα χαμηλές ( $3.1 \pm 2.1$  % στο MPI1,  $7.0 \pm 4.0$  % στο MPI2,  $3.7 \pm 2.4$  % στο MPI3; Πίνακας 3.3.2). Οι δομές των ισομερών *trans* και *cis* ανιχνεύτηκαν στο μονοακόρεστο λιπαρό οξύ  $C_{18:1\omega 9}$  ενώ ο μεταξύ τους λόγος κυμάνθηκε μεταξύ  $0.9 \pm 0.2$  (MPI2; Πίνακας 3.3.2) και  $1.6 \pm 0.5$  (MPI1; Πίνακας 3.3.2).

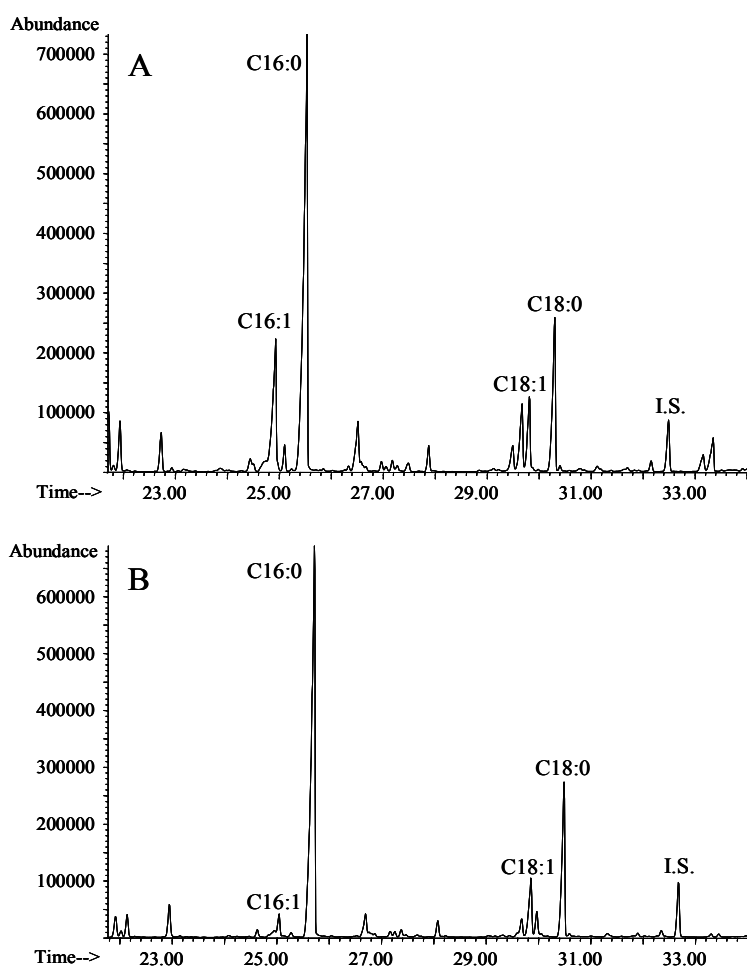
*Ελεύθερα λιπαρά οξέα.* Το κλάσμα των ελεύθερων λιπαρών οξέων περιελάμβανε λιπαρά οξέα με ανθρακική αλυσίδα μεταξύ  $C_8$ - $C_{24}$  (Σχήμα 3.3.5). Οι συγκεντρώσεις των ελεύθερων λιπαρών οξέων που καταγράφηκαν ήταν 4633.3, 3995.3 και 915.0 ng  $g^{-1}$  ξηρής μάζας ιζήματος στους σταθμούς MPI1, MPI2 και MPI3, αντίστοιχα. Οι συγκεντρώσεις των κορεσμένων ελεύθερων λιπαρών οξέων (SFFA; 2949.2 ng  $g^{-1}$  στο MPI1, 2848.0 ng  $g^{-1}$  στο MPI2 και 682.9 ng  $g^{-1}$  στο MPI3; Πίνακας 3.3.1) ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες των μονοακόρεστων ελεύθερων λιπαρών οξέων (MUFFA; 1503.1 ng  $g^{-1}$  στο MPI1, 895.9 ng  $g^{-1}$  στο MPI2 και 208.9 ng  $g^{-1}$  στο MPI3; Πίνακας 3.3.1). Αντίθετα οι συγκεντρώσεις των πολυακόρεστων ελεύθερων λιπαρών οξέων (PUFFA) ήταν ιδιαίτερα χαμηλές (181.0 ng  $g^{-1}$  στο MPI1, 251.3 ng  $g^{-1}$  στο MPI2 και 23.2 ng  $g^{-1}$  στο MPI3; Πίνακας 3.3.1). Γενικά, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα προέρχονται από το πλαγκτόν ή από βενθικά ασπόνδυλα, και θεωρούνται εύκολα αποικοδομήσιμα σε σύγκριση με τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (Wakeham et al., 1995; Gogou et al., 2004). Οι Gogou και συνεργάτες (2004) σε προηγούμενη εργασία που πραγματοποιήθηκε στην υφαλοκρηπίδα της Κρήτης κατέγραψαν επίσης χαμηλές ποσότητες πολυακόρεστων ελεύθερων λιπαρών οξέων ( $35.8 - 301.9$  ng  $g^{-1}$ ; Gogou et al., 2004).

### 3.3.2 Αλλαγές μετά την επώαση

*Αλειφατικοί υδρογονάνθρακες.* Μετά την επώαση των 2-μηνών οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στην κατανομή των κ-αλκανίων δεν ήταν ιδιαίτερα εμφανείς. Εντούτοις, τα επίπεδα των αλειφατικών υδρογονανθράκων (AHC, Πίνακας 3.3.1,) μειώθηκαν σημαντικά στους σταθμούς δειγματοληψίας MPI1 και MPI2. Οι τιμές CPI αυξήθηκαν μετά τις επώσεις υποδηλώνοντας ότι τα κ-αλκάνια με ζυγό αριθμό ατόμων άνθρακα είναι πιο εύκολα αποικοδομήσιμα από τα αντίστοιχα με μονό αριθμό (Πίνακας 3.3.1). Η μεταβολή των υδρογονανθράκων κατά την περίοδο της επώασης μελετήθηκε μέσω της μείωσης των κ-αλκανίων,  $\Sigma(C_{15}-C_{20})$ ,  $\Sigma(C_{21}-C_{36})$  και



του UCM ως προς το οπάνιο 17α(H),21β(H)-C<sub>30</sub>-hopane (C<sub>30</sub>H) (Πίνακας 3.3.1). Τα οπάνια ανήκουν στην κατηγορία των ουσιών που διαθέτουν μεγάλη ανθεκτικότητα σε διαδικασίες βιοαποικοδόμησης στο περιβάλλον και για το λόγο αυτό έχει προταθεί η χρήση τους ως εσωτερικά πρότυπα σε μελέτες βιοαποικοδόμησης (Wang et al., 1999). Στην παρούσα εργασία, οι συγκεκριμένοι διαγνωστικοί λόγοι των κ-αλκανίων ως προς το οπάνιο, μειώνονταν ξεκάθαρα μετά την περίοδο της επώασης, σε όλους τους σταθμούς (Πίνακας 3.3.1) αποτελώντας έτσι ισχυρή ένδειξη για την παρουσία διαδικασιών αποικοδόμησης. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην ύπαρξη βακτηρίων που διαθέτουν ικανότητα αποικοδόμησης υδρογονανθράκων. Η ικανότητα αποικοδόμησης των κ-αλκανίων με διαφορετικό αριθμό ατόμων άνθρακα διέφερε



**Σχήμα 3.3.5:** Χαρακτηριστικό αέριο χρωματογράφημα του κλάσματος των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο σταθμό MPII A) πριν και B) μετά τους 2-μήνες επώαση.

σημαντικά μεταξύ των σταθμών ( $\Sigma(C_{15}-C_{20})/C_{30}H$  και  $\Sigma(C_{21}-C_{36})/C_{30}H$ ; Πίνακας 3.3.1). Στο ρηχό σταθμό MPII ένα ποσοστό ~ 78.6 % των κ-αλκανίων C<sub>15</sub>-C<sub>20</sub> απομακρύνθηκε μετά την επώαση ενώ ένα ποσοστό ~ 86.3 % των κ-αλκανίων C<sub>21</sub> -

C<sub>36</sub> παρέμεινε στο τέλος του πειράματος (Πίνακας 3.3.1). Προηγούμενες εργασίες έχουν δείξει επίσης ότι τα κ-αλκάνια με μικρή ανθρακική αλυσίδα αποικοδομούνται σε πολύ υψηλούς ρυθμούς (Grossi et al., 2002). Οι Grossi και συνεργατές (2002), σε πείραμα που πραγματοποίησαν σε μια ρυπασμένη με υδρογονάνθρακες περιοχή στη Γαλλία, έδειξαν ότι τα κ-αλκάνια με αριθμό ατόμων άνθρακα  $\leq C_{25}$  απομακρύνονταν τελείως από το ίζημα σε μια χρονική περίοδο που δεν ξεπερνούσε τους 6 μήνες. Επίσης, οι Teece και συνεργάτες (1998) έδειξαν ότι εκτός από τα κ-αλκάνια, τα κ-αλκένια αποικοδομούνται ταχύτατα σε οξικές συνθήκες (Teece et al. 1998). Στην παρούσα εργασία, τα κ-αλκένια C<sub>16:1</sub>, C<sub>18:1</sub> και C<sub>20:1</sub> εξαφανίστηκαν μετά από τα πειράματα επώασης σε όλους τους σταθμούς (Πίνακας 3.3.1). Οι ρυθμοί αποικοδόμησης των κ-αλκανίων με μικρή και με μεγάλη ανθρακική αλυσίδα διέφερε επίσης σημαντικά μεταξύ των βαθύτερων σταθμών δειγματοληψίας MPI2 και MPI3. Συγκεκριμένα, στο σταθμό MPI2, ~ 24.8 των κ-αλκανίων με μικρή ανθρακική αλυσίδα και ~ 16.9 % των κ-αλκανίων με μεγάλη ανθρακική αλυσίδα απομακρύνονταν μετά το πείραμα επώασης, ενώ στο βαθύτερο σταθμό MPI3, τα αντίστοιχα ποσοστά απομάκρυνσης ήταν ~ 14.7 για τα κ-αλκάνια με μεγάλη ανθρακική αλυσίδα, ενώ τα κ-αλκάνια με μικρή ανθρακική αλυσίδα παρέμειναν σταθερά (Πίνακας 3.3.1). Επίσης οι ρυθμοί απομάκρυνσης του UCM (UCM/C<sub>30</sub>H) διέφεραν μεταξύ των σταθμών δειγματοληψίας, πιθανότατα ως αποτέλεσμα της ύπαρξης πετρελαίου διαφορετικής προέλευσης στα περιβαλλοντικά δείγματα (Frysinger et al., 2003).

*Προϊόντα λύσις (διγλυκερίδια, γλυκολιπίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα).* Τα κλάσματα των διγλυκεριδίων και γλυκολιπιδίων παρουσίασαν ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις τόσο πριν όσο και μετά το πείραμα επώασης. Τα λιπαρά οξέα των διγλυκεριδίων που έχουν προταθεί ως δείκτες νεκρών και πρόσφατα κατεστραμμένων κυττάρων είναι συνήθως προϊόντα λύσις των διάφορων γλυκεριδίων (Thiele, 1979) και τα επίπεδα συγκεντρώσεών τους είναι ιδιαίτερα χαμηλά εφόσον αποικοδομούνται ταχύτατα και δεν μπορούν να συσσωρευτούν στο περιβάλλον (Rütters et al., 2000b). Τα γλυκολιπίδια αποτελούν το κυριότερο συστατικό της μεμβράνης των κυανοβακτηρίων (Smith, 1988) αλλά βρίσκονται σε ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις στην κυτταρική μεμβράνη των ανοξικών φωτότροφων βακτηρίων (Imhoff and Bias-Imhoff, 1995; Rütters et al., 2002b). Τα χαμηλά επίπεδα γλυκολιπιδίων που ανιχνεύτηκαν στα περιβαλλοντικά δείγματα πιθανότατα υποδηλώνουν ότι οι

φωτοσυνθετικοί οργανισμοί αντιπροσωπεύουν ένα πολύ μικρό ποσοστό της συνολικής μικροβιακής βιομάζας στα ιζήματα της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης.

Μετά την περίοδο επώασης, η κατανομή των ελεύθερων λιπαρών οξέων διαφοροποιήθηκε σημαντικά με το κορεσμένο λιπαρό οξύ C16:0 να αποτελεί το κυριότερο συστατικό τους (Σχήμα 3.3.5). Οι συγκεντρώσεις των ελεύθερων λιπαρών οξέων παρέμειναν σταθερές στο βαθύ σταθμό MPI3, ενώ ένα ποσοστό ~ 22.8% και 7.4% απομακρύνθηκε, μετά το τέλος της επώασης από τα δείγματα των σταθμών MPI1 και MPI2 αντίστοιχα (Πίνακας 3.3.1). Αντίθετα, ένα πολύ υψηλό ποσοστό ~ 59.3% και 55.5% των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων απομακρύνθηκε από τα δείγματα των σταθμών MPI1 και MPI2 αντίστοιχα, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό ήταν κατά πολύ υψηλότερο για τα πολυακόρεστα ελεύθερα λιπαρά οξέα (61.6% στο MPI1; 80.1% στο MPI2; Πίνακας 3.3.1). Επίσης, οι λόγοι των ακόρεστων προς των κορεσμένων ελεύθερων λιπαρών οξέων μειώθηκαν σημαντικά μετά την περίοδο επώασης με μια μικρή εξαίρεση στο σταθμό MPI3 (Σχήμα 3.3.5; Πίνακας 3.3.1).

### **3.3.3 Ρυθμοί στοιχειοποίησης και πηγές οργανικού άνθρακα**

Αν και σε παγκόσμια κλίματα η επιφάνεια που καλύπτουν οι υφαλοκρηπίδες είναι ιδιαίτερα μικρή ο ρόλος τους στην ρύθμιση του βιογεωχημικού κύκλου του άνθρακα είναι ιδιαίτερα σημαντικός (Jahnke et al., 1990; Martin and Sayles, 2004). Στα ιζήματα της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης οι μεταβολικές διαδικασίες που επικρατούν είναι οξικές. Αν και οι ποσότητες οργανικού άνθρακα που καταγράφηκαν ήταν παρόμοιες και στους τρεις βαθυμετρικούς σταθμούς που μελετήσαμε οι μεγάλες διαφορές που παρατηρήθηκαν στους ρυθμούς στοιχειοποίησης του άνθρακα δηλώνουν ότι οι μικροβιακές κοινωνίες είναι πιο ενεργές στους ρηχούς σταθμούς (Σχήμα 3.3.2). Αυτό πιθανότητα οφείλεται στις ποιοτικές διαφορές του οργανικού άνθρακα ως αποτέλεσμα των διαφορετικών πηγών προέλευσής τους.

Σε προηγούμενη εργασία που πραγματοποιήθηκε στην ίδια περιοχή οι Danovaro και συνεργάτες (2000) έδειξαν ότι η βακτηριακή αφθονία τριπλασιάζεται ως αποτέλεσμα της αυξανόμενης εισροής πρωτεϊνών δηλώνοντας ταυτόχρονα ότι η αντίδραση των βακτηρίων των ιζημάτων περιορίζεται περισσότερο από αλλαγές στην ποιότητα και όχι στην ποσότητα του οργανικού υλικού. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι η βακτηριακή ανάπτυξη περιορίζεται από την ποιότητα των διαθέσιμων πηγών άνθρακα και ενέργειας (Vallino et al., 1996). Για παράδειγμα, σε προηγούμενη εργασία (Nedwell et al., 1993) είχε παρατηρηθεί ότι οι ρυθμοί

στοιχειοποίησης του οργανικού άνθρακα σε παράκτια ιζήματα της Ανταρκτικής αυξάνονταν με την εισροή φρέσκου οργανικού υλικού στο οικοσύστημα.

Στην κατανομή των κ-αλκανίων C<sub>21</sub>-C<sub>36</sub> στα ιζήματα της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης τα κ-αλκάνια *n*-C<sub>27</sub>, *n*-C<sub>39</sub>, και *n*-C<sub>31</sub> ήταν τα πιο άφθονα. Τα συγκεκριμένα αλκάνια αποτελούν χαρακτηριστικά συστατικά των φυτικών οργανισμών χερσαίας προέλευσης. Κατά συνέπεια, η συνεισφορά του χερσαίου περιβάλλοντος στην σύσταση των ιζημάτων της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντική (Eglinton and Hamilton, 1967; Gogou et al., 2000; Volkman et al., 2000). Η συγκεκριμένη κατανομή των κ-αλκανίων όπως φαίνεται άλλωστε και σε προηγούμενες εργασίες είναι χαρακτηριστική των παράκτιων περιβαλλόντων (Gogou et al., 1998; 2000; Jeng and Huh, 2004; Tolosa et al., 2004).

Στην παρούσα εργασία, η κατανομή των κ-αλκανίων παρουσίασε διαφορές μεταξύ του ρηχού σταθμού MPI1 και των βαθύτερων σταθμών MPI2 και MPI3 (Σχήμα 3.3.4). Τα κ-αλκάνια με μικρή ανθρακική αλυσίδα (C<sub>15</sub> – C<sub>20</sub>) ήταν πιο άφθονα στο ρηχό σταθμό δειγματοληψίας (Σχήμα 3.3.4). Λόγω της γεωγραφικής του θέσης ο ρηχός σταθμός MPI1, στον οποίο οι ρυθμοί στοιχειοποίησης του οργανικού άνθρακα ήταν υψηλότεροι δέχεται έντονες επιρροές χερσαίας προέλευσης (Σχήμα 3.3.1). Σε προηγούμενη εργασία οι Psarra και συνεργάτες (2000) έδειξαν ότι η πρωτογενής παραγωγικότητα σε ένα ρηχό σταθμό δειγματοληψίας του Κρητικού Πελάγους (100 m) ήταν σαφώς υψηλότερη από έναν βαθύ σταθμό (540 m), ενώ οι καταγεγραμμένες τιμές ήταν πολύ χαμηλές λόγω των έντονων ολιγοτροφικών συνθηκών που επικρατούν γενικά στην περιοχή. Επίσης, τα κ-αλκάνια με μικρή ανθρακική αλυσίδα (C<sub>15</sub> – C<sub>20</sub>) είναι γνωστό ότι προέρχονται από τα βακτήρια και κυρίως από το θαλάσσιο περιβάλλον. Οι ιδιαίτερα χαμηλές τιμές αυτών των αλκανίων που καταγράφηκαν στην παρούσα εργασία δηλώνουν ότι οι ουσίες αυτές αποικοδομούνται πολύ εύκολα και παράλληλα επιβεβαιώνουν τη χαμηλή παραγωγικότητα των νερών του Κρητικού Πελάγους όπως άλλωστε έχει αναφερθεί και σε προηγούμενη εργασία (Gogou et al., 2000). Οι υψηλές ποσότητες του UCM, οι υψηλές επίσης τιμές του λόγου UCM προς τα κ-αλκάνια (UCM / NA; Πίνακας 3.3.1) καθώς και η παρουσία των οπανίων αποτελούν ισχυρές ενδείξεις ότι η περιοχή της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης είναι χρόνια ρυπασμένη με πετρελαϊκούς υδρογονάνθρακες. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται τόσο με την κατανομή των οπανίων (Σχήμα 3.3.3Γ) που είναι χαρακτηριστική των πετρελαϊκών υδρογονανθράκων (Philp, 1985) όσο και με την παρουσία του πριστανίου και του

φυτανίου στα περιβαλλοντικά δείγματα (Σχήματα 3.3.3A, B) (Gogou et al., 2000). Εντούτοις, δεν μπορούμε με απόλυτη βεβαιότητα να βασιστούμε στα δεδομένα του κλάσματος των αλειφατικών υδρογονανθράκων για να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα σε σχέση με την ποιότητα του οργανικού υλικού καθώς το συγκεκριμένο κλάσμα αντιπροσωπεύει ένα μικρό ποσοστό του συνολικού οργανικού άνθρακα (βλ. AHC/OC; Πίνακας 3.3.1).

### 3.3.4 Σύσταση των βακτηριακών κοινοτήτων

Τα λιπαρά οξέα που συστήνουν την κυτταρική λιπιδική στοιβάδα αποτελούν τους πιο χρήσιμους βιοδείκτες για τον υπολογισμό της ζωντανής βακτηριακής βιομάζας στα ιζήματα. Ο προσδιορισμός των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων (PLFA) αποτελεί μια πολύτιμη πηγή πληροφοριών για την περιγραφή της σύστασης των μικροβιακών κοινοτήτων καθώς και για την κατανόηση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των βακτηριακών πληθυσμών (Guezennec and Fiala-Medioni, 1996).

Σε πειράματα καλλιέργειών, τα βακτήρια χαρακτηρίζονται με βάση την ικανότητα αναπνοής τους σε: αερόβια βακτήρια, υποχρεωτικά αερόβια βακτήρια, υποχρεωτικά αναερόβια βακτήρια καθώς και σε βακτήρια που ακολουθούν την αναγωγή θεικών ιόντων στο μεταβολικό τους μονοπάτι. Ο διαχωρισμός μεταξύ των συγκεκριμένων τύπων βακτηρίων βασίζεται κυρίως στην κατανομή των διαφορετικών λιπαρών οξέων που συστήνουν την κυτταρική τους μεμβράνη (Parkes and Taylor, 1983). Οι διαφορές μεταξύ των σχετικών συγκεντρώσεων των κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων με 16 άτομα άνθρακα χρησιμοποιείται ως βάση για το διαχωρισμό των τεσσάρων τύπων βακτηρίων. Συγκεκριμένα, τα αερόβια και υποχρεωτικά αερόβια βακτήρια, περιέχουν ίσες ποσότητες του κορεσμένου και ακόρεστου λιπαρού οξέος C<sub>16</sub>, ενώ τα υποχρεωτικά αναερόβια και τα βακτήρια που ανάγουν θειικά ιόντα διαθέτουν διπλάσιες ποσότητες του μονοακόρεστου οξέος C<sub>16:1ω7</sub> σε σχέση με το κορεσμένο λιπαρό οξύ C<sub>16</sub> (Guckert et al., 1986; Langezaal et al., 2003). Υψηλές ποσότητες των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων C<sub>16:1</sub> ή C<sub>18:1</sub> υπάρχουν συνήθως στην λιπιδική μεμβράνη των θειο-οξειδωτικών βακτηρίων (Guezennec and Fiala-Medioni, 1996; Jannasch et al., 1989; Katayama-Fujimura et al., 1982) καθώς και των μεθανοτροφικών βακτηρίων (Virtue et al., 1996). Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα των φωσφολιπιδίων είναι τα χαρακτηριστικά συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης των gram-αρνητικών βακτηρίων (Macnaughton et al., 1999; Ringelberg et al., 1997). Υψηλές ποσότητες διακλαδωμένων λιπαρών οξέων επίσης χαρακτηρίζουν τα

βακτήρια που ανάγουν θειικά ιόντα (Edlund et al., 1985; Taylor and Parkes, 1983), τα gram-θετικά (Kaneda, 1997) καθώς και τα αναερόβια βακτήρια (Edlund et al., 1985). Συμπερασματικά, τα αερόβια βακτήρια περιέχουν υψηλές ποσότητες των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων και ιδιαίτερα χαμηλές ποσότητες των διακλαδωμένων λιπαρών οξέων (Rajendran et al., 1997).

Στην παρούσα εργασία, η μελέτη των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων έδειξε ότι οι μικροβιακές κοινωνίες των ιζημάτων της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης αποτελούνταν κυρίως από βακτήρια παρά από ευκαρυωτικά ή αρχαία (Guezennec and Fiala-Medioni, 1996) (Πίνακας 3.3.2). Επίσης, οι ιδιαίτερα χαμηλές ποσότητες των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων δηλώνουν τη χαμηλή συνεισφορά των ευκαρυωτικών οργανισμών στη δομή της βενθικής κοινωνίας.

Τα επίπεδα συγκεντρώσεων των PLFA που προσδιορίστηκαν ήταν συγκρίσιμα με τις αντίστοιχες τιμές PLFA που είχαν καταγραφεί σε προηγούμενη εργασία σε εύτροφη περιοχή της Ιαπωνίας ( $0.7 \mu\text{g g}^{-1}$  ξηρής μάζας ιζήματος στον κόλπο Hiroshima Bay και  $1.1 \mu\text{g g}^{-1}$  ξηρής μάζας ιζήματος στην περιοχή Eutachi και Osaka Bay, αντίστοιχα; Rajendran et al. 1997). Οι βακτηριακές αφθονίες που υπολογίστηκαν με βάση τον παράγοντα μετατροπής του βακτηρίου *E.coli* ήταν παρόμοιες με τις αντίστοιχες που είχαν προσδιοριστεί για την ίδια περιοχή από τους Danovaro και συνεργάτες (2000), καθώς και για άλλες περιοχές της Ανατολικής (Bianchi et al., 2003; Boetius et al., 1996) και Δυτικής Μεσογείου (Dellile et al., 1990). Ο παράγοντας μετατροπής αποτελεί ένα πολύ καλό εργαλείο προσδιορισμού της ζωντανής βακτηριακής βιομάζας αλλά πρέπει να τονίσουμε την πιθανότητα σφάλματος στους υπολογισμούς καθώς είναι ευνόητο ότι διαφορετικά είδη μπορεί να περιέχουν διαφορετικές ποσότητες PLFA στις κυτταρικές τους μεμβράνες (Balkwill and Ghiorse, 1985; Balkwill et al., 1998).

Η ανάλυση των PLFA στα ιζήματα της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης έδειξε ότι τα πιο άφθονα λιπαρά οξέα ήταν τα κορεσμένα  $C_{16:0}$  και  $C_{18:0}$  και τα μονοακόρεστα  $C_{16:1}$  και  $C_{18:1}$  που αντιπροσωπεύουν την κατηγορία των αερόβιων gram-αρνητικών βακτηρίων (Πίνακας 3.3.2). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ξεκάθαρα ότι τα αερόβια και υποχρεωτικά αερόβια καθώς και τα βακτήρια που διαθέτουν ικανότητα οξειδωσης του μεθανίου και του θείου βρίσκονται σε υψηλές αφθονίες στην oligοτροφική περιοχή της Κρήτης. Ταυτόχρονα, οι χαμηλές ποσότητες διακλαδωμένων λιπαρών οξέων δηλώνουν τις χαμηλές αφθονίες των αναερόβιων, gram-θετικών καθώς και των βακτηρίων που διαθέτουν ικανότητα αναγωγής των

θεικών ιόντων. Σε προηγούμενες εργασίες, έχει βρεθεί ότι τα διακλαδωμένα λιπαρά οξέα συστήνουν τις κυτταρικές μεμβράνες του gram-θετικού βακτηρίου του γένους *Bacillus* (Kaneda, 1977; Rajendran et al., 1997), του βακτηρίου *Desulphovibrio desulfuricans* που διαθέτει την ικανότητα αναγωγής θεικών ιόντων (Boon et al. 1977; Rajendran et al. 1997), καθώς και των αναερόβιων βακτηρίων. Η ανάλυση της βιβλιοθήκης κλώνων του γονιδίου 16S rRNA που πραγματοποιήθηκε στον ρηχό σταθμό MPI1 (Κεφάλαιο 3.2; Polymenakou et al., 2005c) έδειξε ότι τα gram-θετικά βακτήρια (π.χ. *Firmicutes*, *Actinobacteria*) σχεδόν απουσίαζαν από τα ιζήματα της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης (Polymenakou et al., 2005c). Αντίθετα, οι επικρατούσες ταξινομικές ομάδες ήταν τα gram-αρνητικά βακτήρια *Proteobacteria*, *Holophaga/Acidobacteria* και *Planctomycetales*, που περιείχαν αντιπροσώπους των βακτηριακών γενών *Beggiatoa*, *Thioalcalovibrio*, *Pseudomonas* και *Chromatium* (Polymenakou et al. 2005c).

Η κατανομή των λιπαρών οξέων των PLFA της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης ακολουθεί το βασικό πρότυπο κατανομής των λιπαρών οξέων του βακτηρίου *Thiomicrospira crunega*, που είναι ένα χαρακτηριστικό χημειο-αυτότροφο θειο-οξειδωτικό βακτήριο το οποίο είχε απομονωθεί από μια υδροθερμική πηγή (Guezzenec and Fiala-Medioni, 1996; Jannasch, 1985). Σε προηγούμενη εργασία οι Brinkhoff και συνεργάτες (1999) έδειξαν ότι τα χημειο-αυτότροφα θειο-οξειδωτικά βακτήρια (SOB) βρίσκονται σε υψηλές αφθονίες στις υδροθερμικές πηγές της νήσου Μήλου (Ελλάδα) (Brinkhoff et al., 1999), και παίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην οικολογία των οικοσυστημάτων (Brinkhoff et al., 1999).

### 3.3.5 Ενδείξεις για αποικοδόμηση υδρογονανθράκων

Μέχρι πρόσφατα, ένας σημαντικός αριθμός εργασιών έχει πραγματοποιηθεί για τη μελέτη της επίδρασης των διαδικασιών αποικοδόμησης στη σύσταση και κατανομή των βιοδεικτών. Αρκετές εργασίες που έχουν πραγματοποιηθεί είτε *in vitro* είτε *in situ* έδειξαν ότι τα οπάνια και τα στεράνια είναι πολύ ανθεκτικά σε διαδικασίες βιοαποικοδόμησης (βλέπε Wang et al., 1999). Τα ομόλογα των υδρογονανθράκων με μικρή ανθρακική αλυσίδα αποικοδομούνται γρηγορότερα από τις ουσίες πριστάνιο (Pr) και φυτάνιο (Ph) (Grossi et al., 2002). Σε μελέτες βιοαποικοδόμησης χρησιμοποιούνται μια σειρά διαγνωστικών λόγων των ουσιών που αποικοδομούνται προς τις ουσίες που δύσκολα αποικοδομούνται όπως οι λόγοι C<sub>17</sub>/Pr και C<sub>18</sub>/Ph (Grossi et al., 2002). Εντούτοις, έχει βρεθεί τελικά ότι οι συγκεκριμένοι λόγοι

υποεκτιμούν σημαντικά τον βαθμό βιοαποικοδόμησης καθώς οι ισοπρενοειδείς υδρογονάνθρακες πριστάνιο και φυτάνιο βιοαποικοδομούνται επίσης (Wang et al., 1999). Για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται ως εσωτερικά πρότυπα μια σειρά από ουσίες, όπως το οπάνιο 17α(H),21β(H)-C<sub>30</sub>-hopane (C<sub>30</sub>H) (Prince et al., 1994), που έχουν αποδειχθεί ότι είναι πολύ ανθεκτικές σε διαδικασίες αποικοδόμησης.

Στην παρούσα εργασία, όπου η μείωση στις συγκεντρώσεις των κ-αλκανίων μετά την επώαση δεν ήταν προφανής (Σχήμα 3.3.4) λόγω του μικρού χρόνου επώασης (2-μήνες), υπολογίστηκαν μία σειρά διαγνωστικών λόγων (όπως NA/C<sub>30</sub>H, Σ(C<sub>15</sub>-C<sub>20</sub>)/C<sub>30</sub>H, Σ(C<sub>21</sub>-C<sub>36</sub>)/C<sub>30</sub>H) με σκοπό τη μελέτη των διαδικασιών αποικοδόμησης υδρογονανθράκων στα ιζήματα της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης (Πίνακας 3.3.1). Όλοι οι λόγοι που υπολογίστηκαν μειώνονταν σημαντικά μετά περίοδο επώασης δύο μηνών, δηλώνοντας ότι οι βενθικές μικροβιοκοινωνίες στα ιζήματα του Κρητικού Πελάγους παίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στη τύχη των υδρογονανθράκων.

Τα βακτήρια που διαθέτουν ικανότητα αποικοδόμησης υδρογονανθράκων είναι πολύ σημαντικά στο μεταβολισμό ενός μεγάλου εύρους υδρογονανθράκων είτε φυσικής είτε ανθρωπογενούς προέλευσης. Προηγούμενες εργασίες έχουν δείξει ότι τα οπάνια είναι πολύ σταθερές ουσίες σε σχέση με άλλα πετρελαϊκά προϊόντα όπως τα κ-αλκάνια ή το UCM (Prince et al. 1994). Εντούτοις, το UCM γενικά θεωρείται ότι είναι ανθεκτικό σε διαδικασίες βιοαποικοδόμησης. Στην παρούσα εργασία ο διαγνωστικός λόγος του UCM ως προς το οπάνιο C<sub>30</sub>H (Πίνακας 3.3.1) μειωνόταν σημαντικά μετά την περίοδο της επώασης στους πιο ρηχούς σταθμούς δειγματοληψίας (MPI1 και MPI2). Δεν μπορούμε να πούμε με βεβαιότητα αν οι βενθικές μικροβιακές κοινωνίες ήταν υπεύθυνες για την παρατηρούμενη μείωση στα επίπεδα UCM εφόσον προηγούμενες εργασίες έχουν δείξει ότι η διαδικασία της φωτοοξειδωσης είναι πολύ πιο σημαντική στην αποικοδόμηση των συστατικών του UCM παρά η βιοαποικοδόμηση (Dutta and Harayama, 2000). Πέρα από αυτό, δεν μπορούμε να απορρίψουμε το ενδεχόμενο οι μικροβιακές κοινωνίες των ιζημάτων της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης να μπορούν να αποικοδομούν το UCM. Για το λόγο αυτό ακολουθήσαμε την τεχνική ανίχνευσης του γονιδίου της διοξυγενάσης με τη χρήση των κατάλληλων εκκινητών της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ή PCR με σκοπό να επιβεβαιώσουμε την ύπαρξη βακτηρίων που διαθέτουν ικανότητα αποικοδόμησης αρωματικών ουσιών όπως αυτών που συστήνουν το UCM (π.χ.



μονοαρωματικών και πολυαρωματικών υδρογονανθράκων, Frysinger et al., 2003). Πρέπει να διευκρινίσουμε εδώ ότι τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την αποικοδόμηση των αλκανίων είναι οι μονοοξυγενάσες ενώ τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την αποικοδόμηση των αρωματικών υδρογονανθράκων είναι οι διοξυγενάσες (βλεπε Harwood and Parales, 1996; Heider et al., 1999). Στην παρούσα εργασία, το γονίδιο της διοξυγενάσης ανιχνεύτηκε επιτυχώς κατευθείαν από το ίζημα επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη βακτηρίων με ικανότητα αποικοδόμησης αρωματικών ουσιών στα ιζήματα της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης.

### 3.3.6 Ενδείξεις για καταπόνηση των βακτηριακών πληθυσμών λόγω έλλειψης τροφής

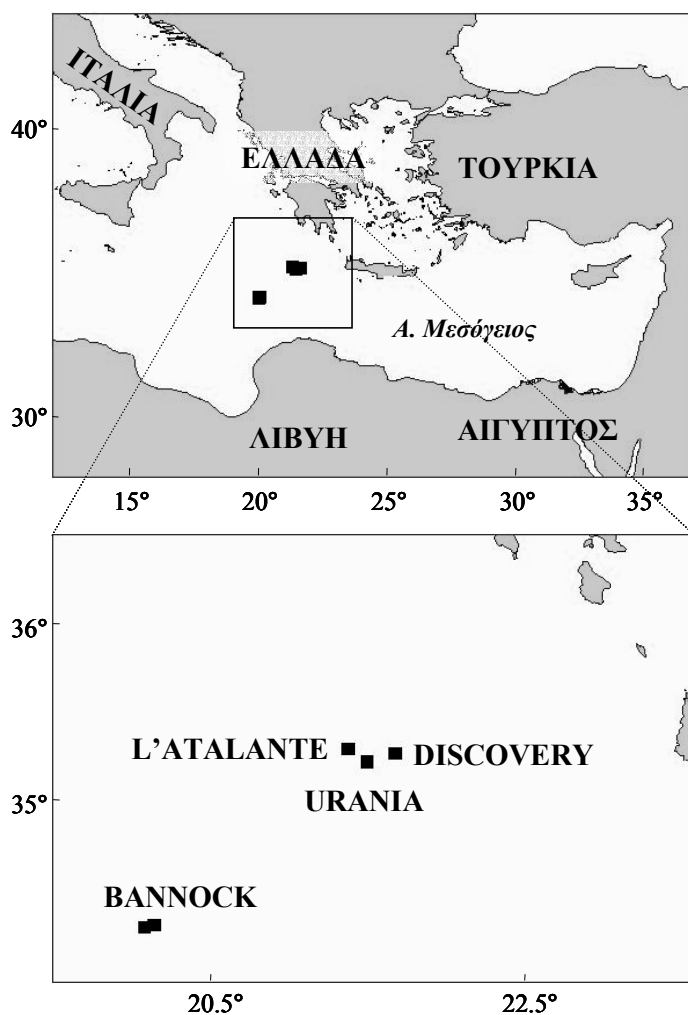
Για την εκτίμηση της φυσιολογικής κατάστασης των μικροβιακών πληθυσμών, πριν την έναρξη των επώασεων, υπολογίστηκε ο λόγος *trans/cis* των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων. Οι υψηλές ποσότητες των ισομερών *trans* των βακτηριακών λιπιδίων σχετίζονται κυρίως με στρατηγικές επιβίωσης των βακτηριακών πληθυσμών όπως για παράδειγμα σε περιπτώσεις έλλειψης τροφής (Guckert et al., 1986; Guezennec and Fiala-Medioni, 1996; Kieft et al., 1997). Στην παρούσα εργασία, ο λόγος *trans/cis* στον ρηχό σταθμό MPI1 ήταν 1.6 δηλώνοντας ότι οι μικροβιακές κοινωνίες της περιοχής βρίσκονταν σε κατάσταση ‘καταπόνησης’ λόγω έλλειψης τροφής. Αντίθετα, στους βαθύτερους σταθμούς MPI2 και MPI3 ο παραπάνω λόγος ήταν ίσος με την μονάδα, δείχνοντας παράλληλα ότι οι μικροβιακές κοινωνίες είχαν ξεπεράσει τέτοια κατάσταση φυσιολογικής πίεσης, ανεξάρτητα από τις ιδιαίτερα χαμηλές ποσότητες άνθρακα. Για το λόγο αυτό, για να εξετάσουμε αν και κατά πόσο οι μικροβιακές κοινωνίες μετέπιπταν σε κατάσταση ‘καταπόνησης’ μετά την περίοδο της επώασης, υπολογίστηκε ο λόγος της συγκέντρωσης των μονοακόρεστων προς των κορεσμένων ελεύθερων λιπαρών οξέων. Μετά την περίοδο των 2-μηνών στα πειράματα επώασης, όπου οι διαθέσιμες πηγές άνθρακα δεν ανανεώνονταν ο παραπάνω λόγος μειωνόταν σε όλους τους σταθμούς (Πίνακας 3.3.2). Η μέγιστη μείωση καταγράφηκε στο ρηχό σταθμό MPI1 δείχνοντας παράλληλα ότι οι μικροβιακές κοινωνίες της εν λόγω περιοχής ήταν πιο αποδοτικές στην αποικοδόμηση των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων C<sub>16:1</sub> και C<sub>18:1</sub>, όπως άλλωστε είχε φανεί και από τους ρυθμούς στοιχειοποίησης του οργανικού άνθρακα (Σχήμα 3.3.2; Πίνακας 3.3.1). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ξεκάθαρα ότι οι μικροβιακές κοινωνίες των ιζημάτων της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης μετά τις επώσεις περνούσαν σε

κατάσταση ‘καταπόνησης’ λόγω έλλειψης τροφής. Οι συγκεκριμένες αλλαγές στην κατανομή των λιπαρών οξέων έρχονται σε πλήρη συμφωνία με αποτελέσματα προηγούμενης εργασίας όπου gram-αρνητικά βακτήρια βρίσκονταν σε κατάσταση φυσιολογικής πίεσης (Kieft et al., 1994). Αυτό πιθανότατα σχετίζεται με στρατηγικές επιβίωσης και προσαρμογής των μικροοργανισμών σε περιβάλλοντα που είναι φτωχά σε θρεπτικά λόγω της κατανάλωσης όλων των διαθέσιμων πηγών άνθρακα που υπάρχουν στο περιβάλλον. Πάρα ταύτα, οι Kieft και συνεργάτες (1997) έχουν αναφέρει ότι τέτοιου είδους κατανομές λιπαρών οξέων συνήθως δεν συναντώνται στη φύση ακόμα και σε oligότροφα περιβάλλοντα.

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

#### 3.4 Μελέτη της επίδρασης της αλατότητας και των οξειδοαναγωγικών συνθηκών στην κατανομή των μικροβιακών κοινοτήτων

Οι ανοξικές λεκάνες της Ανατολικής Μεσογείου (Bannock, L'Atalante, Discovery, Urania) χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα υψηλές πιέσεις, υψηλά επίπεδα αλατότητας, καθώς και από διαφορετικές τιμές pH (Brusa et al., 2001; Corselli et al., 1996; De Lange et al., 1990). Αν και τα περιβάλλοντα αυτά προσελκύουν το ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω της ιδιαιτερότητας τους, εργασίες σχετικές με τον προσδιορισμό των διαφορετικών πηγών άνθρακα και ενέργειας (π.χ. χερσαία ή θαλάσσια) καθώς και της δομής των βενθικών μικροβιακών κοινοτήτων απουσιάζουν. Οι έως τώρα έρευνες έχουν επικεντρωθεί κυρίως στην ανοξική λεκάνη Urania (Brusa et al., 2001; Sass et al., 2001).



**Σχήμα 3.4.1:** Χάρτης που παρουσιάζει τις θέσεις των ανοξικών λεκανών Bannock, L'Atalante, Discovery και Urania.

Η μελέτη των δομικών αλλαγών των βενθικών μικροβιοκοινωνιών στα πολύπλοκα αυτά περιβάλλοντα είναι ιδιαίτερα σημαντική για την κατανόηση της δομής και λειτουργίας των οικοσυστημάτων αυτών καθώς και της αλληλεπίδρασής τους με τα φυσιολογικά περιβάλλοντα. Ιδιαίτερα, η σύνδεση της δομής των βενθικών μικροβιακών κοινωνιών με τις περιβαλλοντικές παραμέτρους καθώς και με τις διαφορετικές πηγές άνθρακα και ενέργειας αποτελεί έναν από τους βασικούς στόχους στο χώρο της μικροβιακής οικολογίας. Η σπουδαιότητα τέτοιων εργασιών τονίζεται επίσης και από το γεγονός ότι οι μικροβιακές κοινωνίες διαδραματίζουν έναν πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των βιογεωχημικών κύκλων (π.χ. άνθρακα, άζωτο, θείο), στην αποικοδόμηση οργανικών ρυπαντών (Boschker et al., 2001; Kieft et al., 1997; White et al., 1983) καθώς και στη μεταφορά ενέργειας στα θαλάσσια περιβάλλοντα (Smoot and Findlay, 2001).

Η εξερεύνηση της δομής των μικροβιακών κοινωνιών σε περιβάλλοντα όπου επικρατούν ακραίες συνθήκες αποτελεί πρόκληση στο χώρο της μικροβιακής οικολογίας λόγω των τεχνικών δυσκολιών που υπάρχουν στην απομόνωση και καταμέτρηση όλων των μικροβίων. Οι πιθανότητες καταστροφής του *in situ* πληθυσμού σε τόσο πολύπλοκα περιβάλλοντα είναι πολλές (Rajendran et al., 1993). Ένας τρόπος αντιμετώπισης αυτού του προβλήματος είναι η μελέτη των μικροβιακών κοινωνιών μέσω των χημικών συστατικών (π.χ. λιπαρά οξέα των φωσφολιπιδίων) των κυτταρικών μεμβρανών τους που είναι συγκεκριμένα για κάθε μικροβιακή ομάδα. (Bååth and Anderson, 2003; Guezennec and Fiala-Medioni, 1996; Rajendran et al., 1993). Πρέπει να τονίσουμε εδώ, ότι η μελέτη των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων (PLFA) αποτελεί ένα πολύ σημαντικό εργαλείο μελέτης της ζωντανής μικροβιακής βιομάζας καθώς ο χρόνος αποικοδόμησής τους είναι άμεσος μετά τον κυτταρικό θάνατο (Aries et al., 2001; Guezennec and Fiala-Medioni, 1996; White et al., 1979; White et al., 1998).

Στην παρούσα εργασία οι αναλύσεις των κ-αλκανίων και λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των δομικών αλλαγών των μικροβιακών κοινωνιών σε σχέση με τις διαφορετικές περιβαλλοντικές παραμέτρους, καθώς και τις πηγές άνθρακα και ενέργειας. Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε σε ιζήματα με διαφορετικά επίπεδα αλατότητας και διαφορετικές οξικές/ανοξικές συνθήκες. Τα δείγματα προήλθαν από τις βαθιές ανοξικές λεκάνες της Ανατολικής Μεσογείου (Bannock, L'Atalante, Urania και Discovery) καθώς και από οξικά περιβάλλοντα κοντά σε αυτές.

### 3.4.1 Χημικές παράμετροι

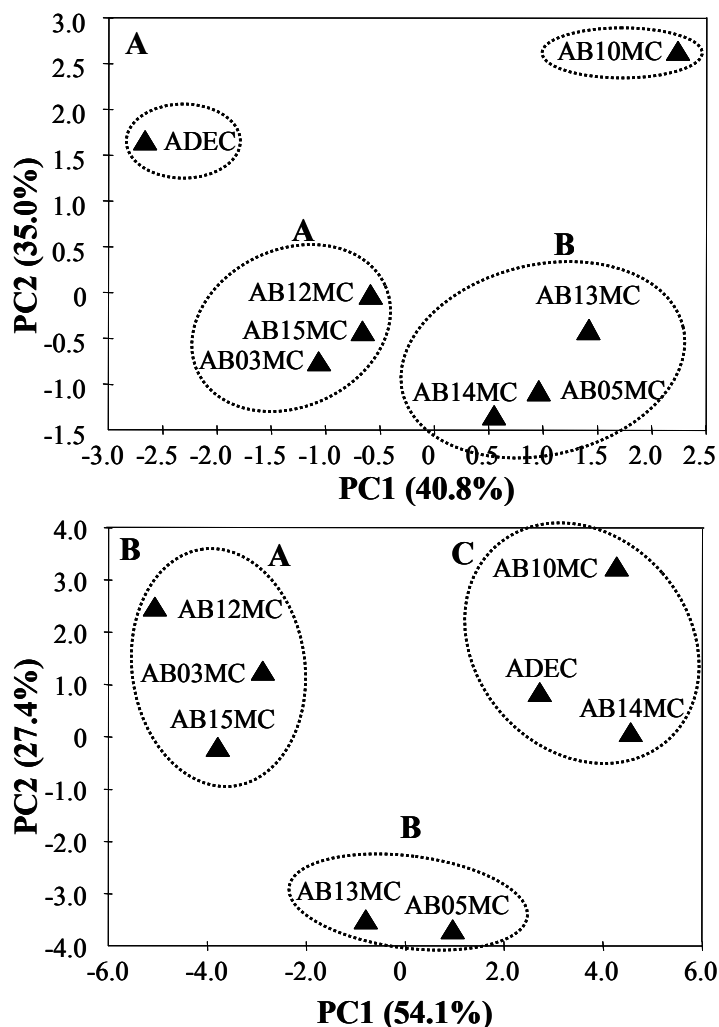
**Πίνακας 3.4.1:** Περιβαλλοντικές παράμετροι των σταθμών δειγματοληψίας.

Σταθμοί	Θέση		Λεκάνη	Βάθος (m)	Eh (mV)	Αλατότητα (psu)	TOC (%)		TON (%)		C/N	
	Long	Lat					μέσος όρος	sd	μέσος όρος	sd	μέσος όρος	sd
ADEC	20°48'77	34°52'75	South Ionian	2840	543	38	1.30	0.69	0.07	0.01	18.14	7.79
AB03MC	20°00'39	34°16'51	Bannock	3179	443	38	0.58	0.03	0.06	0.00	10.70	0.24
AB05MC	20°00'75	34°17'46	Bannock	3295.3	-82	240	0.42	0.09	0.04	0.01	12.42	0.35
AB10MC	21°41'42	35°16'62	Discovery	3532.5	10	380	1.63	0.09	nd	nd	nd	nd
AB12MC	21°30'63	35°13'87	Urania	3310	438	38	0.76	0.09	0.09	0.02	10.66	2.99
AB13MC	21°23'16	35°18'19	L'Atalante	3354.7	-136	290	0.67	0.09	0.06	0.01	12.92	0.75
AB14MC	21°30'64	35°13'78	Urania	3326	-95	160	0.37	0.09	0.03	0.01	13.67	0.20
AB15MC	21°30'64	35°13'78	Urania	3320	475	38	0.67	0.09	0.07	0.00	10.50	0.38

Τα επίπεδα οξειδοαναγωγικού δυναμικού (Eh) και αλατότητας που μετρήθηκαν στα δείγματα του Νοτίου Ιονίου κυμάνθηκαν μεταξύ -136 έως 543 mV και 38 έως 380 psu αντίστοιχα (Πίνακας 3.4.1) ενώ η μεταξύ τους συσχέτιση παρουσιάζεται σημαντική ( $R^2 = 0.717$ ,  $n=8$ ) καθώς το οξειδοαναγωγικό δυναμικό μειώνεται με την αύξηση της αλατότητας. Το βάθος των σταθμών δειγματοληψίας κυμάνθηκε από 2840 έως 3533 m (Πίνακας 3.4.1). Οι συγκεντρώσεις οργανικού άνθρακα κυμάνθηκαν μεταξύ  $0.37\% \pm 0.09\%$  για τη λεκάνη Urania και  $1.63\% \pm 0.09\%$  για τη λεκάνη Discovery (Πίνακας 3.4.1). Οι τιμές αυτές βρίσκονται σε συμφωνία με τις τιμές που καταγράφηκαν σε προηγούμενη εργασία για τη λεκάνη Urania (0.4%; Hübner, 2002) και συγκρίσιμες με τιμές που έχουν καταγραφεί σε άλλες περιοχές της Ανατολικής Μεσογείου (0.38-1.47%; Polymenakou et al., 2005a; 2005b).

Για τη σύγκριση των διαφορετικών σταθμών δειγματοληψίας ως προς τις περιβαλλοντικές παραμέτρους εφαρμόστηκε η στατιστική ανάλυση πρωταρχικών συνιστωσών ή Principal Component Analysis (PCA) (Σχήμα 3.4.2A). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ένα ποσοστό 75.8% της συνολικής διακύμανσης στις περιβαλλοντικές παραμέτρους (βάθος σταθμών δειγματοληψίας, Eh, αλατότητα, οργανικός άνθρακας, οργανικό άζωτο, λόγος C/N) μπορεί να εξηγηθεί από δύο και μόνο πρωταρχικές συνιστώσες (PC) καθώς η PC1 και η PC2 εξηγούν αντίστοιχα ένα ποσοστό 40.8% και 35.0% της συνολικής διακύμανσης (Σχήμα 3.4.2A). Με την ανάλυση PCA προκύπτουν δυο ευδιάκριτες ομάδες. Η ομάδα A περιλαμβάνει τους οξικούς σταθμούς AB03MC, AB12MC και AB15MC που βρίσκονταν κοντά στις ανοξικές λεκάνες ενώ η ομάδα B περιλαμβάνει τους ανοξικούς σταθμούς AB05MC, AB13MC και AB14MC (Σχήμα 3.4.2A). Ο υποοξικός σταθμός AB10MC της λεκάνης Discovery διαχωρίζεται από την ανοξική ομάδα B πιθανότατα λόγω των υψηλότερων τιμών Eh (10 mV; Πίνακας 3.4.1) και αλατότητας (380 psu; Πίνακας 3.4.1) σε σύγκριση με τις τιμές των σταθμών της ανοξικής ομάδας. Επιπλέον ο οξικός σταθμός ADEC που είναι και ο πιο απομακρυσμένος από την περιοχή των ανοξικών

λεκανών διαχωρίζεται από την οξική ομάδα Α πιθανότατα ως αποτέλεσμα των υψηλότερων επιπέδων οργανικού άνθρακα (1.30%; Πίνακας 3.4.1) και λόγου C/N (18.14; Πίνακας 3.4.1) σε σύγκριση με τους υπόλοιπους οξικούς σταθμούς (Σχήμα 3.4.2Α).



**Σχήμα 3.4.2:** Α) Ανάλυση πρωταρχικών συνιστωσών (PCA) των περιβαλλοντικών παραμέτρων (βάθος σταθμών δειγματοληψίας, Eh, αλατότητα, οργανικός άνθρακας, οργανικό άζωτο, λόγος C/N) των επιφανειακών ιζημάτων. Β) Ανάλυση πρωταρχικών συνιστωσών (PCA) των κ-αλκανίων.

### 3.4.2 Κατανομή κ-αλκανίων

Ένας μεγάλος αριθμός χημικών ουσιών χρησιμοποιούνται ως βιοδείκτες για την εκτίμηση της χερσαίας ή/και θαλάσσιας συνεισφοράς στη σύσταση του οργανικού άνθρακα στα ιζήματα. Για παράδειγμα, οι κατανομές των κ-αλκανίων των χερσαίων φυτών (όπου τα ομόλογα με μονό αριθμό ατόμων άνθρακα επικρατούν έναντι των ζυγών; Bouloubassi et al., 1997) έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως τα τελευταία χρόνια ως βιοδείκτες οργανικού άνθρακα χερσαίας προέλευσης (Bouloubassi et al., 1997; Farrington and Tripp, 1977; Gogou et al., 2000; Saliot et al., 1991). Στην παρούσα

εργασία, εξετάσαμε τις κατανομές των κ-αλκανίων στα ιζήματα από την περιοχή του Νοτίου Ιονίου με σκοπό να εξερευνήσουμε τις διαφορετικές πηγές άνθρακα και ενέργειας καθώς και το βαθμό συνεισφοράς του θαλασσιού και χερσαίου οργανικού υλικού στη σύσταση των επιφανειακών ιζημάτων (Damsté et al., 1995). Πρέπει να τονίσουμε εδώ βέβαια, ότι δεν μπορούμε με απόλυτη βεβαιότητα να βασιστούμε στα δεδομένα του κλάσματος των αλειφατικών υδρογονανθράκων για να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα σε σχέση με την ποιότητα του οργανικού υλικού καθώς το συγκεκριμένο κλάσμα αντιπροσωπεύει ένα μικρό ποσοστό του συνολικού οργανικού άνθρακα (βλ. AHC/OC; Πίνακας 3.3.1).

**Πίνακας 3.4.2:** Χαρακτηριστικές παράμετροι των κ-αλκανίων που προσδιορίστηκαν για τους σταθμούς δειγματοληψίας του Νότιου Ιονίου.

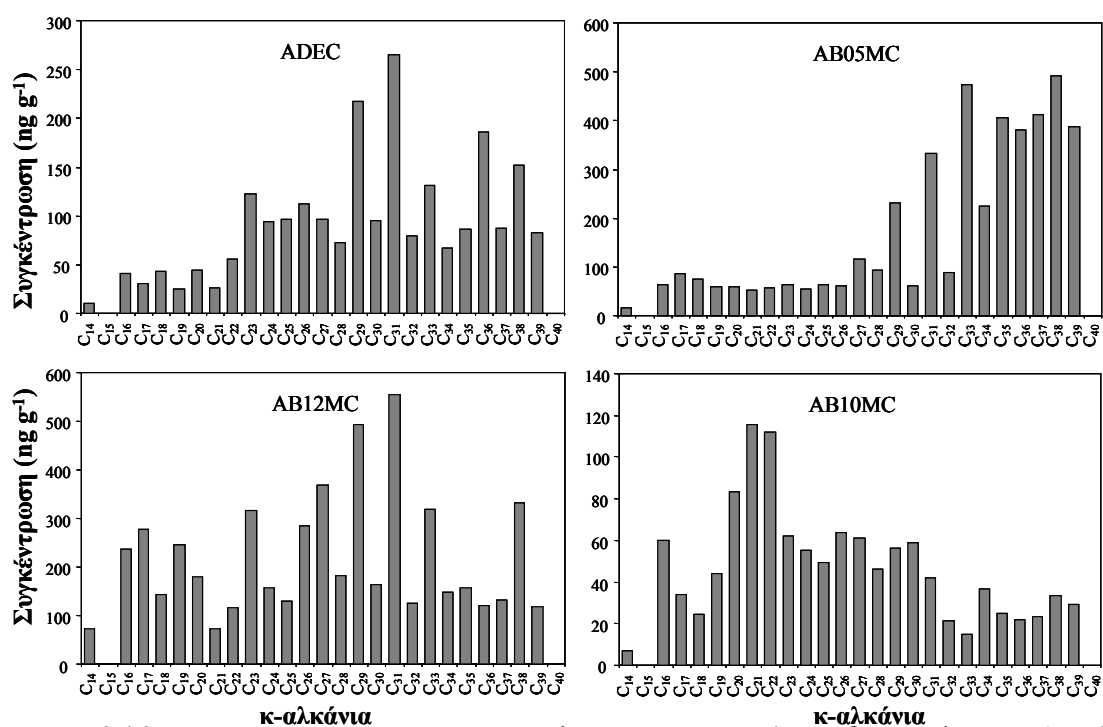
NA: συγκέντρωση κ-αλκανίων;  $\Sigma(C_{14}-C_{20})$ : άθροισμα των συγκεντρώσεων των κ-αλκανίων με μικρή ανθρακική αλυσίδα ( $C_{15} - C_{20}$ );  $\Sigma(C_{21}-C_{36})$ : άθροισμα των συγκεντρώσεων των κ-αλκανίων με μεγάλη ανθρακική αλυσίδα ( $C_{21} - C_{36}$ ); Mar: άθροισμα των συγκεντρώσεων των τριών χαρακτηριστικών κ-αλκανίων θαλάσσιας προέλευσης ( $C_{15}, C_{17}, C_{19}$ ); Ter: άθροισμα των συγκεντρώσεων των τριών χαρακτηριστικών κ-αλκανίων χερσαίας προέλευσης ( $C_{27}, C_{29}, C_{31}$ ); TC: απόλυτη χερσαία συνεισφορά; OC: οργανικός άνθρακας; CPI: δείκτης προτίμησης αριθμού ατόμων άνθρακα (CPI) για τα κ-αλκάνια  $C_{21}$  έως  $C_{36}$ .

Σταθμοί	ADEC	AB03MC	AB05MC	AB10MC	AB12MC	AB13MC	AB14MC	AB15MC
<i>Παράμετροι</i>								
NA ( $\text{ng g}^{-1}$ )	2318.0	4975.0	4408.6	1179.3	5445.3	4776.0	1562.0	5675.3
NA/OC ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	178.7	860.0	1058.5	72.4	715.5	716.6	422.2	852.1
$\Sigma(C_{14}-C_{20})$ ( $\text{ng g}^{-1}$ )	194.6	719.5	358.4	252.7	1156.8	252.8	76.8	702.9
$\Sigma(C_{14}-C_{20})/OC$ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	15.0	124.4	86.1	15.5	152.0	37.9	20.8	105.5
$\Sigma(C_{21}-C_{36})$ ( $\text{ng g}^{-1}$ )	2123.4	4255.4	4050.2	926.6	4288.5	4523.2	1485.2	4972.4
$\Sigma(C_{21}-C_{36})/OC$ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	163.7	735.6	972.4	56.9	563.5	678.6	401.4	746.6
Mar ( $\text{ng g}^{-1}$ )	55.8	279.7	145.2	78.1	523.3	125.2	39.9	333.8
Mar/OC ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	4.3	48.4	34.9	4.8	68.8	18.8	10.8	50.1
Ter ( $\text{ng g}^{-1}$ )	578.7	1655.4	679.6	159.0	1415.4	956.3	299.5	1438.4
Ter/OC ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	44.6	286.2	163.2	9.8	186.0	143.5	80.9	216.0
TC ( $\text{ng g}^{-1}$ )	477.4	1561.2	602.9	20.5	1100.4	723.9	96.7	1136.8
TC/OC ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	36.8	269.9	144.7	1.3	144.6	108.6	26.1	170.7
CPI ( $C_{21} - C_{36}$ )	1.4	2.2	1.7	1.0	1.9	1.4	0.9	1.9
$C_{29}/C_{31}$	0.8	0.9	0.7	1.4	0.9	0.9	0.9	0.8
$C_{35}/C_{31}$	0.3	0.2	1.2	0.6	0.3	1.0	0.6	0.4

Οι συγκεντρώσεις οργανικού άνθρακα μπορεί να ποικίλουν στα διάφορα περιβάλλοντα λόγω των διαφορετικών προελεύσεων τους καθώς και των διαφορετικών επιπέδων ανόργανου υλικού (Gogou et al., 2000). Για το λόγο αυτό, υπολογίσαμε τις συγκεντρώσεις των κ-αλκανίων ως προς τα επίπεδα οργανικού άνθρακα σε κάθε σταθμό ( $\mu\text{g g}^{-1}$  οργανικού άνθρακα), όπως περιγράφεται και από τους Gogou και συνεργάτες (2000).

Οι απόλυτες (NA) και κανονικοποιημένες ως προς τον οργανικό άνθρακα τιμές (NA/OC) των κ-αλκανίων (μήκος ανθρακικής αλυσίδας μεταξύ  $C_{14}$  και  $C_{40}$ ) κυμάνθηκαν μεταξύ  $1179.3 - 5675.3 \text{ ng g}^{-1}$  και  $72.4 - 1058.5 \text{ ng g}^{-1}$  ξηρής μάζας

ιζήματος, αντίστοιχα (Πίνακας 3.4.2). Τα επίπεδα συγκεντρώσεων των ΝΑ όπου η ελάχιστη τιμή καταγράφηκε στον υποοξικό σταθμό AB10MC (1179.3 ng g<sup>-1</sup>; Πίνακας 3.4.2) είναι συγκρίσιμα με αντίστοιχες τιμές από παράκτιες περιοχές του Θερμαϊκού Κόλπου (Βόρειο Αιγαίο) (0.2 – 3.3 μg g<sup>-1</sup> ξηρής μάζας ιζήματος; Polymenakou et al., 2005a) και της Δυτικής Μεσογείου (2.0 – 27.1 μg g<sup>-1</sup> ξηρής μάζας ιζήματος; Bouloubassi et al., 1997) ενώ οι κανονικοποιημένες ως προς τον οργανικό άνθρακα τιμές (NA/OC; Πίνακας 3.4.2) είναι συγκρίσιμες με αντίστοιχες τιμές από την ίδια περιοχή (791.0-822.8 μg g<sup>-1</sup> of OC; Polymenakou et al., 2005a; Κεφάλαιο 3.1).

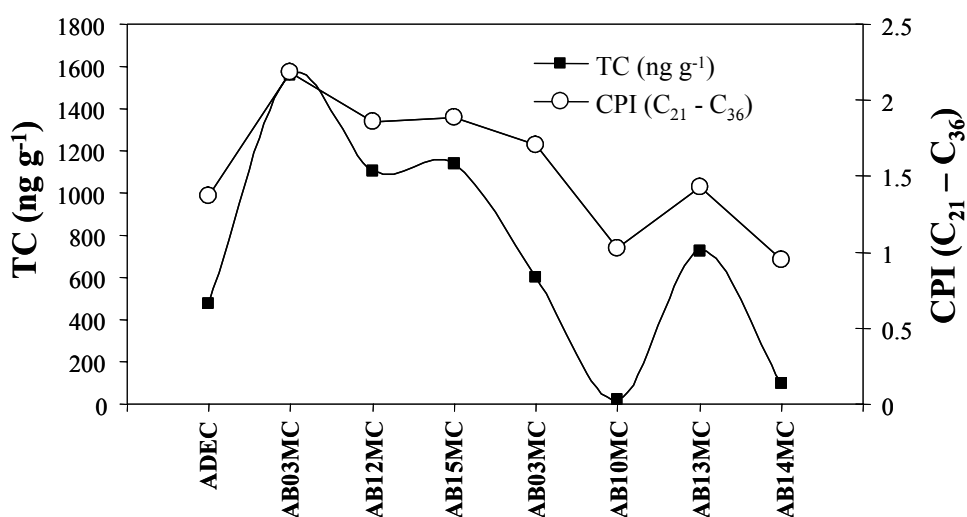


**Σχήμα 3.4.3:** Χαρακτηριστικές κατανομές κ-αλκανίων των σταθμών δειγματοληψίας ADEC, AB12MC, AB05MC and AB10MC.

Τα κ-αλκάνια με μικρό αριθμό ατόμων άνθρακα στην αλυσίδα τους (C<sub>14</sub>-C<sub>20</sub>) βρίσκονταν σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (Σ(C<sub>21</sub>-C<sub>36</sub>), Σ(C<sub>21</sub>-C<sub>36</sub>)/OC; Πίνακας 3.4.2, Σχήμα 3.4.3) καθώς τα κ-αλκάνια με μεγάλη ανθρακική αλυσίδα (> C<sub>20</sub>) παρουσίασαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις (Σ(C<sub>21</sub>-C<sub>36</sub>), Σ(C<sub>21</sub>-C<sub>36</sub>)/OC; Πίνακας 3.4.2, Σχήμα 3.4.3). Τα συγκεκριμένα αλκάνια χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του ‘Δείκτη Προτίμησης Αριθμού Ατόμων Άνθρακα’ ή CPI. Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως (Κεφάλαιο 3.3), τιμές CPI μεγαλύτερες της μονάδας αποτελούν ισχυρή ένδειξη ότι οι υδρογονάνθρακες προέρχονται από τη φύση ή είναι χερσαίας προέλευσης ενώ τιμές CPI ίσες ή χαμηλότερες της μονάδας αποτελούν ένδειξη ότι οι υδρογονάνθρακες προέρχονται είτε από ανθρωπογενείς



δραστηριότητες, είτε από διαδικασίες αποικοδόμησης του οργανικού υλικού είτε καθώς και από πλαγκτονικούς οργανισμούς (Bouloubassi et al., 1997; Simoneit, 1999). Στην παρούσα εργασία, οι τιμές CPI που προσδιορίστηκαν για τα κ-αλκάνια C<sub>21</sub>-C<sub>36</sub> σύμφωνα με την εξίσωση  $CPI = \frac{\sum(C_{21}-C_{35})}{\sum(C_{22}-C_{36})}$  κυμάνθηκαν μεταξύ 0.9 έως 2.2 υποδεικνύοντας παράλληλα ότι οι σταθμοί δειγματοληψίας διαφέρουν ως προς τις πηγές οργανικού άνθρακα και ενέργειας. Υψηλές τιμές CPI αντιστοιχούν σε υψηλή συνεισφορά οργανικού υλικού χερσαίας προέλευσης. Ο προσδιορισμός των τιμών CPI έχει όμως τον εξής περιορισμό. Στις περιπτώσεις όπου η θαλάσσια συνεισφορά είναι υψηλή, οι τιμές CPI μειώνονται ακόμα και αν η χερσαία συνεισφορά παραμένει η ίδια με αποτέλεσμα να δημιουργείται σύγχυση ως προς τη σωστή εκτίμηση της επίδρασης της χέρσου μεταξύ σταθμών με διαφορετικές τιμές CPI (Damsté et al., 1995). Για το λόγο αυτό υπολογίσαμε επίσης και την απόλυτη χερσαία συνεισφορά (TC; Πίνακας 3.4.2) σύμφωνα με την εξίσωση που περιγράφεται από τους Damsté και συνεργάτες (1995):  $TC = \frac{3}{2} [(C_{29} + C_{31}) - \frac{2}{3} (C_{28} + C_{30} + C_{32})]$ . Η διακύμανση των τιμών TC μεταξύ των σταθμών είναι η ίδια με την αντίστοιχη των τιμών CPI δηλώνοντας τελικά ότι τα αποτελέσματα των τιμών CPI δεν υπερεκτιμούν το βαθμό χερσαίας συνεισφοράς μεταξύ των δειγμάτων (Σχήμα 3.4.4).



Σχήμα 3.4.4: Διακύμανση των τιμών CPI και TC στους σταθμούς δειγματοληψίας.

Το άθροισμα των συγκεντρώσεων των τριών χαρακτηριστικών κ-αλκανίων θαλάσσιας προέλευσης (C<sub>15</sub>, C<sub>17</sub>, και C<sub>19</sub>: Mar; Πίνακας 3.4.2) παρουσίασε ιδιαίτερα χαμηλές τιμές σε όλους τους σταθμούς (ποσοστό 2.4 – 9.6% των συνολικών κ-αλκανίων) υποδεικνύοντας τη χαμηλή παραγωγικότητα της περιοχής του Νοτίου Ιονίου καθώς και την υψηλή βιοαποικοδομησιμότητα των συγκεκριμένων ουσιών.

Αντίθετα, το άθροισμα των συγκεντρώσεων των τριών χαρακτηριστικών κ-αλκανίων χερσαίας προέλευσης ( $C_{27}$ ,  $C_{29}$ ,  $C_{31}$ : Ter; Πίνακας 3.4.2) κυμάνθηκε μεταξύ 159.0 έως 1655.4 ng g<sup>-1</sup> ενώ οι κανονικοποιημένες ως προς τον οργανικό άνθρακα τιμές κυμάνθηκαν μεταξύ 9.8 και 286.2 μg g<sup>-1</sup> (Ter και Ter/OC, αντίστοιχα; Πίνακας 3.4.2). Οι τιμές των χερσαίων κ-αλκανίων (απόλυτες και κανονικοποιημένες) παρουσίασαν μεγάλη διακύμανση μεταξύ των σταθμών δειγματοληψίας καθώς οι υψηλότερες τιμές καταγράφηκαν στους οξικούς σταθμούς που βρίσκονταν κοντά στις ανοξικές λεκάνες AB03MC, AB12MC και AB15MC και οι ελάχιστες στον υποοξικό σταθμό AB10MC της λεκάνης Discovery (Πίνακας 3.4.2). Εντούτοις, οι τιμές αυτές είναι υψηλότερες από τις αντίστοιχες για την ολιγοτροφική υφαλοκρηπίδα της Κρήτης (28 – 417 ng g<sup>-1</sup>; Gogou et al., 2000). Ο υποοξικός σταθμός της λεκάνης Discovery παρουσίασε μια ιδιαιτερότητα ως προς την κατανομή των κ-αλκανίων σε σχέση με τους υπόλοιπους σταθμούς. Τα πιο άφθονα αλκάνια που καταγράφηκαν ήταν τα  $C_{20}$ ,  $C_{21}$ , και  $C_{22}$  αντιπροσωπεύοντας ένα ποσοστό 26.3% των συνολικών κ-αλκανίων (Σχήμα 3.4.3), σε αντίθεση με τους υπόλοιπους όπου τα συγκεκριμένα αλκάνια βρίσκονταν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (2.1 – 6.8% των συνολικών κ-αλκανίων). Η κατανομή αυτή μας οδηγεί σε ένα πρώτο συμπέρασμα: η πηγή των κ-αλκανίων στη λεκάνη Discovery διαφέρει από όλες τις υπόλοιπες περιοχές του Νοτίου Ιονίου. Επίσης, ο λόγος των κ-αλκανίων  $C_{29}/C_{31}$  αποτελεί μια δεύτερη ισχυρή ένδειξη ότι στη συγκεκριμένη λεκάνη επικρατούν διαφορετικές συνθήκες συσσώρευσης οργανικού άνθρακα (Πίνακας 3.4.2) καθώς ο συγκεκριμένος λόγος είναι μικρότερος της μονάδας σε όλους τους σταθμούς εκτός από τη λεκάνη Discovery όπου ισούται με 1.4 (Πίνακας 3.4.2). Σύμφωνα με προηγούμενες εργασίες (Gogou et al., 1996; Gogou et al., 2000) οι διαφορές στο λόγο  $C_{29}/C_{31}$  μεταξύ διαφορετικών περιοχών συνήθως σχετίζεται με διαφορές στις πηγές οργανικού υλικού (π.χ. μεταφορά μέσω υφαλοκρηπίδας ή ατμόσφαιρας; Gogou et al., 1996; Gogou et al., 2000). Επίσης, οι ιδιαίτερα χαμηλές τιμές CPI που καταγράφηκαν στους σταθμούς AB10MC και AB14MC (λόγος CPI: 0.9-1.0; Πίνακας 3.4.2) αποτελούν ισχυρή ένδειξη ότι τόσο η λεκάνη Discovery όσο και η Urania λειτουργούν ως τελικοί αποδέκτες του αυτόχθονου οργανικού υλικού που έχει διαφοροποιηθεί λόγω των έντονων διαγενετικών διεργασιών που πραγματοποιούνται στην κολώνα του νερού και στα επιφανειακά ιζήματα.

Επιπλέον πληροφορίες για το βαθμό της θαλάσσιας και χερσαίας συνεισφοράς στα ιζήματα μπορούμε να αντλήσουμε επίσης και από το λόγο των κ-αλκανίων

C<sub>35</sub>/C<sub>31</sub>. Τα επιφανειακά ιζήματα των ανοξικών και υποοξικών σταθμών του Νοτίου Ιονίου παρουσίασαν αυξημένες τιμές του λόγου C<sub>35</sub>/C<sub>31</sub> που κυμάνθηκε μεταξύ 0.6 και 1.2 (Πίνακας 3.4.2). Οι αυξημένες αυτές τιμές πιθανότατα οφείλονται στην συνέκλυση της ουσίας λυκοπάνιο (lycopane) με το κ-αλκάνιο C<sub>35</sub> (Damsté et al., 2003) στα αέρια χρωματογραφήματα ως αποτέλεσμα της δυνατότητας συντήρησης του λυκοπάνιου υπό ανοξικές συνθήκες. Σε προηγούμενη εργασία οι McCaffrey και συνεργάτες (1991) έδειξαν ότι το λυκοπάνιο αποτελεί βασικό συστατικό των θαλασσιών φυτοπλαγκτονικών οργανισμών και όχι των μεθανογενών αρχαίων. Επίσης, πρόσφατα οι Damsté και συνεργάτες (2003) επιβεβαίωσαν ότι η ουσία αυτή προέρχεται από τους φωτοαυτότροφους οργανισμούς, πιθανότατα μέσω διαδικασιών αναγωγής που πραγματοποιούνται από τα μικρόβια και προτείνουν τη χρήση της ουσίας αυτής ως βιοδείκτη ανοξικών συνθηκών σε αρχαία περιβάλλοντα. Η παρατήρηση αυτή αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι οι ανοξικές λεκάνες του Νοτίου Ιονίου λειτουργούν ως αποθήκες συσσώρευσης οργανικού υλικού πλαγκτονικής προέλευσης που καθιζάνουν μέσω της κολώνας του νερού από την εύρωτη ζώνη και διαθέτουν την ικανότητα να συντηρούνται σε γεωλογικά χρονικές περιόδους.

Κατά τρόπο ανάλογο με τις χημικές παραμέτρους, εφαρμόσαμε επίσης τη στατιστική Ανάλυση των Πρωταρχικών Συνιστωσών (PCA) στις κατανομές των κ-αλκανίων με απώτερο σκοπό τη σύγκριση των σταθμών δειγματοληψίας ως προς τις διαφορετικές πηγές οργανικού άνθρακα και ενέργειας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ένα ποσοστό 81.5% της συνολικής διακύμανσης μπορεί να εξηγηθεί από δύο και μόνο πρωταρχικές συνιστώστες (PC) όπου οι PC1 και PC2 εξηγούν ένα ποσοστό 54.1.8% και 27.4.0% της συνολικής διακύμανσης (Σχήμα 3.4.2B). Με την ανάλυση PCA των κ-αλκανίων προκύπτουν επίσης 2 ευδιάκριτες ομάδες, όπως και στην περίπτωση των χημικών παραμέτρων (Σχήμα 3.4.2A). Η ομάδα Α περιλαμβάνει τους οξικούς σταθμούς AB03MC, AB12MC και AB15MC ενώ η ομάδα Β περιλαμβάνει τους ανοξικούς σταθμούς AB05MC και AB13MC. Ο τρίτος ανοξικός σταθμός AB14MC διαχωρίζεται από την ομάδα Β και προσεγγίζει τους σταθμούς ADEC και AB10MC πιθανότατα ως αποτέλεσμα της χαμηλής συνεισφοράς χερσαίου οργανικού υλικού στις περιοχές αυτές (TC/OC = 1.3 – 36.8 μg g<sup>-1</sup>, CPI = 0.9 – 1.4; Πίνακας 3.4.2, Σχήμα 3.4.2A). Τα αποτελέσματα δηλώνουν ξεκάθαρα ότι υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τύποι πηγών οργανικού άνθρακα και ενέργειας (Σχήμα 3.4.2B). Οι σταθμοί της οξικής ομάδας Α χαρακτηρίζονται από τις υψηλότερες τιμές χερσαίας επίδρασης (TC/OC = 144.6 – 269.9 μg g<sup>-1</sup>, CPI = 1.9 – 2.2; Πίνακας 3.4.2, Σχήμα

3.4.2B) ενώ οι λεκάνες Bannock και L'Atalante (σταθμοί ομάδας B) επηρεάζονται περισσότερο από οργανικό υλικό πλαγκτονικής προέλευσης (υψηλός λόγος  $C_{35}/C_{31}$ ; Πίνακας 3.4.2). Επίσης, οι υψηλές συγκεντρώσεις των κ-αλκανίων δηλώνουν ότι η περιοχή των ανοξικών λεκανών αποτελεί το τελικό σημείο εναπόθεσης και συσσώρευσης οργανικού υλικού τόσο χερσαίας όσο και θαλάσσιας προέλευσης που έχει τη τάση να συντηρείται σε τόσο ακραία περιβάλλοντα ενώ δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο να προέρχεται επίσης και από τα γειτονικά γεωλογικά στρώματα (Brusa et al., 2001 ύστερα από επικοινωνία με Corselli, 1999).

### 3.4.3 Σύσταση των μικροβιακών κοινωνιών

Για τη μελέτη της σύστασης των μικροβιακών κοινωνιών στα ιζήματα έχει πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια ένας μεγάλος αριθμός εργασιών που βασίζονται είτε σε διαδικασίες καλλιέργειας (Suzuki and DeLong, 2002; Wieringa et al., 2000) είτε στην ανάλυση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων (PLFA) (Bobbie and White, 1980; White et al., 1979; White et al., 1996). Τα φωσφολιπίδια σχηματίζουν την εξωτερική μεμβράνη των κυττάρων προσφέροντας τους προστασία απέναντι στο περιβάλλον. Η ανάλυση των φωσφολιπιδίων δίνει επίσης τη δυνατότητα υπολογισμού της ζωντανής μικροβιακής βιομάζας καθώς αποικοδομούνται ταχύτατα μετά τον κυτταρικό θάνατο (White et al., 1979) ως αποτέλεσμα της δράσης των φωσφολιπασών (Harvey et al., 1986). Επιπλέον, άλλες κατηγορίες οργανισμών όπως τα αρχαία, τα φυτά, τα φύκη, τα διάτομα και τα ανώτερα ζώα συνθέτουν διαφορετικά είδη φωσφολιπιδίων (Gurr and James, 1980; Parkes and Taylor, 1983). Οι μικροβιακές κοινωνίες των ιζημάτων αποτελούνται κυρίως από βακτήρια, μικροευκαρυωτικούς οργανισμούς και αρχαία. Οι λειτουργικές ομάδες των μικροβίων (μικροοργανισμοί που πραγματοποιούν παρόμοιες μεταβολικές διεργασίες) διαχωρίζονται στα αερόβια και αναερόβια ετερότροφα βακτήρια, στα φωτότροφα βακτήρια, στα ετερότροφα μικροευκαρυωτικά καθώς και στα μεθανογενή αρχαία (Smoot and Findlay, 2001).

Στην παρούσα εργασία, η μελέτη της κατανομής των φωσφολιπιδίων έδειξε ότι τα βακτηριακά λιπίδια είναι κατά πολύ πιο άφθονα από τα συνολικά, δηλώνοντας παράλληλα ότι οι μικροβιακές κοινωνίες αποτελούνται κυρίως από βακτήρια και όχι από μικροευκαρυωτικούς οργανισμούς (Guezennec and Fiala-Medioni, 1996) (Πίνακας 3.4.3).

Οι συγκεντρώσεις των φωσφολιπιδίων που υπολογίστηκαν στα ιζήματα είναι συγκρίσιμες με αντίστοιχες από την περιοχή του Θερμαϊκού Κόλπου (Βόρειο Αιγαίο Πέλαγος) (219-2714 ng g<sup>-1</sup>; Polymenakou et al., 2005a) και της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης (Νότιο Αιγαίο Πέλαγος) (524-1238 ng g<sup>-1</sup>; Polymenakou et al., 2005a). Βασίζόμενοι στις δημοσιευμένες τιμές για το βακτήριο *Escherichia coli* όπου 5.9 × 10<sup>12</sup> κύτταρα αντιστοιχούν σε 1 g (Stratford, 1977), και όπου 1 g βακτηρίων περιλαμβάνει 100 μmol PLFA (White et al., 1979), προσδιορίσαμε τον αριθμό βακτηρίων ανά γραμμάριο ξηρής μάζας ιζήματος. Οι υπολογιζόμενες κυτταρικές αφθονίες που κυμάνθηκαν μεταξύ 1.42 και 7.21 × 10<sup>8</sup> κύτταρα g<sup>-1</sup> (Πίνακας 3.4.3) είναι συγκρίσιμες με τιμές βακτηρίων από την oligοτροφική υφαλοκρηπίδα της Κρήτης (Danovaro et al., 2000), καθώς και από βαθιά ιζήματα της Ανατολικής (Bianchi et al., 2003; Boetius et al., 1996) και Δυτικής Μεσογείου (Dellile et al., 1990).

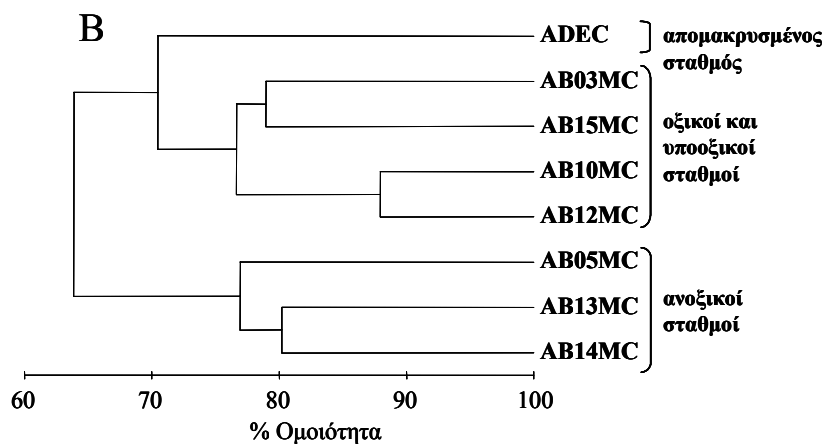
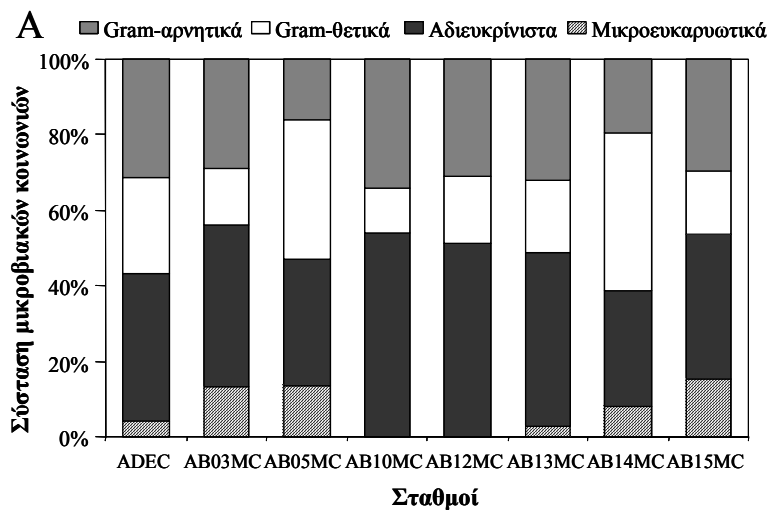
Η κατανομή των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων (PLFA) όλων των σταθμών παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.4.3. Τα λιπαρά οξέα που προσδιορίστηκαν αποτελούνται από κορεσμένα, μονοακόρεστα, πολυακόρεστα και διακλαδωμένα λιπαρά οξέα (Πίνακας 3.4.3). Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα των οποίων οι συγκεντρώσεις κυμάνθηκαν μεταξύ 33.25 ± 7.32 % και 54.09 ± 7.41% των συνολικών λιπαρών οξέων αποτελούνται κυρίως από τα C<sub>16:0</sub> και C<sub>18:0</sub> τα οποία είναι ευρέως διαδεδομένα σε όλους τους οργανισμούς και καλύπτουν ένα μεγάλο φάσμα διαφορετικών βακτηριακών γενών (Rajendran et al., 1993) (Πίνακας 3.4.3; Σχήμα 3.4.5A).

Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (όπως τα C<sub>16:1ω9</sub>, C<sub>17:0</sub>) χρησιμοποιούνται ως δείκτες των gram-αρνητικών βακτηρίων (Ratledge and Wilkinson, 1988). Η ποσοστιαία συνεισφορά των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων ως προς τα συνολικά διέφερε σημαντικά μεταξύ των σταθμών δειγματοληψίας με τις ελάχιστες τιμές να έχουν καταγραφεί για τον υποοξικό σταθμό AB10MC (15.95% των συνολικών λιπαρών οξέων; Σχήμα 3.4.5A) και τον ανοξικό σταθμό AB14MC (19.56% των συνολικών λιπαρών οξέων; Σχήμα 3.4.5A). Για τα λιπαρά οξέα με 16 και 18 άτομα άνθρακα ανιχνεύτηκαν οι μονοακόρεστες δομές στις θέσεις ω7 και ω9 ενώ οι συγκεντρώσεις τους κυμάνθηκαν μεταξύ 0 και 16.74% (Πίνακας 3.4.3).

**Πίνακας 3.4.3:** Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις (*sd*) των φωσφολιπιδίων (PLFA) που προσδιορίστηκαν για τα θαλάσσια ιζήματα του Νοτίου Ιονίου (*n*=3). Στον πίνακα παρουσιάζονται επίσης οι συνολικές ποσότητες των φωσφολιπιδίων ( $\text{ng g}^{-1}$ ), οι βακτηριακές βιομάζες ( $\text{ng g}^{-1}$ ) και οι κυτταρικές αφθονίες ( $\times 10^8$  κύτταρα  $\text{g}^{-1}$ ) για κάθε σταθμό.

PLFA (%)	ADEC		AB03MC		AB05MC		AB10MC		AB12MC		AB13MC		AB14MC		AB15MC	
	μέσος όρος	<i>sd</i>	μέσος όρος	<i>sd</i>	μέσος όρος	<i>sd</i>	μέσος όρος	<i>sd</i>	μέσος όρος	<i>sd</i>	μέσος όρος	<i>sd</i>	μέσος όρος	<i>sd</i>	μέσος όρος	<i>sd</i>
C <sub>14:0</sub>	3.76	0.02	3.56	0.35	5.69	2.77	7.42	0.29	3.70	1.11	8.36	1.10	4.43	1.01	3.53	0.62
14-MeC <sub>14:0</sub>	5.85	0.05	3.53	1.28	2.79	1.23	3.92	0.40	2.58	0.73	4.19	0.49	4.65	0.07	3.71	0.87
12-MeC <sub>14:0</sub>	7.60	0.00	5.90	1.97	4.83	0.10	5.14	2.58	5.56	1.51	5.38	0.48	6.64	2.01	5.65	2.07
C <sub>15:0</sub>	1.27	0.11	1.39	0.03	1.24	0.48	0.98	0.24	1.29	1.10	1.46	0.38	0.69	0.06	1.07	0.29
12-MeC <sub>15:0</sub>											0.70	0.25				
14-MeC <sub>15:0</sub>	1.56	0.06									0.86	0.07	0.65	0.03	0.53	0.74
<i>cis</i> -C <sub>16:1<math>\omega</math>7</sub>	1.90	0.00											0.30	0.23	0.62	0.87
<i>cis</i> -C <sub>16:1<math>\omega</math>9</sub> + <i>trans</i> -C <sub>16:1<math>\omega</math>7</sub>	5.43	0.32	2.63	2.89	5.82	0.03	9.66	0.02	5.52	3.96	13.86	0.58	5.29	1.04	4.52	1.62
<i>trans</i> -C <sub>16:1<math>\omega</math>9</sub>	3.08	0.58	1.80	0.26			1.68	0.98	2.26	0.39	1.56	0.76	1.90	0.43	2.14	0.58
C <sub>16:0</sub>	22.11	0.13	27.72	0.53	20.30	2.10	34.78	1.97	34.47	7.39	26.79	1.44	18.60	4.29	21.16	0.49
13-MeC <sub>16:0</sub>			5.67	1.46	3.04	0.32	2.65	0.85	7.26	1.15	2.38	0.08	1.81	1.52	6.97	1.34
15-MeC <sub>16:0</sub>	4.16	0.32			26.46	6.23					3.93	4.52	28.17	4.86		
14-MeC <sub>16:0</sub>	6.41	0.02							2.38	0.61	1.67	0.64				
C <sub>17:1</sub>	2.42	0.02									0.65	0.30				
C <sub>17:0</sub>	0.93	0.23	1.11	0.32					2.32	3.28	1.12	0.72	0.91	0.41	1.40	0.90
C <sub>18:3<math>\omega</math>3</sub>	0.49	0.06	3.47	1.05	2.21	0.84					1.06	0.54	1.13	0.06	0.41	0.01
C <sub>18:2<math>\omega</math>6,9</sub>	1.21	0.07	6.04	3.45							1.83	0.48	4.33	2.03	6.89	1.51
<i>cis</i> -C <sub>18:1<math>\omega</math>7</sub>	7.46	1.33	7.72	0.81	4.52	0.20	7.90	0.73	7.24	0.38	5.99	1.06	4.86	0.53	9.68	1.63
<i>cis</i> -C <sub>18:1<math>\omega</math>9</sub>	9.94	0.94	16.74	2.02	5.61	0.13	14.96	1.19	16.08	0.98	10.01	1.11	7.21	0.40	12.54	2.17
<i>trans</i> -C <sub>18:1<math>\omega</math>9</sub>	1.03	0.35														
C <sub>18:0</sub>	10.03	2.83	7.34	0.39	5.00	1.59	10.91	4.92	9.34	3.87	4.59	1.54	5.01	0.00	9.92	1.34
C <sub>20:4</sub>	0.17	0.02	1.51	1.47	2.73	0.42							2.48	0.94	2.20	1.47
C <sub>20:3<math>\omega</math>11,14,17</sub>	1.30	0.78			8.55	1.51									5.74	2.06
C <sub>20:2<math>\omega</math>11,14</sub>	0.87	0.18	2.15	0.23												
C <sub>20:0</sub>	1.00	0.10	1.72	0.12	1.22	0.37					3.61	3.83	0.96	0.16	1.34	0.05
<b>Συνολικά PLFA (<math>\text{ng g}^{-1}</math>)</b>	1352.10	208.04	757.36	323.73	3807.90	655.18	1019.26	152.06	941.83	91.98	2933.83	1375.76	2736.56	964.86	1287.56	180.24
<b>Βακτηριακή βιομάζα (<math>\text{ng g}^{-1}</math>)</b>	1296.77	191.99	651.01	250.07	3300.83	640.53	1019.26	152.06	941.83	91.98	2849.16	1337.45	2504.68	805.46	1086.76	87.70
<b><math>\times 10^8</math> κύτταρα <math>\text{g}^{-1}</math></b>	2.83	0.42	1.42	0.55	7.21	0.14	2.23	0.33	2.06	0.2	6.41	2.92	5.47	1.76	2.37	0.19
<b>Ακόρεστα</b>	35.30	4.65	42.06	12.17	29.43	3.14	34.19	2.92	31.10	5.72	34.97	4.83	27.50	5.65	44.73	11.93
<b>Κορεσμένα</b>	39.11	3.43	42.85	1.74	33.45	7.32	54.09	7.41	51.12	16.75	45.93	9.00	30.59	5.93	38.41	3.69
<b>Διακλαδωμένα</b>	25.59	0.45	15.10	4.71	37.12	7.89	11.71	3.83	17.78	3.99	19.10	6.53	41.91	8.49	16.86	5.02

Επίσης οι γεωμετρίες *cis* and *trans* ανιχνεύτηκαν στα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα C<sub>16:1ω7</sub>, C<sub>16:1ω9</sub> και C<sub>18:1ω9</sub> (Πίνακας 3.4.3). Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα με 16 άτομα άνθρακα αποτελούν επίσης τα βασικά συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης των μεθανότροφων βακτηρίων Type I (Makula, 1978; Martz et al., 1983). Γενικά, τα βακτήρια που διαθέτουν ικανότητα οξειδωσης μεθανίου, αποτελούν μια πολύ σημαντική λειτουργική ομάδα μικροοργανισμών στη ρύθμιση των βιογεωχημικών κύκλων ενώ η παρουσία τους στους σταθμούς δειγματοληψίας ήταν αναμενόμενη καθώς το μεθάνιο αποτελεί βασικό χημικό συστατικό των ανοξικών λεκανών.



**Σχήμα 3.4.5:** Α) Σύσταση των μικροβιακών κοινοτήτων στους σταθμούς δειγματοληψίας όπως προέκυψε από την ανάλυση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων. Β) Δενδρόγραμμα κατάταξης των σταθμών δειγματοληψίας βασισμένο στην κατανομή των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων.

Οι White και συνεργάτες (1996) έχουν αναφέρει ότι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς ενώ οι Frostegard and Bååth (1996) πρότειναν τη χρήση του λιπαρού οξέος C<sub>18:2</sub> ως βιοδείκτη παρουσίας μυκήτων στα περιβαλλοντικά δείγματα. Σύμφωνα με τα επίπεδα των συγκεντρώσεων του λιπαρού οξέος C<sub>18:2ω6,9</sub> οι αφθονίες των μυκήτων ήταν

υψηλότερες στον ανοξικό σταθμό AB14MC ( $128.28 \pm 97.26 \text{ ng g}^{-1}$ ) καθώς και στον οξικό σταθμό AB15MC ( $90.12 \pm 31.90 \text{ ng g}^{-1}$ ) της λεκάνης Urania και μηδαμινές στους σταθμούς AB05MC, AB10MC και AB12MC. Επίσης, οι ιδιαίτερα χαμηλές αφθονίες των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που κυμάνθηκαν μεταξύ 0 και 15.24% των συνολικών λιπαρών οξέων υποδηλώνουν τη χαμηλή συνεισφορά των μικροευκαρυωτικών οργανισμών στη σύσταση των βενθικών μικροβιακών κοινωνιών (Σχήμα 3.4.5A).

Γενικά, τα διακλαδωμένα λιπαρά οξέα χρησιμοποιούνται ως βιοδείκτες παρουσίας των gram-θετικών βακτηρίων στα περιβαλλοντικά δείγματα (Zelles, 1999). Τα επίπεδα των διακλαδωμένων λιπαρών οξέων υποδηλώνουν ότι οι κατανομές των gram-θετικών βακτηρίων διέφεραν σημαντικά μεταξύ των σταθμών δειγματοληψίας. Τα gram-θετικά βακτήρια παρουσιάζονταν πολύ πιο άφθονα στις ανοξικές λεκάνες Bannock (σταθμός AB05MC) και Urania (σταθμός AB14MC) με συγκεντρώσεις 37.12% και 41.91% των συνολικών λιπαρών οξέων, αντίστοιχα (Πίνακας 3.4.3; Σχήμα 3.4.5A).

#### **3.4.4 Επίδραση των διαφορετικών οξικών/ανοξικών συνθηκών και επιπέδων αλατότητας**

Τα τελευταία χρόνια η δομή των βενθικών μικροβιακών κοινωνιών έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών στο χώρο της μικροβιακής οικολογίας (Erstein, 1997). Ακόμα μεγαλύτερο ενδιαφέρον προκαλεί η μελέτη των περιβαλλοντικών παραγόντων που ρυθμίζουν τη σύσταση των μικροβιακών κοινωνιών αν αναλογιστούμε το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν οι βακτηριακοί πληθυσμοί στη ρύθμιση των βιογεωχημικών κύκλων. Σε προηγούμενη εργασία (Κεφάλαιο 3.1; Polymenakou et al., 2005a), που πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικά οξικά ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου (Θερμαϊκός Κόλπος, Κρητικό Πέλαγος, Νότιο Ιόνιο, Θάλασσα της Λεβαντίνης), δείξαμε ότι μεταξύ των διαφορετικών περιβαλλοντικών παραμέτρων που προσδιορίστηκαν τόσο ο οργανικός άνθρακας όσο και η χλωροφύλλη *a* παίζουν πρωταρχικό ρόλο στη ρύθμιση της σύστασης των μικροβιακών κοινωνιών (Κεφάλαιο 3.1; Polymenakou et al., 2005a). Αντίστοιχες εργασίες που να αφορούν ακραία περιβάλλοντα με ιζήματα ανοξικά ή με υψηλά επίπεδα αλατότητας δεν υπάρχουν στο χώρο της μικροβιακής οικολογίας.

Στην παρούσα εργασία, ακολουθήσαμε την ανάλυση των φωσφολιπιδίων με σκοπό να εκτιμήσουμε τις αλλαγές στη δομή των βενθικών μικροβιακών κοινωνιών



στις βαθιές ανοξικές λεκάνες Bannock, L'Atalante, Discovery και Urania της Ανατολικής Μεσογείου. Οι λεκάνες αυτές παρουσιάζουν διαφορές τόσο ως προς τα επίπεδα αλατότητας όσο και ως προς το βαθμό των οξικών/ανοξικών συνθηκών που τις χαρακτηρίζουν. Βασιζόμενοι στην κατανομή των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων υπολογίσαμε το βαθμό ομοιότητας μεταξύ των περιβαλλοντικών δειγμάτων και κατόπιν εφαρμόσαμε τη μέθοδο ανάλυσης κατάταξης (hierarchical cluster analysis). Η ανάλυση κατάταξης ομαδοποίησε τους σταθμούς σύμφωνα με το βαθμό της οξειδοαναγωγικής τους ικανότητας παράγοντας δύο ευδιάκριτες ομάδες (Σχήμα 3.4.5B). Ο υποοξικός σταθμός της λεκάνης Discovery (AB10MC) ομαδοποιήθηκε με τους οξικούς σταθμούς AB03MC, AB12MC και AB15MC που βρίσκονταν κοντά στις ανοξικές λεκάνες Bannock και Urania. Οι τιμές Eh αυτών των σταθμών κυμάνθηκαν μεταξύ 10 και 475 mV (Πίνακας 3.4.1). Επίσης, όλοι οι ανοξικοί σταθμοί (AB05MC, AB13MC, AB14MC) διαχωρίζονταν ξεκάθαρα από την οξική ομάδα. Η ομαδοποίηση αυτή μοιάζει σημαντικά με την ομαδοποίηση των σταθμών που προέκυψε από τις χημικές παραμέτρους (η Ανάλυση των Πρωταρχικών Συνιστωσών (PCA) επίσης διαχώρισε τους οξικούς από τους ανοξικούς σταθμούς) υποδεικνύοντας τη στενή σύνδεση των βενθικών μικροβιακών κοινωνιών με τις οξειδοαναγωγικές συνθήκες.

Αντίθετα με το βαθμό των οξικών/ανοξικών συνθηκών, οι συγκεντρώσεις αλατότητας δεν φάνηκαν να παίζουν κανένα ρόλο στη ρύθμιση των μικροβιακών κοινωνιών υποδηλώνοντας ότι τα μικρόβια που ενδιαιτούν στα ιζήματα αυτά είναι πιθανότατα αλοανθεκτικά και όχι αλόφιλα. Αυτό σημαίνει ότι οι συγκεκριμένοι οργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν σε ένα μεγάλο εύρος διαφορετικών επιπέδων αλατότητας χωρίς περιορισμό. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνεται από προηγούμενη εργασία που πραγματοποιήθηκε στη μεσόφαση της λεκάνης Urania και στην οποία βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν διέθεταν την ικανότητα ανάπτυξης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (Brusa et al., 2001).

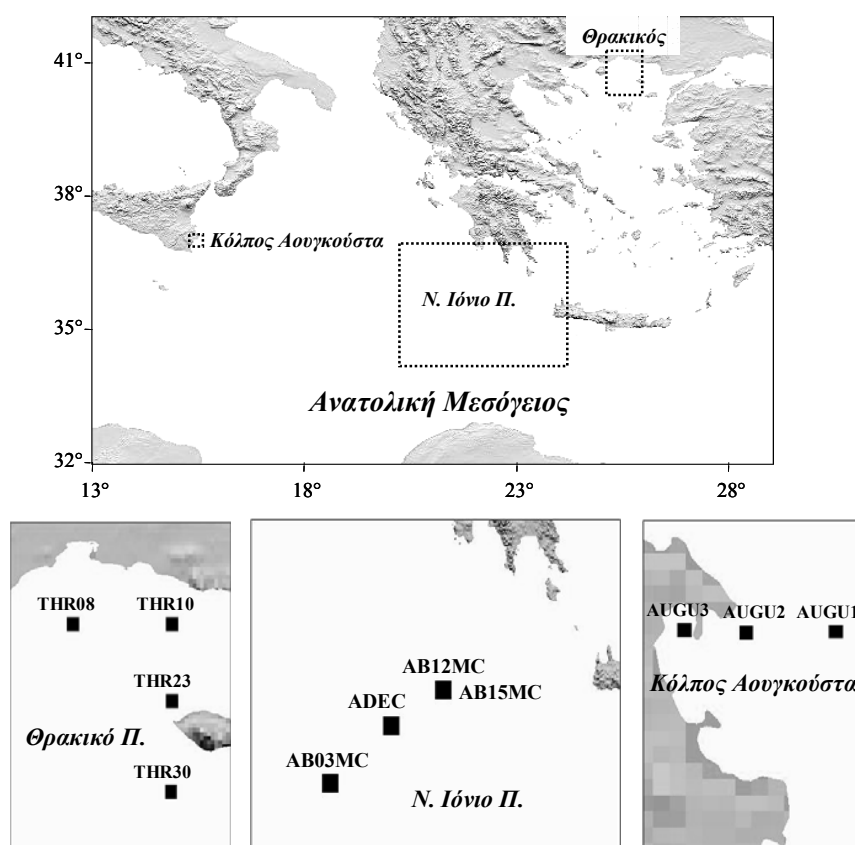
Για να εξετάσουμε το βαθμό στον οποίο οι διάφορες περιβαλλοντικές παράμετροι (όπως Eh, αλατότητα, οργανικός άνθρακας, οργανικό άζωτο, λόγος C/N, και ποσότητα PLFA ως δείκτης μικροβιακής βιομάζας) επηρεάζουν τη σύσταση των μικροβιακών κοινωνιών πραγματοποιήσαμε τη στατιστική ανάλυση BIOENV. Σύμφωνα με τους Clarke και Ainsworth (1993), οι περιβαλλοντικές παράμετροι χρησιμοποιήθηκαν ως βάση δεδομένων για την ανάλυση BIOENV χωρίς καμία περαιτέρω τροποποίηση. Ο υψηλότερος συντελεστής συσχέτισης με τα δεδομένα

PLFA ( $r=0.498$ ) προέκυψε για τις τιμές οξειδοαναγωγικού δυναμικού Eh επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της ανάλυσης κατάταξης και τονίζοντας παράλληλα το μικρό ρόλο που η αλατότητα παίζει στη ρύθμιση των μικροβιακών κοινωνιών. Το αποτέλεσμα αυτό βέβαια ήταν αναμενόμενο δεδομένου των έντονων διαφορών στις τιμές Eh μεταξύ των οξικών και ανοξικών σταθμών. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήσαμε την ανάλυση BIOENV για κάθε ομάδα της ανάλυσης κατάταξης ξεχωριστά (οξική και ανοξική) ώστε να διερευνήσουμε το βαθμό του περιβαλλοντικού ελέγχου των μικροβιακών κοινωνιών σε κάθε περιβάλλον (οξικό και ανοξικό). Στην ανοξική ομάδα, ο υψηλότερος συντελεστής συσχέτισης με τα δεδομένα PLFA ( $r=0.871$ ) προέκυψε για τις μεταβλητές Eh και του οργανικού αζώτου ενώ ο οργανικός άνθρακας συσχετιζόταν επίσης σημαντικά με τη σύσταση των μικροβιακών κοινωνιών ( $r=0.868$ ). Τα αποτελέσματα αυτά τονίζουν τη σημασία της ποιότητας και ποσότητας του οργανικού υλικού στη ρύθμιση των βενθικών μικροβιοκοινωνιών όπως είχε βρεθεί και σε προηγούμενη εργασία για τα οξικά περιβάλλοντα της Ανατολικής Μεσογείου (Κεφάλαιο 3.1; Polymenakou et al., 2005a). Αντίθετα, στην οξική ομάδα, οι μεταβλητές του βάθους των σταθμών δειγματοληψίας και της μικροβιακής βιομάζας (ποσότητα PLFA) παρουσίασαν τον υψηλότερο συντελεστή συσχέτισης με τη σύσταση των μικροβιακών κοινωνιών ( $r=0.796$ ) ενώ ο οργανικός άνθρακας εμφανίζεται να παίζει έναν πολύ μικρό ρόλο. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι στην περιοχή των ανοξικών λεκανών του Νοτίου Ιονίου υπάρχουν δύο διαφορετικές βενθικές μικροβιακές κοινωνίες που πιθανότατα διαθέτουν διαφορετικές λειτουργίες και διαδραματίζουν διαφορετικό ρόλο στις βενθικές διαγενετικές διεργασίες. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στις διαφορετικές γεωχημικές διεργασίες που επικρατούν στις ανοξικές λεκάνες σε σχέση με τα οξικά περιβάλλοντα. Με την ανάλυση PCA της κατανομής των κ-αλκανίων προέκυψε επίσης ότι υπάρχουν διαφορετικές πηγές οργανικού υλικού στα ιζήματα. Συγκεκριμένα, στους σταθμούς δειγματοληψίας που βρίσκονται κοντά στις ανοξικές λεκάνες η χερσαία συνεισφορά στη σύσταση των ιζημάτων είναι πολύ πιο έντονη από ότι στους σταθμούς που βρίσκονται στις ανοξικές λεκάνες. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι τα ακραία αυτά περιβάλλοντα πιθανότατα λειτουργούν ως αποθήκες συσσώρευσης οργανικού υλικού θαλάσσιας προέλευσης που μπορεί να έχει διαφοροποιηθεί κατά τη διάρκεια των διαγενετικών διεργασιών ενώ παράλληλα διαθέτουν την τάση να το διατηρούν κατά τη διάρκεια γεωλογικά χρονικών περιόδων.

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

#### 3.5 Μελέτη της βιοδιαθεσιμότητας των πηγών C: επίδραση του στοιχειακού άνθρακα των ιζημάτων στην κατανομή των μικροβιακών κοινοτήτων

Το οργανικό υλικό που εισάγεται στο θαλάσσιο βυθό προέρχεται από διάφορες πηγές ενώ τόσο το είδος όσο και η ποσότητα που τελικά καθιζάνει εξαρτώνται από τις διαγενετικές διεργασίες που πραγματοποιούνται στην κολώνα του νερού και στα επιφανειακά ιζήματα (Teese et al., 1998). Τα τελευταία χρόνια, η μελέτη του ‘στοιχειακού άνθρακα’ ή αιθάλης έχει προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον καθώς έχει θεωρηθεί ότι αποτελεί τη μη αποικοδομήσιμη μορφή του οργανικού υλικού που μπορεί να διατηρηθεί και να συσσωρευτεί στα ιζήματα (Dickens et al., 2004; Gélinaš et al., 2001; Middelburg et al., 1999). Ο στοιχειακός άνθρακας προέρχεται από την ατελή καύση της φυτικής βιομάζας και των ορυκτών καυσίμων (Elmqvist et al., 2004;



**Σχήμα 3.5.1:** Χάρτης της Ανατολικής Μεσογείου που παρουσιάζονται οι σταθμοί δειγματοληψίας του Θρακικού Πελάγους, Νοτίου Ιονίου και Κόλπου Αουγκούστα.

Middelburg et al., 1999) ενώ σχηματίζεται κυρίως στη χέρσο και μεταφέρεται στον ωκεανό μέσω των ποταμών και μέσω της ατμόσφαιρας με τις διαδικασίες της υγρής και ξηρής εναπόθεσης των αερολυμάτων (Dickens et al., 2004; Masiello et al., 1998).

Τα τελευταία χρόνια, ένας μεγάλος αριθμός χημικών ουσιών, όπως οι αλειφατικοί υδρογονάνθρακες χρησιμοποιούνται ως βιοδείκτες για την εκτίμηση των ανθρωπογενών, χερσαίων και θαλάσσιων πηγών οργανικού άνθρακα στα θαλάσσια περιβάλλοντα. Οι ουσίες αυτές προέρχονται από ένα μεγάλο αριθμό αλλόχθονων πηγών όπως τα χερσαία ανώτερα φυτά, καθώς και αυτόχθονων πηγών όπως το πλαγκτόν και τα βακτήρια (Wakeham, 1996). Επίσης, οι αλειφατικοί υδρογονάνθρακες αποτελούν τα βασικά συστατικά του ακατέργαστου πετρελαίου παρουσιάζοντας μια κατανομή κ-αλκανίων στην οποία οι ποσότητες των ομόλογων με μονό και ζυγό αριθμό ατόμων άνθρακα είναι παρόμοιες (Simoneit, 1999; Wakeham, 1996). Για το λόγο αυτό, η ανάλυση του κλάσματος των αλειφατικών υδρογονανθράκων προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τον προσδιορισμό των πηγών ρύπανσης στα διάφορα περιβάλλοντα. Η συγκεκριμένη ανάλυση δε δίνει καμία πληροφορία για τις επιδράσεις της περιβαλλοντικής ρύπανσης στους θαλάσσιους οργανισμούς (Fang and Findlay, 1996) και επομένως η παράλληλη χημική και βιολογική μελέτη των περιβαλλοντικών δειγμάτων καθίσταται αναγκαία για την εκτίμηση της επίδρασης της ρύπανσης (Kieft et al., 1997; White et al., 1983; White, 1994).

Οι φυσικές μικροβιακές κοινωνίες χαρακτηρίζονται από υψηλή βιοποικιλότητα, ενώ συμμετέχουν σε έναν μεγάλο αριθμό βιογεωχημικών διεργασιών (Boschker et al., 1998). Μεταξύ των οργανισμών, τα βακτήρια αποτελούν τα πρώτα συστατικά των βιοκοινωνιών που διαθέτουν τη δυνατότητα να αποκρίνονται άμεσα σε αλλαγές στις περιβαλλοντικές συνθήκες (Evans, 1977; Fang and Findlay, 1996). Ο κυριότερος οικολογικός ρόλος των βακτηριακών κοινωνιών είναι η αποικοδόμηση των διάφορων συστατικών του οργανικού υλικού (Boschker et al., 1998; Boschker et al., 2001).

Εργασίες που αφορούν τη σύνδεση της σύστασης των μικροβιακών κοινωνιών με τις διάφορες περιβαλλοντικές παραμέτρους (όπως του στοιχειακού άνθρακα και της πετρελαϊκής ρύπανσης) σε ιζήματα από την ευρύτερη περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου είναι πολύ περιορισμένες (Polymenakou et al., 2005a). Η Ανατολική Μεσόγειος θάλασσα είναι μια από τις πιο ολιγοτροφικές περιοχές του πλανήτη (Ignatiades, 1969; Krom et al., 1991; Tselepides et al., 2000), ενώ περιλαμβάνει περιοχές που χαρακτηρίζονται από διαφορετικά επίπεδα ανθρωπογενών επιδράσεων (Polymenakou et al., 2005a). Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής που έχει ως σκοπό τον προσδιορισμό των περιβαλλοντικών παραμέτρων που ρυθμίζουν τη σύσταση των μικροβιακών κοινωνιών, η συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε για την παροχή πληροφοριών σχετικά με την επίδραση της μη

αποικοδομήσιμης μορφής του οργανικού υλικού στη βιοδιαθεσιμότητα των πηγών άνθρακα και ενέργειας καθώς και στην κατανομή των μικροβιακών κοινωνιών σε περιβάλλοντα με διαφορετικά επίπεδα πετρελαϊκών υδρογονανθράκων. Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν δείγματα ιζημάτων από ρυπασμένες και μη περιοχές της Ανατολικής Μεσογείου και πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις στοιχειακού άνθρακα, αλειφατικών υδρογονανθράκων και φωσφολιπιδίων.

### 3.5.1 Χημικές παράμετροι

Τα δεδομένα οργανικού άνθρακα, κ-αλκανίων και φωσφολιπιδίων που προέρχονται από τους σταθμούς του Νοτίου Ιονίου και περιλαμβάνονται στη συγκεκριμένη εργασία περιγράφονται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 3.4 (Polymenakou et al., 2005d). Ο σταθμός AB03MC βρίσκεται κοντά στην περιοχή της ανοξικής λεκάνης Bannock ενώ οι σταθμοί AB12MC και AB15MC βρίσκονται κοντά στην περιοχή της ανοξικής λεκάνης Urania. Αντίθετα, ο σταθμός ADEC επιλέχθηκε εφόσον αντιπροσωπεύει μια περιοχή απομακρυσμένη από ανθρωπογενείς επιρροές (Polymenakou et al., 2005d). Στη συνέχεια, περιγράφονται λεπτομερώς τα δεδομένα από τους υπόλοιπους σταθμούς που επιλέχθηκαν για το σκοπό της συγκεκριμένης εργασίας.

**Πίνακας 3.5.1:** Βάθος σταθμός δειγματοληψίας (m), ολικός οργανικός άνθρακας (TOC), στοιχειακός άνθρακας (BC), % αναλογία του BC ως προς το TOC (BC/OC), βιοδιαθέσιμος οργανικός άνθρακας (BOC), χλωροφύλλη *a* (Chl *a*), φαιοχρωστικές (Φαιοχρ.), και ισοδύναμο χλωροπλαστικών χρωστικών (CPE) των σταθμών δειγματοληψίας. Mean και sd δηλώνουν αντίστοιχα τους μέσους όρους και τις τυπικές αποκλίσεις μεταξύ δειγμάτων του ίδιου σταθμού ( $n=3$ ).

Σταθμοί	Βάθος ιζήματος (cm)	Βάθος κολώνας νερού (m)	TOC (%)		BC (%)		BC/OC (%)	BOC (%)	Chl <i>a</i>		Φαιοχρ.		CPE	
			mean	sd	mean	sd			mean	sd	mean	sd	mean	sd
ADEC	0-1	2840	1.30	0.69	0.21	0.03	16.05	1.09	0.06	0.00	0.35	0.06	0.40	0.06
AB03MC	0-1	3179	0.58	0.03	0.28	0.04	48.91	0.30	0.03	0.01	0.12	0.02	0.15	0.03
AB12MC	0-1	3310	0.76	0.09	0.35	0.08	45.69	0.41	0.05	0.02	0.30	0.04	0.35	0.06
AB15MC	0-1	3320	0.67	0.09	0.33	0.07	50.10	0.33	0.04	0.00	0.27	0.01	0.30	0.01
AUGU1	0-1	1700	0.55	0.02	0.27	0.02	48.26	0.29	0.48	0.07	2.95	0.05	3.43	0.02
AUGU2	0-1	600	1.73	0.06	0.60	0.10	34.73	1.13	1.72	0.41	6.62	0.47	8.34	0.05
AUGU3	0-1	100	1.37	0.07	0.63	0.10	46.13	0.74	1.11	0.00	4.78	0.18	5.90	0.17
THR08	0-1	52.1	0.38	0.10	0.08	0.00	20.91	0.30	0.05	0.00	1.01	0.11	1.06	0.10
THR08	8-10	52.1	0.55	0.08	0.13	0.01	22.69	0.43	0.02	0.00	0.43	0.12	0.45	0.12
THR10	0-1	62.5	0.34	0.09	0.01	0.00	2.38	0.33	0.70	0.18	2.01	0.21	2.70	0.39
THR10	8-10	62.5	0.25	0.08	0.01	0.00	4.31	0.24	0.03	0.00	0.69	0.01	0.72	0.02
THR23	0-1	81	0.42	0.06	0.05	0.05	12.97	0.36	0.66	0.26	2.12	0.05	2.78	0.21
THR23	8-10	81	0.33	0.04	0.08	0.01	24.04	0.25	0.04	0.00	0.51	0.22	0.54	0.22
THR30	0-1	223	0.45	0.11	0.15	0.00	34.31	0.29	2.30	0.15	2.87	0.21	5.17	0.06
THR30	8-10	223	0.33	0.03	0.22	0.01	65.68	0.11	0.08	0.03	0.37	0.11	0.46	0.14

Το βάθος των σταθμών δειγματοληψίας κυμάνθηκε από 52.1 m στο Θρακικό Πέλαγος έως 3320 m στην περιοχή του Νοτίου Ιονίου. Οι συγκεντρώσεις οργανικού άνθρακα που κυμάνθηκαν από  $0.25 \pm 0.08\%$  στα βαθύτερα στρώματα των ιζημάτων

(8-10 cm) του Θρακικού Πελάγους έως  $1.73 \pm 0.06\%$  στο σταθμό AUGU2 του Κόλπου Αουγκούστα στη Σικελία (Πίνακας 3.5.1) είναι συγκρίσιμες με αντίστοιχες τιμές άλλων περιοχών της Ανατολικής (0.38 – 1.47%; Polymenakou et al., 2005a; 0.23 – 0.99%; Bianchi et al., 2003) καθώς και της Δυτικής Μεσογείου (0.38 – 1.47%; Bouloubassi et al., 1997). Τα επίπεδα στοιχειακού άνθρακα κυμάνθηκαν από 0.01 – 0.63% C (Πίνακας 3.5.1) ενώ παρουσίασαν σημαντική συσχέτιση με τα επίπεδα οργανικού άνθρακα ( $R^2 = 0.69$ ;  $n = 15$ ). Η συνεισφορά του στοιχειακού άνθρακα (BC) στη σύσταση του ολικού οργανικού άνθρακα παρουσιάστηκε ιδιαίτερα σημαντική (2.38 - 65.68 %; Πίνακας 3.5.1) υποδεικνύοντας ότι τα επίπεδα BC αποτελούν ένα πολύ σημαντικό μέρος της συνολικής πηγής άνθρακα στα ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου. Αντίθετα με προηγούμενη εργασία (Middelburg et al., 1999), τα ιζήματα των βαθιών δειγματοληπτικών σταθμών της Ανατολικής Μεσογείου δεν παρουσίασαν καμία τάση να περιέχουν τα μεγαλύτερα ποσοστά BC.

Γενικά, ο στοιχειακός άνθρακας χαρακτηρίζεται ως η χημικά και βιολογικά σταθερή μορφή του οργανικού άνθρακα στα θαλάσσια ιζήματα, αν και σε εργαστηριακά πειράματα έχουν καταγραφεί περιπτώσεις διάσπασής του μέσω μικροβιολογικών διεργασιών (Middelburg et al., 1999). Αν και οι Middelburg και συνεργάτες (1999) παρουσίασαν δεδομένα που στηρίζουν την άποψη ότι ο στοιχειακός άνθρακας μπορεί να αποικοδομηθεί στα ιζήματα παρουσία οξυγόνου και νιτρικών ιόντων, εργασίες που έχουν δημοσιευθεί στα εγκυρότερα επιστημονικά περιοδικά (*Nature*, *Science*) παρουσιάζουν τα επίπεδα BC ως σημαντικούς δείκτες της μη αποικοδομήσιμης μορφής οργανικού άνθρακα στο περιβάλλον (Dickens et al., 2004; Schulze et al., 2000) που θεωρητικά δεν μπορεί να αξιοποιηθεί από τους οργανισμούς. Επίσης, οι Dickens και συνεργάτες (2004) παρουσίασαν τη θεωρία τους σύμφωνα με την οποία η ανακύκλωση του στοιχειακού άνθρακα στα ιζήματα πραγματοποιείται σε μεγάλα χρονικά διαστήματα της γεωλογικής κλίμακας λόγω των ιδιαίτερα χαμηλών ρυθμών σχηματισμού και καταστροφής του. Κατά συνέπεια, η ανακύκλωσή του διαχωρίζεται από τη βιολογική ανακύκλωση του οργανικού άνθρακα υποδηλώνοντας ότι οι οργανισμοί δεν παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του στοιχειακού άνθρακα στο περιβάλλον, χωρίς όμως να αποκλείεται το ενδεχόμενο τα επίπεδα του να επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα των πηγών άνθρακα και ενέργειας. Προηγούμενες εργασίες έχουν δείξει επίσης ότι η κατανομή του στοιχειακού άνθρακα στα επιφανειακά ιζήματα μπορεί να επηρεάζει τόσο τη διαφοροποίηση όσο και τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυκυκλικών αρωματικών

υδρογονανθράκων (Gustafsson et al., 1997). Στην παρούσα εργασία, η ποσότητα του βιοδιαθέσιμου οργανικού άνθρακα (BOC) υπολογίστηκε αφαιρώντας τις ποσότητες στοιχειακού άνθρακα από τις αντίστοιχες του ολικού οργανικού άνθρακα. Τα επίπεδα BOC στα ιζήματα κυμάνθηκαν από 0.11 έως 1.13 % C με τη μέγιστη τιμή να έχει καταγραφεί στο σταθμό AUGU2 του Κόλπου Αουγκούστα (Πίνακας 3.5.1). Οι συγκεντρώσεις χλωροφύλλης *a* και φαιοχρωστικών παρουσίασαν μεγάλες διαφορές μεταξύ των σταθμών δειγματοληψίας με τις μέγιστες τιμές να έχουν καταγραφεί στους ρηχούς σταθμούς του Κόλπου Αουγκούστα (αντίστοιχα 1.11 – 1.72  $\mu\text{g g}^{-1}$  και 4.78 – 6.62  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; Πίνακας 3.5.1) και στο σταθμό THR30 (0-1) του Θρακικού Πελάγους (αντίστοιχα 2.30 και 2.87  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; Πίνακας 3.5.1). Ο συγκεκριμένος σταθμός επηρεάζεται σημαντικά από τις χαμηλές σε αλατότητα και πλούσιες σε θρεπτικά μάζες νερού της Μαύρης Θάλασσας που εισέρχονται στο Βόρειο Αιγαίο μέσω των στενών των Δαρδανελίων (Poulos et al., 1997). Οι μάζες νερού είτε μεταφέρουν υψηλές ποσότητες χλωροπλαστικών χρωστικών (χλωροφύλλη *a*, φαιοχρωστικές; Πίνακας 3.5.1) που καθιζάνουν και συσσωρεύονται στο βυθό είτε επηρεάζουν τοπικά την πρωτογενή παραγωγικότητα με τις υψηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών αλάτων που εμπεριέχουν.

### 3.5.2 Ανθρωπογενείς και βιογενείς επιδράσεις

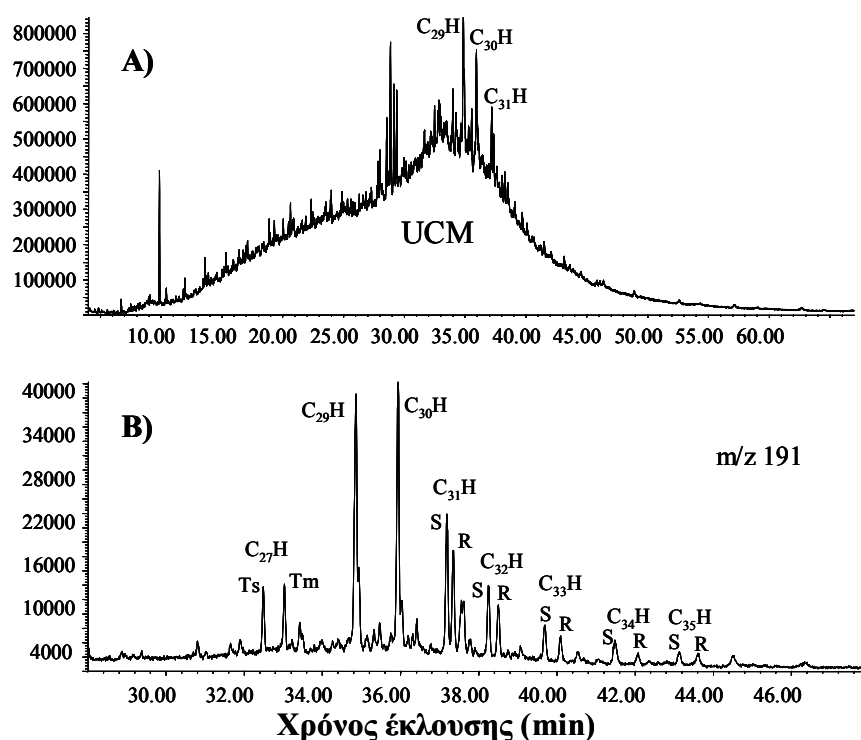
Ένα μεγάλο ποσοστό του οργανικού υλικού που εισέρχεται στην Ανατολική Μεσόγειο προέρχεται από τη βιομηχανία και γενικά τις ανθρωπογενείς δραστηριότητες (Caddy, 1993). Το υλικό αυτό καθιζάνει στο θαλάσσιο βυθό και επηρεάζει τη σύνθεση και λειτουργία των βενθικών κοινοτήτων. Στην πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, η κατανομή των αλειφατικών υδρογονανθράκων μελετήθηκε με σκοπό την εκτίμηση των ανθρωπογενών και βιογενών (χερσαίων και θαλάσσιων) επιδράσεων στην Ανατολική Μεσόγειο (Σχήμα 3.5.1).

Στον Πίνακα 3.5.2 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των διαφορετικών κατηγοριών υδρογονανθράκων καθώς και οι διαγνωστικοί παράμετροι που υπολογίστηκαν. Επίσης, οι κανονικοποιημένες ως προς τον οργανικό άνθρακα συγκεντρώσεις των αλειφατικών υδρογονανθράκων υπολογίστηκαν ( $\mu\text{g g}^{-1}$  οργανικού άνθρακα) σύμφωνα με τους Gogou και συνεργάτες (2000). Τα κ-αλκάνια και το ‘Μίγμα μη Διαχωριζόμενων Ουσιών’ (UCM) ήταν τα πιο άφθονα συστατικά των κλασμάτων των αλειφατικών υδρογονανθράκων ενώ στο σταθμό AUGU2 τα πιο άφθονα συστατικά ήταν το UCM και τα οπάνια (Πίνακες 3.5.2, 3.5.3; Σχήμα 3.5.2Α).





Οι απόλυτες (AHC) και κανονικοποιημένες ως προς τον οργανικό άνθρακα συγκεντρώσεις (AHC/OC) των αλειφατικών υδρογονανθράκων παρουσίασαν μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ των σταθμών δειγματοληψίας με τιμές να κυμαίνονται αντίστοιχα από 1.2 έως 462.8  $\mu\text{g g}^{-1}$  και από 370.8 έως 26698.4  $\mu\text{g g}^{-1}$  (Πίνακας 3.5.2). Γενικά, όταν οι συγκεντρώσεις των υδρογονανθράκων ενός δείγματος είναι μεγαλύτερες από 500  $\mu\text{g g}^{-1}$  αποτελούν ισχυρότατη ένδειξη ότι η περιβαλλοντική ρύπανση είναι πολύ σημαντική στη συγκεκριμένη περιοχή, ενώ τιμές κάτω από 10  $\mu\text{g g}^{-1}$  θεωρούνται σχετικά χαμηλές και χαρακτηρίζουν την περιοχή ως μη ρυπασμένη (Tolosa et al., 2004; Volkman et al., 1992). Οι μέγιστες συγκεντρώσεις



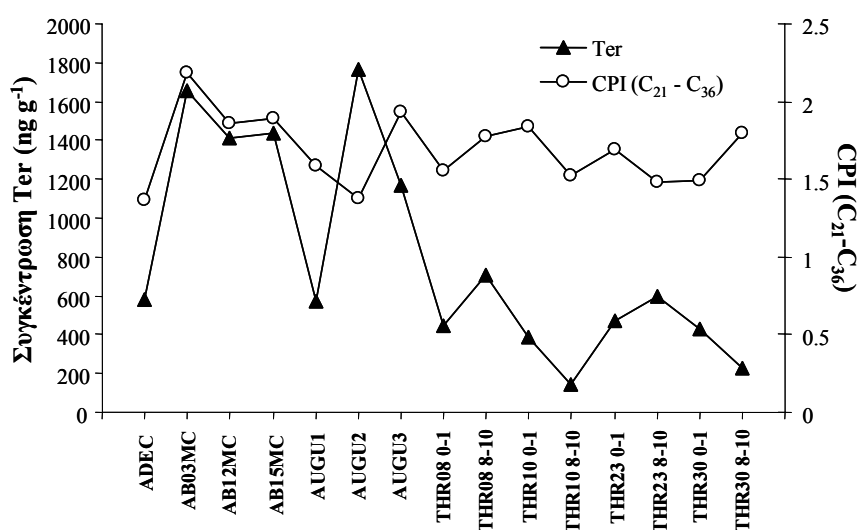
**Σχήμα 3.5.2:** Α) Αέριο χρωματογράφημα του κλάσματος των αλειφατικών υδρογονανθράκων στον έντονα ρυπασμένο σταθμό AUGU2 του Κόλπου Αουγκούστα. UCM, 'Μίγμα Μη Διαχωριζόμενων Ουσιών'. Β) Παράδειγμα χρωματογραφήματος ιόντων ( $m/z$  191) των οπανίων που προσδιορίστηκαν στο σταθμό. Τα πλήρη ονόματα των οπανίων που παρουσιάζονται συντομογραφικά περιγράφονται στον Πίνακα 3.5.3.

υδρογονανθράκων καταγράφηκαν στους ρηχούς σταθμούς του Κόλπου Αουγκούστα, υποδηλώνοντας ότι ο ανθρωπογενής παράγοντας είναι πολύ σημαντικός στη συγκεκριμένη περιοχή. Τα επίπεδα των συγκεντρώσεων αυτών είναι συγκρίσιμα με τα αντίστοιχα περιοχών που αντιμετωπίζουν σοβαρό πρόβλημα χρόνιας πετρελαϊκής ρύπανσης, όπως στο Hong Kong (60 – 646  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; Hong et al., 1995) και στην Κασπία Θάλασσα (29 – 1820  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; Tolosa et al., 2004). Αντίθετα, τα επίπεδα αλειφατικών υδρογονανθράκων που καταγράφηκαν για τα ιζήματα από το Θρακικό Πέλαγος, από

το βαθύ σταθμό του Κόλπου Αουγκούστα και από το χαρακτηριστικό σταθμό απομακρυσμένης περιοχής του Νοτίου Ιονίου, ήταν ιδιαίτερα χαμηλά χαρακτηρίζοντας τις περιοχές αυτές ως μη ρυπασμένες. Οι απόλυτες (NA) και κανονικοποιημένες ως προς τον οργανικό άνθρακα συγκεντρώσεις (NA/OC) των κ-αλκανίων κυμάνθηκαν αντίστοιχα από 532.7 έως 5127.9 ng g<sup>-1</sup> ξηρής μάζας και από 178.7 έως 860.0 μg g<sup>-1</sup> ξηρής μάζας ιζήματος (Πίνακας 3.5.2). Οι μικρότερες τιμές NA καταγράφηκαν στα βαθύτερα στρώματα των ιζημάτων του Θρακικού Πελάγους (όπως 532.7 ng g<sup>-1</sup>; Πίνακας 3.5.2) ενώ ο απομακρυσμένος σταθμός του Νοτίου Ιονίου (ADEC) παρουσίασε τη μικρότερη τιμή NA/OC (178.7 μg g<sup>-1</sup>; Πίνακας 3.5.2). Για σύγκριση, αναφέρουμε εδώ τις ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις NA που έχουν καταγραφεί σε άλλες απομακρυσμένες και μη ρυπασμένες περιοχές, όπως στο νησί της Ανταρκτικής South Orkney (0.4 μg g<sup>-1</sup>; Cripps, 1994) και στη βαθιά λεκάνη της Βορειοδυτικής Μεσογείου (1.1 μg g<sup>-1</sup>; Tolosa et al., 1996). Αντίθετα οι υπόλοιποι σταθμοί του Νοτίου Ιονίου, που βρίσκονται κοντά στις ανοξικές λεκάνες Bannock και Urania, και πιθανότατα επηρεάζονται από αυτές, παρουσίασαν τις υψηλότερες (κανονικοποιημένες ως προς τον οργανικό άνθρακα) τιμές NA (Κεφάλαιο 3.4).

Το μήκος ανθρακικής αλυσίδας των κ-αλκανίων που ανιχνεύθηκαν στα χρωματογραφήματα κυμάνθηκαν από C<sub>14</sub> έως C<sub>39</sub>. Τα ομόλογα με μικρή ανθρακική αλυσίδα (Σ(C<sub>14</sub>-C<sub>20</sub>); Πίνακας 3.5.2) προέρχονται κυρίως από φυτοπλαγκτονικούς οργανισμούς (Gogou et al., 2000) ενώ τα ομόλογα με μεγάλη ανθρακική αλυσίδα (Σ(C<sub>21</sub>-C<sub>36</sub>); Πίνακας 3.5.2) χαρακτηρίζουν την ύπαρξη πηγών χερσαίας προέλευσης καθώς προέρχονται από τα ανώτερα φυτά (Gogou et al., 2000). Και οι δύο κατηγορίες αλκανίων παρουσίασαν υψηλές συγκεντρώσεις τόσο στους ρηχούς σταθμούς του Κόλπου Αουγκούστα όσο και στους βαθείς σταθμούς του Νοτίου Ιονίου που βρίσκονταν κοντά στις ανοξικές λεκάνες (Πίνακας 3.5.2). Τα υψηλά επίπεδα των κ-αλκανίων με μικρή ανθρακική αλυσίδα (C<sub>14</sub> έως C<sub>20</sub>) που καταγράφηκαν στους σταθμούς αυτούς υποδεικνύουν επίσης την παρουσία πηγών ‘ελαφρύ’ πετρελαίου (light oil; Tolosa et al., 2004). Τα ομόλογα με μεγάλη ανθρακική αλυσίδα τα οποία βρέθηκαν σε μεγαλύτερες αφθονίες από τα αντίστοιχα με μικρή ανθρακική αλυσίδα σε όλους τους σταθμούς (Σ(C<sub>14</sub>-C<sub>20</sub>) και Σ(C<sub>21</sub>-C<sub>36</sub>); Πίνακας 3.5.2) χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του Δείκτη Προτίμησης Αριθμού Ατόμων Άνθρακα ή CPI. Τιμές CPI μεγαλύτερες της μονάδας υποδεικνύουν ότι οι αλειφατικοί υδρογονάνθρακες προέρχονται από φυσικές ή/και χερσαίες πηγές ενώ τιμές κοντά ή ίσες με την μονάδα αντιστοιχούν σε πετρελαϊκές ή/και ανθρωπογενείς πηγές (Gogou

et al., 2000; Simoneit, 1999). Στην παρούσα εργασία, οι τιμές CPI που υπολογίστηκαν σύμφωνα με την εξίσωση:  $CPI = \frac{\sum(C_{21}-C_{35})}{\sum(C_{22}-C_{36})}$  (Simoneit, 1999) κυμάνθηκαν από 1.4 έως 2.2 (Πίνακας 3.5.2) υποδεικνύοντας ότι οργανικό υλικό χερσαίας προέλευσης συνεισφέρει στη σύσταση των ιζημάτων των υπό μελέτη περιοχών (Gogou et al., 2000). Εντούτοις, στην περίπτωση που οι θαλάσσιες πηγές είναι εξίσου σημαντικές οι τιμές CPI κατά συνέπεια μειώνονται ακόμα και αν η χερσαία συνεισφορά παραμένει η ίδια, με αποτέλεσμα όταν βασιζόμαστε αποκλειστικά και μόνο στις τιμές CPI να υποεκτιμούμε σημαντικά τη συνεισφορά της χέρσου (Damsté et al., 1995). Για το λόγο αυτό, υπολογίσαμε την απόλυτη χερσαία συνεισφορά στα ιζήματα αθροίζοντας τα τρία πιο άφθονα χερσαία κ-αλκάνια, τα  $C_{27}$ ,



**Σχήμα 3.5.3:** Διάγραμμα που παρουσιάζονται οι τιμές Ter και CPI των σταθμών δειγματοληψίας. Η συγκέντρωση των Ter παρουσιάζεται σε  $ng\ g^{-1}$  ξηρής μάζας ιζήματος. Ter: άθροισμα των συγκεντρώσεων των χερσαίων κ-αλκανίων  $C_{27}$ ,  $C_{29}$  και  $C_{31}$ ; CPI ( $C_{21}-C_{36}$ ): δείκτης προτίμησης αριθμού ατόμων άνθρακα που προσδιορίστηκε για τα κ-αλκάνια από  $C_{21}$  έως  $C_{36}$ .

$C_{29}$  και  $C_{31}$  (Ter: Πίνακας 3.5.2). Το αποτέλεσμα έδειξε ότι η κατανομή των τιμών Ter διέφερε σημαντικά από την αντίστοιχη των τιμών CPI (Σχήμα 3.5.3). Για παράδειγμα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα CPI η χερσαία συνεισφορά στο βαθύ σταθμό AUGU1 υπερεκτιμάται σε σχέση με το σταθμό AUGU2 καθώς οι αντίστοιχες απόλυτες τιμές Ter διαφέρουν σημαντικά (Σχήμα 3.5.3). Οι συγκεντρώσεις των τριών πιο άφθονων χερσαίων κ-αλκανίων παρουσίασαν μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ των σταθμών δειγματοληψίας με τιμές που κυμάνθηκαν από 145.5 έως 1767.0  $ng\ g^{-1}$  (Πίνακας 3.5.2). Η υψηλότερη χερσαία συνεισφορά παρατηρήθηκε στους ρηχούς σταθμούς του Κόλπου Αουγκούστα καθώς και στους τρεις σταθμούς του Νοτίου Ιονίου που βρίσκονταν κοντά στις ανοξικές λεκάνες (Σχήμα 3.5.3). Αντίθετα, τα χερσαία αλκάνια ήταν λιγότερο άφθονα στους ρηχούς σταθμούς του Θρακικού Πελάγους. Τα

ομόλογα κ-αλκανίων χαρακτηριστικά θαλάσσιας προέλευσης (Mar: άθροισμα των συγκεντρώσεων των κ-αλκανίων C<sub>15</sub>, C<sub>17</sub>, και C<sub>19</sub>, Πίνακας 3.5.2) βρίσκονταν επίσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις με τιμές που κυμάνθηκαν από 61.7 έως 268.4 ng g<sup>-1</sup> και αντιπροσώπευαν ένα πολύ μικρό μέρος των συνολικών κ-αλκανίων (6.4 – 15.3%; Πίνακας 3.5.2). Οι τιμές αυτές υποδεικνύουν τόσο τη χαμηλή παραγωγικότητα του Θρακικού Πελάγους όσο και την υψηλή αποικοδομησιμότητα της συγκεκριμένης κατηγορίας αλκανίων (Gogou et al., 2000).

Το UCM ήταν το κυριότερο συστατικό του κλάσματος των αλειφατικών υδρογονανθράκων στους περισσότερους σταθμούς (Πίνακας 3.5.2). Μια πρόσφατη εργασία έδειξε ότι το UCM αποτελείται από ένα μίγμα διακλαδωμένων αλκανίων, κυκλοαλκανίων, ναφθαλενίων και πολυκυκλικών πολυαρωματικών υδρογονανθράκων (Frysiner et al., 2003) ενώ η παρουσία του στα ιζήματα συνδέεται άμεσα με πηγές πετρελαίου ή/και διαδικασίες αποικοδόμησης οργανικού υλικού (Tolosa et al., 2004). Επίσης, UCM που εμφανίζεται στα χρωματογραφήματα στην περιοχή των κ-αλκανίων με μικρή ανθρακική αλυσίδα μπορεί να συνδεθεί και με διαδικασίες βακτηριακής αποικοδόμησης οργανικού υλικού όπως αυτή των καταλοίπων θαλασσιών φυκών (Tolosa et al., 2004; Venkatesan and Kaplan, 1982). Οι απόλυτες (UCM) και κανονικοποιημένες ως προς τον οργανικό άνθρακα συγκεντρώσεις (UCM/OC) των UCM ήταν υψηλότερες σε σταθμούς του Νοτίου Ιονίου (αντίστοιχα 2.6 – 103.3 μg g<sup>-1</sup> και 200 – 15513 μg g<sup>-1</sup>; Πίνακας 3.5.2) και του Κόλπου Αουγκούστα (αντίστοιχα 1.3 – 447.4 μg g<sup>-1</sup> και 241.0 – 25809.7 μg g<sup>-1</sup>; Πίνακας 3.5.2). Οι χαμηλότερες τιμές καταγράφηκαν στα βαθύτερα στρώματα των ιζημάτων των σταθμών THR23 (αντίστοιχα 0.1 και 21.6 μg g<sup>-1</sup>; Πίνακας 3.5.2) και THR30 (αντίστοιχα 0.4 και 124.3 μg g<sup>-1</sup>; Πίνακας 3.5.2) του Θρακικού Πελάγους. Τα επίπεδα UCM στους ρηχούς σταθμούς του Θρακικού Πελάγους, στο βαθύ σταθμό του Κόλπου Αουγκούστα (AUGU1) και στον απομακρυσμένο σταθμό του Νοτίου Ιονίου (ADEC) είναι συγκρίσιμα με την ολιγοτροφική υφαλοκρηπίδα της Κρήτης (0.3 – 4.8 μg g<sup>-1</sup>; Gogou et al., 2000). Αντίθετα, τα επίπεδα UCM των υπολοίπων σταθμών είναι παρόμοια τόσο με τις τιμές παράκτιων περιοχών (7-488 μg g<sup>-1</sup>; Tolosa et al., 1996) όσο και με τις τιμές ανοιχτών περιοχών της Βορειοδυτικής Μεσογείου (7-13 μg g<sup>-1</sup>; Tolosa et al., 1996). Οι ισοπρενοειδείς υδρογονάνθρακες πριστάνιο και φυτάνιο βρέθηκαν σε όλα τα δείγματα με τιμές που κυμάνθηκαν από 8.7 έως 144.0 ng g<sup>-1</sup> ξηρής μάζας ιζήματος (Πίνακας 3.5.2).

Τα υψηλά επίπεδα UCM που καταγράφηκαν στους σταθμούς, οι υψηλοί λόγοι UCM προς NA (UCM / NA; Πίνακας 3.5.2) και η παρουσία των ουσιών φυτάνιο και πριστάνιο αποτελούν ισχυρότατες ενδείξεις χρόνιας περιβαλλοντικής ρύπανσης στις υπό μελέτη περιοχές (Gogou et al., 2000). Επιπλέον, οι υψηλότερες καταγραφόμενες τιμές αλειφατικών υδρογονανθράκων στους ρηχούς σταθμούς του Κόλπου

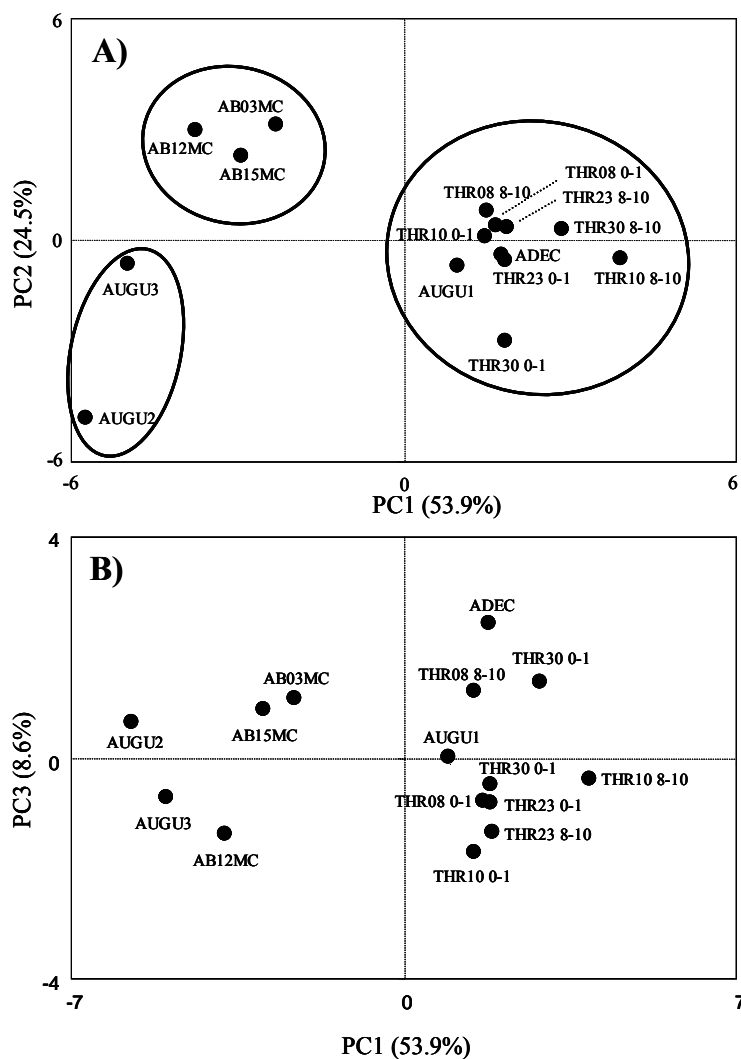
**Πίνακας 3.5.3:** Συγκεντρώσεις των οπανίων ( $\text{ng g}^{-1}$ ) που προσδιορίστηκαν στους σταθμούς δειγματοληψίας. Τα επίπεδα των οπανίων των σταθμών που δεν παρουσιάζονται στον Πίνακα ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης.

Σταθμοί		ADEC	AB12MC	AB15MC	AUGU1	AUGU2	AUGU3	THR08	THR23	THR30
Βάθος ιζήματος (cm)		0-1	0-1	0-1	0-1	0-1	0-1	0-1	8-10	0-1
<i>Οπάνια (<math>\text{ng g}^{-1}</math>)</i>	<i>Ονομασία</i>									
C <sub>27</sub> H Ts	18α (H)-22,29,30-trisnorheohopane	-	-	-	-	410.9	103.0	-	-	-
C <sub>27</sub> H Tm	17α (H)-22,29,30-trisnorhopane	-	-	217.7	-	423.4	106.5	-	16.8	-
C <sub>29</sub> H	17α (H),21β(H)-29-norhopane	32.2	208.9	634.9	64.7	2726.6	531.7	33.3	24.7	26.5
C <sub>30</sub> H	17α (H),21β(H)-hopane	37.4	226.7	840.8	84.8	2535.2	537.3	50.5	43.4	33.2
C <sub>31</sub> HS	17α (H),21β(H)-homohopane	26.6	194.9	659.5	31.3	1165.7	291.4	18.0	14.1	18.9
C <sub>31</sub> HR	17α (H),21β(H)-homohopane	18.2	105.6	441.0	20.8	783.4	211.6	17.3	11.2	13.4
C <sub>32</sub> HS	17α (H),21β(H)-bishomohopane	19.3	160.3	482.3	14.6	625.2	174.1	-	-	12.9
C <sub>32</sub> HR	17α (H),21β(H)-bishomohopane	11.7	80.1	330.7	-	438.9	130.1	-	-	8.0
C <sub>33</sub> HS	17α (H),21β(H)-trishomohopane	13.7	87.4	401.7	-	367.4	98.6	-	-	-
C <sub>33</sub> HR	17α (H),21β(H)-trishomohopane	11.6	-	202.3	-	192.8	63.7	-	-	-
C <sub>34</sub> HS	17α (H),21β(H)-tetrakishomohopane	7.8	-	320.8	-	267.9	96.7	-	-	-
C <sub>34</sub> HR	17α (H),21β(H)-tetrakishomohopane	6.2	-	133.5	-	99.7	36.5	-	-	-
C <sub>35</sub> HS	17α (H),21β(H)-pentakishomohopane	9.1	-	240.9	-	126.7	43.7	-	-	-
C <sub>35</sub> HR	17α (H),21β(H)-pentakishomohopane	5.8	-	197.3	-	113.7	45.7	-	-	-

Αουγκούστα υποδεικνύουν ξεκάθαρα ότι η συγκεκριμένη περιοχή δέχεται έντονες επιρροές από τη δυναμική βιομηχανική ζώνη της πόλης και επομένως οι ανθρωπογενείς δραστηριότητες επηρεάζουν κατά πολύ τη σύσταση των ιζημάτων. Αντίθετα, οι υψηλές τιμές υδρογονανθράκων στους σταθμούς του Νοτίου Ιονίου που βρίσκονται κοντά στις ανοξικές λεκάνες, πιθανότατα προέρχονται από τα γειτονικά γεωλογικά στρώματα καθώς είναι σχεδόν απίθανο οι επιρροές των ανθρωπογενών δραστηριοτήτων να φτάνουν σε τόσο μεγάλο βάθος (~ 3300 m) και σε τόσο απομακρυσμένες περιοχές όπως αυτές του Νοτίου Ιονίου (Brusa et al., 2001; Polymenakou et al., 2005d).

Για την επιβεβαίωση της περιβαλλοντικής ρύπανσης, προσπαθήσαμε να αντλήσουμε επιπλέον στοιχεία με την ανίχνευση ιόντων που χαρακτηρίζουν συστατικά του πετρελαίου όπως των πεντακυκλικών τερπενοειδών (Gogou et al., 2000; Tolosa et al., 2004; Wang et al., 1999). Στην παρούσα εργασία, τα πεντακυκλικά τερπάνια (οπάνια) με ανθρακική αλυσίδα από C<sub>27</sub> έως C<sub>35</sub> προσδιορίστηκαν στους περισσότερους σταθμούς με βάση το φάσμα μάζας τους και τον χρόνο έκλουσης στα χρωματογραφήματα (Phillip, 1985) (Πίνακας 3.5.3). Στο Σχήμα 3.5.2B παρουσιάζεται το χαρακτηριστικό χρωματογράφημα ιόντων (m/z 191)

οπανίων που καταγράφηκε στον πιο επιβαρημένο σε πετρελαϊκούς υδρογονάνθρακες σταθμό AUGU2. Τα ομόλογα με αριθμό ατόμων άνθρακα  $\geq C_{29}$  εμφανίζονται με τη μορφή των θερμοδυναμικά σταθερών δομών 17α(H), 21β(H). Οι μέγιστες τιμές οπανίων καταγράφηκαν για το ομόλογο C<sub>30</sub> καθώς οι λόγοι C<sub>29</sub>/C<sub>30</sub> κυμάνθηκαν από



**Σχήμα 3.5.4:** Ανάλυση Πρωταρχικών Συνιστωσών των χαρακτηριστικών ιζημάτων (ολικός οργανικός άνθρακας, στοιχειακός άνθρακας, βιοδιαθέσιμος οργανικός άνθρακας, χλωροφύλλη *a*, φαιοχρωστικές, ισοδύναμα χλωροπλαστικών χρωστικών, παράμετροι αλειφατικών υδρογονανθράκων). Α) Διάγραμμα συνιστωσών PC1 και PC2. Β) Διάγραμμα συνιστωσών PC1 και PC3.

0.57 έως 0.92, ενώ για τους ρηχούς σταθμούς του Κόλπου Αουγκούστα η κατανομή μεταξύ των ομολόγων C<sub>29</sub> και C<sub>30</sub> διέφερε (AUGU2: 1.08; AUGU3: 0.99). Πετρέλαιο που προέρχεται από ανθρακικά άλατα συνήθως παρουσιάζει τιμές λόγου C<sub>29</sub>/C<sub>30</sub> > 1 σε σχέση με πετρέλαιο σχιστολιθικής προέλευσης (Tolosa et al., 2004), οπότε οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στο συγκεκριμένο λόγο μεταξύ των σταθμών πιθανότατα σχετίζεται με διαφορές στις πηγές πετρελαίου. Τα ομόλογα οπανίων C<sub>31</sub>-

C<sub>35</sub> εμφανίζονταν με τη μορφή των C-22 διαστερεοϊσομερών (επιμερή 22*S* και 22*R*) (Πίνακας 3.5.3). Ο λόγος των επιμερών 22*S*/(22*S* + 22*R*) παρουσίασε τιμές κοντά στο όριο 0.6 (τιμές λόγου: 0.51 έως 0.67) που χαρακτηρίζει την παρουσία 'ώριμου' πετρελαίου (Tolosa et al., 2004).

Σε μια προσπάθεια να μελετήσουμε τη σχέση μεταξύ των σταθμών δειγματοληψίας, πραγματοποιήθηκε η Στατιστική Ανάλυση Πρωταρχικών Συνιστωσών (PCA) σε όλα τα χημικά δεδομένα (ολικός οργανικός άνθρακας, στοιχειακός άνθρακας, βιοδιαθέσιμος οργανικός άνθρακας, χλωροφύλλη *a*, φαιοχρωστικές, CPE, παράμετροι αλειφατικών υδρογονανθράκων) (Σχήμα 3.5.4). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ένα ποσοστό 87% της συνολικής μεταβλητότητας των περιβαλλοντικών παραμέτρων μπορεί να ερμηνευθεί με τρεις πρωταρχικές συνιστώσες ή PC όπου οι PC1, PC2 και PC3 εξηγούν αντίστοιχα το 53.9%, 24.5% και 8.6% της συνολικής μεταβλητότητας (Σχήματα 3.5.4A, B). Η πρώτη συνιστώσα (PC1) φαίνεται να διαχωρίζει τους πιο ρυπασμένους σταθμούς του Κόλπου της Αουγκούστα και του Νοτίου Ιονίου που εμφανίζονται στο αριστερό μέρος του διαγράμματος, από τους μη ρυπασμένους σταθμούς που εμφανίζονται δεξιά (Σχήμα 3.5.4A). Τόσο ο βαθύς σταθμός του Κόλπου Αουγκούστα όσο και ο απομακρυσμένος και μη ρυπασμένος σταθμός του Νοτίου Ιονίου ομαδοποιείται με τους σταθμούς του Θρακικού Πελάγους. Η προβολή και η σχετική θέση των σταθμών στο διάγραμμα PCA φαίνεται να σχετίζεται με τις συγκεντρώσεις των περιβαλλοντικών παραμέτρων (Σχήμα 3.5.4A). Συγκεκριμένα, η κατανομή των σταθμών από τα αριστερά προς στα δεξιά αντιπροσωπεύει μια τάση μείωσης των συγκεντρώσεων των περιβαλλοντικών παραμέτρων. Η παρατήρηση αυτή, υποδεικνύει την ύπαρξη διαφορετικών τροφικών καταστάσεων μεταξύ των σταθμών δειγματοληψίας που ακολουθούν μια διαβάθμιση από τις πιο παραγωγικές και ρυπασμένες περιοχές του Κόλπου Αουγκούστα προς τις 'καθαρές' και φτωχές σε οργανικό άνθρακα περιοχές του Θρακικού Πελάγους.

Η δεύτερη συνιστώσα (PC2) διαχωρίζει τους σταθμούς του Νοτίου Ιονίου από τους σταθμούς του Κόλπου Αουγκούστα πιθανότατα ως αποτέλεσμα των σχετικά χαμηλότερων επιπέδων αλειφατικών υδρογονανθράκων και οργανικού άνθρακα (Πίνακες 3.5.1, 3.5.2; Σχήμα 3.5.4A) και φαίνεται να συσχετίζεται περισσότερο με διαφορές στις κανονικοποιημένες ως προς τον οργανικό άνθρακα τιμές των κ-αλκανίων. Αντίθετα, η τρίτη συνιστώσα (PC3) φαίνεται να διαχωρίζει τα περιβαλλοντικά δείγματα με βάση την απόλυτη θαλάσσια (Mar) και χερσαία συνεισφορά (Ter) στα ιζήματα. Για παράδειγμα, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι

διαφορετικές θέσεις των σταθμών AUGU3 και ADEC στις συνιστώσες PC2 και PC3, αν και διατηρούν σταθερές τις θέσεις τους ως προς τη συνιστώσα PC1 (Σχήματα 3.5.4A, B). Οι παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των σταθμών που προκύπτουν με τη συνιστώσα PC3 δηλώνουν την ύπαρξη διαφορετικών τύπων οργανικού υλικού μεταξύ των περιοχών δειγματοληψίας (Σχήμα 3.5.4B).

### 3.5.3 Σύσταση των μικροβιακών κοινωνιών

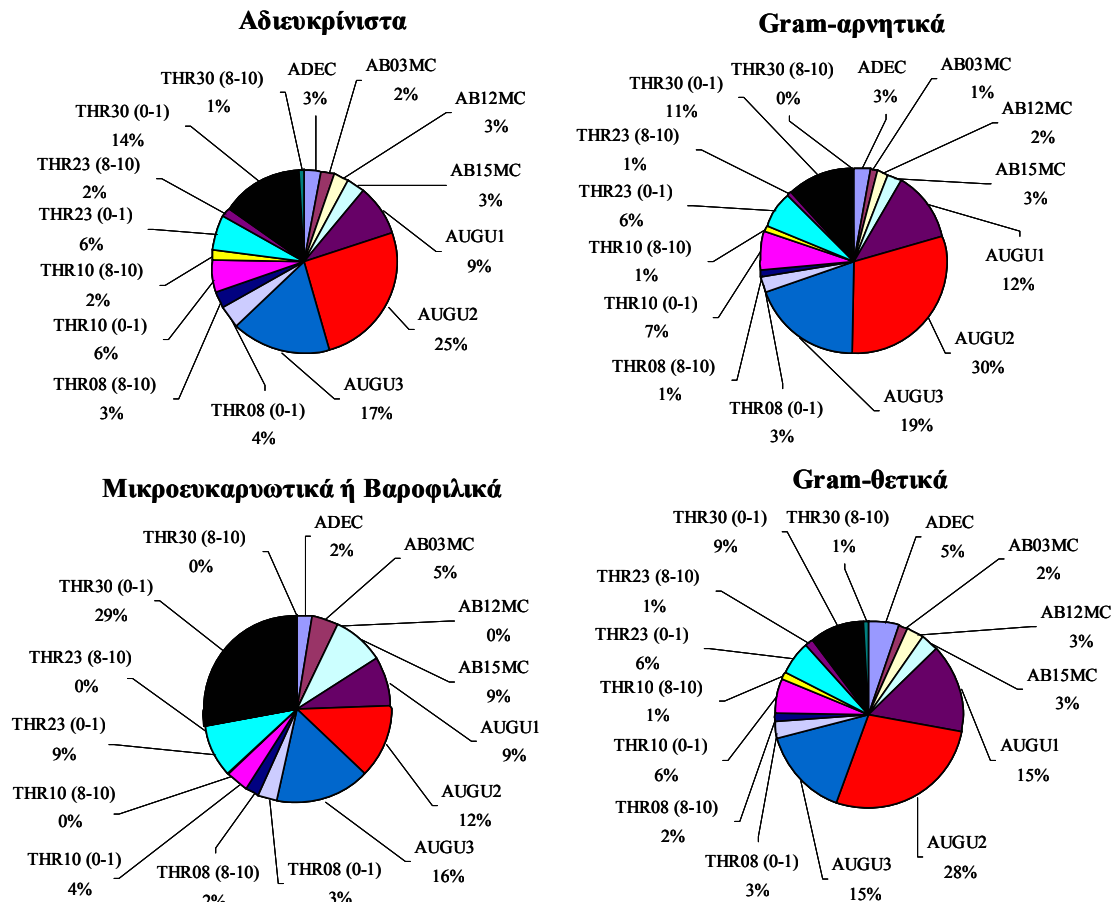
Οι μικροβιακές κοινωνίες των ιζημάτων αποτελούνται από βακτήρια, αρχαία και μικροευκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι λειτουργικές ομάδες των μικροβίων (δηλ. μικροοργανισμοί με παρόμοιες μεταβολικές διαδικασίες) διαχωρίζονται στα αερόβια και αναερόβια βακτήρια, φωτότροφα βακτήρια, ετερότροφους μικροευκαρυωτικούς οργανισμούς και μεθανογενή αρχαία (Smoot and Findlay, 2001). Ένας πολύ χρήσιμος τρόπος εκτίμησης της μικροβιακής βιομάζας καθώς και της σύστασης των κοινωνιών τους είναι με τον προσδιορισμό των χημικών συστατικών των μεμβρανών τους. Για παράδειγμα, είναι γνωστό ότι οι διαφορετικές λειτουργικές ομάδες των μικροβίων συνθέτουν διαφορετικά φωσφολιπίδια μέσω βιοχημικών μονοπατιών (Bååth and Anderson, 2003; Guezennec and Fiala-Medioni, 1996; Rajendran et al., 1993; White et al., 1979). Το γεγονός αυτό καθιστά τη χρήση των φωσφολιπιδίων ή PLFAs ως ταξινομικούς βιοδείκτες, ιδιαίτερα χρήσιμους στον προσδιορισμό της σύστασης των μικροβιοκοινωνιών. Εντούτοις, η επικάλυψη των πρότυπων κατανομής των PLFA μεταξύ διαφορετικών ειδών είναι γεγονός, με αποτέλεσμα να καθίσταται αδύνατη η μελέτη των βιοκοινωνιών σε επίπεδο ειδών.

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, η ανάλυση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων πραγματοποιήθηκε με στόχο την εκτίμηση των αφθονιών και της σύστασης των βακτηριακών κοινωνιών καθώς και της πιθανής απόκρισης των μικροβιοκοινωνιών στα διαφορετικά επίπεδα των περιβαλλοντικών παραμέτρων (όπως ολικός οργανικός άνθρακας και στοιχειακός άνθρακας).

Η σύσταση και κατανομή των PLFA στα ιζήματα του Κόλπου Αουγκούστα και του Θρακικού Πελάγους παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.5.4. Τα λιπαρά οξέα που ανιχνεύτηκαν στα ιζήματα περιελάμβαναν τις κατηγορίες των κορεσμένων, μονοακόρεστων, πολυακόρεστων και διακλαδωμένων λιπαρών οξέων με μήκος ανθρακικής αλυσίδας να κυμαίνεται μεταξύ C<sub>14:0</sub> και C<sub>20:0</sub> (Πίνακας 3.5.4). Οι συγκεντρώσεις των συνολικών PLFA διέφεραν σημαντικά μεταξύ των σταθμών δειγματοληψίας με τιμές που κυμάνθηκαν από 273.8 ± 96.8 έως 10656 ± 959.5 ng g<sup>-1</sup>



ξηρής μάζας ιζήματος. Οι μικρότερες τιμές καταγράφηκαν στα βαθύτερα στρώματα ιζημάτων (8-10 cm) του Θρακικού Πελάγους δείχνοντας ότι τα φωσφολιπίδια δε διατηρούνται αποτελεσματικά στα ιζήματα κατά την διάρκεια των ιζηματοποθέσεων.



**Σχήμα 3.5.5:** Σύγκριση των λειτουργικών ομάδων (αδιευκρίνιστα, gram-αρνητικά, gram-θετικά, μικροευκαρυωτικά ή βαροφιλικά) μεταξύ των σταθμών δειγματοληψίας.

Τα επίπεδα PLFA που προσδιορίστηκαν για το Θρακικό Πέλαγος ήταν συγκρίσιμα με αντίστοιχες τιμές από ιζήματα του Θερμαϊκού Κόλπου (Βόρειο Αιγαίο Πέλαγος) (219-2714 ng g<sup>-1</sup>; Polymenakou et al., 2005a) και της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης (Νότιο Αιγαίο Πέλαγος) (524-1238 ng g<sup>-1</sup>; Polymenakou et al., 2005a). Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις PLFA στους σταθμούς του Κόλπου Αουγκούστα ήταν κατά πολύ υψηλότερες από τις υπόλοιπες περιοχές της Ανατολικής Μεσογείου και χαμηλότερες από έντονα ευτροφικά συστήματα όπως της Wadden Sea (36.0 – 71.1 μg g<sup>-1</sup>; Langezaal et al., 2003), ή μιας υφάλμυρης λίμνης στη Γερμανική Βαλτική θάλασσα (> 40 μg ml<sup>-1</sup> ιζήματος; Boschker et al., 2001). Οι βακτηριακές αφθονίες όπως υπολογίστηκαν με βάση τον παράγοντα μετατροπής του βακτηρίου *Escherichia coli* κυμάνθηκαν από 1.0 ± 0.1 to 21.3 ± 1.7 10<sup>8</sup> κύτταρα g<sup>-1</sup> με τη μέγιστη καταγραφόμενη τιμή στους πιο παραγωγικούς σταθμούς του Κόλπου Αουγκούστα

(Πίνακας 3.5.4) και την ελάχιστη στα βαθύτερα στρώμα των ιζημάτων (8-10 cm) του Θρακικού Πελάγους.

Τα κυριότερα βακτηριακά λιπαρά οξέα που ανιχνεύτηκαν ήταν τα κορεσμένα  $C_{16:0}$ ,  $C_{18:0}$  και τα μονοακόρεστα  $C_{16:1}$  και  $C_{18:1}$  (Πίνακας 3.5.4). Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα δε χαρακτηρίζουν κάποια συγκεκριμένη κατηγορία οργανισμών καθώς βρίσκονται σε όλα τα βακτηριακά είδη (Rajendran et al., 1993) και επομένως θεωρείται ότι αντιπροσωπεύουν το ποσοστό των οργανισμών που δεν μπορούν να προσδιοριστούν. Στην παρούσα εργασία, τα κορεσμένα λιπαρά οξέα κυμάνθηκαν από  $33.3 \pm 2.1$  % στο βαθύ σταθμό του Κόλπου Αουγκούστα έως  $58.7 \pm 16.8$  % στον πιο ρηχό σταθμό THR08 (0-1) του Θρακικού Πελάγους. Τα υψηλά ποσοστά της συγκεκριμένης κατηγορίας λιπαρών οξέων δηλώνουν ότι ένα πολύ μεγάλο ποσοστό της ζωντανής μικροβιακής βιομάζας των ιζημάτων της Ανατολικής Μεσογείου δεν μπορεί να χαρακτηριστεί και να ταξινομηθεί σε οποιαδήποτε από τις γνωστές λειτουργικές ομάδες με βάση τη χημική τους σύσταση.

Τα μονοακόρεστα PLFAs συστήνουν κατά κανόνα τις μεμβράνες των gram-αρνητικών βακτηρίων (Macnaughton et al., 1999; Ringelberg et al., 1997). Προηγούμενες εργασίες έχουν δείξει επίσης ότι τα λιπαρά οξέα  $C_{16:1}$  και  $C_{18:1}$  αποτελούν χαρακτηριστικούς δείκτες βακτηριακής προέλευσης (Langezaal et al., 2003; Oliver and Colwell, 1973), που προέρχονται από μεθανότροφους οργανισμούς (Virtue et al., 1996). Υψηλές ποσότητες των λιπαρών οξέων  $C_{16:1}$  ή  $C_{18:1}$  στις κυτταρικές τους μεμβράνες διαθέτουν επίσης τα θειο-οξειδωτικά βακτήρια (Guezennec and Fiala-Medioni, 1996; Jannasch et al., 1989; Katayama-Fujimura et al., 1982) καθώς και το χημειοαυτότροφο βακτήριο *Thiomicrospira crunega*, που διαθέτει ικανότητα οξείδωσης του στοιχείου θείου και έχει απομονωθεί από μια υδροθερμική πηγή (Guezennec and Fiala-Medioni, 1996; Jannasch, 1985). Στην παρούσα εργασία, η συνεισφορά των μονοακόρεστων στα συνολικά λιπαρά οξέα διέφερε σημαντικά μεταξύ των σταθμών του Κόλπου Αουγκούστα και του Θρακικού Πελάγους (Πίνακας 3.5.4). Στον Κόλπο Αουγκούστα, τα gram-αρνητικά βακτήρια ήταν τα πιο άφθονα με τιμές που κυμάνθηκαν από  $40.4 \pm 3.1$  έως  $41.8 \pm 0.4$  % των συνολικών λιπαρών οξέων, ενώ στο Θρακικό Πέλαγος τα κορεσμένα λιπαρά οξέα παρουσίασαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις με εξαίρεση στο σταθμό THR10 (0-1) (Πίνακας 3.5.4). Επιπλέον, τα βαθύτερα στρώματα ιζημάτων (8-10 cm) του Θρακικού Πελάγους έδειξαν τις υψηλότερες διαφορές μεταξύ των ποσοστών των κορεσμένων

**Πίνακας 3.5.4:** Μέσοι όροι (*mean*) και τυπικές αποκλίσεις (*sd*) των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων (PLFAs) που προσδιορίστηκαν στα ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου. Η ολική ποσότητα των PLFA ( $\text{ng g}^{-1}$ ), η βακτηριακή βιομάζα ( $\text{ng g}^{-1}$ ), ο κυτταρικός αριθμός ( $\times 10^8$  κύτταρα  $\text{g}^{-1}$ ) και οι σχετικές αναλογίες των κορεσμένων, μονοακόρεστων, πολυακόρεστων και διακλαδωμένων λιπαρών οξέων παρουσιάζονται επίσης για κάθε σταθμό.

PLFA (%)	AUGU1		AUGU2		AUGU3		THR08 (0-1)		THR08 (8-10)		THR10 (0-1)		THR10 (8-10)		THR23 (0-1)		THR23 (8-10)		THR30 (0-1)		THR30 (8-10)	
	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>
C <sub>14:0</sub>	4.5	0.6	6.1	0.1	5.9	0.3	6.8	0.7	6.3	0.9	5.0	0.4	4.4	1.1	2.6	1.8	3.8	0.0	5.4	0.5	4.6	0.7
14-MeC <sub>14:0</sub>	5.2	0.7	4.9	0.0	3.8	0.1	4.2	0.9	1.1	0.4	3.8	0.4	2.8	0.3	3.4	0.4	2.8	0.5	2.1	1.0	1.0	1.4
12-MeC <sub>14:0</sub>	5.6	0.7	4.9	0.3	4.2	0.2	3.1	1.4	2.1	0.9	3.3	0.3	5.2	0.1	2.8	0.8	6.2	0.1	1.8	0.7	3.4	1.1
C <sub>15:0</sub>	1.3	0.1	2.0	0.1	1.7	0.5	2.0	0.3	3.7	1.5	1.4	0.0	1.6	0.4	1.8	0.0	2.1	0.7	1.3	0.1	2.1	0.1
10-MeC <sub>15:0</sub>	0.4	0.2	-	-	-	-	0.5	0.1	0.7	0.9	0.3	0.1	0.6	0.1	0.3	0.1	-	-	0.4	0.1	1.1	0.1
12-MeC <sub>15:0</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.2	1.7	0.3	0.2	-	-
14-MeC <sub>15:0</sub>	1.9	0.1	2.3	0.1	1.6	0.0	1.7	0.2	0.2	0.3	3.7	0.1	1.1	0.8	2.7	1.2	1.3	0.3	4.3	2.2	-	-
<i>cis</i> -C <sub>16:1ω7</sub>	1.7	0.2	0.9	0.0	0.9	0.2	0.7	0.9	0.8	1.2	1.2	0.1	1.0	0.3	0.7	1.0	-	-	0.7	0.3	-	-
<i>cis</i> -C <sub>16:1ω9</sub> + <i>trans</i> -C <sub>16:1ω7</sub>	9.4	0.8	10.6	0.7	10.4	1.2	5.3	0.2	2.9	1.3	12.7	0.2	4.6	1.7	9.2	5.3	6.5	2.2	12.7	3.9	4.9	2.7
<i>trans</i> -C <sub>16:1ω9</sub>	3.5	0.6	2.0	0.1	2.0	0.3	1.9	0.2	0.3	0.5	2.0	0.0	1.1	0.2	1.8	0.5	1.1	0.2	1.1	0.4	0.0	0.0
C <sub>16:0</sub>	21.1	1.8	24.2	1.4	25.2	0.6	28.3	3.7	29.5	7.4	24.3	0.4	28.1	3.6	25.6	1.8	28.4	0.8	27.4	6.5	29.1	0.1
13-MeC <sub>16:0</sub>	4.4	0.0	2.3	0.0	1.9	0.2	1.4	1.9	2.1	0.7	2.6	0.1	3.3	0.3	2.4	0.6	3.2	0.5	1.3	0.6	-	-
15-MeC <sub>16:0</sub>	2.8	2.3	1.2	0.1	1.3	0.1	1.2	1.7	10.8	3.5	1.2	0.1	0.9	0.2	1.9	1.0	0.6	0.3	1.5	0.4	-	-
14-MeC <sub>16:0</sub>	1.5	0.5	1.1	0.2	1.3	0.4	0.8	1.1	-	-	1.0	0.0	2.6	0.3	1.4	0.3	1.9	0.2	0.8	0.0	17.2	3.2
C <sub>17:1</sub>	1.6	0.1	1.0	0.3	0.8	0.2	0.5	0.7	-	-	1.2	0.1	1.2	0.2	1.0	0.1	0.7	0.0	0.6	0.1	-	-
C <sub>17:0</sub>	0.9	0.1	1.1	0.1	1.1	0.1	0.9	1.3	1.4	0.4	1.1	0.1	1.5	0.3	1.6	0.5	1.4	0.3	1.2	0.5	1.6	0.3
C <sub>18:3ω3</sub>	0.5	0.2	0.4	0.2	0.4	0.1	0.2	0.3	0.9	0.1	0.9	0.6	0.1	0.1	0.3	0.3	-	-	0.5	0.2	-	-
C <sub>18:2ω6,9</sub>	1.3	0.3	0.6	0.2	0.9	0.1	1.2	0.2	2.4	1.2	0.7	0.3	0.5	0.7	1.3	0.1	0.2	0.3	1.0	0.3	1.1	1.6
<i>cis</i> -C <sub>18:1ω7</sub>	7.0	0.4	6.0	0.4	6.5	0.4	8.0	1.6	6.5	0.4	6.7	0.3	8.0	1.4	7.5	0.4	7.7	1.9	5.9	1.6	6.5	0.6
<i>cis</i> -C <sub>18:1ω9</sub>	17.1	1.7	16.7	0.4	17.1	0.7	16.2	0.4	6.9	7.9	13.8	0.3	15.2	4.0	15.7	1.3	11.4	2.6	9.6	1.1	6.6	4.2
<i>trans</i> -C <sub>18:1ω9</sub>	-	-	4.6	1.0	2.9	0.1	1.0	0.6	-	-	4.4	0.2	1.3	1.8	0.8	0.3	0.5	0.7	3.1	3.6	1.7	2.4
C <sub>18:0</sub>	4.4	0.7	4.6	0.3	5.3	0.2	9.1	0.1	14.9	8.5	6.1	0.3	14.8	4.5	7.9	2.5	16.9	8.7	6.4	3.4	15.8	1.3
C <sub>20:4</sub>	0.7	0.1	0.7	0.1	0.9	0.1	1.0	0.3	0.6	0.3	1.1	0.1	-	-	1.5	0.4	-	-	1.6	0.2	0.5	0.7
C <sub>20:3ω11,14,17</sub>	0.9	0.1	-	-	1.5	0.1	-	-	3.0	1.9	-	-	-	-	2.4	1.1	-	-	5.7	0.2	-	-
C <sub>20:3ω8,11,14</sub>	-	-	-	-	-	-	0.8	0.6	-	-	0.1	0.0	-	-	0.3	0.1	-	-	0.4	0.3	-	-
C <sub>20:2ω11,14</sub>	0.8	0.4	0.2	0.3	-	-	1.3	0.5	-	-	0.5	0.0	-	-	1.2	0.8	-	-	0.6	0.4	-	-
C <sub>20:1</sub> + C <sub>22:6</sub>	0.2	0.4	0.7	0.4	1.5	0.6	0.8	0.3	-	-	0.3	0.4	-	-	0.8	0.2	-	-	1.7	1.0	-	-
C <sub>20:0</sub>	1.2	0.0	0.8	0.1	0.8	0.1	1.2	0.2	2.9	1.8	0.8	0.0	-	-	1.0	0.2	2.0	0.3	0.6	0.1	2.9	0.1
<b>Ολικά PLFA (<math>\text{ng g}^{-1}</math>)</b>	<b>4457.7</b>	<b>102.9</b>	<b>10656.0</b>	<b>959.5</b>	<b>7085.7</b>	<b>711.7</b>	<b>1371.6</b>	<b>347.9</b>	<b>725.8</b>	<b>272.1</b>	<b>2454.9</b>	<b>552.0</b>	<b>516.0</b>	<b>49.1</b>	<b>2529.0</b>	<b>752.6</b>	<b>488.2</b>	<b>262.8</b>	<b>5295.7</b>	<b>2492.3</b>	<b>273.8</b>	<b>96.8</b>
<b>Βακτηριακή βιομάζα (<math>\text{ng g}^{-1}</math>)</b>	<b>3943.8</b>	<b>74.8</b>	<b>9738.0</b>	<b>787.7</b>	<b>6262.3</b>	<b>721.4</b>	<b>1190.8</b>	<b>318.0</b>	<b>633.6</b>	<b>264.0</b>	<b>2198.7</b>	<b>456.8</b>	<b>471.8</b>	<b>47.8</b>	<b>2138.5</b>	<b>615.0</b>	<b>447.3</b>	<b>234.3</b>	<b>4330.0</b>	<b>1860.2</b>	<b>253.1</b>	<b>97.0</b>
<b><math>\times 10^8</math> κύτταρα <math>\text{g}^{-1}</math></b>	<b>8.6</b>	<b>0.2</b>	<b>21.3</b>	<b>1.7</b>	<b>13.7</b>	<b>1.6</b>	<b>2.6</b>	<b>0.7</b>	<b>1.4</b>	<b>0.6</b>	<b>4.8</b>	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>	<b>0.1</b>	<b>4.7</b>	<b>1.3</b>	<b>1.0</b>	<b>0.5</b>	<b>9.5</b>	<b>4.1</b>	<b>0.6</b>	<b>0.2</b>
<b>Κορεσμένα (%)</b>	<b>33.3</b>	<b>2.1</b>	<b>38.9</b>	<b>1.6</b>	<b>40.0</b>	<b>0.0</b>	<b>48.3</b>	<b>2.1</b>	<b>58.7</b>	<b>16.8</b>	<b>38.6</b>	<b>0.3</b>	<b>50.5</b>	<b>9.3</b>	<b>40.5</b>	<b>3.1</b>	<b>54.6</b>	<b>7.2</b>	<b>42.3</b>	<b>10.1</b>	<b>56.1</b>	<b>1.0</b>
<b>Μονοακόρεστα (%)</b>	<b>40.4</b>	<b>3.1</b>	<b>41.8</b>	<b>0.4</b>	<b>40.7</b>	<b>1.6</b>	<b>33.6</b>	<b>0.9</b>	<b>17.5</b>	<b>8.6</b>	<b>42.0</b>	<b>0.2</b>	<b>32.4</b>	<b>9.0</b>	<b>36.7</b>	<b>3.1</b>	<b>27.9</b>	<b>6.2</b>	<b>33.8</b>	<b>7.9</b>	<b>19.7</b>	<b>3.8</b>
<b>Πολυακόρεστα (%)</b>	<b>4.5</b>	<b>0.8</b>	<b>2.6</b>	<b>0.5</b>	<b>5.2</b>	<b>0.9</b>	<b>5.3</b>	<b>0.4</b>	<b>7.0</b>	<b>3.5</b>	<b>3.6</b>	<b>1.2</b>	<b>0.6</b>	<b>0.8</b>	<b>7.8</b>	<b>0.5</b>	<b>0.2</b>	<b>0.3</b>	<b>11.5</b>	<b>2.2</b>	<b>1.6</b>	<b>2.3</b>
<b>Διακλαδωμένα (%)</b>	<b>21.8</b>	<b>4.4</b>	<b>16.7</b>	<b>0.7</b>	<b>14.1</b>	<b>0.7</b>	<b>12.8</b>	<b>2.6</b>	<b>16.9</b>	<b>4.7</b>	<b>15.8</b>	<b>0.7</b>	<b>16.5</b>	<b>1.1</b>	<b>14.9</b>	<b>0.5</b>	<b>17.2</b>	<b>1.3</b>	<b>12.4</b>	<b>4.4</b>	<b>22.6</b>	<b>0.6</b>

και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων που περιείχαν (Πίνακας 3.5.4). Τα επίπεδα των δύο αυτών κατηγοριών λιπαρών οξέων παρουσίασαν συσχέτιση με τα επίπεδα τόσο του οργανικού άνθρακα όσο και του CPE (Πίνακες 3.5.1, 3.5.4) δηλώνοντας ότι οι αφθονίες των μικροβιακών λειτουργικών ομάδων, όπως προκύπτουν από την ανάλυση των φωσφολιπιδίων, πιθανότατα συνδέονται με τις διαφορετικές τροφικές καταστάσεις των υπό μελέτη οικοσυστημάτων.

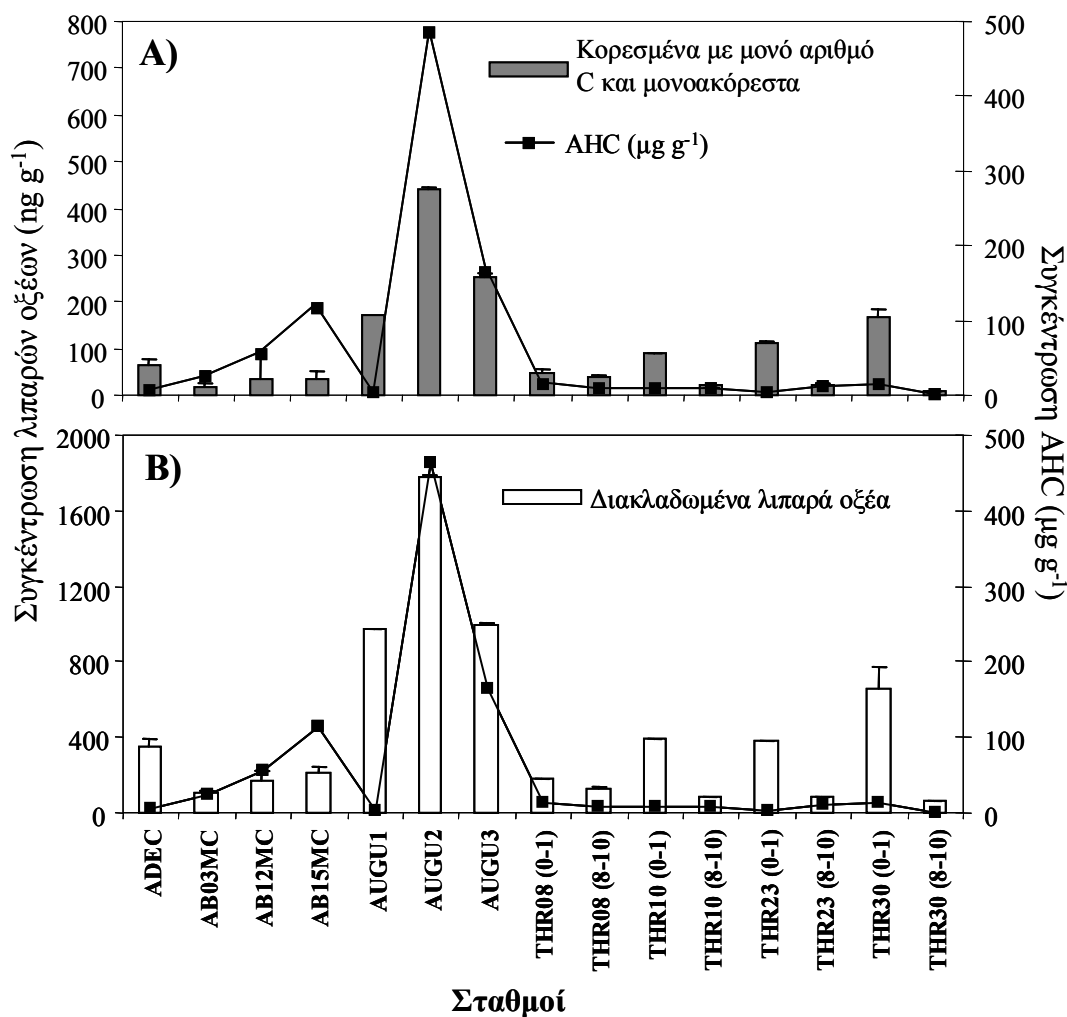
Οι White και συνεργάτες (1996) ανέφεραν ότι τα πολυακόρεστα PLFAs αποτελούν τα βασικά συστατικά των ευκαρυωτικών οργανισμών ενώ οι DeLong και Yaganos (1985) δήλωσαν ότι η συγκεκριμένη κατηγορία λιπαρών οξέων μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης παρουσίας βαροφιλικών βακτηρίων. Συγκεκριμένα, η σύνθεση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στις κυτταρικές μεμβράνες πραγματοποιείται από τους οργανισμούς των βαθιών οικοσυστημάτων ως μέσο επιβίωσης σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς με τον τρόπο αυτό δίνεται η δυνατότητα διατήρησης της ρευστότητας των μεμβρανών τους (DeLong & Yaganos, 1985). Στην παρούσα εργασία, το ποσοστό συνεισφοράς των πολυακόρεστων στα συνολικά λιπαρά οξέα κυμάνθηκε από  $0.2 \pm 0.3$  έως  $7.8 \pm 0.5$  % με τις ελάχιστες τιμές να έχουν καταγραφεί στα βαθύτερα στρώματα του Θρακικού Πελάγους (Πίνακας 3.5.4). Οι χαμηλές αφθονίες των καταγραφόμενων πολυακόρεστων PLFAs δηλώνουν ξεκάθαρα ότι οι μικροευκαρυωτικοί οργανισμοί ή/και τα βαροφιλικά βακτήρια αντιπροσωπεύουν ένα πολύ μικρό ποσοστό της συνολικής βενθικής μικροβιομάζας (Guezennec and Fiala-Medioni, 1996).

Η τελευταία κατηγορία PLFA, δηλαδή τα διακλαδωμένα λιπαρά οξέα αποτελούν με τη σειρά τους δείκτες παρουσίας των gram-θετικών βακτηρίων (Zelles, 1999). Η συνεισφορά των gram-θετικών βακτηρίων στη σύνθεση των βενθικών μικροβιακών κοινωνιών ήταν παρόμοια μεταξύ των σταθμών με τιμές που κυμάνθηκαν από  $12.4 \pm 4.4$  έως  $22.6 \pm 0.6$  % (Πίνακας 3.5.4).

### **3.5.4 Επίδραση των υδρογονανθράκων**

Η μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας και της απόκρισης των μικροβιοκοινωνιών σε αλλαγές στις περιβαλλοντικές συνθήκες αποτελεί ένα ταχέως αναπτυσσόμενο κλάδο στο χώρο της μικροβιακής οικολογίας. Η ανάλυση τόσο της μικροβιακής βιομάζας όσο και της σύστασης των κοινωνιών προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες σε μελέτες που αφορούν την πίεση της περιβαλλοντική ρύπανσης στις μικροβιοκοινωνίες (Fang and Findlay, 1996).

Στη συγκεκριμένη ενότητα οι αφθονίες των διαφορετικών λειτουργικών ομάδων (όπως gram-αρνητικά, gram-θετικά, μικροευκαρυωτικά ή/και βαροφιλικά βακτήρια) συγκρίθηκαν μεταξύ των σταθμών δειγματοληψίας (Σχήμα 3.5.5) σε μια προσπάθεια εκτίμησης των δομικών αλλαγών των μικροβιακών πληθυσμών από δείγματα ιζημάτων που παρουσιάζουν διαφορές ως προς την τροφική τους κατάσταση. Οι οξικοί σταθμοί του Νοτίου Ιονίου που περιγράφονται στο Κεφάλαιο 3.4 (Polymenakou et al., 2005d) περιλαμβάνονταν επίσης στην ανάλυση.



**Σχήμα 3.5.6:** Διαγράμματα που παρουσιάζουν Α) το άθροισμα των κορεσμένων με μονό αριθμό ατόμων άνθρακα και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων και Β) το άθροισμα των διακλαδωμένων λιπαρών οξέων των σταθμών δειγματοληψίας. Το άθροισμα των αλειφατικών υδρογονανθράκων (AHC) παρουσιάζεται επίσης σε κάθε διάγραμμα. Οι συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων και των AHC παρουσιάζονται αντίστοιχα σε ng g<sup>-1</sup> και μg g<sup>-1</sup>.

Όλες οι διαφορετικές λειτουργικές ομάδες ήταν πολύ πιο άφθονες στον Κόλπο Αουγκούστα και στον πιο επιβαρημένο σταθμό του Θρακικού Πελάγους (THR30 0-1; Σχήμα 3.5.5). Εντούτοις, οι χαμηλότερες αφθονίες καταγράφηκαν στα βαθύτερα στρώματα των ιζημάτων ως αποτέλεσμα πιθανότατα της μικρής διαθεσιμότητας των

πηγών άνθρακα και ενέργειας (όπως οργανικός άνθρακας και φωτοσυνθετικές χρωστικές). Οι μικροευκαρυωτικοί οργανισμοί ήταν πολύ πιο άφθονοι στα επιφανειακά στρώματα του σταθμού THR30 ο οποίος επηρεάζεται από τις θαλάσσιες μάζες νερού της Μαύρης Θάλασσας (Σχήμα 3.5.5) και στους ρηχούς σταθμούς του Κόλπου Αουγκούστα.

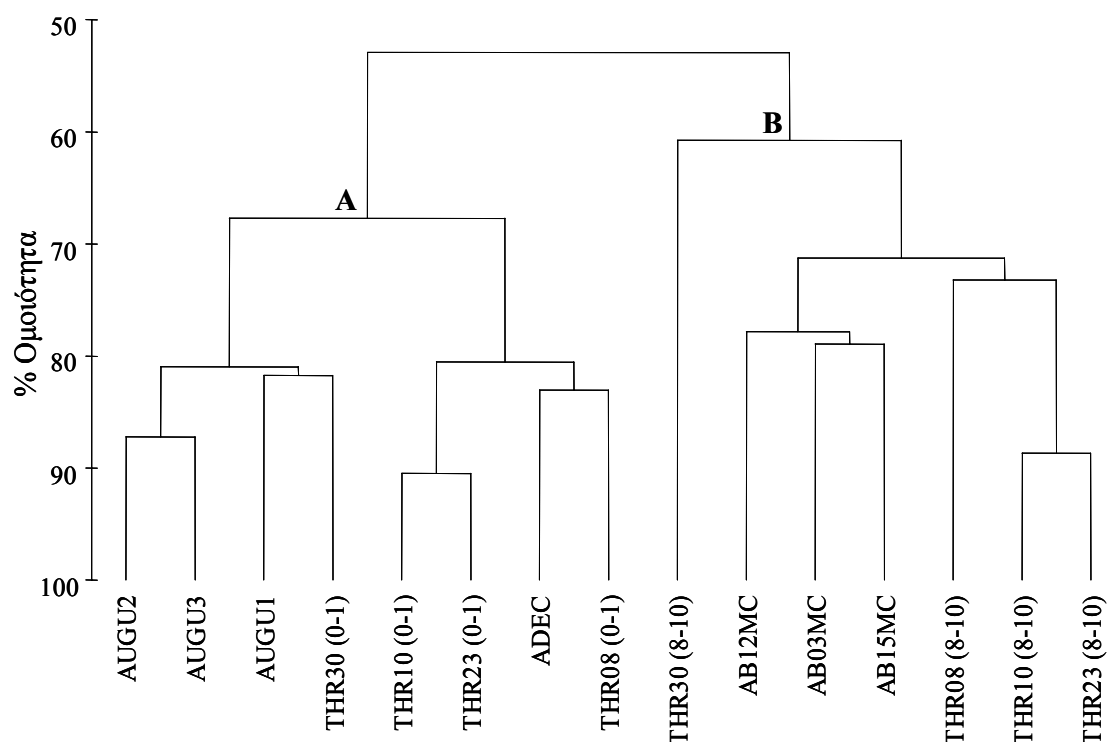
Σε πείραμα που είχε πραγματοποιηθεί σε προηγούμενη εργασία οι Agies και συνεργάτες (2000) παρατήρησαν ότι θαλάσσια βακτηριακά στελέχη που αναπτύσσονταν σε καλλιέργειες παρουσία πετρελαίου συνέθεταν σε μεγάλες ποσότητες κορεσμένα λιπαρά οξέα με μονό αριθμό ατόμων άνθρακα και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (Agies et al., 2000). Επίσης, οι Pinturier-Geiss και συνεργάτες (2002) πρότειναν ότι η παρατηρούμενη αύξηση στις ποσότητες των διακλαδωμένων και με μονό αριθμό ατόμων άνθρακα λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων πιθανότατα συνδέεται με την ανάπτυξη υδροανθρακοκλαστικών βακτηρίων σε ιζήματα πλούσια σε υδρογονάνθρακες. Για το λόγο αυτό, στην παρούσα εργασία, υπολογίσαμε το άθροισμα των μονών κορεσμένων και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (Σχήμα 3.5.6A) καθώς και το άθροισμα των διακλαδωμένων λιπαρών οξέων (Σχήμα 3.5.6B) και τα παρουσιάσαμε στο ίδιο διάγραμμα με τους αλειφατικούς υδρογονάνθρακες (Σχήμα 3.5.6). Η σχετική αύξηση στις ποσότητες των διακλαδωμένων και μονών λιπαρών οξέων στους ρηχούς σταθμούς του Κόλπου Αουγκούστα καθώς και στους σταθμούς που βρίσκονται κοντά στις ανοξικές λεκάνες πιθανότατα οφείλεται στις αυξημένες ποσότητες υδρογονανθράκων (Σχήμα 3.5.6). Συνήθως, οι διαδικασίες ιζηματοπόθεσης μεταφέρουν σωματίδια πλούσια σε οργανικό άνθρακα με αποτέλεσμα τη δημιουργία τοπικά ζωντανών βιοκοινωνιών (short-lived hotspots; Fenchel and Glud, 2000; Tselepides and Lampadariou, 2004). Κατά ανάλογο τρόπο, η παρατηρούμενη παράλληλη αύξηση των φωσφολιπιδίων και υδρογονανθράκων στην περίπτωση των ιζημάτων της Ανατολικής Μεσογείου μπορεί να ερμηνευθεί πιθανότατα ως το αποτέλεσμα μίας διαδικασίας σχηματισμού βενθικών τοπικών μικροβιοκοινωνιών (benthic hotspots) λόγω της παρουσίας υψηλών ποσοτήτων υδρογονανθράκων.

Βασιζόμενοι στις συγκεκριμένες παρατηρήσεις, προτείνουμε την εξής ερμηνεία: οι βενθικές μικροβιακές κοινωνίες που ενδιατούν στα ρυπασμένα ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου έχουν οδηγηθεί στην ανάπτυξη βακτηρίων που διαθέτουν ικανότητα αποικοδόμησης υδρογονανθράκων με στόχο την αποικοδόμηση των διαθέσιμων πηγών άνθρακα. Το ερώτημα που προκύπτει και πρέπει περαιτέρω να

διερευνηθεί είναι εάν και κατά πόσο οι οργανισμοί αυτοί διαθέτουν πραγματικά την ικανότητα να αποικοδομούν υδρογονάνθρακες είτε φυσικής είτε πετρελαϊκής προέλευσης.

### 3.5.5 Επίδραση του μη αποικοδομήσιμου οργανικού υλικού

Ο στοιχειακός άνθρακας (BC) αποτελεί τη χημικά και βιολογικά σταθερή μορφή του οργανικού υλικού στο περιβάλλον (Dickens et al., 2004; Gélinas et al., 2001; Middelburg et al., 1999). Οι καλύτερα προσαρμοσμένοι οργανισμοί σε αλλαγές στις περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς και στις διάφορες μορφές του παρεχόμενου οργανικού υλικού είναι τα μικρόβια. Αυτά γενικά χαρακτηρίζονται από υψηλή ποικιλότητα και συμμετέχουν σε ένα μεγάλο εύρος βιογεωχημικών διαδικασιών (Boschker et al., 1998; Evans, 1977; Fang and Findlay, 1996). Εργασίες όμως που να περιγράφουν την επίδραση του μη αποικοδομήσιμου οργανικού υλικού στην βιοδιαθεσιμότητα των πηγών άνθρακα καθώς και στη δομή των μικροβιοκοινωνιών στα ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου, δεν υπάρχουν.



**Σχήμα 3.5.7:** Δενδρόγραμμα ανάλυσης κατάταξης βασισμένο στη σύγκριση των μοτίβων των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων (PLFA) των σταθμών δειγματοληψίας.

Στην παρούσα εργασία, με βάση την κατανομή των φωσφολιπιδίων υπολογίστηκε η ομοιότητα μεταξύ των περιβαλλοντικών δειγμάτων. Η Ανάλυση Κατάταξης που πραγματοποιήθηκε είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή δύο ευδιάκριτων ομάδων

(Σχήμα 3.5.7). Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει όλα τα επιφανειακά ιζήματα του Θρακικού Πελάγους, τα ιζήματα από τον Κόλπο Αουγκούστα καθώς και το μη ρυπασμένο σταθμό του Νοτίου Ιονίου ενώ η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τα βαθύτερα στρώματα των σταθμών του Θρακικού Πελάγους και τα ιζήματα που συλλέχθηκαν κοντά στις ανοξικές λεκάνες (Σχήμα 3.5.7).

Το αποτέλεσμα αυτό ομαδοποιεί σταθμούς που χαρακτηρίζονται από διαφορετικά επίπεδα πετρελαϊκής ρύπανσης (ρυπασμένους και μη) με συνέπεια να μην είναι εύκολη η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τις περιβαλλοντικές παραμέτρους που ευθύνονται για αυτή την ομαδοποίηση. Για το λόγο αυτό, η ανάλυση BIOENV πραγματοποιήθηκε σε μια προσπάθεια να προσδιοριστούν οι κυριότερες παράμετροι που φαίνεται να παίζουν το πρωταρχικό ρόλο στη σύσταση των μικροβιακών κοινωνιών. Η μέθοδος BIOENV αναλύει τη συσχέτιση μεταξύ των ομοιοτήτων των περιβαλλοντικών μεταβλητών και των ομοιοτήτων που προκύπτουν από τις κατανομές PLFA. Οι συσχετίσεις αυτές επαναλαμβάνονται για όλους τους πιθανούς συνδυασμούς ενώ ο προκύπτων συνδυασμός περιβαλλοντικών δεδομένων που εμφανίζει τον υψηλότερο συντελεστή συσχέτισης ( $R$ ) είναι αυτός που εξηγεί καλύτερα το αποτέλεσμα της Ανάλυσης Κατάταξης. Σύμφωνα με τους Clarke και Ainsworth (1993), όλες οι μετρούμενες περιβαλλοντικές παράμετροι περιλαμβάνονταν στην ανάλυση BIOENV χωρίς περαιτέρω τροποποίηση.

Ο υψηλότερος συντελεστής συσχέτισης με τα δεδομένα PLFA ( $R = 0.772$ ) προέκυψε με δύο μόνο μεταβλητές, τον βιοδιαθέσιμο οργανικό άνθρακα και τα επίπεδα CPE, ενώ ο ολικός οργανικός άνθρακας δε φάνηκε να παίζει κάποιο σημαντικό ρόλο. Έτσι, η ομάδα A της ανάλυσης κατάταξης περιλαμβάνει όλους τους σταθμούς που χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα βιοδιαθέσιμου οργανικού άνθρακα και CPE ενώ η ομάδα B περιλαμβάνει τα ιζήματα που είναι σχετικά φτωχά σε οργανικό υλικό και φωτοσυνθετικές χρωστικές. Σε δεύτερο στάδιο η ανάλυση BIOENV πραγματοποιήθηκε μεταξύ των σταθμών κάθε ομάδας με στόχο τη διερεύνηση των περιβαλλοντικών παραμέτρων που ρυθμίζουν τη μικροβιακή σύσταση σε κάθε περιβάλλον χωριστά (πλούσιο ή φτωχό σε οργανικό υλικό). Μεταξύ των σταθμών της ομάδας A ο υψηλότερος συντελεστής συσχέτισης με τα δεδομένα PLFA προέκυψε με τις μεταβλητές του στοιχειακού άνθρακα και των επιπέδων CPE ( $R = 0.866$ ), ενώ μεταξύ των σταθμών της ομάδας B οι μεταβλητές του ολικού οργανικού άνθρακα, χλωροφύλλης  $a$ , και αλειφατικών υδρογονανθράκων



παρουσίασαν την υψηλότερη συσχέτιση με τη σύσταση των μικροβιακών κοινοτήτων ( $R = 0.856$ ).

Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι η ποσότητα της μη αποικοδομήσιμης μορφής του οργανικού υλικού στα ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της δομής των βενθικών μικροβιοκοινοτήτων. Προηγούμενες εργασίες αναφέρουν ότι ο οργανικός άνθρακας δεν αντιπροσωπεύει καλό δείκτη της διαθέσιμης τροφής στο περιβάλλον καθώς περιέχει ένα μεγάλο ποσοστό από μη αποικοδομήσιμο υλικό το οποίο είναι μη βιοδιαθέσιμο στις βενθικές κοινότητες (Tselepidis & Lampadariou, 2004). Εναλλακτικά, οι χλωροπλαστικές χρωστικές που προέρχονται από διαδικασίες πρωτογενούς παραγωγικότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες τροφής. Στην παρούσα εργασία, η μη αποικοδομήσιμη μορφή του οργανικού υλικού προσδιορίστηκε χημικά, καθιστώντας δυνατό τον υπολογισμό του βιοδιαθέσιμου οργανικού άνθρακα ο οποίος βρέθηκε τελικά να συσχετίζεται θετικά με τη δομή των βενθικών μικροβιακών πληθυσμών. Τα φτωχά σε φωτοσυνθετικές χρωστικές και οργανικό άνθρακα ιζήματα του Θρακικού Πελάγους και Νοτίου Ιονίου (σταθμοί ομάδας Β) περιλαμβάνουν μικροβιακές κοινότητες που πιθανότατα έχουν αναπτύξει την ικανότητα να χρησιμοποιούν όλες τις διαθέσιμες πηγές άνθρακα συμπεριλαμβανομένου και της μη αποικοδομήσιμης μορφής καθώς ο ολικός οργανικός άνθρακας έπαιξε το πρωταρχικό ρόλο στη ρύθμιση της δομής των κοινοτήτων αυτών. Είναι ολοφάνερο, ότι προτού καταλήξουμε σε ασφαλή συμπεράσματα πρέπει να πραγματοποιηθεί πολύ περισσότερη δουλειά σχετικά με τη σημασία και την επίδραση της μη αποικοδομήσιμης μορφής του οργανικού υλικού στη βιοδιαθεσιμότητα των πηγών άνθρακα καθώς και στη σύνθεση των μικροβιακών κοινοτήτων σε ρυπασμένες και μη περιοχές.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Σύνθεση - Συμπεράσματα**

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν ο προσδιορισμός των περιβαλλοντικών παραμέτρων που ρυθμίζουν τη σύσταση των μικροβιακών κοινοτήτων σε ιζήματα από την ευρύτερη περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου. Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκε ένας μεγάλος αριθμός δειγμάτων από σταθμούς που παρουσιάζουν έντονες διαφορές ως προς την τροφική κατάσταση (ολιγοτροφικά, μεσότροφα και εύτροφα), το βάθος (παράκτια, βαθιά), το βαθμό περιβαλλοντικής ρύπανσης (ρυπασμένα και μη), το βαθμό οξειδοαναγωγικών συνθηκών (οξικά και ανοξικά), τα επίπεδα αλατότητας (από φυσιολογικά μέχρι ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις αλατότητας) καθώς και ως προς το ποσοστό του μη αποικοδομήσιμου οργανικού υλικού που εμπεριέχουν.

Η σύσταση των μικροβιακών κοινοτήτων μελετήθηκε με την εφαρμογή διαφορετικών χημικών και μοριακών τεχνικών όπως με τις τεχνικές γενετικής αποτύπωσης του γονιδίου 16S rRNA, με τη κατασκευή βιβλιοθηκών κλώνων του ίδιου γονιδίου και με την ανάλυση των φωσφολιπιδίων. Η παρούσα διατριβή διαρθρώθηκε σε επιμέρους ολοκληρωμένες εργασίες που κάθε μια είχε σχεδιαστεί έτσι ώστε να απαντήσει σε συγκεκριμένα ερωτήματα.

Σε ένα πρώτο στάδιο επιχειρήσαμε τη σύγκριση της σύστασης των μικροβιακών πληθυσμών σε ένα μεγάλο εύρος διαφορετικών ιζημάτων της Ανατολικής Μεσογείου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από το Θερμαϊκό Κόλπο, το Κρητικό Πέλαγος, το Νότιο Ιόνιο και τη Θάλασσα της Λεβαντίνης και εφαρμόστηκαν οι μοριακές τεχνικές γενετικής αποτύπωσης DGGE και T-RFLP, καθώς και η κλασική μέθοδος ανάλυσης των φωσφολιπιδίων. Απώτερος στόχος μας ήταν η τελική επιλογή συγκεκριμένων δειγμάτων που παρουσιάζουν διαφοροποίηση σε ότι αφορά τη μικροβιακή τους σύσταση για την κατασκευή βιβλιοθηκών κλώνων. Οι σταθμοί δειγματοληψίας που επιλέχθηκαν διέφεραν σημαντικά τόσο ως προς το βάθος τους όσο και ως προς τα επίπεδα πετρελαϊκών υδρογονανθράκων, οργανικού άνθρακα και χλωροφύλλης. Οι σχετικά χαμηλές ποσότητες φωσφολιπιδίων που καταγράφηκαν στους βαθείς σταθμούς πιθανότατα οφείλονται στη χαμηλή διαθεσιμότητα θρεπτικών αλάτων που γενικά χαρακτηρίζει την Ανατολική Μεσόγειο και που έχει ως συνέπεια την χαμηλή πρωτογενή παραγωγικότητα και κατά επέκταση την περιορισμένη αποθήκευση οργανικού υλικού στο ιζημα. Τα αποτελέσματα ανάλυσης DGGE έδειξαν ότι οι μικροβιακές κοινότητες

των ιζημάτων από την πιο παραγωγική (μεσότροφη) περιοχή του Θερμαϊκού Κόλπου διέφεραν κατά πολύ από τις ολιγοτροφικές περιοχές του Κρητικού, Νοτίου Ιονίου καθώς και της Θάλασσας της Λεβαντίνης. Αντίθετα, με την ανάλυση T-RFLP οι μικροβιακές κοινότητες των βαθιών ιζημάτων διέφεραν σημαντικά από αυτές των παράκτιων περιοχών. Οι συντελεστές συσχέτισης που υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ανάλυσης BIOENV ήταν ιδιαίτερα υψηλοί δηλώνοντας ότι οι μικροβιακές κοινότητες συσχετίζονται σημαντικά με τις μετρούμενες περιβαλλοντικές παραμέτρους. Μεταξύ αυτών, ο συνδυασμός των επιπέδων οργανικού άνθρακα και χλωροφύλλης *a* φαίνεται να παίζει το μέγιστο ρόλο στη ρύθμιση των βακτηριακών κοινωσιών. Επιπλέον το βάθος (T-RFLP) και η μικροβιακή βιομάζα (PLFA) φαίνεται να συνεισφέρουν κατά ένα βαθμό στην ρύθμιση των βακτηριακών κοινωσιών. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, δείξαμε ότι η παράλληλη εφαρμογή διαφορετικών τεχνικών μπορεί να προσφέρει πολύτιμες και πιο ασφαλείς πληροφορίες στη μελέτη της σύστασης των μικροβιακών κοινωσιών.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των τεχνικών αποτύπωσης DGGE, T-RFLP και PLFA, οι περιοχές του Θερμαϊκού Κόλπου, του Νοτίου Ιονίου και της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης παρουσιάζουν διαφοροποίηση σε ότι αφορά τη μικροβιακή τους σύσταση. Αντιπροσωπευτικοί σταθμοί των περιοχών αυτών επιλέχθηκαν για τη μελέτη της σύστασης και ποικιλότητας των βακτηριακών κοινωσιών με την κατασκευή μεγάλων βιβλιοθηκών κλώνων του γονιδίου 16S rRNA. Πρέπει εδώ να τονιστεί ότι είναι η πρώτη φορά που πραγματοποιείται τέτοια μελέτη σε οξικά περιβάλλοντα από την ευρύτερη περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου. Και οι τέσσερις βακτηριακές βιβλιοθήκες κλώνων 16S rDNA χαρακτηρίζονταν από υψηλή ποικιλότητα και περιελάμβαναν νουκλεοτιδικές αλληλουχίες στενά συνδεδεμένες με τις πιο γνωστές κλάσεις και τα πιο διαδεδομένα φύλα που έχουν αναφερθεί στα ιζήματα. Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι η πλειοψηφία των αλληλουχιών ομαδοποιούνταν κυρίως με *Gamma-*, *Alpha-*, και *Delta-Proteobacteria*, *Acidobacteria/Holophaga*, *Planctomycetales*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* και *Verrucomicrobia* καθώς. Επίσης, ένας περιορισμένος αριθμός κλώνων (<4 ανά ομάδα) ήταν στενά συνδεδεμένος με *Betaproteobacteria*, *Nitrospirae*, *Green nonsulfur bacteria (Chloroflexi)*, *Spirochaetales*, *Chlamydiae*, *Firmicutes* και με την υποψήφια ομάδα OP11 (candidate division OP11).

Οι αφθονίες των αλληλουχιών που συνδέονταν με τα *Gammaproteobacteria* ήταν υψηλότερες στους παράκτιους σταθμούς του Θερμαϊκού Κόλπου και της

υφαλοκρηπίδας της Κρήτης σε αντίθεση με το βαθύ σταθμό του Νοτίου Ιονίου. Οι διαφορές αυτές υποδηλώνουν ότι η ύπαρξη της συγκεκριμένης ομάδας πιθανότατα να σχετίζεται με την εισαγωγή στο ιζήμα φρέσκου οργανικού υλικού και/ή πελαγικών βακτηρίων από την εύρωτη ζώνη. Οι περισσότερες αλληλουχίες συνδέονταν με 16S rDNA φυλοτύπους που δεν έχουν καλλιεργηθεί στο εργαστήριο και με κλώνους από περιβάλλοντα πλούσια σε υδρογονάνθρακες που διαθέτουν την ικανότητα είτε να αποικοδομούν οργανικούς ρυπαντές (π.χ. βενζόλιο) είτε να χρησιμοποιούν θείο ή αμμωνία στο μεταβολικό τους μονοπάτι.

Με τη συγκεκριμένη εργασία δείξαμε ότι οι βακτηριακές κοινωνίες των βαθιών θαλασσών χαρακτηρίζονται από υψηλή πολυπλοκότητα γενώματος (4350 βακτηριακούς φυλοτύπους με ποσοστό επικάλυψης από 23 έως 36%) με τιμές συγκρίσιμες των χερσαίων περιβαλλόντων. Η υψηλή αφθονία των ειδών που υπολογίστηκε για όλα τα ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου, δείχνει ότι χιλιάδες κλώνοι πρέπει να αναλυθούν για την εκτίμηση της πραγματικής βακτηριακής ποικιλότητας της περιοχής. Αυτό που πρέπει να τονίσουμε ώστε να συνειδητοποιήσουμε το μέγεθος της βακτηριακής ποικιλότητας των ιζημάτων της Ανατολικής Μεσογείου είναι ότι κανένας κοινός κλώνος δεν εντοπίστηκε μεταξύ των τεσσάρων διαφορετικών βιβλιοθηκών. Το γεγονός αυτό πιθανότατα οφείλεται είτε στην τοπική διαφοροποίηση των βακτηριακών κοινωνιών είτε στην υπερβολικά υψηλή βακτηριακή ποικιλότητα.

Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι ένας μεγάλος αριθμός φυλοτύπων συνδεόταν στενά με βακτήρια που διαθέτουν ικανότητα αποικοδόμησης υδρογονανθράκων. Για το λόγο αυτό σε ένα επόμενο στάδιο, επιχειρήσαμε να μελετήσουμε την ικανότητα αποικοδόμησης των μικροοργανισμών σε ένα έντονα ολιγότροφο περιβάλλον (Κρητικό Πέλαγος) με την πραγματοποίηση πειράματος επώασης διάρκειας 2 μηνών. Στο συγκεκριμένο πείραμα προσδιορίστηκαν οι ρυθμοί στοιχειοποίησης του οργανικού υλικού και διερευνήθηκε η ικανότητα αποικοδόμησης υδρογονανθράκων ενώ η σύσταση των μικροβιακών κοινωνιών μελετήθηκε με την ανάλυση των φωσφολιπιδίων.

Η ανάλυση των φωσφολιπιδίων έδειξε ξεκάθαρα ότι αερόβια και υποχρεωτικά αερόβια gram αρνητικά βακτήρια καθώς και βακτήρια που διαθέτουν ικανότητα οξείδωσης του μεθανίου και του θείου βρίσκονται σε υψηλές αφθονίες στην ολιγοτροφική περιοχή της Κρήτης. Ταυτόχρονα, οι χαμηλές ποσότητες διακλαδωμένων λιπαρών οξέων δηλώνουν τις χαμηλές αφθονίες των αναερόβιων,

gram-θετικών καθώς και των βακτηρίων που διαθέτουν ικανότητα αναγωγής των θεικών ιόντων.

Μετά από επώαση 2-μήνων οι αλλαγές στις κατανομές των ελεύθερων λιπαρών οξέων έδειξαν ξεκάθαρα ότι οι μικροβιακές κοινότητες των ιζημάτων της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης περνούσαν σε κατάσταση 'καταπόνησης' λόγω έλλειψης τροφής. Αυτό πιθανότατα σχετίζεται με στρατηγικές επιβίωσης και προσαρμογής των μικροοργανισμών σε περιβάλλοντα που είναι φτωχά σε θρεπτικά λόγω της κατανάλωσης όλων των διαθέσιμων πηγών άνθρακα και ενέργειας που υπάρχουν στο περιβάλλον. Η μεταβολή των υδρογονανθράκων κατά την περίοδο της επώασης μελετήθηκε μέσω της μείωσης των κ-αλκανίων,  $\Sigma(C_{15}-C_{20})$ ,  $\Sigma(C_{21}-C_{36})$  και του UCM ως προς το οπάνιο 17α(H),21β(H)-C<sub>30</sub>-hopane (C<sub>30</sub>H) το οποίο θεωρητικά διαθέτει μεγάλη ανθεκτικότητα σε διαδικασίες βιοαποικοδόμησης στο περιβάλλον. Οι συγκεκριμένοι διαγνωστικοί λόγοι των κ-αλκανίων ως προς το οπάνιο μειώνονταν ξεκάθαρα μετά την περίοδο επώασης σε όλους τους σταθμούς. Αυτό αποτελεί ισχυρή ένδειξη για την παρουσία διαδικασιών αποικοδόμησης πιθανότατα ως αποτέλεσμα της ύπαρξης βακτηρίων που διαθέτουν ικανότητα αποικοδόμησης υδρογονανθράκων. Για πρώτη φορά στην παγκόσμια βιβλιογραφία παρουσιάζονται δεδομένα αποικοδόμησης υδρογονανθράκων σε τόσο oligότροφο περιβάλλον καθώς οι έως τώρα σχετικές εργασίες περιορίζονται σε περιβάλλοντα έντονα ρυπασμένα.

Ο διαγνωστικός λόγος του UCM ως προς το οπάνιο C<sub>30</sub>H μειωνόταν εξίσου σημαντικά μετά την περίοδο επώασης στους πιο ρηχούς σταθμούς δειγματοληψίας. Για την επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων ακολουθήσαμε την τεχνική ανίχνευσης του γονιδίου της διοξυγενάσης με τη χρήση των κατάλληλων εκκινητών της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ή PCR. Στόχος ήταν η επιβεβαίωση της ύπαρξης βακτηρίων που διαθέτουν ικανότητα αποικοδόμησης αρωματικών ουσιών όπως αυτών που συστήνουν το UCM. Το γονίδιο της διοξυγενάσης ανιχνεύτηκε επιτυχώς επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη βακτηρίων με ικανότητα αποικοδόμησης αρωματικών ουσιών στα ιζήματα της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης.

Εδώ πρέπει να τονίσουμε ότι είναι η πρώτη φορά στην παγκόσμια βιβλιογραφία όπου γονίδιο αποικοδόμησης (όπως η διοξυγενάση) ανιχνεύτηκε κατευθείαν από δείγμα oligότροφου περιβάλλοντος χωρίς τη μεσολάβηση καλλιέργειας, γεγονός που δηλώνει ότι το συγκεκριμένο γονίδιο βρίσκεται σε μεγάλο αριθμό αντιγράφων στην Ανατολική Μεσόγειο. Πρόσφατα, οι Junca και Pieper (2003) κατόρθωσαν να

ανιχνεύσουν το γονίδιο της διοξυγενάσης από ένα έντονα ρυπασμένο δείγμα εδάφους (Δημοκρατία της Τσεχίας) στο οποίο οι ποσότητες των αρωματικών υδρογονανθράκων βενζόλιο, τολουόλιο, εθυλοβενζόλιο και ξυλόλιο ήταν ιδιαίτερα υψηλές (6-320 mg L<sup>-1</sup>; Junca and Pieper, 2003).

Πώς όμως οι μικροβιακές κοινωνίες διαφοροποιούνται σε περιβάλλοντα που επικρατούν ακραίες συνθήκες; Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν μια σειρά ιζημάτων από περιβάλλοντα με διαφορετικά επίπεδα αλατότητας και διαφορετικές οξειδοαναγωγικές συνθήκες από τις βαθιές ανοξικές λεκάνες της Ανατολικής Μεσογείου (Bannock, L'Atalante, Urania και Discovery) καθώς και από οξικά περιβάλλοντα κοντά σε αυτές. Η εξερεύνηση της δομής των μικροβιακών κοινωνιών σε περιβάλλοντα όπου επικρατούν ακραίες συνθήκες αποτελεί πρόκληση στο χώρο της μικροβιακής οικολογίας λόγω των τεχνικών δυσκολιών που υπάρχουν στην απομόνωση και καταμέτρηση όλων των μικροβίων. Οι διαγνωστικοί λόγοι που υπολογίστηκαν με βάση τις κατανομές των κ-αλκανίων αποτελούν ισχυρή ένδειξη ότι οι ανοξικές λεκάνες του Νοτίου Ιονίου λειτουργούν ως αποθήκες συσσώρευσης οργανικού υλικού πλαγκτονικής προέλευσης που καθιζάνουν μέσω της κολώνας του νερού από την εύφωτη ζώνη και διαθέτουν την ικανότητα να συντηρούνται σε γεωλογικά χρονικές περιόδους. Επίσης, οι υψηλές συγκεντρώσεις των κ-αλκανίων δηλώνουν ότι η περιοχή των ανοξικών λεκανών αποτελεί το τελικό σημείο εναπόθεσης και συσσώρευσης οργανικού υλικού τόσο χερσαίας όσο και θαλάσσιας προέλευσης. Έχει δε την τάση να συντηρείται σε τόσο ακραία περιβάλλοντα ενώ δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο να προέρχεται επίσης και από τα γειτονικά γεωλογικά στρώματα.

Η ανάλυση κατάταξης των δεδομένων φωσφολιπιδίων ομαδοποίησε τους σταθμούς κατά τέτοιο τρόπο υποδεικνύοντας τη στενή σύνδεση των βενθικών μικροβιακών κοινωνιών με τις οξειδοαναγωγικές συνθήκες. Αντίθετα με το βαθμό των οξικών/ανοξικών συνθηκών, οι συγκεντρώσεις αλατότητας δεν φάνηκαν να παίζουν κανένα ρόλο στη ρύθμιση των μικροβιακών κοινωνιών υποδηλώνοντας ότι τα μικρόβια που ενδιααιτούν στα ιζήματα αυτά είναι πιθανότατα αλοανθεκτικά και όχι αλόφιλα. Αυτό σημαίνει ότι οι συγκεκριμένοι οργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν σε ένα μεγάλο εύρος διαφορετικών επιπέδων αλατότητας χωρίς περιορισμό. Στους ανοξικούς σταθμούς οι μεταβλητές του οργανικού αζώτου και άνθρακα φαίνεται να παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των μικροβιακών κοινωνιών σε αντίθεση

με τους οξικούς όπου ο ρόλος του οργανικού άνθρακα παρουσιάζεται λιγότερο σημαντικός.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι στην περιοχή των ανοξικών λεκανών του Νοτίου Ιονίου υπάρχουν δύο διαφορετικές βενθικές μικροβιακές κοινότητες που πιθανότατα διαθέτουν διαφορετικές λειτουργίες και διαδραματίζουν διαφορετικό ρόλο στις βενθικές διαγενετικές διεργασίες. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στις διαφορετικές γεωχημικές διεργασίες που επικρατούν στις ανοξικές λεκάνες σε σχέση με τα οξικά περιβάλλοντα. Με την ανάλυση PCA της κατανομής των κ-αλκανίων προέκυψε επίσης ότι υπάρχουν διαφορετικές πηγές οργανικού υλικού στα ιζήματα. Συγκεκριμένα, στους σταθμούς δειγματοληψίας που βρίσκονται κοντά στις ανοξικές λεκάνες η χερσαία συνεισφορά στη σύσταση των ιζημάτων είναι πολύ πιο έντονη από ότι στους σταθμούς που βρίσκονται στις ανοξικές λεκάνες.

Στη συνέχεια μελετήσαμε το ρόλο του 'στοιχειακού' άνθρακα στη βιοδιαθεσιμότητα των πηγών άνθρακα και ενέργειας και κατά συνέπεια στη σύσταση των μικροβιακών κοινωσιών. Τα τελευταία χρόνια, η μελέτη του στοιχειακού άνθρακα ή αιθάλης έχει προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον καθώς έχει θεωρηθεί ότι αποτελεί τη μη αποικοδομήσιμη μορφή του οργανικού υλικού που μπορεί να διατηρηθεί και να συσσωρευτεί στα ιζήματα (Dickens et al., 2004; Gélinas et al., 2001; Middelburg et al., 1999). Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν δείγματα ιζημάτων από ρυπασμένες και μη περιοχές της Ανατολικής Μεσογείου και πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις στοιχειακού άνθρακα, αλειφατικών υδρογονανθράκων και φωσφολιπιδίων.

Η συνεισφορά του στοιχειακού άνθρακα (BC) στη σύσταση του ολικού οργανικού άνθρακα παρουσιάστηκε ιδιαίτερα σημαντική υποδεικνύοντας ότι τα επίπεδα BC αποτελούν ένα πολύ σημαντικό μέρος της συνολικής πηγής άνθρακα στα ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις υδρογονανθράκων καταγράφηκαν στους ρηχούς σταθμούς του Κόλπου Αουγκούστα, υποδηλώνοντας ότι ο ανθρωπογενής παράγοντας είναι πολύ σημαντικός στη συγκεκριμένη περιοχή. Αντίθετα, τα επίπεδα αλειφατικών υδρογονανθράκων που καταγράφηκαν στο Θρακικό Πέλαγος, στο βαθύ σταθμό του Κόλπου Αουγκούστα και στο χαρακτηριστικό σταθμό απομακρυσμένης περιοχής του Νοτίου Ιονίου, ήταν ιδιαίτερα χαμηλά χαρακτηρίζοντας τις περιοχές αυτές ως μη ρυπασμένες.

Η ανάλυση Πρωταρχικών Συνιστωσών των περιβαλλοντικών δεδομένων υποδεικνύει την ύπαρξη διαφορετικών τροφικών καταστάσεων μεταξύ των σταθμών δειγματοληψίας που ακολουθούν μια διαβάθμιση από τις πιο παραγωγικές και

ρυπασμένες περιοχές του Κόλπου Αουγκούστα προς τις ‘καθαρές’ και φτωχές σε οργανικό άνθρακα περιοχές του Θρακικού Πελάγους. Οι χαμηλότερες βακτηριακές αφθονίες καταγράφηκαν στα βαθύτερα στρώματα των ιζημάτων ως αποτέλεσμα πιθανότατα της μικρής διαθεσιμότητας των πηγών άνθρακα και ενέργειας (όπως οργανικός άνθρακας και φωτοσυνθετικές χρωστικές). Αντίθετα, οι υψηλότερες αφθονίες καταγράφηκαν στους πλούσιους σε οργανικό υλικό σταθμούς του Κόλπου Αουγκούστα καθώς και στο επιφανειακό στρώμα του σταθμού THR30 ο οποίος επηρεάζεται από τις θαλάσσιες μάζες νερού της Μαύρης Θάλασσας.

Η σχετική αύξηση στις ποσότητες των διακλαδωμένων και μονών λιπαρών οξέων στους ρηχούς σταθμούς του Κόλπου Αουγκούστα καθώς και στους σταθμούς που βρίσκονται κοντά στις ανοξικές λεκάνες πιθανότατα οφείλεται στις αυξημένες ποσότητες υδρογονανθράκων. Η παρατηρούμενη παράλληλη αύξηση των φωσφολιπιδίων και υδρογονανθράκων στην περίπτωση των ιζημάτων της Ανατολικής Μεσογείου μπορεί να ερμηνευθεί πιθανότατα ως το αποτέλεσμα μίας διαδικασίας σχηματισμού χαρακτηριστικών βενθικών μικροβιοκοινωνιών (benthic hotspots) λόγω της παρουσίας υψηλών ποσοτήτων υδρογονανθράκων.

Βασιζόμενοι στις συγκεκριμένες παρατηρήσεις, προτείνουμε την εξής ερμηνεία: οι βενθικές μικροβιακές κοινωνίες που ενδιατούν στα ρυπασμένα ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου έχουν οδηγηθεί στην ανάπτυξη βακτηρίων που διαθέτουν ικανότητα αποικοδόμησης υδρογονανθράκων με στόχο την αποικοδόμηση των διαθέσιμων πηγών άνθρακα. Το ερώτημα που προκύπτει και πρέπει περαιτέρω να διερευνηθεί είναι εάν και κατά πόσο οι οργανισμοί αυτοί διαθέτουν πραγματικά την ικανότητα να αποικοδομούν υδρογονάνθρακες είτε φυσικής είτε πετρελαϊκής προέλευσης. Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι η ποσότητα της μη αποικοδομήσιμης μορφής του οργανικού υλικού στα ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της δομής των βενθικών μικροβιοκοινωνιών. Τα φτωχά σε φωτοσυνθετικές χρωστικές και οργανικό άνθρακα ιζήματα του Θρακικού Πελάγους και Νοτίου Ιονίου περιλαμβάνουν μικροβιακές κοινωνίες που πιθανότατα έχουν αναπτύξει την ικανότητα να χρησιμοποιούν όλες τις διαθέσιμες πηγές άνθρακα και ενέργειας συμπεριλαμβανομένου και της μη αποικοδομήσιμης μορφής καθώς ο ολικός οργανικός άνθρακας έπαιξε το πρωταρχικό ρόλο στη ρύθμιση της δομής των κοινωνιών αυτών. Για πρώτη φορά παρουσιάζονται δεδομένα που στηρίζουν την άποψη ότι ο ‘στοιχειακός’ άνθρακας μπορεί να



αποικοδομηθεί στο περιβάλλον καθώς μέχρι στιγμής είναι γνωστό ότι μπορεί να διασπαστεί μόνο σε πειράματα καλλιέργειών στο εργαστήριο.

### **Σύνοψη Συμπερασμάτων**

Περίληπτικά, οι απαντήσεις των επιμέρους επιστημονικών ερωτημάτων που θέσαμε αρχικά (Κεφάλαιο 1) έχουν ως εξής:

#### **1. Το βάθος επηρεάζει τη σύσταση των μικροβιακών κοινωνιών?**

- Με την τεχνική γενετικής αποτύπωσης T-RFLP δείξαμε ότι οι μικροβιακές κοινωνίες των βαθιών ιζημάτων διαφέρουν σημαντικά από αυτές των παράκτιων περιοχών.
- Η φυλογενετική ομάδα *Gammaproteobacteria* ήταν πολύ πιο άφθονη στους παράκτιους σταθμούς του Θερμαϊκού Κόλπου και της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης σε αντίθεση με το βαθύ σταθμό του Νοτίου Ιονίου στον οποίο κυρίαρχο ρόλο έχει η ομάδα *Holophaga/Acidobacteria*. Για πρώτη φορά, η συγκεκριμένη ομάδα που έχει χαρακτηριστεί αρκετά πρόσφατα βρέθηκε σε τόσο μεγάλες αφθονίες σε θαλάσσιο περιβάλλον.

#### **2. Πώς επηρεάζονται οι μικροβιακές κοινωνίες από το βαθμό περιβαλλοντικής ρύπανσης σε περιοχές της Ανατολικής Μεσογείου;**

- Οι βακτηριακές αφθονίες ήταν πολύ υψηλότερες σε περιβάλλοντα που επηρεάζονται σημαντικά από ανθρωπογενείς δραστηριότητες (π.χ. Θερμαϊκός Κόλπος) καθώς και σε περιβάλλοντα που χαρακτηρίζονται ως έντονα ρυπασμένα λόγω των υψηλών επιπέδων πετρελαϊκών υδρογονανθράκων (π.χ Κόλπος Αουγκούστα).
- Οι υψηλές ποσότητες υδρογονανθράκων που καταγράφηκαν στον έντονα ρυπασμένο Κόλπο Αουγκούστα ευθύνονται πιθανότατα για το σχηματισμό χαρακτηριστικών βενθικών μικροβιοκοινωνιών (benthic hotspots).
- Οι βενθικές μικροβιακές κοινωνίες που ενδιατούν στα έντονα ρυπασμένα ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου πιθανότατα έχουν οδηγηθεί στην ανάπτυξη βακτηρίων που διαθέτουν ικανότητα αποικοδόμησης υδρογονανθράκων με στόχο την εκμετάλλευση των διαθέσιμων πηγών άνθρακα και ενέργειας.

**3. Η κατανομή των μικροβιακών κοινωνιών διαφοροποιείται σε περιοχές που παρουσιάζουν ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. διαβάθμιση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης και αλατότητας);**

- Οι βενθικές μικροβιακές κοινωνίες στην περιοχή των ανοξικών λεκανών του Νοτίου Ιονίου φαίνεται να συνδέονται στενά με τις οξειδοαναγωγικές συνθήκες που επικρατούν.
- Αντίθετα με το βαθμό των οξικών/ανοξικών συνθηκών, οι συγκεντρώσεις αλατότητας δεν φάνηκαν να παίζουν κανένα ρόλο στη ρύθμιση των μικροβιακών κοινωνιών υποδηλώνοντας ότι τα μικρόβια που ενδιαίτουν στα ιζήματα αυτά είναι πιθανότατα αλοανθεκτικά και όχι αλόφιλα.
- Στην περιοχή των ανοξικών λεκανών του Νοτίου Ιονίου υπάρχουν δύο διαφορετικές βενθικές μικροβιακές κοινωνίες που κατά συνέπεια διαθέτουν διαφορετικές λειτουργίες και διαδραματίζουν διαφορετικό ρόλο στις βενθικές διαγενετικές διεργασίες. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στις διαφορετικές γεωχημικές διεργασίες που επικρατούν στις ανοξικές λεκάνες σε σχέση με τα οξικά περιβάλλοντα.

**4. Ποιοι είναι οι σημαντικότεροι περιβαλλοντικοί παράγοντες που ελέγχουν την κατανομή των μικροβιακών κοινωνιών;**

- Ο συνδυασμός των επιπέδων οργανικού άνθρακα και χλωροφύλλης *a* φαίνεται ότι παίζει το μέγιστο ρόλο στη ρύθμιση των βακτηριακών κοινωνιών σε περιβάλλοντα φτωχά σε οργανικό άνθρακα.
- Στους ανοξικούς σταθμούς του Νοτίου Ιονίου οι μεταβλητές του οργανικού αζώτου και άνθρακα φαίνεται να παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των μικροβιακών κοινωνιών σε αντίθεση με τους σταθμούς που βρίσκονται κοντά στις ανοξικές λεκάνες όπου ο ρόλος του οργανικού άνθρακα παρουσιάζεται ασήμαντος.
- Τα επίπεδα στοιχειακού άνθρακα αποτελούν ένα πολύ σημαντικό μέρος της συνολικής πηγής άνθρακα στα ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου επηρεάζοντας αρνητικά τα επίπεδα των βιοδιαθέσιμων πηγών άνθρακα και ενέργειας.
- Η ποσότητα της μη αποικοδομήσιμης μορφής του οργανικού υλικού στα ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της δομής των βενθικών μικροβιοκοινωνιών.

- Για πρώτη φορά παρουσιάζονται δεδομένα που στηρίζουν την άποψη ότι ο ‘στοιχειακός’ άνθρακας μπορεί να αποικοδομηθεί στο περιβάλλον καθώς μέχρι στιγμής είναι γνωστό ότι μπορεί να διασπαστεί μόνο σε πειράματα καλλιεργειών στο εργαστήριο. Τα φτωχά σε φωτοσυνθετικές χρωστικές και οργανικό άνθρακα ιζήματα του Θρακικού Πελάγους και Νοτίου Ιονίου περιλαμβάνουν μικροβιακές κοινωνίες που πιθανότατα έχουν αναπτύξει την ικανότητα να χρησιμοποιούν όλες τις διαθέσιμες πηγές άνθρακα συμπεριλαμβανομένου και της μη αποικοδομήσιμης μορφής καθώς ο ολικός οργανικός άνθρακας έπαιξε το πρωταρχικό ρόλο στη ρύθμιση της δομής των κοινωνιών αυτών.

**5. Ποια συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν σχετικά με το ρόλο του έντονα ολιγοτροφικού χαρακτήρα της Ανατολικής Μεσογείου στη ρύθμιση της δομής και λειτουργίας των βακτηριακών πληθυσμών;**

- Οι βακτηριακές κοινωνίες των βαθιών και έντονα ολιγοτροφικών περιβαλλόντων χαρακτηρίζονται από υψηλή πολυπλοκότητα γενώματος με τιμές συγκρίσιμες των χερσαίων περιβαλλόντων. Η βιοποικιλότητα των ιζημάτων της Ανατολικής Μεσογείου είναι η υψηλότερη που έχει καταγραφεί μέχρι σήμερα παγκοσμίως.
- Με το πείραμα επώασης που πραγματοποιήθηκε, δείξαμε ότι οι μικροβιακές κοινωνίες των ιζημάτων της υφαλοκρηπίδας της Κρήτης περνούν άμεσα σε κατάσταση ‘καταπόνησης’ λόγω της κατανάλωσης των διαθέσιμων πηγών άνθρακα και ενέργειας που υπάρχουν στο περιβάλλον.
- Για πρώτη φορά στην παγκόσμια βιβλιογραφία παρουσιάζονται δεδομένα αποικοδόμησης υδρογονανθράκων σε τόσο ολιγότροφο περιβάλλον καθώς οι μέχρι στιγμής σχετικές εργασίες περιορίζονται σε περιβάλλοντα έντονα ρυπασμένα. Η έλλειψη τροφής σε περιβάλλοντα έντονα ολιγοτροφικά πιθανότατα λειτουργεί δραστικά στην ανάπτυξη μηχανισμών επιβίωσης από τους μικροβιακούς πληθυσμούς. Ένας πιθανός μηχανισμός επιβίωσης είναι η εκμετάλλευση όλων των διαθέσιμων πηγών άνθρακα συμπεριλαμβανομένων και των ουσιών που χαρακτηρίζονται ως ρυπαντές.
- Με την παρούσα διατριβή παρουσιάσαμε ισχυρές ενδείξεις για την παρουσία διαδικασιών αποικοδόμησης πιθανότατα ως αποτέλεσμα της ύπαρξης βακτηρίων που διαθέτουν ικανότητα αποικοδόμησης υδρογονανθράκων.

## Μελλοντικές Προοπτικές

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής θέτουν το ερώτημα για το ρόλο του ολιγότροφου χαρακτήρα της Μεσογείου στη φυσιολογική κατάσταση των μικροβιακών πληθυσμών. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι η έλλειψη τροφής λειτουργεί δραστικά στην ανάπτυξη μηχανισμών επιβίωσης από τους μικροβιακούς πληθυσμούς. Ένας μηχανισμός επιβίωσης είναι η εκμετάλλευση όλων των διαθέσιμων πηγών άνθρακα συμπεριλαμβανομένων και των ουσιών που χαρακτηρίζονται ως ρυπαντές. Οι μικροοργανισμοί που διαθέτουν το γονίδιο της διοξυγενάσης, δημιουργούν ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων με σκοπό την αποικοδόμηση και εκμετάλλευση και των πιο ‘δύστροπων’ ουσιών. Η συγκεκριμένη θεωρία που συντάξαμε με σκοπό να ερμηνεύσουμε τις ισχυρές ενδείξεις αποικοδόμησης υδρογονανθράκων σε ένα έντονα ολιγότροφο περιβάλλον γεννά με τη σειρά της πλήθος επιστημονικών ερωτημάτων: Μήπως τελικά η Ανατολική Μεσόγειος αποτελεί πηγή βακτηρίων με υψηλές δυνατότητες που μπορούν κάλλιστα να χρησιμοποιηθούν στη Βιοτεχνολογία ή/και Φαρμακευτική; Μήπως τελικά μελέτες βιοαποικοδόμησης ουσιών, επικίνδυνων για τον άνθρωπο, δεν πρέπει να περιορίζονται μόνο σε περιβάλλοντα έντονα ρυπασμένα αλλά και σε έντονα ολιγότροφα περιβάλλοντα όπως σε αυτά της Ανατολικής Μεσογείου;

Είναι ολοφάνερο, ότι προτού καταλήξουμε σε ασφαλή συμπεράσματα πρέπει να πραγματοποιηθεί πολύ περισσότερη δουλειά που πρέπει να επικεντρωθεί στα εξής σημεία:

1. Περαιτέρω διερεύνηση της αποικοδομητικής ικανότητας των μικροοργανισμών που ενδιατούν τα ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου με έμφαση στις ιδιαίτερα ολιγότροφες περιοχές.
2. Μελέτη της σημασίας και επίδρασης της μη αποικοδομήσιμης μορφής του οργανικού υλικού στη βιοδιαθεσιμότητα των πηγών άνθρακα και ενέργειας καθώς και στη μικροβιακή δομή ρυπασμένων και μη περιοχών με πραγματοποίηση καλλιεργειών στο εργαστήριο διατηρώντας τις *in situ* συνθήκες.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Acinas, S.G., Rodríguez-Valera, F., Pedrós-Alió, C. (1997). Spatial and temporal variation in marine bacterioplankton diversity as shown by RFLP fingerprinting of PCR amplified 16S rDNA. *FEMS Microbiology Ecology* 24, 27-40.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI\_blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402.
- Aries, E., Doumenq, P., Artaud, J., Acquaviva, M., Mille, G., Bertrand, J.-C. (2000). Determination of potential biomarkers or index of hydrocarbonoclastic bacterial activity by in vitro studies on the lipidic composition of marine bacterial strains grown on *n*-alkanes and petroleum. 4<sup>th</sup> International Symposium on the Interface between *Analytical Chemistry and Microbiology*, June 4-7.
- Acinas, S.G., Marcelino, L.A., Klepac-Ceraj, V., Polz, M.F. (2004). Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *Journal of Bacteriology* 186, 2629-2635.
- Alexander, M. 1999. Biodegradation and bioremediation. Academic Press San Diego.
- Aller, R.C. (1994). Bioturbation and remineralization of sedimentary organic matter: effects of redox oscillation. *Chemical Geology* 114, 331-345.
- Amann, R., Ludwig, W. (2000). Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiology Reviews* 24, 555-565.
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews* 59, 143-69.
- Aries, E., Doumenq, P., Artaud, J., Acquaviva, M., Bertrand, J. C. (2001). Effects of petroleum hydrocarbons on the phospholipid fatty acid composition of a consortium composed of marine hydrocarbon-degrading bacteria. *Organic Geochemistry* 32, 891-903.
- Bååth, E., Anderson, T.-H. (2003). Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 955-963.
- Balkwill, D.L., Ghiorse, W.C. (1985). Characterization of subsurface bacteria associated with two shallow aquifers in Oklahoma. *Applied and Environmental Microbiology* 50, 580-588.

- Balkwill, D.L., Leach, F.R., Wilson, J.T., McNabb, J.F., White, D.C. (1988). Equivalence of microbial biomass measures based on membrane lipid and cell wall components, adenosine triphosphate, and direct counts in subsurface sediments. *Microbial Ecology* 16, 73-84.
- Balkwill, D.L., Murphy, E.M., Fair, D.M., Ringelberg, D.B., White, D.C. (1998). Microbial communities in high and low recharge environments: implications for microbial transport in the Vadose Zone. *Microbial Ecology* 35, 156-171.
- Balopoulos, E.Th., Theocharis, A., Kontoyiannis, H., Varnavas, S., Voutsinou-Taliadouri, F., Iona, A., Souvermezoglou, A., Ignatiades, L., Gotsis-Skretas, O., Pavlidou, A. (1999). Major advances in the oceanography of the southern Aegean Sea-Cretan Straits system (Eastern Mediterranean). *Progress in Oceanography* 44, 109-130.
- Bano, N., Hollibaugh, J.T. (2002). Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 505-518.
- Barnett, P.R.P., Watson, J., Connelly, D. (1984). A multiple corer for taking virtually undisturbed sediment samples from shelf bathyal and abyssal sediments. *Oceanologica Acta* 7, 399-408.
- Basford, D.J., Eleftheriou, A. (1988). The benthic environment of the North Sea (56° to 61°N). *Journal of Marine Biological Association UK* 68, 125-141.
- Bayly, R.C., Barbour, M.G. (1984). The degradation of aromatic compounds by the *meta* and gentisate pathways. In: Moo-Young, M., (ed.) *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 635-644.
- Benson, D.A., Boguski, M.S., Lipman, D.J., Ostell, J. (1997). GenBank. *Nucleic Acids Research* 25, 1-6.
- Beristain, M., Arnold, C. (1991). Hypoxia in Long Island Sound. *MSRC Bulletin* 1, 1-6.
- Berner, R.A. (1982). Burial of organic carbon and pyrite in the modern ocean: its geochemical and environmental significance. *American Journal of Sciences* 282, 451-475.
- Bianchi, A., Tholosan, O., Garcin, J., Polychronaki, T., Tselepides, A., Buscail, R., Duineveld, G. (2003). Microbial activities at the benthic boundary layer in the Aegean Sea. *Progress in Oceanography* 57, 219-236.

- Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry and Physiology* 37, 911–917.
- Blumer, M., Guillard R.R.L., Chase, T. (1971). Hydrocarbons of marine phytoplankton. *Marine Biology* 8, 183-189.
- Boetius, A., Scheibe, S., Tselepidis, A., Thiel, H. (1996). Microbial biomass and activities in deep-sea sediments of the Eastern Mediterranean: trenches are benthic hotspots. *Deep-Sea Research I* 43, 1439-1460.
- Bobbie, R.J., White, D.C. (1980). Characterization of benthic microbial community structure by high-resolution gas chromatography of fatty acid methyl esters. *Applied and Environmental Microbiology* 39, 1212-1222.
- Boivin-Jahns, V., Ruimy, R., Bianchi, A., Dumas, S., Christen, R. (1996). Bacterial diversity in a deep-subsurface clay environment. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3405-3412.
- Boon, J.J., De Leeuw, J.W., van der Hoek, G.L., Vosjan, J.H. (1977). Significance and taxonomic value of iso and anteiso monoenoic fatty acids and branched  $\beta$ -hydroxy acids in *Desulfovibrio desulfuricans*. *Journal of Bacteriology* 129, 1183-1191.
- Boschker, H.T.S., Graaf, W.D., Köster, M., Meyer-Reil, L.A., Cappenberg, T.E. (2001). Bacterial populations and processes involved in acetate and propionate consumption in anoxic brackish sediment. *FEMS Microbiology Ecology* 35, 97-103.
- Boschker, H.T.S., Nold, S.C., Wellsbury, P., Bos, D., de Graaf, W., Pel, R., Parkes, R.J., Cappenberg, T.E. (1998). Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by  $^{13}\text{C}$ -labelling of biomarkers. *Nature* 392, 801-805.
- Bouloubassi, I., Lipiatou, E., Saliot, A., Tolosa, I., Bayona, J.M., Albaiges, J. (1997). Carbon sources and cycle in the Western Mediterranean: II. The use of molecular markers to determine the origin of organic matter. *Deep Sea Research* 44, 781-799.
- Bowman, J.P., Rea, S.M., McCammon, S.A., McMeekin, T.A. (2000). Diversity and community structure within anoxic sediment from marine salinity meromictic lakes and a coastal meromictic marine basin, Versfold Hills, Eastern Antarctica. 2000. *Environmental Microbiology* 2, 227-237.

- Bowman, J.P., McCuaig, R.D. (2003). Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2463-2483.
- Bowman, J.P., McCammon, S.A., Gibson, J.A.E., Robertson, L., Nichols, P.D. (2003). Prokaryotic metabolic activity and community structure in Antarctic continental shelf sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2448-2462.
- Bregant, D., Catalano, G., Civitarese, G., Luchetta, A. (1990). Some chemical characteristics of the brines in Bannock and Tyro basins: salinity, sulphur compounds,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{F}^-$ , pH,  $\text{A}_\text{t}$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ . *Marine Chemistry* 31, 35-62.
- Brinkhoff, T., Sievert, S.M., Kuever, J., Muyzer, G. (1999). Distribution and diversity of sulfur-oxidizing *Thiomicrospira* spp. at a shallow-water hydrothermal vent in the Aegean Sea (Milos, Greece). *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3843-3849.
- Brusa, T., Borin, S., Ferrari, F., Sorlini, C., Corselli, C., Daffonchio, D. (2001). Aromatic hydrocarbon degradation patterns and catechol 2,3-dioxygenase genes in microbial cultures from deep anoxic hypersaline lakes in the eastern Mediterranean sea. *Microbiological Research* 156, 49-58.
- Brusa, T., Del Puppo, E., Ferrari, A., Rodondi, G., Andreis, C., Pellegrini, S. (1997). Microbes in deep-sea anoxic basins. *Microbiological Research* 151, 45-56.
- Caddy, J.F. (1993). Contrast between recent fishery trends and evidence from nutrient enrichment in two large marine ecosystems: The Mediterranean and the Black Seas. In Sherman, K., et al. (eds.) Large Marine Ecosystems: Stress, Mitigation, and Sustainability, Washington, D.C.: American Association for the Advancement of Science, pp. 137-147.
- Camerlenghi, A. (1990). Anoxic basins of the eastern Mediterranean: geological framework. *Marine Chemistry* 31, 1-19.
- Camerlenghi, A., Cita, M.B. (1987). Setting and tectonic evolution of some Eastern Mediterranean deep-sea basins. *Marine Geology* 75, 31-56.
- Casamayor, E.O., Massana, R., Benlloch, S., Øvreås, L., Díez, B., Goddard, V.J., Gasol, J.M., Joint, I., Rodríguez-Valera, F., Pedrós-Aliós, C. (2002). Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environmental Microbiology* 4, 338-348.



- Cerniglia, C.E. (1984). Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Advances in Applied Microbiology* 30, 31-71.
- Chao, A. (1984). Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal in Statistics* 11, 265-270.
- Charlou, J.L., Donval, J.P., Zitter, T., Roy, N., Jean-Baptiste, P., Foucher, J.P., Woodside, J., MEDINAUT Scientific Party. (2003). Evidence of methane venting and geochemistry of brines on mud volcanoes of the Eastern Mediterranean Sea. *Deep-Sea Research I* 50, 941-958.
- Chronis, G., Lykousis, V., Anagnostou, C., Karageorgis, A., Stavrakakis, S., Poulos, S. (2000). Sedimentological processes in the southern margin of the Cretan Sea (NE Mediterranean). *Progress in Oceanography* 46,143-162.
- Clarke, K.R., Ainsworth, M. (1993). A method of linking multivariate community structure to environmental variables. *Marine Ecology Progress Series* 92, 205-219.
- Clement, B.G., Kehl, L.E., DeBord, K.L., Kitts, C.L. (1998). Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *Journal of Microbiological Methods* 31, 135-142.
- Coolen, M.J., Cypionka, H., Sass, A.M., Sass, H., Overmann, J. (2002). Ongoing modification of Mediterranean Pleistocene sapropels mediated by prokaryotes. *Science* 28, 2407-2410.
- Corselli, C., Basso, D., De Lange, G.J., Thomson, J. (1996). Mediterranean Ridge Accretionary Complex yields rich surprises. *EOS Transactions, American Geophysical Union* 77, 227-228.
- Cripps, G.C. (1994). Hydrocarbons in the Antarctic marine environments: monitoring and background. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 55, 3-13.
- Dagley, S. (1986). Biochemistry of aromatic hydrocarbon degradation in *Pseudomonas*. In: Sokatch, J.R., Ornston, L.N., (eds.) *The Bacteria*. Academic Press, Inc., New York, N.Y., pp. 527-555.
- Damsté, J.S.S., Frewin, N.L., Kenig, F., De Leeuw, J.W. (1995). Molecular indicators for palaeoenvironmental change in a Messinian evaporitic sequence (Vena del Gesso, Italy). I: Variations in extractable organic matter of ten cyclically deposited marl beds. *Organic Geochemistry* 23, 471-483.

- Damsté, J.S.S., Kuypers, M.M.M., Schouten, S., Schute, S., Rullkötter, J. (2003). The lycopane/C<sub>31</sub> *n*-alkane ratio as a proxy to assess paleoxicity during sediment deposition. *Earth and Planetary Science Letters* 209, 215-226.
- Danovaro, R., Marralle, D., Dell'Anno, A., Della Croce, N., Tselepides, A., Fabiano, M. (2000). Bacterial response to seasonal changes in labile organic matter composition on the continental shelf and bathyal sediments of the Cretan Sea. *Progress in Oceanography* 46, 345-366.
- Dauwe, B., Middelburg, J.J., Herman, P.M.J. (2001). Effect of oxygen on the degradability of organic matter in subtidal and intertidal sediments of the North Sea area. *Marine Ecology Progress Series* 215, 13-22.
- De Lange, G.J., Boelrijk, N.A.I.M., Catalano, G., Corselli, C., Klinkhammer, G.P., Middelburg, J.J., Müller, D.W., Ullman, W.J., van Gaans, P., Woititez, J.R.W. (1990). Sulphate-related equilibria in the hypersaline brines of the Tyro and Bannock Basins, eastern Mediterranean. *Marine Chemistry* 31, 89-112.
- De Lange, G.J., ten Haven, H.L. (1983). Recent sapropel formation in the eastern Mediterranean. *Nature* 305, 797-798.
- Dellile, D., Guide, L.D., Cahet, G. (1990). Temporal variation of benthic bacterial microflora on the North Western Mediterranean continental shelf and slope. *Marine Ecology* 11, 105-115.
- DeLong, E.F., Yayanos, A.A. (1985). Adaptation of membrane lipids of deep-sea bacterium to changes in hydrostatic pressure. *Science* 228, 1101-1103.
- Dickens, A.F., Gélinas, Y., Masiello, C.A., Wakeham, S., Hedges, J.H. (2004). Reburial of fossil organic carbon in marine sediments. *Nature* 427, 336-339.
- Dutta, T.K., Harayama, S. (2000). Fate of crude oil by the combination of photooxidation and biodegradation. *Environmental Science and Technology* 34, 1500-1505.
- Eder, W., Jahnke, L.L., Schmidt, M., Huber, R. (2001). Microbial diversity of the brine-seawater interface of the Kebrit deep, Red Sea, studied via 16S rRNA gene sequences and cultivation methods. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3077-3085.
- Edlund, A., Nichols, P.D., Roffey, R., White, D.C. (1985). Extractable and lipopolysaccharide fatty acid and hydroxyl acid profiles from *Desulfovibrio* species. *Journal of Lipid Research* 26, 982-988.
- Eglinton, G., Hamilton, R.J. (1967). Leaf epicuticular waxes. *Science* 156, 1322.

- Eltis, L.D., Bolin, J.T. (1996). Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases. *Journal of Bacteriology* 178, 5930-5937.
- Elmqvist, M., Gustafsson, Ö., Andersson, P. (2004). Quantification of sedimentary black carbon using the chemothermal oxidation method: an evaluation of ex situ pretreatments and standard additions approaches. *Limnology and Oceanography: Methods* 2, 417-427.
- Emery, K.O., Heezen, B., Allan, T.D. (1966). Bathymetry of the Eastern Mediterranean sea. *Deep Sea Research* 13, 173-192.
- Epstein, S.S. (1997). Microbial food webs in marine sediments. I. Trophic interactions and grazing rates in two tidal flat communities. *Microbial Ecology* 34, 188-198.
- Evans, W.C. (1977). Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments. *Nature* 270, 17-22.
- Fabiano, M., Danovaro, R. (1994). Composition of organic matter in sediments facing a river estuary (Tyrrhenian Sea): relationships with bacteria and microphytobenthic biomass. *Hydrobiologia* 277, 71-84.
- Fang, J., Findlay, R.H. (1996). The use of a classic lipid extraction method for simultaneous recovery of organic pollutants and microbial lipids from sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 27, 63-71.
- Farrington, J.W., Tripp, B.W. (1977). Hydrocarbons in western north Atlantic surface sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 41, 1627-1641.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17, 368-376.
- Fenchel, T., Finlay, B.J. (1995). Ecology and Evolution in Anoxic Worlds. Oxford University Press, New York, pp. 1-22.
- Fenchel, T., Glud, R.N. (2000). Benthic primary production and O<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> dynamic in a shallow water sediment: Spatial and temporal heterogeneity. *Ophelia*, 53, 159-171.
- Fenchel, T., Riedl, R.J. (1970). The sulfide system: a new biotic community underneath the oxidized layer of marine sand bottoms. *Marine Biology* 7, 255-268.

- Ferris, M.J., Muyzer, G., Ward, D.M. (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied Environmental Microbiology* 62, 340-346.
- Flynn, S.J., Löffler, F.E., Tiedje, J.M. (2000). Microbial community changes associated with a shift from reductive dechlorination of PCE to reductive dechlorination of *cis*-DCE and VC. *Environmental Science and Technology* 34, 1056-1061.
- Finster, K., Liesack, W., Thamdrup, B. (1998). Elemental sulfur and thiosulfate disproportionation by *Desulfocapsa sulfoexigens* sp. nov., a new anaerobic bacterium isolated from marine surface sediment. *Applied and Environmental Microbiology* 64,119-125.
- Friedrich, M., Springer, N., Ludwig, W., Schink, B. (1996). Phylogenetic positions of *Desulfofustis glycolicus* gen. nov., sp. nov., and *Syntrophobotulus glycolicus* gen. nov., sp. nov., two new strict anaerobes growing with glycolic acid. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46,1065-1069.
- Friedrich, M., Grosser, R.J., Kern, E.A., Inskeep, W.P., Ward, D.M. (2000). Effect of model sorptive phases on phenanthrene biodegradation: molecular analysis of enrichments and isolates suggests selection based on bioavailability. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2703-2710.
- Frostegard, A., Bååth, E. (1996). The use of phospholipid fatty acid analysis to estimated bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility of Soils* 22, 59-65.
- Fryinger, G.S., Gaines, R.B., Xu, L., Reddy, C.M. (2003). Resolving the unresolved complex mixture in petroleum-contaminated sediments. *Environmental Science and Technology* 37, 1653-1662.
- Gélinas, Y., Prentice, K.M., Baldock, J.A., Hedges, J.I. (2001). An improved thermal oxidation method for the quantification of soot/graphitic black carbon in sediments and soils. *Environmental Science and Technology* 35, 3519-3525.
- Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L., Field, K.G. (1990). Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345:61-62.
- Giovannoni, S., Rappé, M. (2000). Evolution, diversity and molecular ecology of marine prokaryotes. In: Kirchman, D.L. (ed.) *Microbial Ecology of the Oceans*, New York, Wiley-Liss, pp. 47-84.

- Gogou, A.I., Apostolaki, M., Stephanou E.G. (1998). Determination of organic molecular markers in marine aerosols and sediments: one-step flash chromatography compound class fractionation and capillary gas chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A* 799, 215-231.
- Gogou, A., Bouloubassi, I., Stephanou, E.G. (2000). Marine organic geochemistry of the Eastern Mediterranean: 1. Aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in Cretan Sea surficial sediments. *Marine Chemistry* 68 (4), 265-282.
- Gogou, A., Stephanou, E.G. (2004). Marine organic geochemistry of the Eastern Mediterranean: 2. Polar biomarkers in Cretan Sea surficial sediments. *Marine Chemistry* 85, 1-25.
- Gogou, A., Stratigakis, N., Kanakidou, M., Stephanou, E.G. (1996). Organic aerosols in Eastern Mediterranean: components source reconciliation by using molecular markers and atmospheric back trajectories. *Organic Geochemistry* 25, 79-96.
- Gray, J.S. (1981). The ecology of marine sediments. Cambridge University Press, London.
- Gray, J.P., Herwig R.P. (1996). Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 4049-4059.
- Green, P.N. (1992). Taxonomy of methylotrophic bacteria. In: Murrel, J.C., Dalton, H. (eds.) Methane and Methanol Utilizers, New York, Plenum Press, pp. 23-84.
- Grossi, V., Massias, D., Stora, G., Bertrand, J.C. (2002). Burial, exportation and degradation of acyclic petroleum hydrocarbons following a simulated oil spill in bioturbated Mediterranean coastal sediments. *Chemosphere* 48, 947-954.
- Guckert, J.B., Hood, M.A., White, D.C. (1986). Phospholipid ester-linked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: Increases in the trans / cis ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids. *Applied and Environmental Microbiology* 52, 749-801.
- Guezennec, J., Fiala-Medioni, A. (1996). Bacterial abundance and diversity in the Barbados Trench determined by phospholipids analyses. *FEMS Microbiology Ecology* 19, 83-93.
- Gulledge, J., Ahmad, A., Steudler, P.A., Pomerantz, W.J., Cavanaugh, C.M. (2001). Family- and genus-level 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for ecological studies of methanotrophic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4726-4733.

- Gurr, M.I., James, A.T. (1980). Lipid biochemistry and introduction. Chapman and Hall., London, p. 387.
- Gustafsson, Ö., Gschwend, P.M. (1998). The flux of black carbon to surface sediment on the New England continental shelf. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 62, 465-472.
- Gustafsson, Ö., Haghseta, F., Chan, C., Macfarlane, J., Gschwend, P.M. (1997). Quantification of the dilute sedimentary soot-phase: implications for PAH speciation and bioavailability. *Environmental Science and Technology* 31, 203-209.
- Han, J., McCarthy, E.D., Calvin, M., Benn, M.H. (1968). Hydrocarbon constituents of the blue-green algae *Nostoc muscorum*, *Anacystis nidulans*, *Phormidium luridum* and *Chlorogloea fritschii*. *Journal of Chemical Society C*, 2785-2791.
- Harms, G., Zengler, K., Rabus, R., Aeckersberg, F., Minz, D., Rosselló-Mora, R., Widdel, F. (1999). Anaerobic oxidation of *o*-xylene, *m*-xylene, and homologous alkylbenzenes by new types of sulfate-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 999-1004.
- Harmsen, H.J.M., Prieur, D., Jeanthon, C. (1997). Group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to identify thermophilic bacteria in marine hydrothermal vents. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4061-4068.
- Harvey, H.R., Fallom, R.D., Patton, J.S. (1986). The effect of organic matter and oxygen on the degradation of bacterial membrane lipids in marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 50, 795-805.
- Harwood, C.S., Parales, R.E. (1996). The  $\beta$ -ketoacid pathway and the biology of self-identity. *Annual Review in Microbiology* 50, 553-559.
- Hedges, J.I., Stern, J.H. (1984). Carbon and nitrogen determinations of carbonate-containing solids. *Limnology and Oceanography* 29, 657-663.
- Heezen B.C., Ewing, M. (1963). The Mid Oceanic Ridge. In: Hill, M.N. (ed.) *The Seas* 3. Interscience, New York, pp. 388-410.
- Heider, J., Spormann, A.M., Beller, H.R., Widdel, F. (1999). Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews* 22, 459-473.
- Hong, H., Xu, L., Zhang, L., Chen, J.C., Wong, Y.S., Wan, T.S.M. (1995). Environmental fate and chemistry of organic pollutants in the sediments of Xiamen harbor and Victoria harbor. *Marine Pollution Bulletin* 31, 229-236.

- Horton, C., Clifford, M., Schmitz, J. (1997). A real-time oceanographic nowcast/forecast system for the Mediterranean Sea. *Journal of Geophysical Research* 102, 25123-25156.
- Hübner, A. (2002). Geochemical and mineralogical investigation of sediments from the anoxic, hypersaline Urania basin (eastern Mediterranean) to characterize marine sedimentation under extreme conditions. Ph.D. Thesis, Fachbereich Geowissenschaften, Freie Universität Berlin.
- Hübner, A., De Lange, G.J., Dittmer, J., Halbach, P. (2003). Geochemistry of an exotic sediment layer above sapropel S-1: mud expulsion from the Urania Basin, eastern Mediterranean? *Marine Geology* 197, 49-61.
- Ignatiades, L. (1969). Annual cycles, species diversity and succession of phytoplankton in lower Saronikos Bay, Aegean Sea. *Marine Biology* 3, 196-200.
- Imhoff, J.F., Bias-Imhoff, U. (1995). Lipids, quinines and fatty acids of anoxygenic phototrophic bacteria. In: Blankenship, R.E., Madigan, M.T., Bauer, C.E. (eds.) *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Adv. Photosynth., vol. 2. Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, pp. 179-205.
- Imhoff, J.F., Suling, J., Petri, R. (1998). Phylogenetic relationships among the *Chromatiaceae*, their taxonomic reclassification and description of the new genera *Allochromatium*, *Halochromatium*, *Isochromatium*, *Marichromatium*, *Thiococcus*, *Thiohalocapsa* and *Thermochromatium*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 1129-1143.
- Jahnke, R.A., Reimers, C.E., Craven, D.B. (1990). Intensification of recycling of organic matter at the sea floor near ocean margins. *Nature* 348, 50-54.
- Jannasch, H.W. (1985). The chemosynthetic support of life and the microbial diversity at deep-sea hydrothermal vents. *Proceeding in R. Social London* 225, 277-297.
- Jannasch, H.W., Nelson, D.C., Wirsén, C.O. (1989). Massive natural occurrence of unusually large bacteria (*Beggiatoa* sp.) at a hydrothermal deep-sea vent site. *Nature* 342, 834-836.
- Jeng, W.-L., Huh, C.-A. (2004). Lipids in suspended matter and sediments from the East China Sea Shelf. *Organic Geochemistry* 35, 647-660.
- Jongsma, D., Fortuin, A.R.W., Huson, S.R., Troelstra, G.T., Klaver, G., Peters, J.M., van Harten, D., De Lange, G.J., ten Haven, H.L. (1983). Discovery of an anoxic basin within the Strabo Trench, eastern Mediterranean. *Nature* 305, 795-797.

- Jørgensen, B.B. (1983). Processes at the sediment-water interface. In: Bolin, B., Cook, R.B. (eds.) *The Major Biogeochemical Cycles and Their Interaction*, John Wiley, Chichester, pp. 477-515.
- Jørgensen, B.B., Revsbech, N.P. (1989). Oxygen uptake, bacterial distribution and carbon-nitrogen-sulfur cycling in sediments from the Baltic Sea-North Sea transition. *Ophelia* 31, 29-49.
- Junca, H., Pieper, D.H. (2003). Amplified functional DNA restriction analysis to determine catechol 2,3-dioxygenase gene diversity in soil bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 55, 697-708.
- Kaneda, T. (1977). Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched chain preference. *Bacteriology Reviews* 41, 391-418.
- Karageorgis, A.P., Anagnostou, C.L. (2001). Particulate matter spatial-temporal distribution and associated surface sediment properties: Thermaikos Gulf and Sporades Basin, NW Aegean Sea. *Continental Shelf Research* 21, 2141-2153.
- Katayama-Fujimura, Y., Tsuzaki, N., Kuraishi, H. (1982). Ubiquinone, fatty acid and DNA base composition determination as a guide to the taxonomy of the genus *Thiobacillus*. *Journal of General Microbiology* 128, 1599-1611.
- Kato, C., Li, L., Tamaoka, J., Horikoshi, K. (1997). Molecular analyses of the sediment of the 11,000-m deep Mariana Trench. *Extremophiles* 1, 117-23.
- Kieft, T.L., Ringelberg, D.B., White, D.C. (1994). Changes in ester-linked phospholipids fatty acid profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 3299-3299.
- Kieft, T.L., Wilch, E., O'Connor, K., Ringelberg, D.B., White, D.C. (1997). Survival and phospholipids fatty acid profiles of surface and subsurface bacteria in natural sediment microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1531-1542.
- Koizumi, Y., Kojima, H., Fukui, M. (2003). Characterization of depth-related microbial community structure in lake sediment by denaturing gradient gel electrophoresis of amplified 16S rDNA and reversely transcribed 16S rRNA fragments. *FEMS Microbiology Ecology* 46, 147-157.
- Krom, M.D., Brenner, S., Kress, N., Gordon, L.I. (1991). Phosphorous limitation of primary productivity in the Eastern Mediterranean Sea. *Limnology and Oceanography* 36, 424-432.



- Kuenen, J.G., Bos, P. (1987). Habitats and ecological niches of chemolitho(auto)trophic bacteria. In Schlegel, H.G., Bowien, B. (eds.) *Autotrophic Bacteria*, Brock/Springer Series in Contemporary Biosciences, Science Tech Publishers, Madison. pp. 53-80.
- Kuhner, M.K., Felsenstein, J. (1994). A simulation comparison of phylogeny algorithms under equal and unequal evolutionary rates. *Molecular Biology and Evolution* 11, 459-468 (*Erratum* 12, 525, 1995).
- Kulbusch, T.A.J. (1995). Method for determining black carbon in residues of vegetation fires. *Environmental Science and Technology* 29, 2695-2702.
- Lallemant, S., Truffert, C., Jolivet, L., Henry, P., Chamot-Rooke, N., de Voogd, B. (1994). Spatial transition from compression to extension in the Western Mediterranean Ridge accretionary complex. *Tectonophysics* 234, 33-52.
- Lampadariou, N. (2001). Study of meiobenthic ecosystem of the Aegean Sea with a special emphasis on nematodes. PhD Thesis, Biology Department, University of Crete, Heraklion, Greece, pp. 44.
- Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, Goodfellow, M., (eds.) *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, Wiley and Sons, Chichester, pp. 115-175.
- Lane, D.L., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., Pace, N.R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceeding National Academy of Sciences USA* 82, 6955-6959.
- Langezaal, A.M., Ernst, S.R., Haese, R.R., van Bergen, R.F., van der Zwaan, G.J. (2003). Disturbance of intertidal sediments: the response of bacteria and foraminifera. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 58, 249-264.
- Lascaratos, A., Roether, W., Nittis, K., Klein, B. (1999). Recent changes in deep water formation and spreading in the eastern Mediterranean Sea: a review. *Progress in Oceanography* 44, 5-36.
- Le Pichon, X., Lallemant, S.J., Chamot-Rooke, N., Lemeur, D., Pascal, G. (2002). The Mediterranean Ridge backstop and the Hellenic nappes. *Marine Geology* 186, 111-125.
- Le Pichon, X., Lyberis, N., Angelier, J., Renard, V. (1982). Strain distribution over the Mediterranean Ridge: a synthesis incorporating new Sea-Beam data. *Tectonophysics* 86, 243-274.

- Li, L., Kato, C., Horikoshi, K. (1999<sup>o</sup>). Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths. *Biodiversity and Conservation* 8, 659-677.
- Li, L., Kato, C., Horikoshi, K. (1999b). Microbial diversity in sediments collected from the deepest cold-seep area, the Japan Trench. *Marine Biotechnology* 1, 391-400.
- Lindström, E.S. (1998). Bacterioplankton community composition in a boreal forest lake. *FEMS Microbiology Ecology* 27, 163-174.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H., Forney, L.J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16s rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4516-4522.
- Lopez-Garcia, P., Rodriguez-Valera, F., Pedros-Allo, C., Moreira, D. (2001). Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature* 409, 603-607.
- Lorenzen, C., Jeffrey, J. (1980). Determination of chlorophyll in sea water. *UNESCO Technical Papers in Marine Science* 35, 1-20.
- Ludwig, W., Bauer, S.H., Bauer, M., Held, I., Kirchhof, G., Schulze, R., Huber, I., Spring, S., Hartmann, A., Schleifer, K.H. (1997). Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. *FEMS Microbiology Letters* 153, 181-190.
- Ludwig, W., Probst, J.L., Kempe, S. (1996). Predicting the oceanic input of organic carbon by continental erosion. *Global Biogeochemical Cycles* 10, 23-42.
- MacGillivray, A.R., Shiaris, M.P. (1994). Relative Role of Eukaryotic and Prokaryotic Microorganisms in Phenanthrene Transformation in Coastal Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 1154-1159.
- Mackin, J.E., Aller, R.C., Vigil, H., Rude, P. (1991). Nutrient and dissolved oxygen fluxed across the sediment-water interface. In: Cochran, J.K., et al. (eds.) Long Island Sound Study: Sediment Geochemistry and Biology, EPA Final Report CE 002870026, Section IV, pp. 1-252.
- Macnaughton, S.J., Stephen, J.R., Venosa, A.D., Davis, G.A., Chang, Y.J., White, D.C. (1999). Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3566-3574.
- Madrid, V.M., Aller, J.Y., Aller, R.C., Chistoserdov, A.Y. (2001). High prokaryote diversity and analysis of community structure in mobile mud deposits off French

- Guiana: identification of two new bacterial candidate divisions. *FEMS Microbiology Ecology* 37, 197-209.
- Maidak, B.L., Cole, J.R., Lilburn, T.G., Parker, C.T., Saxman, JrP.-R., Farris, R.J., Garrity, G.M., Olsen, G.J., Schmidt, T.M., Tiedje, J.M. (2001). The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res* 29, 173-174.
- Maidak, B.L., Cole, J.R., Parker, C.T.Jr., Garrity, G.M., Larsen, N., Li, B., Lillburn, T.G., McCaughey, M.J., Olsen, G.J., Overbeek, R., Pramanik, S., Schmidt, T.M., Tiedje, J.M., Woese, C.R. (1999). A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Research* 27, 171-173.
- Makula, R.A. (1978). Phospholipid composition of methane-utilizing bacteria. *Journal of Bacteriology* 134, 771-777.
- Malanotte-Rizzoli, P., Hecht, A. (1988). Large-scale properties of the Eastern Mediterranean: a review. *Oceanologica Acta* 11, 323-335.
- Malanotte-Rizzoli, P., Manca, B., Ribera d'Alcala, M., Theocharis, A., Bergamasco, A., Bregant, D., Budillon, G., Civitarese, G., Georgopoulos, D., Michelato, A., Sansone, E., Scarazzato, P., Souvermezoglou, E. (1997). A synthesis of the Ionian Sea hydrography, circulation and water mass pathways during POEN-Phase I. *Progress in Oceanography* 39, 153-204.
- Martin, W.R., Sayles, F.L. (2004). Organic matter cycling in sediments of the continental margin in the northwest Atlantic Ocean. *Deep-Sea Research I* 51, 457-489.
- Martz, R.F., Sebacher, D.L., White, D.C. (1983). Biomass measurement of methane-forming bacteria in environmental samples. *Journal of Microbiological Methods* 1, 53-61.
- Masiello, C.A., Druffel, E.R.M. (1998). Black carbon in deep sea sediments. *Science* 280, 1911-1913.
- Massana, R, Jürgens, K. (2003). Composition and population dynamics of planktonic bacteria and bacterivorous flagellates in seawater chemostat cultures. *Aquatic Microbial Ecology* 32, 11-22.
- McCaffrey, M.A., Farrington, J.W., Repeta, D.J. (1991). The organic geochemistry of Peru margin surface sediments: II. Paleoenvironmental implications of hydrocarbon and alcohol profiles. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 55, 483-498.

- Medinaut/Medineth Shipboard Scientific Parties (2000). Linking Mediterranean Brine pools and Mud Volcanism. *EOS Transactions-American Geophysical Union* 81, 625-632.
- Medriff Consortium. (1995). Three brine lakes discovered in the seafloor of the eastern Mediterranean. *EOS Transactions, American Geophysical Union* 76, 313-318.
- Mesarch, M.B., Nakatsu, C.H., Nies, L. (2000). Development of catechol 2,3-dioxygenase-specific primers for monitoring bioremediation by competitive quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 678-683.
- Middelburg, J.J., Nieuwenhuize, J., van Breugel, P. (1999). Black carbon in marine sediments. *Marine Chemistry* 65, 245-252.
- Moeseneder, M.M., Arrieta, J.M., Muyzer, G., Winter, C., Herndl, G.J. (1999). Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3518-3525.
- Moore, R.L. (1981). The biology of *Hyphomicrobium* and other prosthecate, budding bacteria. *Annual Review in Microbiology* 35, 567-594.
- Morasch, B., Richnow, H.H., Schink, B., Meckenstock, R.U. (2001). Stable hydrogen and carbon isotope fractionation during microbial toluene degradation: mechanistic and environmental aspects. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4842-4849.
- Moyer, C.L. (2001). Molecular Phylogeny: applications and implications for marine microbiology. In: Paul, J.H. (ed.) *Methods in Microbiology*, San Diego, Marine Microbiology, Academic Press, pp. 375-394.
- Muyzer, G. (1998). Structure, function and dynamics of microbial communities: the molecular biological approach. *Advances in Molecular Ecology* 87-117.
- Muyzer, G. (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 2, 317-322.
- Muyzer, G., DeWaal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695-700.

- Nedwell, D.B., Walker, T.R., Ellis-Evans, J.C., Clarke, A. (1993). Measurements of seasonal rates and annual budgets of organic carbon fluxes in an Antarctic coastal environment at Signy Island, South Orkney Islands, suggest a broad balance between production and decomposition. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3989-3995.
- Nogales, B., Moore, E.R.B., Llobet-Brossa, E., Rossello-Mora, R., Amann, R., Timmis, K.N. (2001). Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1874-1884.
- Nogi, Y., Kato, C. (1999). Taxonomic studies of extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench and description of *Moritella yayanosii* sp. nov., a new barophilic bacterial isolate. *Extremophiles* 3, 71-77.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W., Backhaus, H. (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNA in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology* 178, 5636-5643.
- Oliver, J.D., Colwell, R.R. (1973). Extractable lipids of gram-negative marine bacteria: fatty acid composition. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 23, 442-458.
- Parker, C.A., O'Reilly J.E. (1991). Oxygen depletion in Long Island sound: A historical perspective. *Estuaries* 14, 248-264.
- Parkes, R.J., Taylor, J. (1983). The relationship between fatty acid distribution and bacterial respiratory types in contemporary marine sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 16, 173-189.
- Philp, R.P. (1985). Fossil fuel biomarkers: applications and spectra. Elsevier, Amsterdam.
- Phillips, C.J., Smith, Z., Embley, T.M., Prosser, J.L. (1999). Phylogenetic differences between particle-associated and planktonic ammonia-oxidizing bacteria of the  $\beta$  subdivision of the class *Proteobacteria* in the Northwestern Mediterranean Sea. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 779-786.
- Pichinoty, F., Asselineau, J., Mandel, M. (1984). Caractérisation biochimique de *Bacillus benzoovorans* sp. nov., une nouvelle espèce filamenteuse, engainée et mésophile, dégradant divers acides aromatiques et phénols. *Annual Microbiology* 135B, 209-217.

- Pinturier-Geiss, L., Méjanelle, L., Dale, B., Karlsen, D.A. (2002). Lipids as indicators of eutrophication in marine coastal sediments. *Journal of Microbiological Methods* 48, 239-257.
- Polymenakou, P.N., Bertilsson, S., Tselepides, A., Stephanou, E.G. (2005a). Links between geographic location, environmental factors and microbial community composition in sediments of the Eastern Mediterranean Sea. *Microbial Ecology* In press
- Polymenakou, P.N., Pusceddu, A., Tselepides, A., Polychronaki, T., Giannakourou, A., Danovaro, R., Fiordelmondo, C., Hatziyanni, E. (2005b). Benthic microbial abundance and activities in an intensively trawled ecosystem (Thermaikos Gulf, Aegean Sea). *Continental Shelf Research*, submitted
- Polymenakou, P.N., Bertilsson, S., Tselepides, A., Stephanou, E.G. (2005c). Bacterial community composition in sediments from the Eastern Mediterranean Sea: a comparison of four 16S rDNA clone libraries. *Microbial Ecology*, In press
- Polymenakou, P.N., Stephanou, E.G., Tselepides, A. (2005d). *n*-Alkanes and microbial community fatty acid profiling along a salinity and oxic/anoxic gradient in deep-sea sediments from the South Ionian Sea (Eastern Mediterranean). Submitted
- Polz, M.F., Cavanaugh, C.M. (1998). Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3724-3730.
- Postma, H. (1988). Tidal flat areas. In: Jansson, B.O. (ed.) *Lecture Notes on Coastal and Estuarine Studies*. Vol. 22. Springer, Berlin. pp. 103-121.
- Poulos, S.E., Chronis, G.Th., Collins, M.B., Lykousis, V. (2000). Thermaikos Gulf Coastal System, NW Aegean Sea: an overview of water / sediment fluxes in relation to air-land-ocean interactions and human activities. *Journal of Marine Systems* 25, 47-76.
- Poulos, S.E., Drakopoulos, P.G., Collins, M.B. (1997). Seasonal variability in sea surface oceanographic conditions in the Aegean Sea (Eastern Mediterranean): an overview. *Journal of Marine Systems* 13, 225-244.
- Prince, R.C., Elmendorf, D.L., Lute, J.R., Hsu, C.S., Halth, C.E., Senius, J.D., Dechert, G.J., Douglas G.S., Butler, E.L. (1994).  $17\alpha(H),21\beta(H)$ -Hopane as a conserved internal marker for estimating the biodegradation of crude oil. *Environmental Science and Technology* 28, 142-145.

- Rabinowitz, P.D., Ryan, W.B.F. (1970). Gravity anomalies and crustal shortening in the Eastern Mediterranean. *Tectonophysics* 10, 585-608.
- Rajendran, N., Matsuda, O., Rajendran, R., Urushigawa, Y. (1997). Comparative description of microbial community structure in surface sediments of eutrophic bays. *Marine Pollution Bulletin* 34, 26-33.
- Rajendran, N., Suwa, Y., Urushigawa, Y. (1993). Distribution of phospholipids ester-linked fatty acid biomarkers for bacteria in the sediment of Ise Bay, Japan. *Marine Chemistry* 42, 39-56.
- Ratledge, C., Wilkinson, S.G. (1988). An overview of microbial lipids. In: Microbial lipids, Academic Press, London, Vol.I., pp. 3-22.
- Ravenschlag, K., Sahm, K., Pernthaler, J., Amann, R. (1999). High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3982-3989.
- Reichenbach, H., Dworkin, M. (1992). The myxobacteria. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (eds.) *The Prokaryotes*, Springer-Verlag, New York, NY, pp. 3416-3487.
- Rimoldi, B., Alexander, J., Morris, S. (1996). Experimental turbidity currents entering density-stratified water: analogues for turbidites in Mediterranean hypersaline basins. *Sedimentology* 43, 527-540.
- Ringelberg, D.B., Sutton, S., White, D.C. (1997). Biomass, bioactivity and biodiversity: microbial ecology of the deep subsurface: analysis of ester-linked phospholipid fatty acid. *FEMS Microbiology Reviews* 20, 371-377.
- Rütters, H., Sass, H., Cypionka, H., Rullkötter, J. (2002a). Phospholipid analysis as a tool to study complex microbial communities in marine sediments. *Journal of Microbiological Methods* 48, 149-160.
- Rütters, H., Sass, H., Cypionka, H., Rullkötter, J. (2002b). Microbial communities in a Wadden Sea sediment core-clues from analyses of intact glyceride lipids and release fatty acids. *Organic Geochemistry* 33, 803-816.
- Ryan, W.B.F., Kasterns, K.A., Cita, M.B. (1982). Geological evidence concerning tectonics in the Eastern Mediterranean. *Tectonophysics* 86, 213-242.
- Salot, A., Laureillard, J., Scribe, P., Sicre, M.A. (1991). Evolutionary trends in the lipid biomarker approach for investigating the biogeochemistry of organic matter in the marine environment. *Marine Chemistry* 36, 233-248.

- Santegoeds, C.M., Nold, S.C., Ward, D.M. (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis used to monitor the enrichment culture of aerobic chemoorganotrophic bacteria from a hot spring cyanobacterial mat. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3922-3928.
- Sass, A.M., Sass, H., Coolen, M.J.L., Cypionka, H., Overmann, J. (2001). Microbial communities in the chemocline of a hypersaline deep-sea basin (Urania Basin, Mediterranean Sea). *Applied and Environmental Microbiology* 67, 5392-5402.
- Schijf, J., De Baar, H.J.W., Millero, F.J. (1995). Vertical distributions and speciation of dissolved rare earth elements in the anoxic brines of Bannock Basin, eastern Mediterranean Sea. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59, 3285-3299.
- Schulze, E.D., Wirth, C., Heimann, M. (2000). Managing forests after Kyoto. *Science* 289, 2058-2059.
- Sekiguchi, H., Watanabe, M., Nakahara, T., Xu, B., Uchiyama, H. (2002). Succession of bacterial community structure along the Changjiang river determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5142-5150.
- Shokes, R.F., Trabant, P.K., Presley, B., Reid, D.F. (1977). Anoxic, hypersaline basin in the northern Gulf of Mexico. *Nature* 196, 1443-1446.
- Sievert, S.M., Brinkhoff, T., Muyzer, G., Ziebis, W., Kuever, J. (1999). Spatial heterogeneity of bacterial populations along an environmental gradient at a shallow submarine hydrothermal vent near Milos Island (Greece). *Applied Environmental Microbiology* 65, 3834-3842.
- Sievert, S.M., Kuever, J., Muyzer, G. (2000). Identification of 16S ribosomal DNA-defined bacterial populations at a shallow submarine hydrothermal vent near Milos Island (Greece). *Applied Environmental Microbiology* 66, 3102-3109.
- Simoneit, B.R.T. (1999). A review of biomarker compounds as source indicators and tracers for air pollution. *Environmental Science and Pollution* 6, 159-169.
- Smith, P.F. (1988). Archaeobacteria and other specialized bacteria. In: Ratledge, C., Wilkinson, S.G., (eds.) *Microbial Lipids*. Academic Press, London, pp. 299-488.
- Smoot, J.C., Findlay, R.H. (2001). Spatial and seasonal variation in a reservoir sedimentary microbial community as determined by phospholipids analysis. *Microbial Ecology* 42, 350-358.



- Song, B., Kerkhof, L.J., Häggblom, M.M. (2002). Characterization of bacterial consortia capable of degrading 4-bromobenzoate under denitrifying conditions. *FEMS Microbiology Letters* 213, 183–188.
- Sorokin, D.Y., Lysenko, A.M., Mityushina, L.L., Tourova, T.P., Jones, B.E., Rainey, F.A., Robertson, L.A., Kuenen, G.J. (2001). *Thioalkalimicrobium aerophilum* gen. nov., sp. nov. and *Thioalkalimicrobium sibericum* sp. nov., and *Thioalkalivibrio versutus* gen. nov., sp. nov., *Thioalkalivibrio nitratis* sp. nov., novel and *Thioalkalivibrio denitrificans* sp. nov., novel obligately alkaliphilic and obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria from soda lakes. *International Journal of Systematic Evolutional Microbiology* 51, 565-580.
- Staay, S.Y.M.-v.d., Wachter, R.D., Vaultot, D. (2001). Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature* 409, 607-610.
- Staley, J.T., Konopka, A. (1985). Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review in Microbiology* 39, 321-349.
- Staley, J.T., Gosink, J.J. (1999). Poles apart: biodiversity and biogeography of sea ice bacteria. *Annual Review in Microbiology* 53, 189-215.
- Stratford, D.C. (1977). *An Atlas of Medical Microbiology: Common Human Pathogens*, Blackwell Scientific, Edinburg.
- Strunk, O., Ludwig, W. (1996). ARB: A software environment for sequence data, 2.1.1. Department of Microbiology, Technical University of Munich, Munich
- Suzuki, M.T., DeLong, E.F. (2002). Marine Prokaryote Diversity. In: Staley, J.T., Reysenbach, A.L., (eds.) *Biodiversity of Microbial Life*. Wiley-Liss, NewYork, pp. 209-234.
- Suzuki, M., Giovannoni, S.J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 625-630.
- Tamegai, H., Li, L., Masui, N., Kato, C. (1997). A denitrifying bacterium from the deep sea at 11,000-m depth. *Extremophiles* 1, 207-211.
- Taylor, J., Parkes, R.J. (1983). The cellular fatty acids of the sulfate reducing bacteria, *Desulfobacter* sp., *Desulfobulbus* sp, and *Desulfovibrio desulfuricans*. *Journal of General Microbiology* 129, 3303-3309.
- Teece, M.A., Getliff, J.M., Leftley, J.W., Parkes, R.J., Maxwell, J.R. (1998). Organic degradation of the marine prymnesiophyte *Emiliana huxleyi* under oxic and

- anoxic conditions as a model for early diagenesis: long chain alkadienes, alkenones and alkyl alkenoates. *Organic Geochemistry* 29, 863-880.
- Teske, A., Hinrichs, K.-U., Edgcomb, V., de Vera Gomez, A., Kysela, D., Sylva, S.P., Sogin, M.L., Jannasch, H.W. (2002). Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas basin: evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1994-2007.
- Theocharis, A., Balopoulos, E., Kioroglou, S., Kontoyiannis, H., Iona, A. (1999). A synthesis of the circulation and hydrography of the South Aegean Sea and the Straits of the Cretan Arc (March 1994-January 1995). *Progress in Oceanography* 44, 469-509.
- Theocharis, A., Georgopoulos, D., Lascaratos, A., Nittis, K. (1993). Water masses and circulation in the central region of the Eastern Mediterranean: Eastern Ionian, South Aegean and Northwest Levantine, 1986-87. *Deep-Sea Research, Part II* 40, 1121-1142.
- Theocharis, A., Klein, B., Nittis, K., Roether, W. (2002). Evolution and status of the Eastern Mediterranean Transient (1997-1999). *Journal of Marine Systems* 33-34, 91-116.
- Thiele, O.W. (1979). Lipide, Isoprenoide mit Steroiden. Thieme Verlag, Stuttgart, p. 415.
- Thompson, J.R., Marcelino, L.A., Polz, M.F. (2002). Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequences and elimination by 'reconditioning PCR'. *Nucleic Acids Research* 30, 2083-2088.
- Tolosa, I., Bayona, J.M., Albaiges, J. (1996). Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons and sulfur/oxygen derivatives in Northwestern Mediterranean sediments: spatial and temporal variability, fluxes and budgets. *Environmental Science and Technology* 30, 2495-2503.
- Tolosa, I., de Mora, S., Sheikholeslami, M.S., Villeneuve, J.-P., Bartocci, J., Cattini, C. (2004). Aliphatic and aromatic hydrocarbons in coastal Caspian Sea sediments. *Marine Pollution Bulletin* 48, 44-60.
- Torsvik, V., Øvreås, L., Thingstad, T.F. (2002). Prokaryotic diversity – Magnitude, dynamics and controlling factors. *Science* 296, 1064-1066.
- Torsvik, V., Lise Daae, F., Sandaa, R.-A., Øvreås, L. (1998). Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology* 64, 53-62.

- Truffert, C., Chamot-Rooke, N., Lallemand, S., de Voogd, B., Huchon, P., Le Pichon, X. (1993). The crust of the Western Mediterranean Ridge from deep seismic data and gravity modelling. *Geophysical Journal, International* 114, 360-372.
- Tselepides, A. (1992). Ecological study of the bathyal ecosystem of the Aegean Sea. PhD Thesis, Biology Department, University of Crete, Heraklion, Greece.
- Tselepides, A., Lampadariou, N. (2004). Deep-sea meiofaunal community structure in the Eastern Mediterranean: are trenches benthic hotspots? *Deep-Sea Research I*, 51, 833-847.
- Tselepides, A., Zervakis, V., Polychronaki, T., Danovaro, R., Chronis, G. (2000). Distribution of nutrients and particulate organic matter in relation to the prevailing hydrographic features of the Cretan Sea (NE Mediterranean). *Progress in Oceanography* 46, 113-142.
- U.S. Environmental Protection Agency. (1999). Use of monitored natural attenuation of Superfund, RCRA corrective action, and underground storage tank sites. Directive 9200.4-17P. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- Urakawa, H., Kita-Tsukamoto, K., Ohwada, K. (1999). Microbial diversity in marine sediments from Sagami bay and Tokyo bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology* 145, 3305-3315.
- Vallino, J.J., Hoppkinson, C.S., Hobbie, J.E. (1996). Modeling bacterial utilization of dissolved organic matter: optimization replaces Monod growth kinetics. *Limnology and Oceanography* 41, 1591-1609.
- Van der Wielen, P.W.J.J., Bolhuis, H., Borin, S., Daffonchio, D., Corselli, C., Giuliano, L., D'Auria, G., de Lange, G.J., Huebner, A., Varnavas, S.P., Thomson, J., Tamburini, C., Marty, D., McGenity, T.J., Timmis, K.N., BioDeep Scientific Party. (2005). The enigma of prokaryotic life in deep hypersaline anoxic basins. *Science* 307, 121-123.
- Vengosh, A., De Lange, G.J., Starinsky, A. (1998). Boron isotope and geochemical evidence for the origin of Urania and Bannock brines at the eastern Mediterranean: Effect of water-rock interactions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 62, 3221-3228.
- Vengosh, A., Starinsky, A., Anati D.A. (1994). The origin of Mediterranean interstitial waters-relics of ancient Miocene brines: a re-evaluation. *Earth and Planetary Science Letters* 121, 613-627.

- Venkatesan, M.I., Kaplan, I.R. (1982). Distribution and transport of hydrocarbons in surface sediments of the Alaskan outer continental shelf. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 46, 2135-2149.
- Vergin, K.L., Urbach, E., Stein, J.L., DeLong, E.F., Lanoil, B.D., Giovannoni, S.J. (1998). Screening a fosmid library of marine environmental genomic DNA fragments reveals four clones related to members of the order *Planctomycetales*. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3075-3078.
- Vestal, J.R., White, D.C. (1989). Lipid analysis in microbial ecology: quantitative approaches to the study of microbial communities. *BioScience* 39, 535-541.
- Virtue, P., Nichols, P.D., Boon, P.I. (1996). Simultaneous estimation of microbial phospholipid fatty acids and diether lipids by capillary gas chromatography. *Journal of Microbiological Methods* 25, 177-185.
- von Wintzingerode, F., Göbel, U.B., Stackebrandt, E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Ecology* 21, 213-229.
- Volkman, J.K., Holdsworth, D.G., Neil, G.P., Bavor, Jr., H.J. (1992). Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediments. *The Science of Total Environment* 112, 203-219.
- Volkman, J.K., Rojans, D., Rullkötter, J., Scholz-Böttcher, B.M., Liebezeit, G. (2000). Sources and diagenesis of organic matter in tidal flat sediments from the German Wadden Sea. *Continental Shelf Research* 20, 1139-1158.
- Wagner, A., Blackstone, N., Cartwright, P., Dick, M., Misof, B., Snow, P., Wagner, G.P., Bartels, J., Murtha, M., Pendleton, J. (1994). Surveys of gene families using polymerase chain reaction: PCR selection and PCR drift. *Systematic Biology* 43, 250-261.
- Wagner-Dobler, I., Bennisar, A., Vancanneyt, M., Strompl, C., Brummer, I., Einchner, C., Grammel, I., Moore, E.R.B. (1998). Microcosm enrichment of biphenyl-degrading microbial communities from soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3014-3022.
- Wakeham, S.G. (1995). Lipid biomarkers for heterotrophic alteration of suspended particulate organic matter in oxygenated and anoxic water columns of the ocean. *Deep Sea Research II* 42, 1749-1771.
- Wakeham, S.G. (1996). Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in Black Sea sediments. *Marine Chemistry* 53, 187-205.

- Wallmann, K., Aghib, F.S., Castradori, D., Cita, M.B., Suess, E., Greinert, J., Rickert, D. (2002). Sedimentation and formation of secondary minerals in the hypersaline Discovery Basin, eastern Mediterranean. *Marine Geology* 186, 9-28.
- Wang, Z., Fingas, M., Page, D.S. (1999). Oil spill identification. *Journal of Chromatography A* 843, 369-411.
- Ward, D.M., Weller, R., Bateson, M.M. (1990a). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultivated microorganisms in a natural environment. *Nature* 345, 63-65.
- Ward, D.M., Weller, R., Bateson, M.M. (1990b). 16S rRNA sequences reveal uncultured inhabitants of a well-studied thermal community. *FEMS Microbiology Reviews* 75, 105-116.
- White, D.C. (1994). Is there anything else you need to understand about the microbiota that cannot be derived from analysis of nucleic acids? *Microbial Ecology* 28, 163-166.
- White, D.C. (1988). Validation of quantitative analysis for microbial biomass, community structure, and metabolic activity. *Archives of Hydrobiology Erg. Limnology* 31, 1-18.
- White, D.C., Davis, W.M., Nickels, J.S., King, J.D., Bobbie, R.J. (1979). Determination of sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia* 40, 51-62.
- White, D.C., Fredrickson, H.F., Gehron, M.H., Smith, G.A., Martz, R.F. (1983). The groundwater aquifer microbiota: biomass, community structure, and nutritional status. *Device Industrial Microbiology* 24, 189-199.
- White, D.C., Phelps, T.J., Onstott, T.C. (1998). What's up down there? *Current Opinion in Microbiology* 1, 286-290.
- White, D.C., Ringelberg, D.B. (1997). Utility of the signature lipid biomarker analysis in determining the in situ viable biomass, community structure, and nutritional/physiologic status of deep subsurface microbiota. In: Amy, P.S., Haldeman, D.L., (eds.) *The Microbiology of the Terrestrial Deep Subsurface*. Elsevier Science Ltd, CRC, New York, pp. 119-136.
- White, D.C., Stair, J.O., Ringelberg, D.B. (1996). Quantitative comparisons of in situ microbial diversity by signature biomarker analysis. *Journal of Industrial Microbiology* 17, 185-196.

- Wieland, A., Kühl, M., McGowan, L., Fourçans, A., Duran, R., Caumette, P., García de Oteyza, T., Grimalt, J.O., Solé, A., Diestra, E., Esteve, I., Herbert, R.A. (2003). Microbial mats on the Orkney Islands revisited: microenvironment and microbial community composition. *Microbial Ecology* 46, 371-390.
- Wieringa, E.B.A., Overmann, J., Cypionka, H. (2000). Detection of abundant sulfate-reducing bacteria in marine oxic sediment layers by a combined cultivation and molecular approach. *Environmental Microbiology* 2, 417-427.
- Wilson, S., Burns, K., Codi, S. (2001). Identifying sources of organic matter in sediments from a detritivorous coral reef fish territory. *Organic Geochemistry* 32, 1257-1269.
- Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiology Reviews* 51, 221-271.
- Yanagibayashi, M., Nogi, Y., Li, L., Kato, C. (1999). Changes in the microbial community in Japan Trench sediment from a depth of 6292 m during cultivation without decompression. *FEMS Microbiology Letters* 170, 271-279.
- Yentsch, C.S., Menzel, D.W. (1963). A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep-Sea Research* 10, 221-231.
- Yunker, M.B., Macdonald, R.W. (2003). Alkane and PAH depositional history, sources and fluxed in sediments from the Fraser River Basin and Strait of Georgia, Canada. *Organic Geochemistry* 34, 1429-1454.
- Zelles, L. (1999). Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils* 29, 111-129.
- Zhang, C.L. (2002). Stable carbon isotopes of lipid biomarkers: analysis of metabolites and metabolic fates of environmental microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 25-30.
- Zink, K.G., Wilkes, H., Disko, U., Elvert, M., Horsfield, B. (2003). Intact phospholipids-microbial "life markers" in marine deep subsurface sediments. *Organic Geochemistry* 34, 755-769.
- Γώγου, Α. (1998). Μελέτη του βιογεωχημικού κύκλου βιογενών και ανθρωπογενών οργανικών ενώσεων στο θαλάσσιο περιβάλλον της Βορειοανατολικής Μεσογείου. *Διδακτορική Διατριβή*. Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

# ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ Ι





# Microbial Ecology ΥΠΟ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ

## Links between Geographic Location, Environmental Factors and Microbial Community Composition in Sediments of the Eastern Mediterranean Sea

PARASKEVI N. POLYMENAKOU<sup>1,3,\*</sup>, STEFAN BERTILSSON<sup>2</sup>, ANASTASIOS TSELEPIDES<sup>1</sup>, EURIPIDES G. STEPHANOU<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Hellenic Center for Marine Research, Gournes Pediados, GR 71003, Heraklion, Crete, Greece

<sup>2</sup> Department of Limnology, Evolutionary Biology Center, Norbyv. 20, SE-752 36 Uppsala University, Uppsala, Sweden

<sup>3</sup> Environmental Chemical Processes Laboratory, Department of Chemistry, University of Crete, GR 71409, Heraklion, Greece

\* Corresponding author. Mailing address: Hellenic Center for Marine Research, Gournes Pediados, GR 71003, Heraklion, Crete, Greece. Phone.: +30 2810 337855, Fax.: +30 2810 337822 E-mail: polymen@imbc.gr

Received: 21 December 2003 Accepted: 7 April 2004

Running Title: Microbial communities of the Eastern Mediterranean Sea

Keywords: microbial community composition, Denaturing gradient gel electrophoresis, Terminal-restriction fragment length polymorphism, phospholipids-linked fatty acids, Eastern Mediterranean Sea

### Abstract

The bacterial community composition of marine surface sediments originating from various regions of the Eastern Mediterranean Sea (12 sampling sites) was compared by parallel use of three fingerprinting methods: analysis of 16S rRNA gene fragment heterogeneity by denaturing gradient electrophoresis (DGGE), terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and analysis of phospholipid-linked fatty acid composition (PLFA). Sampling sites were located at variable depths (30-2860 m; water column depth above the sediments) and the sediments differed greatly also in their degree of petroleum contamination ( $0.4-18 \mu\text{g g}^{-1}$ ), organic carbon (0.38-1.5 %) and chlorophyll-*a* content ( $0.01 - 7.7 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Despite a high degree of correlation between the three different community fingerprint methods, some major differences were observed. DGGE banding patterns showed a significant separation of sediment communities from the Northern, more productive waters of the Thermaikos Gulf and the oligotrophic waters of the Cretan, S. Ionian and Levantine Sea. T-RFLP analysis clearly separated the communities of deep sediments (> 1494 m depth) from their shallow (< 617 m) counterparts. PLFA analysis grouped a shallow station from the productive waters of the north with the deep oligotrophic sediments from the Ionian and Levantine Sea, with low concentrations of PLFAs, and hence low microbial biomass, as the common denominator. The degree of petroleum contamination was not significantly correlated to the apparent composition of the microbial communities for any of the three methods, whereas organic carbon content and sediment chlorophyll-*a* were important in this regard.

### 1. Introduction

Sediment bacteria play a significant ecological and biogeochemical role in marine ecosystems. This is largely a result of their high abundance (typically  $>10^8$  cells  $\text{ml}^{-1}$ , [18, 19, 58]) relative to the overlying water column and their key function in mediating and regulating the transformation and speciation of major bioactive elements (e.g. carbon, nitrogen,

phosphorus, oxygen and sulfur) in these environments. Sediment bacteria are also key players in the degradation of organic pollutants [1, 9, 28, 37, 60, 61] and represent a major reservoir of genetic variability with a local diversity equal to soil systems [56].

Despite their importance, our knowledge of the bacteria that inhabit sediments is very limited and based primarily on highly selective cultivation studies [10, 54]. In order to study the regional variability and to some extent also the influence of environmental parameters on bacterial community composition in marine sediments, we sampled multiple stations from a variety of regions and depths in the eastern basin of the Mediterranean Sea (Thermaikos Gulf, Cretan Sea, South Ionian Sea, Levantine Sea). The microbial community composition in the sediments was analyzed by three different culture independent techniques: analysis of 16S rRNA gene fragment heterogeneity by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) [42-44] and terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) [20, 39, 40] as well as analysis of phospholipid-linked fatty acid composition (PLFA) [63]. Cultivation-based techniques are less suited for assessing the composition of bacterial communities in natural environments since the dominant fraction of extant microbiota (>99%) escape cultivation [46, 53].

The eastern basin of the Mediterranean Sea is considered to be one of the most oligotrophic regions in the world and is characterized by an overall nutrient deficit [26, 58]. This area is also characterized by a complex bottom geomorphology [27, 45] and dynamic hydrographic and meteorological conditions [6, 32, 55, 58]. The Thermaikos Gulf is mesotrophic and the transport and deposition of particulate matter of riverine origin mainly takes place along the western part of the continental shelf [27]. In contrast, the Cretan Sea is an oligotrophic and very dynamic region from a hydrological and physiographic point of view. The Cretan Basin consists of a narrow continental shelf (1.5° slope) followed by a steep slope (2°-4°) and a rather flat deeper area with depths above 1500 m [14]. The Cretan basin is influenced by the cold and oxygen depleted Trans-Mediterranean water. This water also has a low salinity but is on the other hand quite rich in nutrients flowing in from the Levantine Sea [6, 55]. The South Ionian Sea exchange water with the Levantine basin through the Cretan passage and is also linked to the South Adriatic Sea. Hence the Ionian Sea is the transition basin for the spreading of the deep thermohaline water mass from its source in the southern Adriatic Sea to the Levantine Sea [38]. These features affect the distribution of nutrients and consequently the organic matter production in the euphotic zone which eventually reaches the ocean sea floor to fuel benthic communities [57]. Finally, the sampled regions are exposed to varying degree of anthropogenic influences (e.g. petroleum contamination, [23]) and these features combined are likely to affect not only the chemical composition of the surface sediments, but also the associated microbial communities.

There is a general lack of information regarding microbial community composition in sediments of the Eastern Mediterranean Sea with the only available data retrieved from the extreme hydrothermal vent area near Milos Island (Greece) [12, 49, 50] and the late Pleistocene organic-rich sediments (sapropels) southeast of Crete (Greece) [17]. The available information on geographical variation in sediment microbiota globally is also limited and mostly restricted to 16S rDNA clone library analysis from different deep-sea environments like the Japan Trench [33] or from a comparative study between a sediment lake and a coastal marine basin [11]. The present study represents the first geographical survey of microbial community structure in sediments of the poorly characterized Eastern Mediterranean Sea as well as one of the first studies of geographical variation in sediment bacterial communities in general.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1 Sediment collection and biogeochemical characterization*

Sediment samples were collected from 4 different regions of the Eastern Mediterranean Sea (Figure 1). A Bowers and Connelly Multiple-corer (8 cores, i.d. 9.0 cm) [7] was used to collect undisturbed sediment samples from the Thermaikos Gulf in February 2002 and from the Levantine and Cretan Sea in May and July 2002, respectively. Cores from the South Ionian Sea were collected in November 2001, using an USNEL Boxcorer. All sampling was

carried out onboard the R/V's *Aegaeo* and *Philia*. Mixed surface sediment (0-1 cm) of each sample was used for all analyses. Subsamples for analysis of phospholipids and petroleum hydrocarbons were sealed in aluminum foil and stored at -20°C until further analysis took place, whereas samples for DNA analysis were collected and stored frozen in sterile plastic cups. Sediment redox potential was measured using calibrated combined redox electrodes (Mettler Toledo, Switzerland). Sediment chlorophyll-*a* concentration was determined fluorometrically [36, 64] using a Turner TD-700 fluorometer. Total organic carbon in sediments was analyzed according to Hedges and Stern [25], using a Perkin Elmer CHN 2400 analyser. All measurements were carried out in triplicate. *n*-Alkanes and petroleum hydrocarbons (petroleum H/C; assessed as the sum of *n*-alkanes and unresolved complex mixture - UCM) were Soxhlet extracted from the sediments and fractionated as described by Gogou et al. [22]. Compound identification was performed by GC-MS analysis with authentic standard compounds. 1-chlorohexadecane was used as internal standard for quantification. The GC-MS analysis was carried out on a Hewlett-Packard 6890 GC equipped with a mass-selective detector [22]. The sediments were compared by principal component analysis (PCA) using analyzed environmental parameters (chlorophyll-*a*, organic carbon content, total phospholipids, petroleum hydrocarbons and *n*-alkanes). PCA was carried out using the PRIMER 5.2.2 software package (Plymouth Routines In Multivariate Ecological Research). In addition, the analyzed environmental parameters were transformed into a sediment similarity matrix and a dendrogram was produced using neighbour-joining cluster analysis included in the same software.

### 2.2 Extraction of nucleic acids

Total DNA was extracted from sediments using the FastDNA-Spin Kit for Soil (Q-BIOgene, Carlsbad, CA). Aliquots of 0.5g of fresh sediment were distributed to individual Lysing Matrix tubes included in the extraction kit. DNA extraction was performed according to the protocol provided by the manufacturer with the exception that cell lysis was achieved using a Mini-Beadbeater (Biospec products, Bartlesville OK) set to 5000 rpm over 30 seconds. DNA extracts were stored at -80°C until analysis. Analysis of recovered DNA by 1% agarose gel electrophoresis, ethidium bromide staining and UV-transillumination showed that fragment size typically exceeded 20 kb in length (data not shown). Nucleic acid extracts from each sample were also analyzed spectrophotometrically at 260 and 280 nm using a Lambda-40 spectrophotometer (Perkin Elmer) and Uvette microcuvettes (Eppendorff). The DNA concentration in the extracts was estimated from UV-absorbance according to Sambrook and Russel [47] and varied from 15-107.5 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  in the different extracts.

### 2.3 T-RFLP analysis

T-RFLP was used to assess the genetic heterogeneity of PCR products generated in a mixed-template PCR amplification of 16S rRNA using bacteria-specific primers. In this form, T-RFLP is a culture independent method that provides a fingerprint of the bacterial community composition and has proven to be a reproducible and accurate tool for community analysis [16, 35, 42]. The bacteria-specific primer 27f labeled with hexachlorofluorescein [59] and the universal primer 519r [31] were used in the PCR reactions. For each sample, triplicate 30  $\mu\text{l}$  reactions were set up and PCR amplified using a Stratagene Robocycler with an initial 3 min denaturation at 94°C followed by 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 50°C and 2 min at 72°C followed by a single 10 min extension at 72°C. Each reaction tube contained 1 ng of genomic DNA template, PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH=9, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100 and 2 mM MgCl<sub>2</sub>), 200  $\mu\text{M}$  of each deoxynucleoside triphosphate, 100 nM of each primer and 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA). Replicate PCR products were pooled and purified using a Qiaquick PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA). The concentration of PCR products from the different samples was determined by comparison to a Low DNA Mass ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA) using 2% agarose gel electrophoresis, ethidium bromide staining and UV-transillumination. Approximately 60 ng aliquots of each PCR product was separately digested with the restriction enzymes *HaeIII*, *HhaI* and *RsaI* at 37°C overnight as specified by the manufacturer (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Fragment size was determined on an ABI 3700, 96-capillary sequencer after addition of a <500bp ROX-labelled size marker (Applied Biosystems) to each sample. Terminal restriction fragments were sized and quantified using the GeneScanView 1.1/4 software (C.R.I.B.I., University of Padova) and the patterns derived from different samples were compared pairwise to detect common TRFs. The size standard calls for some of the samples were corrected based on this comparison. Fragments with size differences below 0.5 bases were considered to be identical.

#### 2.4 DGGE analysis

DGGE is a method for electrophoretic separation of various double stranded DNA fragments and is based on differences in duplex melting behavior between genotypes. An approximately 160 base-pair long hypervariable region in the 16S rRNA gene was amplified using PCR conditions identical to the T-RFLP analysis except that the bacterial primer 357F-GC and the universal primer 518R were used [48]. The ability of DGGE to resolve complex mixtures of such short 16S rRNA PCR products is limited [29] but it is still a powerful tool to detect changes in microbial communities within or between habitats [49]. The gel was prepared and run as described previously [48]. PCR products were loaded on an 8% polyacrylamide gel with a 30 - 65 % urea-formamide denaturing gradient and run at 200 V for 6 hours at 60°C, using the gel system DGGE 2000 (CBS Scientific). At least 350 ng of PCR product was loaded in each lane and after the separation, the gel was stained with SYBR Gold® nucleic acid gel stain (Molecular Probes) as recommended by the manufacturer. Documentation of gel images was performed with a GDS 66-1000 system (Tehtum, Umeå, Sweden). Band positions were determined using a ruler placed on the gel image using the software program Adobe Photoshop 7.0. The contrast of the gel image was enhanced using the same program.

#### 2.5 Cluster analysis of DGGE and T-RFLP results

Similarity matrices were prepared separately for the DGGE and T-RFLP results by pairwise comparison of all possible sample combinations using Sorensen's equation as described by Lindström [34] where the similarity  $S = 2J / (N_A + N_B)$ , where J is the number of common bands or terminal restriction fragments in samples A and B, and  $N_A$  and  $N_B$  are the total number of bands in the sample A and B respectively. Similarity matrices were transformed to dendrograms using neighbour-joining cluster analysis included in the Primer 5.2.2 software.

#### 2.6 Total lipid extraction

Total lipids were extracted from aliquots of lyophilized sediment samples (Freeze-Drier-Refrigerant R502) using a method modified from Bligh and Dyer [8]. Three grams of lyophilized sample was extracted by sonication for 5 min in a mixture of chloroform/methanol/phosphate buffer (2:1:0.8 v/v). Subsequently, samples were agitated for 3 hours at 4°C in the dark. Following a centrifugation to pelletize sediment particles, the supernatant was separated in two phases by adding 7.5 ml of chloroform and 7.5 ml of deionized water. The lower chloroform phase that contains the total lipids was evaporated to near dryness.

#### 2.7 PLFA separation and derivatization

Total lipid extracts were separated on columns (0.5 cm inner diameter) packed with 1.0 g of silica gel (Silica gel 60 (0.063-200mm); Merck). Neutral lipids were eluted with 10 ml chloroform, glycolipids were eluted with 20 ml acetone and phospholipids were eluted with 10 ml methanol. Fractions containing phospholipids were evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen and were then diluted in 0.5 ml of a 1:1 solution of toluene and methanol (v/v). Subsequently, the phospholipids were transmethylated under mild alkaline methanolysis (0.2 N methanolic potassium hydroxide). Immediately after addition of 0.5 ml glacial acetic acid (0.2 N), samples were subjected to phase partitioning by addition of 2 ml chloroform and 2 ml deionized water. The organic phase was transferred to a clean glass vial and evaporated to dryness [51].

### 2.8 PLFA analysis and cluster analysis

Gas chromatography-Mass Spectrometry was used to identify and quantify the fatty acid methyl esters (FAME) in the polar fraction. A Hewlett Packard Model 6890 GC equipped with a split-splitless injector was directly coupled to a fused silica capillary column (HP-5 MS with 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness, 30 m $\times$ 0.25 mm I.D.) attached to the ion source. Helium was used as a carrier gas. The chromatographic conditions were the following: injector temperature 270°C; temperature program, 70°C (1 min), 70-140°C (10°C/min), 140-240°C (4°C/min), and 240°C (30 min). 1  $\mu\text{l}$  of each sample was injected in the splitless mode. Identification of individual fatty acids was based on a comparison of retention times to commercially available standards (FAME Mix, Supelco). Quantification was accomplished by using an internal standard (nonadecanoic acid methyl ester) added to each sample. The classical fatty acid terminology is used: *A:B $\omega$ C* where *A* indicates the total number of carbon atoms, *B* the number of unsaturations and *C* the number of carbon atoms between the unsaturations and alpha carbon. The suffixes *c* and *t* represent *cis* and *trans* isomers, respectively. Pair wise comparison of PLFA composition between the environmental samples was used to generate a similarity matrix. Subsequently hierarchical cluster analysis was performed using the PRIMER 5.2.2 software, in the same way as for DGGE and T-RFLP analyses.

### 2.9 Statistical analysis

A Spearman rank correlation (R) was computed between the corresponding elements of each pair of matrices (environmental parameters, DGGE, T-RFLP, PLFA). The significance of the correlations (P) was determined using the 'Second Stage' analysis and the RELATE program included in the PRIMER software. Second stage analysis takes two or more similarity matrices and calculates similarity values using rank correlation, and the results are then copied to a new similarity matrix. The relation between measured environmental variables and microbial community structure was investigated using BIOENV analysis, included in the PRIMER software [15]. BIOENV analyze the correlation between Euclidean distance similarity matrices for environmental variables and the different similarity matrices computed for DGGE, T-RFLP and PLFA analysis. These correlations are repeated for all possible combinations of the measured environmental variables (depth, organic carbon content, chlorophyll-*a*, petroleum hydrocarbons, *n*-alkanes, and phospholipids) and the set of environmental variables that produce the highest correlation are those that most accurately explain the community fingerprints.

## 3. Results

### 3.1 Sediment characteristics

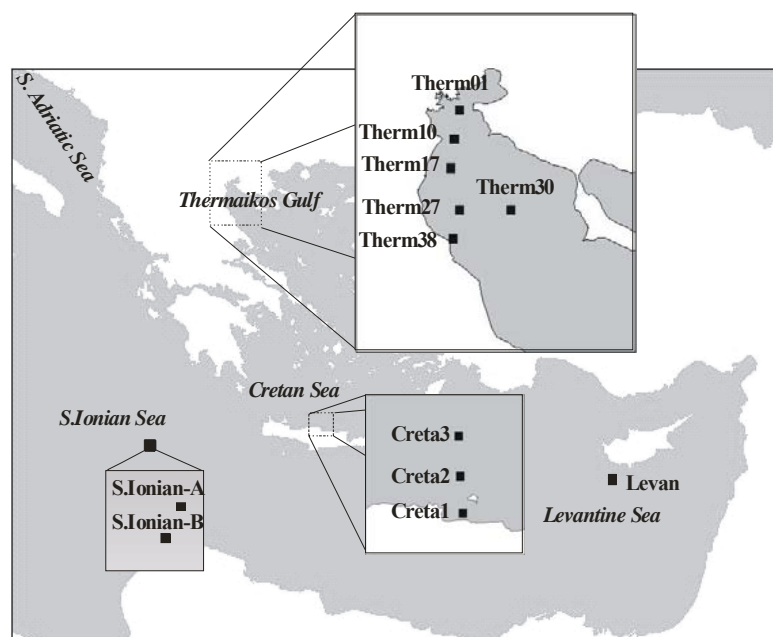
The surface sediments studied were highly oxic as indicated by the positive redox potentials (292-416 mV; Table 1), suggesting that aerobic metabolic processes dominated in the microbial community. The chlorophyll-*a* and organic carbon content varied between the different sediments and there was a strong positive correlation between these two parameters ( $r^2 = 0.79$ ,  $n=12$ ). Chlorophyll-*a* was highest in the Thermaikos Gulf and in the shallowest station of the Cretan Sea (depth  $\leq 100\text{m}$ ) while organic carbon content was highest in the Thermaikos Gulf also and in the deep stations of the South Ionian Sea.

The total concentration of phospholipids was also highest in the shallow stations of the Thermaikos Gulf ( $\leq 51\text{m}$ ) with observed values ranging from 1491 to 2714  $\text{ng g}^{-1}$  (Table 1). Intermediate PLFA concentrations were recorded in the Cretan Sea (524 – 1238  $\text{ng g}^{-1}$ ; Table 1) whereas low values ( $< 219 \text{ng g}^{-1}$ ) were recorded in the South Ionian and the Levantine Sea as well as in the deepest (86 m) station in the Thermaikos Gulf (Table 1). The levels of both petroleum hydrocarbons and *n*-alkanes were clearly highest in sediments from the shallowest station of the Thermaikos Gulf (Therm01; 17856  $\text{ng g}^{-1}$  and 3313  $\text{ng g}^{-1}$  respectively; Table 1). This station is located most closely to the urban area of Thessaloniki Bay (Fig. 1) with strong anthropogenic influences from the Harbour and the city's adjacent industrial zone and with strong riverine inputs that have passed a hydroelectric power dam-construction [27]. The lowest values of *n*-alkanes and petroleum hydrocarbons were found in the Levantine and

Cretan Sea (petroleum H/C: 449–939 ng g<sup>-1</sup> and *n*-alkanes: 105–280 ng g<sup>-1</sup>; Table 1) and in a single station within the Thermaikos Gulf (Therm 27) whereas intermediate levels were found in the South Ionian Sea and the five remaining stations in the Thermaikos Gulf (Table 1).

Hierarchical cluster analysis and PCA were used to compare the different environmental parameters for the different sediments. For the PCA, eigenvalues were developed based on a correlation matrix. The results indicated that 94.3% of the total variance in biogeochemical parameters (chlorophyll-*a*, total organic carbon, total phospholipids, petroleum H/C and *n*-alkanes) can be represented by only two principal components (PC) (results not shown). PC1 explained 78.2% of the total variance and

was strongly dependent on petroleum hydrocarbon concentrations and organic carbon (as well as chlorophyll-*a*) whereas PC2 explained 16.1 % of the total variance and relied mostly on total PLFA concentrations (results not shown). Hierarchical cluster analysis based on the similarity matrices for environmental variables clearly separated station Therm01 from all other stations. The Cretan Sea sediments grouped together as did the S. Ionian sediments, whereas the deepest station from the Thermaikos Gulf (Therm 30) grouped separately from the more shallow sediments of this region (Fig. 2).



**Figure 1.** Geographic locations of sediment sampling stations in the Eastern Mediterranean Sea. Thermaikos Gulf: Therm, Cretan Sea: Creta, Ionian Sea: S.Ionian, Levantine Sea: Levan.

### 3.2 16S rRNA-based analysis of bacterial communities

**Table 1.** Characteristics of surface sediments (0-1 cm) from stations of the Thermaikos Gulf, Cretan Sea, South Ionian and Levantine Sea. Sediment redox potential (Eh) is given in mV. Chlorophyll-*a* (Chl*a*), organic carbon (OC), phospholipid linked fatty acids (PLFA), petroleum hydrocarbons (H/C) and *n*-alkanes are presented relative sediment dry weight

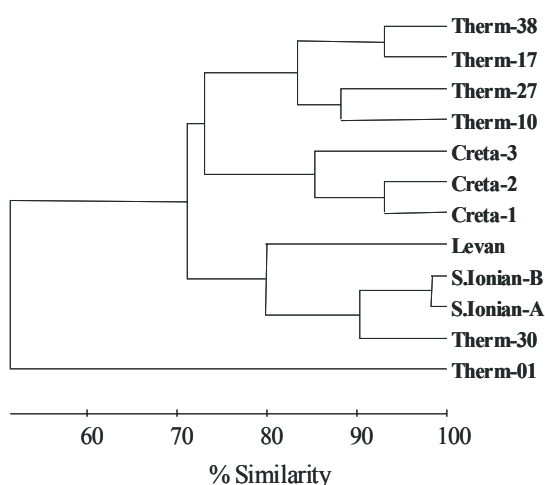
Stations	Depth (m)	Eh (mV)	Chl <i>a</i>		OC		PLFA ng g <sup>-1</sup>	petroleum H/C ng g <sup>-1</sup>	<i>n</i> -alkanes ng g <sup>-1</sup>
			μg g <sup>-1</sup>	stdev	%	stdev			
Therm-01	30	348	7.67	2.75	1.47	0.12	2261	17856	3313
Therm-10	41	292	4.95	0.70	1.04	0.02	1491	1479	387
Therm-17	55	416	4.63	0.39	0.97	0.02	2714	2892	1181
Therm-27	64	359	4.88	0.97	0.94	0.07	2294	846	234
Therm-38	51	405	3.02	0.27	1.01	0.04	1945	2001	1095
Therm-30	86	375	1.22	0.07	0.53	0.04	219	1516	399
Creta-1	100	nd	0.32	0.06	0.45	nd	623	670	147
Creta-2	617	nd	0.06	0.02	0.48	nd	524	939	105
Creta-3	1494	nd	0.02	0.00	0.42	nd	1238	449	130
S.Ionian-A	2790	303	0.05	0.02	0.79	0.07	129	1916	650
S.Ionian-B	2860	277	0.03	0.00	0.78	0.02	96	1876	617
Levan	1780	nd	0.01	0.00	0.38	nd	106	619	280

<sup>a</sup> nd: not determined

A number of different culture independent techniques have been developed, most of which are based on the genetic variability in universally distributed marker genes such as the 16S rRNA gene [3]. Both DGGE and T-RFLP analyses of such universally distributed marker genes provide a representation of the different operational taxonomic units (OTUs) present in a microbial community. Ideally, each distinct band observed in the DGGE and each unique terminal restriction fragment length in the T-RFLP represents an OTU in a community [52].

The reproducibility of the DGGE fingerprints were assessed by comparing the banding patterns in replicate samples subject to independent PCR amplification and DGGE. The comparison showed that the distinct gel-bands that were used for similarity matrix calculations were present in both DGGE analyses. One example of such replicate analysis for Therm 17 is included in Figure 3A (lane 3 and 7). These replicates were 75% similar since 2 bands were missing in lane 7, likely as a result of the lower total amount of PCR product in this sample. In the DGGE analysis, each sample produced between 5 and 11 distinct gel-bands (Fig 3A). The DGGE patterns were similar for all stations within the Thermaikos Gulf with an overall similarity exceeding 78% (Fig. 3B). The patterns obtained for the bacterial communities in the deeper sediments of the Southern part of the region were more variable and had little resemblance to samples from the Thermaikos Gulf (< 33 % similarity; Figure 3B). The cluster analysis also grouped samples from the more pristine Levantine and Cretan Sea and separated them from the more petroleum-rich sediment samples of the South Ionian Sea (Table1) indicating that the level of petroleum contaminants may be of some importance as a regulator of bacterial community structure, at least in the deeper, less organic rich sediments. There are likely many more rRNA-variants in each lane than the 5-11 distinct bands that were detected. Screening of 16S rRNA clone libraries have shown that the number of unique 16S rRNA fragments in some of the studied sediments greatly exceed one hundred variants (Polymenakou et al., unpublished). Most of these different ribotypes could either not be resolved on the rather broad denaturing gradient needed to capture all variants of amplified fragments on the gel, or were not visible on the gel as a result of the rather limited linear dynamic range of this PCR-based fingerprinting method. In addition, the amplified 16S rRNA fragment is rather short and may not contain enough variation to resolve closely related bacteria on a standard DGGE gel.

Hierarchical cluster analysis based on the similarity of the detected T-RFLP patterns arranged the environmental samples in a slightly different way depending on the type of restriction enzyme used. Digestions with *RsaI* produced very few (average 23) terminal restriction fragments (TRFs) with little overlap in the presence of individual TRFs between the samples and therefore these data were excluded from the analysis whereas results from digestions with *HhaI* and *HaeIII* were scrutinized further. Digestions with *HaeIII* produced a very high number of TRFs for each sample (average 71) making peak separation and data analysis difficult and time-consuming. Similar results (excessive number of TRFs after digestion with *HaeIII*) have also been reported in a previous study [16]. *HhaI* digestions generated between 15 and 51 TRFs (average 33) and cluster analysis clearly separated deep samples from the shallow ones. Similar clustering was also obtained using *HaeIII* digestions (a correlation coefficient of 0.81 between *HhaI* and *HaeIII* similarity matrices for the 12 sediments,  $P < 0.001$ ) validating the reproducibility of the T-RFLP method. The combined



**Figure 2.** Cluster analysis dendrogram based on comparison of the environmental characteristics (chl *a*, organic carbon, total phospholipids, petroleum H/C and *n*-alkanes) from the different surface sediment samples.



results from these two digestions were used to calculate similarity matrices presented in Figure 4B.

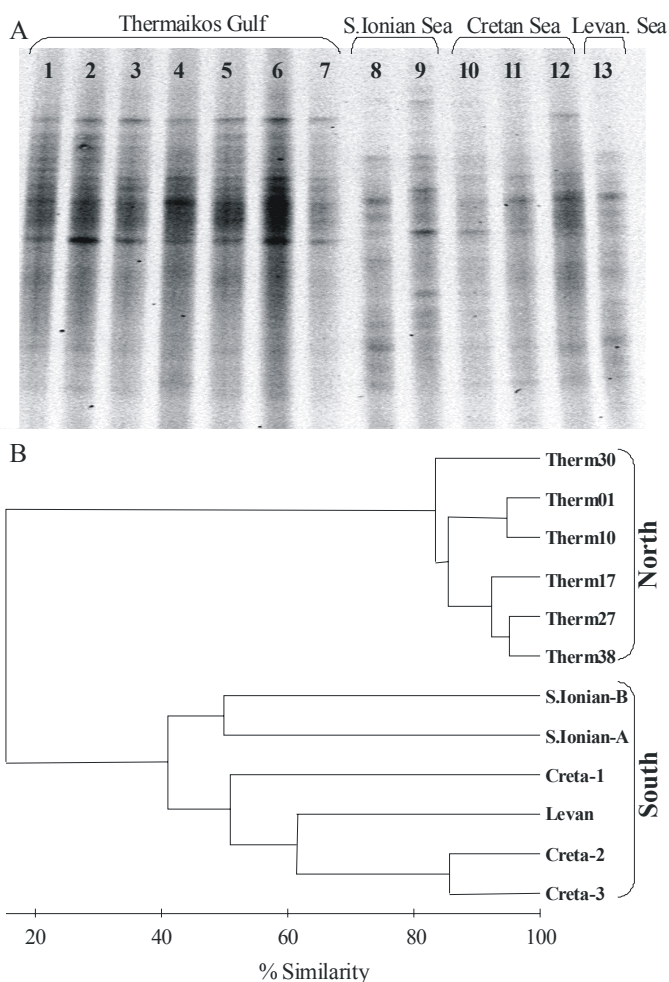
The T-RFLP fingerprinting technique grouped the sediment samples in a slightly different way compared to the DGGE. The first group contained all shallow stations ( $\leq 617$  m depth) while the second group contained the deep ones ( $\geq 1494$  m depth) (Fig. 4B).

### 3.3 PLFA analysis of microbial communities

The use of PLFA analysis to describe microbial communities also depends on the universal distribution of another type of biomarker in microorganisms (e.g. polar lipids present in cellular membranes). Analysis of PLFA composition in marine sediments provides significant information about the structure of microbial communities since some PLFAs are limited to specific bacterial groups whereas the total amount of PLFAs provides an estimate of total microbial biomass [4, 62, 63, 65].

The most abundant saturated fatty acids were C14:0, C15:0, C16:0 and C18:0 whereas the most abundant monounsaturated fatty acids were C15:1, C16:1 and C18:1 (Figure 5A). Low amounts of polyunsaturated fatty acids were observed, indicating a minor or low contribution of microeukaryotes to the total viable microbial communities. The total PLFA content in the sediments ranged from 96 – 2294 ng g<sup>-1</sup> (dry wt sediment; Table 1) with the lowest values recorded in the three deepest stations. These values are almost three times lower than values reported for other environments, probably due to the low organic carbon content in these sediments [10, 24]. The PLFA profiles in the sediments of the Eastern Mediterranean Sea showed a dominant contribution of bacterial lipids to total sedimentary lipids ( $> 79\%$ ), indicating that the microbial communities were dominated by bacteria rather than by eukaryotes or archaea.

The total amount of C20 and C22 polyunsaturated fatty acids (PUFA), which is an indicator of freshly sedimented labile organic material [10], averaged 28 – 165 ng g<sup>-1</sup> for the 5 shallowest stations of the Thermaikos Gulf and in all three stations from the Cretan Sea. On the other hand, the levels recorded from the deepest station of Thermaikos Gulf and the deep stations of the South Ionian and Levantine Sea were close to the detection limit (2.5 – 7.9 ng g<sup>-1</sup>; Table 1). Despite these differences, the overall PLFA patterns were quite similar between



**Figure 3.** (A) Negative image of DGGE patterns from PCR amplified mixed community 16S rDNA obtained for surface sediments (0-1 cm) in the Eastern Mediterranean Sea. Lanes 1-Therm01; 2-Therm10; 3-Therm17; 4-Therm30; 5-Therm38; 6-Therm27 7-replicate of Therm17; 8-S.Ionian-A; 9-S.Ionian-B; 10-Creta-3; 11-Creta-2; 12-Creta-1; 13, Levantine Sea Replicates in lane 3 and 7 were based on separate PCR reactions. (B) Cluster analysis dendrogram based on comparison of DGGE patterns from the different surface sediment samples.

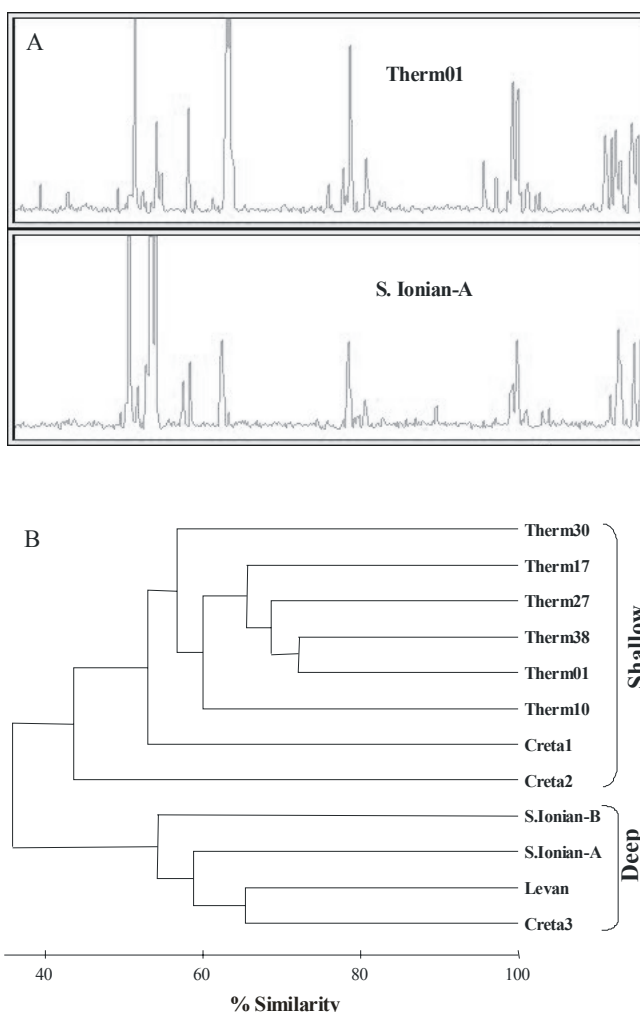


the various locations and depths in the Eastern Mediterranean Sea (Fig. 5A). Therefore, cluster analysis was performed to discriminate between the PLFA profiles in the different environmental samples, taking both PLFA composition and concentrations of individual PLFAs into account (Fig. 5B). The highest similarity was recorded between sediments within the Thermaikos Gulf (95% similarity between the stations Therm27 and Therm38) whereas the lowest similarity was observed between the South Ionian Sea and the Thermaikos Gulf (31% similarity between stations S.Ionian-B and Therm17). For comparison, replicate samples analyzed for the three Cretan Sea samples were between 94 and 97 % similar. Cluster analysis of PLFAs demonstrated major qualitative differences between the four deeper southern sediments characterized by low microbial biomass (e.g. low PLFA content) compared to more shallow northern sediments with higher PLFA content (Figure 5B).

### 3.4 Comparison of the different fingerprinting techniques and correlation to environmental factors

To investigate the degree of similarity between the different sediment similarity matrices based on environmental parameters, DGGE, T-RFLP and PLFA, we used inter-matrix correlations as input data for a ‘second stage’ analysis of similarity (Table 2). Despite the use of different primer pairs, sediment similarity matrices derived from the PCR-based DGGE and T-RFLP fingerprints were highly correlated. The sediment similarity matrix obtained from PLFA analyses were highly correlated to environmental characteristics and to T-RFLP fingerprinting results while correlations between sediment similarity matrices for biogeochemical parameters and DGGE as well as T-RFLP were less strong.

As recommended by Clarke and Ainsworth (1993), all measured environmental parameters were included in the BIOENV analysis without any prior transformations [15]. The highest rank correlation with DGGE data ( $R=0.747$ ; Table 3) were obtained with only two variables, the organic carbon content and the chlorophyll-*a*, while the highest rank correlation for T-RFLP and PLFA results also relied on an additional third variable, e.g. depth or PLFA content, to obtain the highest rank correlation (Table 3). These results point to the key role of the amount and quality of organic matter as regulators of bacterial communities in these sediments.

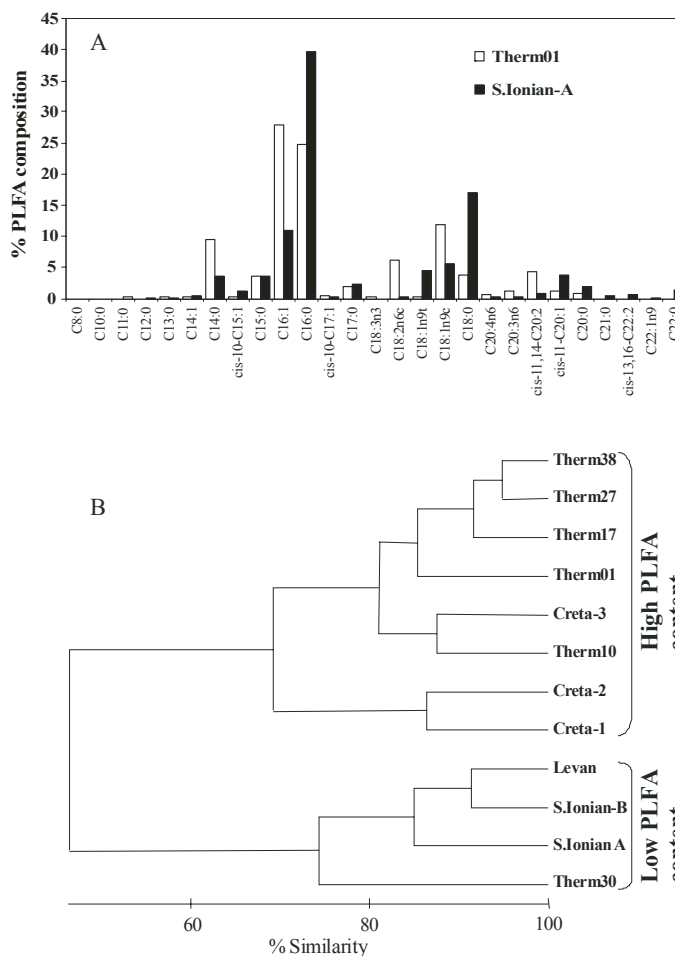


**Figure 4.** (A) Characteristic T-RFLP patterns of PCR amplified mixed-community 16S rRNA digested with *HhaI* obtained for sediments from the Eastern Mediterranean Sea. (B) Cluster analysis dendrogram of T-RFLP pattern similarity using restriction enzymes *HhaI* and *HaeIII*.

#### 4. Discussion

An increasing number of culture-independent techniques have been applied to study microbial communities in marine and freshwater sediments, and this has enabled a more complete assessment of the largely unculturable microbial community that reside in sediments [2, 3, 30]. The use of rapid fingerprinting methods, such as the ones employed in the current study, has become an invaluable and frequently used tool in sampling intensive studies of changes occurring in natural bacterial communities over time, between habitats, or as a result of environmental impact. However, studies that involve parallel use of different fingerprinting methods are so far scarce even if some recent studies have compared multiple methods for community fingerprinting [5, 10, 13, 21, 41-43].

We used three different culture independent techniques (DGGE, T-RFLP and PLFA analysis) to assess the similarity of bacterial communities in biogeochemically variable surface sediments from the Eastern Mediterranean Sea. Among the detected PLFAs, monounsaturated fatty acids made up a dominant pool in most samples, indicating the predominance of aerobic gram-negative bacteria in the analyzed surface sediments [24]. This can be expected in these highly oxidic sediments (Table 1) where aerobic metabolic processes dominate community metabolism. The low phospholipid content in the deeper sediments is likely due to the characteristic low nutrient availability of the Eastern Mediterranean Sea [26, 58], resulting in limited primary production and low sediment burial of organic carbon. The Thermaikos Gulf samples are all shallow and high in chlorophyll and organic carbon content compared to the other studied areas and also had high to intermediate petroleum levels (Table 1). The DGGE banding patterns suggest that the bacterial communities of these sediments were distinct from all the other sediments (Fig. 3). On the other hand the T-RFLP clearly distinguishes the four deepest sediments (> 1494 m) from the more shallow ones (Fig. 4). These deep sediments are all largely inorganic (Table 1). The reason for the slightly different clustering between the two methods is not evident, but one explanation may be that inherent limitations in the resolution of the employed DGGE-method result in DGGE lanes that contain less OTUs (e.g. bands) compared to the number of peaks observed in the individual T-RFLP interpherograms (1.5–8 times more). An alternative explanation is that the capillary-based instrument equipped with laser-induced fluorescence used for T-RF detection is able to detect less abundant ribotypes that cannot be visualized in the DGGE-gel due to a limited linear dynamic range for ribotype detection [42].



**Figure 5.** (A) Characteristic PLFA profiles in surface sediments from two sampling stations (Therm01, S.Ionian A). The dominant fatty acids are C16:1 and C16:0. Similar patterns were also observed for the rest sampling sites (data not shown); (B) Cluster analysis dendrogram of phospholipids profiles.

PLFA analysis grouped the deepest station from the Thermaikos Gulf (Therm 30) together with the extremely deep stations in the South Ionian and Levantine Sea (Fig. 5A). This is in agreement with the biogeochemical characterization of the sediments, e.g. the cluster analysis of sediment characteristics also grouped the deepest station of the Thermaikos Gulf (Therm 30) together with the stations from the South Ionian, Levantine and Cretan Sea (Fig. 2). This is mainly a result of the low chlorophyll-*a*, low total organic carbon and low PLFA content of these sediments. Apparently, the petroleum hydrocarbon levels did not contribute significantly to bacterial community composition since there was no apparent clustering of sediments with high petroleum content for any of the employed fingerprinting techniques (Table 1, Fig. 3-5).

**Table 2.** Spearman rank correlations (numbers in bold) in a ‘Second Stage’ analysis based on sediment sample similarity matrices with respect to biogeochemistry, DGGE, T-RFLP and PLFA characteristics. All correlations are significantly different from zero (P and Rho values in italics).

<b>Spearman rank correlations / P / Rho</b>			
<b>'Second Stage' analysis</b>	<b>DGGE</b>	<b>T-RFLP</b>	<b>PLFA</b>
Biogeochemistry	<b>0.617</b> / <i>0.06/0.233</i>	<b>0.546</b> / <i>0.09/0.009</i>	<b>0.755</b> / <i>&lt;0.001/0.511</i>
DGGE		<b>0.760</b> / <i>&lt;0.001/0.519</i>	<b>0.617</b> / <i>0.06/0.233</i>
T-RFLP			<b>0.693</b> / <i>&lt;0.001/0.386</i>

These differences in biogeochemical characteristics and the different community composition of station Therm30 compared to the other sampling sites in the Thermaikos Gulf is probably due to the geomorphological complexity and the variable bottom topography of this area [27, 45]. The sediments in the major parts of this area were fine-grained silty, while the central-eastern part of the Thermaikos Gulf (station Therm30) was characterized by high sand content (> 70 %) rich in heavy minerals [27].

**Table 3.** Summary of results from the BIOENV analysis of similarity matrices based on DGGE, T-RFLP and PLFA analysis of community structure: The combination of environmental variables generating the highest rank correlations between similarity matrices of community fingerprints and environmental data are presented.

	DGGE	T-RFLP	PLFA
<b>BIOENV' analysis</b>			
Variable 1	<i>organic carbon</i>	<i>organic carbon</i>	<i>organic carbon</i>
Variable 2	<i>chlorophyll a</i>	<i>chlorophyll a</i>	<i>chlorophyll a</i>
Variable 3	-	<i>depth</i>	<i>PLFA</i>
Highest Rank Correlation	<b>0.747</b>	<b>0.820</b>	<b>0.983</b>

The Cretan Sea is also characterized by a complex bottom geomorphology and stable hydrographic and atmospheric conditions [14, 58]. Station Creta-1 is located at the beginning of the continental shelf whereas Creta-2 is located on the steep slope and Creta-3 in the beginning of the flat bottom below the shelf. Station Creta-3 is also situated away from sources of terrestrial inputs [14, 58]. The water circulation in the Cretan Sea is dominated by a mesoscale dipole (an anticyclone in the West and a cyclone in the East) that acts as a pump transferring water masses from the Levantine Sea. At the same time these water masses are transported towards the upper slope and shelf and thereby indirectly fertilize the benthic ecosystem during the summer (where the samples were collected) [6, 58]. The geographical differences of these three stations combined with the complex local hydrological and atmospheric phenomena [58], may explain the observed variability in bacterial community

composition (Fig. 3, 4, 5) despite the restricted geographical distribution of these three stations (Fig. 1). Both PLFA and biogeochemical parameters analysis placed all stations of the Cretan Sea together with the coastal stations of the Thermaikos Gulf. In contrast, the DGGE analysis grouped the Cretan Sea sediments together with the stations from the South Ionian and Levantine Sea. We cannot exclude the possibility that the time of sampling (e.g. season) could have affected the observed bacterial community composition as well as the biogeochemical characteristics of the sediments. This factor is likely of minor importance in the deeper sediments from the Levantine, S. Ionian and Cretan Sea, but could have been of significance for the Thermaikos Gulf sites (sampled in February) and the most shallow station in the Cretan Sea (sampled in July).

The rank correlation values measured with the BIOENV approach were high, and indicated that microbial community structure were well correlated with the measured environmental variables (Table 3). Among these environmental variables, the combination of organic carbon and chlorophyll-*a* content appear to play a major role as regulators of bacterial community composition since all different fingerprinting techniques exhibited the highest correlations values when these parameters were included in the analysis, either alone (DGGE) or in combination with depth (T-RFLP) or microbial biomass (PLFA).

All existing fingerprinting methods currently in use to describe microbial communities have limitations and detect various components of the often very complex bacterial communities that exist in nature. With the present study, we show that the use of single fingerprinting method to compare different communities of sediment bacteria may produce variable results as a consequence of the method of choice. We cannot say for sure which method (DGGE, T-RFLP, PLFA) provides the most accurate description of the typically very complex bacterial communities in sediments, but the parallel identification of community shifts visible with different fingerprinting techniques may be one way to obtain more robust analyses of variation in bacterial community composition over temporal and spatial scales.

### Acknowledgments

The officers and the crew of the R/V Aegaeo and Philia are acknowledged for their assistance during the sampling. We also acknowledge three anonymous reviewers whose comments helped to improve the manuscript. This work was jointly supported by the Commission of the European Communities (through the Energy and Environment projects INTERPOL, ADIOS and CYCLOPS), the Greek Ministry of Development (General Secretariat of Research and Technology) and from the Swedish Research Council and the Swedish Research Council for Environment, Agricultural Sciences and Special Planning (Grants to S.B.).

### References

1. Alexander M (1999) Biodegradation and bioremediation. Academic Press San Diego
2. Amann R, Ludwig W (2000) Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiol Rev* 24:555-565
3. Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59:143-69
4. Aries E, Doumenq P, Artaud J, Acquaviva M, Bertrand JC (2001) Effects of petroleum hydrocarbons on the phospholipid fatty acid composition of a consortium composed of marine hydrocarbon-degrading bacteria. *Org Geochem* 32:891-903
5. Balkwill DL, Murphy EM, Fair DM, Ringelberg DB, White DC (1998) Microbial communities in high and low recharge environments: implications for microbial transport in the Vadose Zone. *Microb Ecol* 35:156-171
6. Balopoulos ETh, Theocharis A, Kontoyiannis H, Varnavas S, Voutsinou-Taliadouri F, Iona A, Souvermezoglou A, Ignatiades L, Gotsis-Skretas O, Pavlidou A (1999) Major advances in the oceanography of the southern Aegean Sea-Cretan Straits system (Eastern Mediterranean). *Prog Oceanogr* 44:109-130
7. Barnett PRP, Watson J, Connelly D (1984) A multiple corer for taking virtually undisturbed sediment samples from shelf bathyal and abyssal sediments. *Oceanol Acta* 7:399-408

8. Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911–917
9. Boschker HTS, Graaf WD, Köster M, Meyer-Reil LA, Cappenberg TE (2001) Bacterial populations and processes involved in acetate and propionate consumption in anoxic brackish sediment. *FEMS Microbiol Ecol* 35:97-103
10. Bowman JP, McCammon SA, Gibson JAE, Robertson L, Nichols PD (2003) Prokaryotic metabolic activity and community structure in Antarctic continental shelf sediments. *Appl Environ Microbiol* 69:2448-2462
11. Bowman JP, Rea SM, McCammon SA, McMeekin TA (2000) Diversity and community structure within anoxic sediment from marine salinity meromictic lakes and a coastal meromictic marine basin, Versfold Hills, Eastern Antarctica. *Environ Microbiol* 2:227-237
12. Brinkhoff T, Sievert SM, Kuever J, Muyzer G (1999) Distribution and diversity of sulfur-oxidizing *Thiomicrospira* spp. at a shallow-water hydrothermal vent in the Aegean Sea (Milos, Greece). *Appl Environ Microbiol* 65:3843-3849
13. Casamayor EO, Massana R, Benlloch S, Øvreås L, Díez B, Goddard VJ, Gasol JM, Joint I, Rodríguez-Valera F, Pedrós-Aliós C (2002) Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environ Microbiol* 4:338-348
14. Chronis G, Lykousis V, Anagnostou C, Karageorgis A, Stavrakakis S, Poulos S (2000) Sedimentological processes in the southern margin of the Cretan Sea (NE Mediterranean). *Prog Oceanogr* 46:143-162
15. Clarke KR, Ainsworth M (1993) A method of linking multivariate community structure to environmental variables. *Mar Ecol Prog Ser* 92:205-219
16. Clement BG, Kehl LE, DeBord KL, Kitts CL (1998) Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *J Microbiol Meth* 31:135-142
17. Coolen MJ, Cypionka H, Sass AM, Sass H, Overmann J (2002) Ongoing modification of Mediterranean Pleistocene sapropels mediated by prokaryotes. *Science* 28:2407-2410
18. Danovaro R, Manini E, Dell'Anno A (2002) Higher abundance of bacteria than of viruses in deep Mediterranean sediments. *Appl Environ Microbiol* 68:1468-1472
19. Danovaro R, Marrale D, Dell'Anno A, Della Croce N, Tselepidis A, Fabiano M (2000) Bacterial response to seasonal changes in labile organic matter composition on the continental shelf and bathyal sediments of the Cretan Sea. *Prog Oceanogr* 46:345-366
20. Egert M, Friedrich MW (2003) Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism analysis of microbial community structure. *Appl Environ Microbiol* 69:2555-2562
21. Flynn SJ, Löffler FE, Tiedje JM (2000) Microbial community changes associated with a shift from reductive dechlorination of PCE to reductive dechlorination of *cis*-DCE and VC. *Environ Sci Technol* 34:1056-1061
22. Gogou A, Apostolaki M, Stephanou EG (1998) Determination of organic molecular markers in marine aerosols and sediments: one-step flash chromatography compound class fractionation and capillary gas chromatographic analysis. *J Chromatogr A* 799:215-231
23. Gogou A, Bouloubassi I, Stephanou EG (2000) Marine organic geochemistry of the Eastern Mediterranean: 1. Aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in Cretan Sea surficial sediments. *Mar Chem* 68:265-282
24. Guezennec J, Fiala-Medioni A (1996) Bacterial abundance and diversity in the Barbados Trench determined by phospholipid analysis. *FEMS Microbiol Ecol* 19:83-93
25. Hedges JI, Stern JH (1984) Carbon and nitrogen determinations of carbonate-containing solids. *Limnol Oceanogr* 29:657-663
26. Ignatiades L (1969) Annual cycles, species diversity and succession of phytoplankton in lower Saronikos Bay, Aegean Sea. *Mar Biol* 3:196-200

27. Karageorgis AP, Anagnostou CL (2001) Particulate matter spatial-temporal distribution and associated surface sediment properties: Thermaikos Gulf and Sporades Basin, NW Aegean Sea. *Cont Shelf Res* 21:2141-2153
28. Kieft TL, Wilch E, O'Connor K, Ringelberg DB, White DC (1997) Survival and phospholipids fatty acid profiles of surface and subsurface bacteria in natural sediment microcosms. *Appl Environ Microbiol* 63:1531-1542
29. Kisand V, Wikner J (2003) Limited resolution of 16S rDNA DGGE caused by melting properties and closely related DNA sequences. *J Microbiol Meth* 54:183-193
30. Koizumi Y, Kojima H, Fukui M (2003) Characterization of depth-related microbial community structure in lake sediment by denaturing gradient gel electrophoresis of amplified 16S rDNA and reversely transcribed 16S rRNA fragments. *FEMS Microbiol Ecol* 46:147-157
31. Lane DL, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR (1985) Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Nat Acad Sci USA* 82:6955-6959
32. Lascaratos A, Roether W, Nittis K, Klein B (1999) Recent changes in deep water formation and spreading in the eastern Mediterranean Sea: a review. *Prog Oceanogr* 44:5-36
33. Li L, Kato C, Horikoshi K (1999) Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths. *Biodivers Conserv* 8:659-677
34. Lindström ES (1998) Bacterioplankton community composition in a boreal forest lake. *FEMS Microbiol Ecol* 27:163-174
35. Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16s rRNA. *Appl Environ Microbiol* 63:4516-4522
36. Lorenzen C, Jeffrey J (1980) Determination of chlorophyll in sea water. UNESCO Technical Papers in Marine Science 35:1-20
37. MacGillivray AR, Shiaris MP (1994) Relative Role of Eukaryotic and Prokaryotic Microorganisms in Phenanthrene Transformation in Coastal Sediments. *Appl Environ Microbiol* 60:1154-1159
38. Malanotte-Rizzoli P, Manca BB, Ribera d' Alcalá M, Theocharis A, Bergamasco A, Bregant D, Budillon G, Civitarese G, Georgopoulos D, Michelato A, Sansone E, Scarazzato P, Souvermezoglou E (1997) A synthesis of the Ionian Sea hydrography, circulation and water mass pathways during POEM-Phase-I. *Prog Oceanog* 39:153-204
39. Marsh TL (1999) Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Curr Opin Microbiol* 2:323-327
40. Marsh TL, Saxman P, Cole J, Tiedje J (2000) Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol* 66:3616-3620
41. Massana R, Jürgens K (2003) Composition and population dynamics of planktonic bacteria and bacterivorous flagellates in seawater chemostat cultures. *Aquat Microb Ecol* 32:11-22
42. Moeseneder MM, Arrieta JM, Muyzer G, Winter C, Herndl GJ (1999) Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 65:3518-3525
43. Muyzer G (1999) DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 2:317-322
44. Muyzer G, DeWaal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59:695-700
45. Poulos SE, Chronis GTh, Collins MB, Lykousis V (2000) Thermaikos Gulf Coastal System, NW Aegean Sea: an overview of water / sediment fluxes in relation to air-land-ocean interactions and human activities. *J Mar Syst* 25:47-76

46. Ringelberg DB, Sutton S, White DC (1997) Biomass, bioactivity and biodiversity: microbial ecology of the deep subsurface: analysis of ester-linked phospholipid fatty acid. *FEMS Microbiol Rev* 20:371–377
47. Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbour, New York
48. Sekiguchi H, Watanabe M, Nakahara T, Xu B, Uchiyama H (2002) Succession of bacterial community structure along the Changjiang river determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. *Appl Environ Microbiol* 68:5142–5150
49. Sievert SM, Brinkhoff T, Muyzer G, Ziebis W, Kuever J (1999) Spatial heterogeneity of bacterial populations along an environmental gradient at a shallow submarine hydrothermal vent near Milos island (Greece). *Appl Environ Microbiol* 65:3834–3842
50. Sievert SM, Kuever J, Muyzer G (2000) Identification of 16S ribosomal DNA-defined bacterial populations at a shallow submarine hydrothermal vent near Milos Island (Greece). *Appl Environ Microbiol* 66:3102–3109
51. Smoot JC, Findlay RH (2001) Spatial and seasonal variation in a reservoir sedimentary microbial community as determined by phospholipids analysis. *Microb Ecol* 42:350–358
52. Song B, Kerkhof LJ, Häggblom MM (2002) Characterization of bacterial consortia capable of degrading 4-bromobenzoate under denitrifying conditions. *FEMS Microbiol Lett* 213:183–188
53. Staley JT, Konopka A (1985) Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* 39:321–349
54. Suzuki MT, DeLong EF (2002) Marine Prokaryote Diversity. In: Staley JT, Reysenbach AL (ed) *Biodiversity of Microbial Life*, Wiley-Liss, New York, pp 209–234
55. Theocharis A, Balopoulos E, Kioroglou S, Kontoyiannis H, Iona A (1999) A synthesis of the circulation and hydrography of the South Aegean Sea and the Straits of the Cretan Arc (March 1994–January 1995). *Prog Oceanogr* 44:469–509
56. Torsvik V, Øvreås L, Thingstad TF (2002) Prokaryotic diversity –Magnitude, dynamics and controlling factors. *Science* 296:1064–1066
57. Tselepides A, Polychronaki T, Marralle D, Akoumianaki I, Dell’Anno A, Pusceddu A, Danovaro R (2000a) Organic matter composition of the continental shelf and bathyal sediments of the Cretan Sea. *Prog Oceanogr* 46:311–344
58. Tselepides A, Zervakis V, Polychronaki T, Danovaro R, Chronis G (2000b) Distribution of nutrients and particulate organic matter in relation to the prevailing hydrographic features of the Cretan Sea (NE Mediterranean). *Prog Oceanogr* 46:113–142
59. Vergin KL, Urbach E, Stein JL, DeLong EF, Lanoil BD, Giovannoni SJ (1998) Screening a fosmid library of marine environmental genomic DNA fragments reveals four clones related to members of the order Planctomycetales. *Appl Environ Microbiol* 64:3075–3078
60. White DC (1994) Is there anything else you need to understand about the microbiota that cannot be derived from analysis of nucleic acids? *Microb Ecol* 28:163–166
61. White DC, Fredrickson HF, Gehron MH, Smith GA, Martz RF (1983) The groundwater aquifer microbiota: biomass, community structure, and nutritional status. *Dev Indust Microbiol* 24:189–199
62. White DC, Phelps TJ, Onstott TC (1998) What’s up down there? *Curr Opin in Microbiol* 1:286–290
63. White DC, Ringelberg DB (1997) Utility of the signature lipid biomarker analysis in determining the in situ viable biomass, community structure, and nutritional/physiologic status of deep subsurface microbiota. In: Amy PS, Haldeman DL (ed) *The Microbiology of the Terrestrial Deep Subsurface*, Elsevier Science Ltd, CRC, New York, pp 119–136
64. Yentsch CS, Menzel DW (1963) A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep-Sea Res* 10:221–231
65. Zhang CL (2002) Stable carbon isotopes of lipid biomarkers: analysis of metabolites and metabolic fates of environmental microorganisms. *Curr Opin in Biotech* 13:25–30





# ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ II



# Microbial Ecology ΥΠΟ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ

## Bacterial Community Composition in Different Sediments from the Eastern Mediterranean Sea: a Comparison of Four 16S rDNA Clone Libraries

PARASKEVI N. POLYMENAKOU<sup>1,3</sup>, STEFAN BERTILSSON<sup>2,\*</sup>, ANASTASIOS TSELEPIDES<sup>1</sup>, EURIPIDES G. STEPHANOU<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Hellenic Center for Marine Research, Gournes Pediados, GR 71003, Heraklion, Crete, Greece

<sup>2</sup> Limnology/Department of Ecology & Evolution, Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Norbyv. 20, SE-75236, Uppsala, Sweden.

<sup>3</sup> Environmental Chemical Processes Laboratory, Department of Chemistry, University of Crete, 71409, Heraklion, Greece

\* Author for correspondence: Stefan Bertilsson. Tel: + 46-18-4712712. Fax: + 46-18-531134. E-mail: [stebe@ebc.uu.se](mailto:stebe@ebc.uu.se)

Received: 07 January 2005 Accepted: 09 March 2005

Running Title: Bacterial diversity in Mediterranean sediments

Keywords: sediment, bacteria, 16S rDNA, clone library, diversity, community composition

### Abstract

The regional variability of sediment bacterial community composition and diversity was studied by comparative analysis of four large 16S ribosomal DNA (rDNA) clone libraries from sediments in different regions of the Eastern Mediterranean Sea (Thermaikos Gulf, Cretan Sea and South Ionian Sea). Amplified rRNA restriction analysis of 664 clones from the libraries indicate that the rDNA richness and evenness was high: e.g. a near 1:1 relationship among screened clones and number of unique restriction patterns when up to 190 clones were screened for each library. Phylogenetic analysis of 207 bacterial 16S rDNA sequences from the sediment libraries demonstrated that *Gamma*-, *Delta*-, and *Alphaproteobacteria*, *Holophaga/Acidobacteria*, *Planctomycetales*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, and *Verrucomicrobia* were represented in all four libraries. A few clones also grouped with the *Betaproteobacteria*, *Nitrospirae*, *Spirochaetales*, *Chlamydiae*, *Firmicutes* and candidate division OP11. The abundance of sequences affiliated with *Gammaproteobacteria* was higher in libraries from shallow sediments in the Thermaikos Gulf (30m) and the Cretan Sea (100m) compared to the deeper South Ionian station (2790 m). Most sequences in the four sediment libraries clustered with uncultured 16S rDNA phylotypes from marine habitats, and many of the closest matches were clones from hydrocarbon seeps, benzene mineralizing consortia, sulfate-reducers, sulfur-oxidizers and ammonia oxidizers. LIBSHUFF statistics of 16S rRNA gene sequences from the 4 libraries revealed major differences, indicating either a very high richness in the sediment bacterial communities or considerable variability in bacterial community composition among regions, or both.

### 1. Introduction

It is notoriously difficult to isolate and cultivate bacterial populations representative of natural bacterial communities and this limitation is believed to be even more severe in environments characterized by extreme environmental conditions [9]. Hence our current understanding of microbial biodiversity in marine environments relies to a large extent on the development and use of culture independent molecular methods that can provide information on the phylogeny and distribution of non-cultivable microorganisms [6, 27]. Sequence

analysis of PCR-amplified and cloned 16S ribosomal RNA genes (16S rDNA), is a widely used approach to assess microbial diversity and community composition in environmental samples [10, 63]. This approach has been used to describe the composition of bacterial communities in several marine sediments, but most of these libraries contain relatively few clones (e.g. [24, 31, 32, 61]) and therefore provide limited information on the composition and diversity of the usually very complex natural microbial communities found in sediments. On the other hand, these libraries have revealed that sequences related to the *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*- and *Deltaproteobacteria*, Gram-positives, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes*, *Planctomycetales*, *Actinobacteria*, as well as *Verrucomicrobia* likely occur at high frequencies in most sediments. More extensive screening of a few sediment 16S rDNA clone libraries have also demonstrated that additional bacterial groups can be abundant, for example the recently introduced phylum *Gemmatimonadetes* (previously known as candidate division KS-B) [65], the new candidate division KS-A [35] and clones affiliated with the candidate divisions OP 3, OP 8 and OP 11 [10, 56]. Thus it can be expected that the analysis of more such large clone libraries will reveal other, hitherto undiscovered groups and divisions.

Analyses of multiple large clone libraries with similar techniques enable comparisons to be made among bacterial communities in different samples as well as identification of widely distributed sediment bacterial phylotypes. A comparison of bacterial phylotypes (98% similar 16S rDNA) in three separate libraries constructed from different horizons (0- to 0.4- cm, 1.5- to 2.5-cm and 20- to 21-cm depth) in an Antarctic continental shelf sediment demonstrated that 76 out of a total 496 phylotypes were present in all three libraries [10]. A similar comparison of medium-sized 16S rDNA clone libraries (69-130 clones) from five Antarctic lake sediments and a coastal sediment from the same area also indicate that sediments were highly dissimilar even if sediment libraries from geochemically similar lakes shared several common phylotypes [11]. Knowing the phylogeny and occurrence of different bacterial populations in sediments is a first step towards understanding the biogeochemical function and ecology of these largely uncultivated microbial communities as well as the extent of genetic diversity that can be found in sediment bacteria across the globe [10]. However, with the exception of some functionally defined bacterial groups (methanogens, methanotrophs, sulfate reducing bacteria), our knowledge about the ecology and physiology of sediment bacteria is fragmentary due to the lack of cultured representatives for many groups as well as the lack of extensive biogeographical studies of sediment bacterial populations [10].

The eastern basin of the Mediterranean Sea is considered to be one of the world's most oligotrophic areas and is characterized by an overall nutrient deficit [28, 60] and extremely low primary productivity [19, 44]. As a result, minute amounts of organic matter reach the sea floor [15, 16, 17] and the growth and abundance of benthic bacteria is likely constrained by the input of fresh organic material from the pelagic zone [18]. Furthermore, some regions of the Eastern Mediterranean Sea are highly exposed to anthropogenic influence and therefore contain many steep pollutant concentration gradients [23, 42]. Until now, few attempts have been made to describe the diversity and composition of sediment bacterial communities in the Eastern Mediterranean Sea. The only available information have been acquired from sites exposed to extreme physicochemical conditions, such as a) a hydrothermal vent area near Milos Island [12, 50, 51], b) the microbial community inhabiting the chemocline of the hypersaline anoxic Urania basin in the Eastern Mediterranean Sea [48], and c) the late Pleistocene organic-rich sediments (sapropels) southeast of Crete (Greece) [14]. There is also a general lack of information regarding bacterial communities in the Western region of the Mediterranean Sea, where the only available data was retrieved from 16S rDNA analysis of mesocosms with Mediterranean Sea water [45, 49] and marine bacterioplankton collected outside the Spanish coast [1, 4, 40].

Using multiple fingerprinting techniques (PLFA analysis and 16S rRNA genotyping by denaturing gradient gel electrophoresis and terminal-restriction fragment length polymorphism) we observed marked differences in bacterial community composition in surface sediments from various regions of the Eastern Mediterranean Sea. [42]. Bacterial communities from sediment of the Northern, more productive regions of the Thermaikos Gulf

were significantly separated from the oligotrophic regions of the Cretan, South Ionian and Levantine seas. Furthermore, communities of deep sediments (> 1494 m depth) were clearly separated from their shallow (< 617 m) counterparts. We could also correlate the community composition to environmental state variables such as sediment carbon content and chlorophyll whereas petroleum contamination was less important in this regard [42]. The present study complements this survey in providing a detailed comparative 16S rRNA gene analysis of four of these sediment bacterial communities obtained from various regions of the oligotrophic Eastern Mediterranean Sea.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Sampling sites and geochemical characteristics

Sediment samples were collected from 3 regions in the Eastern Mediterranean Sea (Thermaikos Gulf, Cretan Sea and South Ionian Sea; Fig. 1). A Bowers and Connelly Multiple-corer (8 cores, i.d. 9.0 cm) [8] was used to collect undisturbed sediment samples from the Thermaikos Gulf in February 2002 and from the Cretan Sea in July 2002. Sediment from the South Ionian Sea was collected in November 2001, using an USNEL Boxcorer. All sampling was carried out onboard the R/V's *Aegaeo* and *Philia*. Mixed surface sediment samples (0-1 cm) from each of the four sampled sediments were stored frozen in sterile plastic vials for subsequent analysis. Sediment chlorophyll *a* [33] and total organic carbon concentration [25] were determined using a Turner TD-700 fluorometer and a Perkin Elmer CHN 2400 analyser, respectively. Petroleum hydrocarbons (H/C) and *n*-alkanes were analyzed according to Gogou et al. [22], while phospholipid linked fatty acids (PLFA) were analyzed as described by Polymenakou et al. [42].

### 2.2 DNA extraction, PCR, cloning and RFLP screening

Total DNA was extracted from sediments using the FastDNA-Spin Kit for Soil (Q-BIOgene, Carlsbad, CA) as previously described [42]. Bacterial 16S rRNA genes were amplified from mixed genomic samples using the polymerase chain reaction (PCR) with the universal bacterial primers 27f modified to match also *Planctomycetales* (5'-AGRGTGGATCMTGGCTCAG-3') [62] and 1492r (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') [30]. PCR conditions were designed to minimize bias [43, 63]. For each sample, eight replicate PCR reactions of 30  $\mu$ l were amplified in a Stratagene Robocycler with initial denaturation at 94°C for 3 min followed by 25 cycles of 1 min at 94°C, 1 min annealing at 55°C, 3 min primer extension at 72°C and a final extension at 72°C for 7 min. Each tube contained 1-4 ng of target DNA, PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9, 50 mM KCl, 0.1 % Triton X-100 and 2 mM MgCl<sub>2</sub>), 100 nM of each primer, 200  $\mu$ M of each dNTP and 0.25 U Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA). Products from each of the 8 PCR reactions were used as templates 1:10 (vol.) in duplicate 3-cycle reconditioning PCR-reactions (16 reactions total) to eliminate heteroduplex formation that may introduce artificial diversity in clone libraries [57]. All PCR products were pooled and precipitated with ethanol and sodium acetate [47] followed by gel purification using the Qiaquick PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA). The concentration of PCR products generated from the different sediment samples was determined by direct comparison to a Low DNA Mass ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA) using 2% agarose gel electrophoresis, ethidium bromide staining and UV-transillumination. For each sampling site, 5-10 ng of PCR product was cloned into the pCR 4-TOPO vector and transformed into chemically competent cells of *E.coli* One shot TOP10 cells using the TOPO TA Cloning® kit (Version M) as recommended by the manufacturer (Invitrogen, Carlsbad, CA). At least 200 positive clones from each clone library (selected by blue and white screening) were transferred to 96-well plates and incubated overnight at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium containing 50  $\mu$ g kanamycin ml<sup>-1</sup>. Aliquots of the individual clones were (i) archived at -80°C in 7% Dimethyl sulfoxide or (ii) washed by pelletizing cells in a 30 min centrifugation at 10,000 x g followed by supernatant removal by low-speed centrifugation (<500 rpm) of inverted plates. Pelletized cells were resuspended in 30  $\mu$ l sterile and UV-irradiated MQ-grade water. Cells were lysed by heating at 98°C for 10 minutes followed by agitation. The lysates were used (1:10 vol.) as templates in a PCR amplification

of the insert using external (vector) primers M13f-20 (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') and M13r (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'; Invitrogen) to avoid co-amplification of *E. coli* host-cell DNA. PCR amplification was carried out for 25 cycles as described before. Positive transformants (clones carrying an insert of correct size) were identified by agarose gel electrophoresis as described above. Aliquots (5 $\mu$ l) of individual PCR products were digested with two four-cutting restriction enzymes (*HhaI* and *HaeIII*) for 16 h according to instructions supplied by the manufacturer (Invitrogen, Carlsbad, CA). After inactivation of the enzymes (20 min at 85°C), fragments were sized by electrophoresis on a 2% agarose gel (2.5 hours, 80V, 10°C). Fragments were recorded using ethidium bromide staining and UV-transillumination. A 100bp DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA) was used for determination of fragment size. The resulting restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns were then used to classify clones into operational taxonomic units (OTUs).

### 2.3 Sequencing and phylogenetic analysis

A total of 219 clones from randomly chosen OTUs were sequenced on an ABI 3700 96-capillary sequencer (Applied Biosystems) using primer 27f [62] and the BigDye terminator kit v.3.1 (Applied Biosystems). This generated high-quality reads of between 450 and 780 bases. Ten of the sequences were identified as likely chimeric molecules using the Chimera Check software included in the Ribosomal Database Project II [36] and these were excluded from further analysis. The remaining 209 sequences were compared to Genbank entries using BLAST (Basic Local Alignments Tool) [5] in order to obtain a preliminary phylogenetic affiliation of the clones. Two sequences were affiliated with eukaryote organelles and were excluded from further analysis. The remaining 207 clones (63 from station Therm01, 45 from station Therm30, 49 from station Cretal and 50 from station S.Ionian), were used for phylogenetic analysis. All sequences were imported to the ARB software Version 2.5b [54] and aligned using the integrated aligner tool and the fast aligner option followed by manual alignment of the sequences to closely related sequences in the ARB database. Phylogenetic trees were constructed in ARB using maximum likelihood [21]. The robustness of tree topologies was confirmed by maximum parsimony analysis [54] with 100 bootstrap replications [20]. Novel clusters of uncultured sediment bacteria were defined as monophyletic groups of 16S rDNA sequences with a minimum sequence similarity of 90%. Additional criteria were that the cluster should contain at least three sequences from a minimum of two libraries.

### 2.4 Analysis of species richness and clone library similarity

For each clone library, the RFLP-based distribution of clones in different OTUs was used to estimate species richness using the web based Rarefaction calculator software (<http://www2.biology.ualberta.ca/jbrzusto/rarefact.php>). Species richness was estimated using the nonparametric Chao estimator  $S^*_1 = S_{\text{obs}} + (a^2/2b)$  where  $S_{\text{obs}}$  is the number of 16S rDNA clones observed,  $a$  is the number of clones observed just once and  $b$  is the number of clones observed twice [13]. The standard deviation (SD) was estimated using the equation  $SD = b[(a/(4b))^4 + (a/b)^3 + (a/2b)^2]$ . To determine the significance of differences between two clone libraries (e.g.  $X$  and  $Y$ ), differences ( $\Delta C$ ) between “homologous”  $C_X(D)$  and “heterologous” coverage curves  $C_{XY}(D)$  were calculated using the LIBSHUFF software (<http://libshuff.mib.uga.edu/> [52]). The “homologous” coverage of clone library  $X$  is calculated using the equation  $C_X = 1 - (N_X/n)$ , where  $N_X$  is the number of unique sequences in the sample and  $n$  is the total number of sequences. In a similar way, the “heterologous” coverage of clone library  $X$  by a second clone library  $Y$  is defined as:  $C_{XY} = 1 - (N_{XY}/n)$ , where  $N_{XY}$  is the number of sequences in clone library  $X$  not found in the second clone library  $Y$  and  $n$  is the number of sequences in  $X$ . Both  $N_X$  and  $N_{XY}$  can be defined at different levels of evolutionary distance ( $D$ ), e.g. homology of the sequenced 16S rRNA fragments, to generate a coverage curve. If clone libraries are similar then the coverage curves  $C_X(D)$  and  $C_{XY}(D)$  are also expected to be similar. Significance of  $\Delta C$  is described by  $P$ , which is calculated by randomly shuffling sequences (e.g. 999 times) and estimating  $\Delta C$  after each shuffling. The randomized values plus the empirical value of  $\Delta C$  are ranked from largest to smallest, and

then the  $P$  value is estimated to be  $r/(N + 1)$ , where  $r$  denotes the rank of the empirical value of  $\Delta C$  [52].

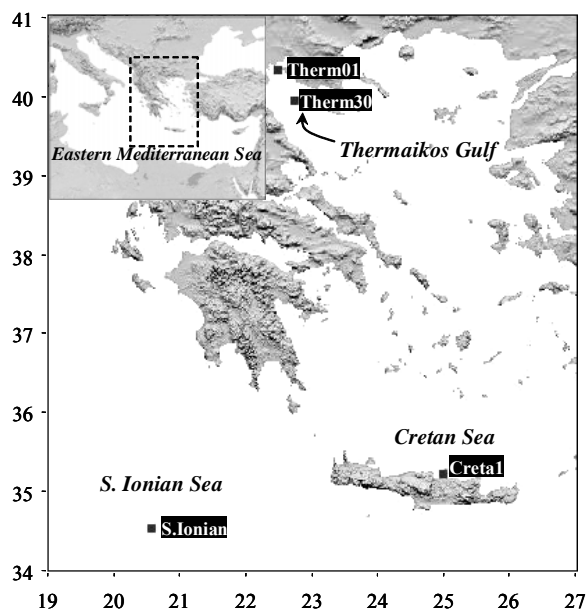
### 2.5 Nucleotide sequence accession numbers

The 207 partial 16S rDNA sequences generated in the present study have been deposited in Genbank under accession numbers AY533880-AY534086.

## 3. Results

### 3.1 Sediment characteristics

Sediment sampling sites were located at variable depths (30-2790 m) in various regions of the Eastern Mediterranean Sea (Tables 1 and 2, Fig. 1). A detailed description of the biogeochemical characterization of the sediments has been presented elsewhere [42]. Briefly, the depths of the sampling stations varied from 30-100 meters for the Thermaikos Gulf and the Cretan Sea, whereas the sediment from the South Ionian Sea was collected from 2790 meters depth. Chlorophyll  $a$ , total organic carbon, petroleum H/C and  $n$ -alkane levels were highest in station Therm01 ( $7.68 \mu\text{g g}^{-1}$ , 1.47 %,  $17.86 \mu\text{g g}^{-1}$  and  $3.31 \mu\text{g g}^{-1}$  respectively) whereas the lowest levels were recorded in sediments from station Creta1 ( $0.32 \mu\text{g g}^{-1}$ , 0.45 %,  $0.67 \mu\text{g g}^{-1}$  and  $0.15 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectively). Stations Therm30 and S.Ionian, were characterized by intermediate levels of organic carbon ( $0.53 \pm 0.04$  % and  $0.79 \pm 0.07$  %) and petroleum H/C ( $1.5 \mu\text{g g}^{-1}$  and  $1.9 \mu\text{g g}^{-1}$ ), whereas the PLFA content was much higher in the station located in the Thermaikos Gulf (Therm01;  $2.26 \mu\text{g g}^{-1}$ ) compared to the other three sampling sites (Table 1).



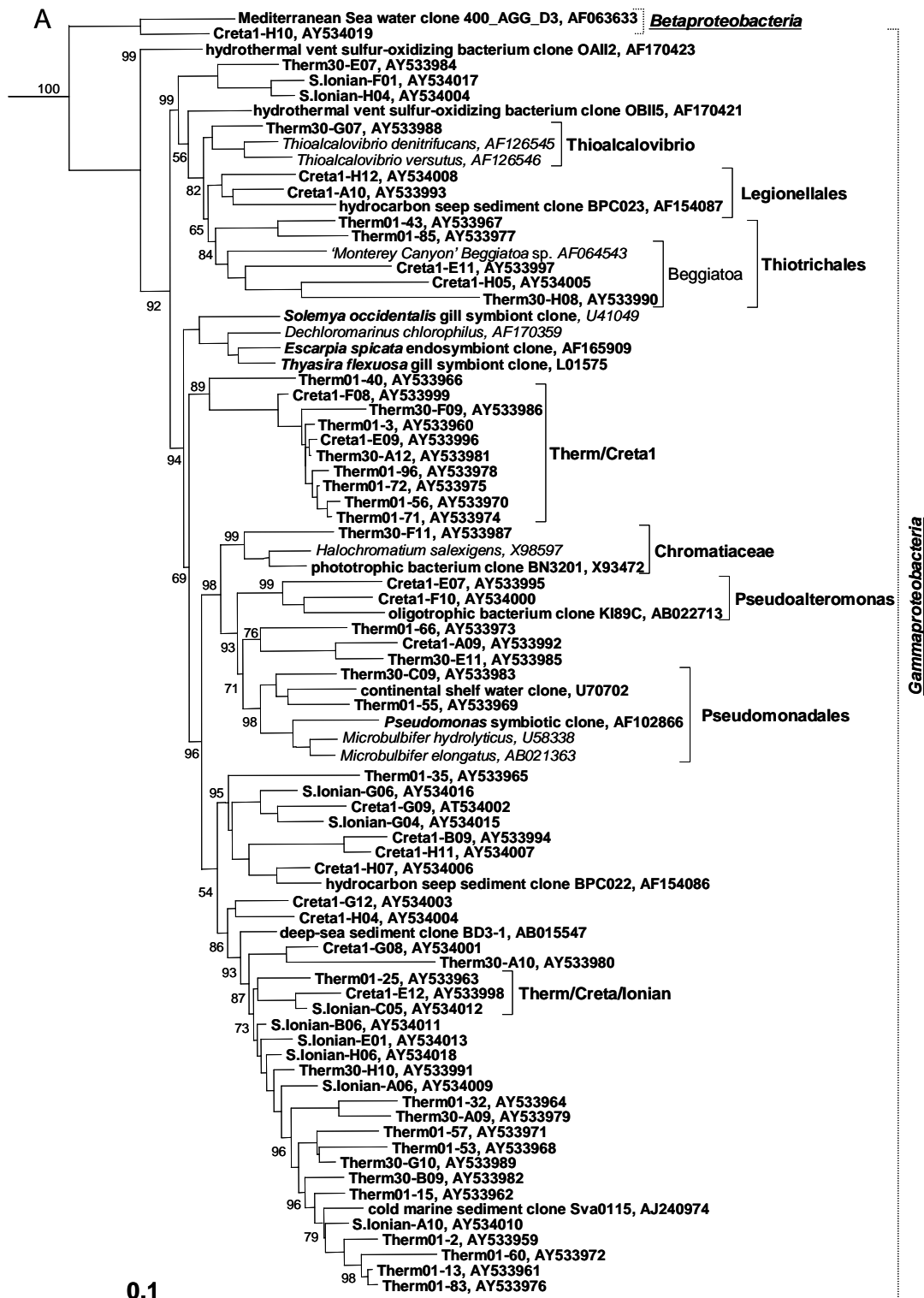
**Figure 1.** Geographic location of sampled sediment stations in the Eastern Mediterranean Sea.

**Table 1.** Biogeochemical characteristics of the sampling stations.

	Therm01	Therm30	Creta1	S.Ionian
<b>Region</b>	Thermaikos Gulf	Thermaikos Gulf	Cretan Sea	South Ionian Sea
<b>Station character</b>	shallow mesotrophic	shallow mesotrophic	shallow oligotrophic	deep oligotrophic
<b>Chlorophyll <math>a</math> (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>	$7.68 \pm 2.75$	$1.22 \pm 0.07$	$0.32 \pm 0.06$	$0.05 \pm 0.001$
<b>organic carbon (%)</b>	$1.47 \pm 0.12$	$0.53 \pm 0.04$	$0.45 \pm 0.06$	$0.79 \pm 0.07$
<b>petroleum H/C (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>	17.86	1.52	0.67	1.92
<b><math>n</math>-alkanes (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>	3.31	0.39	0.15	0.65
<b>PLFA (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>	2.26	0.22	0.62	0.13

### 3.2 Taxonomic groups and their distribution

All four bacterial 16S rDNA clone libraries were diverse and included sequences affiliated with most classes or phyla previously detected in marine sediments (Table 3). Among the 207 bacterial 16S rDNA sequences used for phylogenetic analyses, 37% shared 86-92% sequence similarity with any cultured bacterial strain. The remaining clones were also distinct from any cultured bacterial species ( $< 86\%$  sequence similarity). Pairwise comparisons of all sequences in the four libraries showed high heterogeneity in the libraries as only 28 sequences (14%) shared more than 92% similarity to any of the other sequences or



**Figure 2.** Maximum likelihood 16S rDNA tree showing positions of phylotypes affiliated with A) *Betaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria*, B) *Deltaproteobacteria*, C) *Alphaproteobacteria*, D) *Holophaga/Acidobacteria*, E) *Planctomycetales* and F) *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Spirochaetales*, *Actinobacteria*, *Nitrospirae*, *Bacteroidetes*, *Chlamydiae*, *Verrucomicrobia*, the candidate division OP11 from sediment clone libraries in the Eastern Mediterranean Sea. Partial 16S rDNA sequences obtained from the clone libraries Therm01, Therm30, Creta1 and S.Ionian and their closest matching entries in Genbank were included in the analysis. Bootstrap values at the nodes (100 replications) were calculated using maximum parsimony. Values below 50% are not shown. The scale bar indicates 10% nucleotide change per 16S rRNA position. Sequences from cultured representatives are indicated by italics.



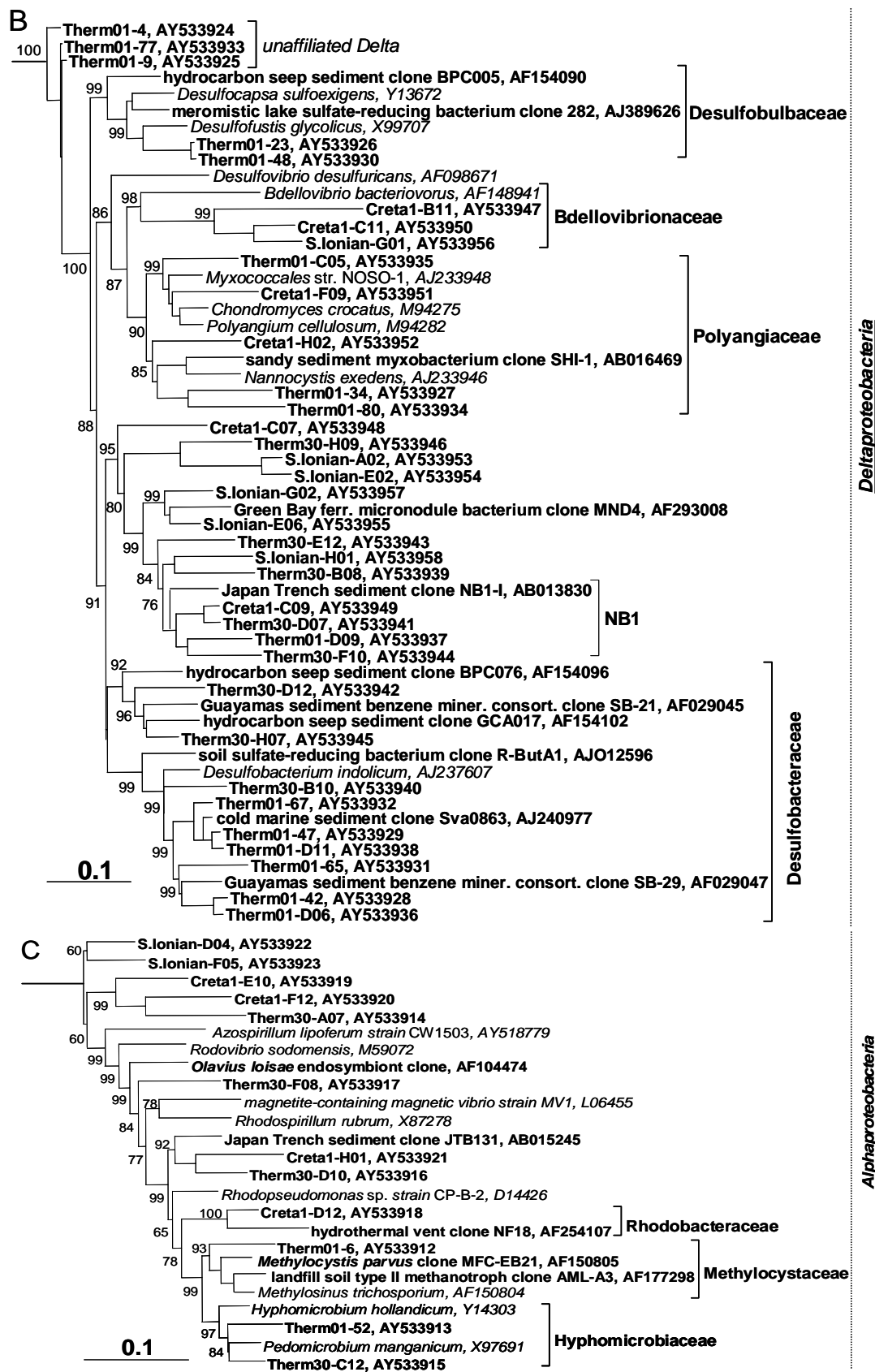
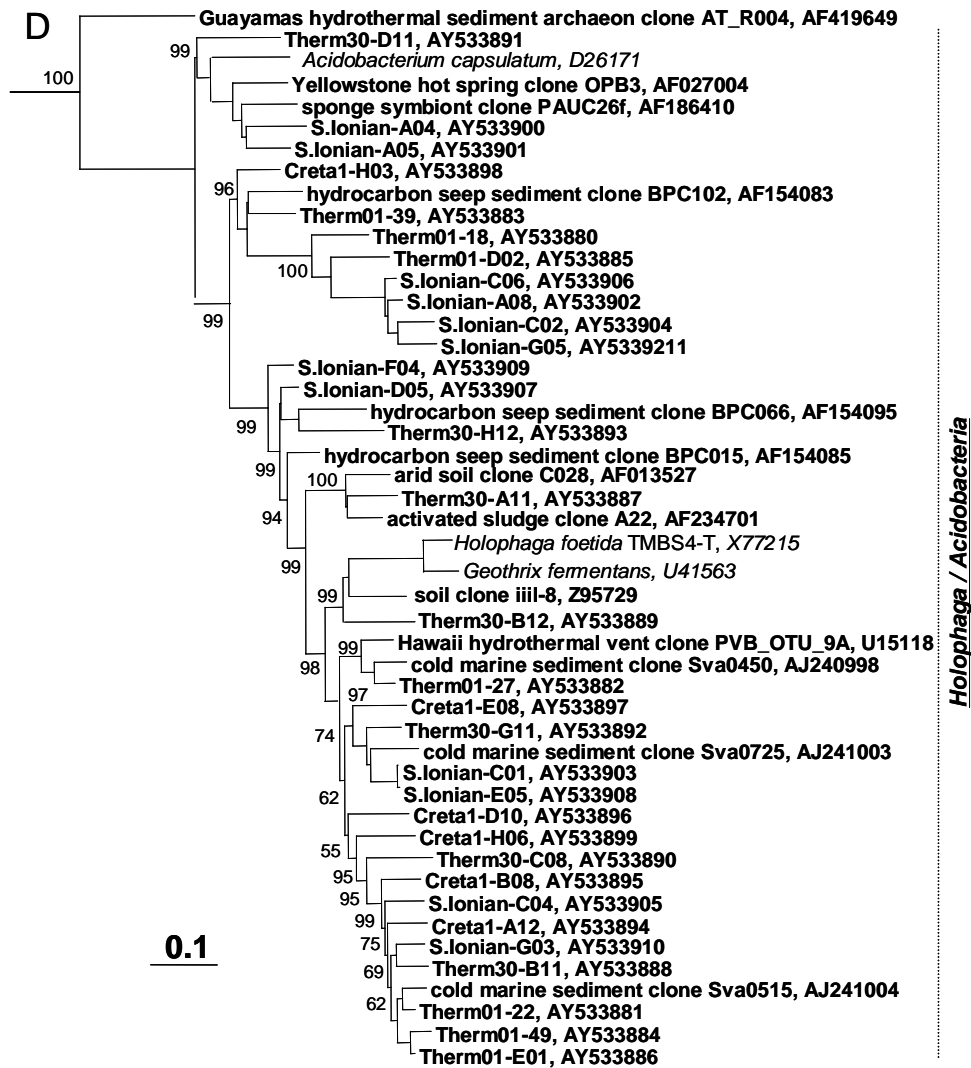


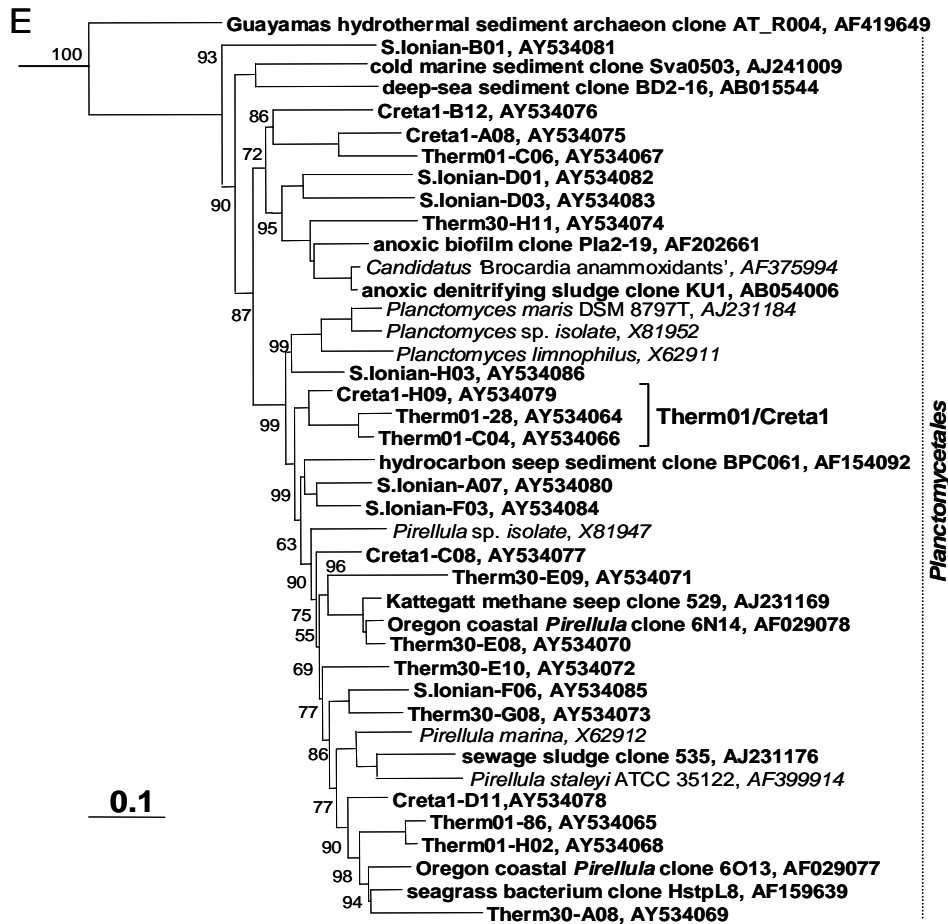
Figure 2. Continued



**Figure 2.** Continued

any sequence published in Genbank. Three novel clusters were identified within the *Gammaproteobacteria* and the *Planctomycetales* (Figs. 2A, 2E). Phylogenetic analysis of the partial 16S rDNA revealed that sequences grouped mainly with *Gamma*-, *Alpha*-, and *Deltaproteobacteria*, *Holophaga/Acidobacteria*, *Planctomycetales*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, and *Verrucomicrobia* whereas *Epsilonproteobacteria* were absent from all the libraries. In addition, a few clones (<4 per group) were affiliated with *Betaproteobacteria*, *Nitrospirae*, *Chloroflexi*, *Spirochaetales*, *Chlamydiae*, *Firmicutes* and the candidate division OP11. Finally, ten clones could not be affiliated with any known bacterial group (Table 3).

*Gammaproteobacteria* were frequently encountered in all four clone libraries, representing 31.7, 28.9, 36.7 and 20% of the clones from Therm01, Therm30, Creta1 and S.Ionian libraries, respectively (Table 3). Few sequences (<7%) were affiliated with established phylogenetic groups containing cultured representatives, i.e. *Thioalcalovibrio*, *Legionellales*, *Thiotrichales*, *Chromatiaceae*, *Pseudoalteromonas* and *Pseudomonadales* (Fig. 2A). The remaining sequences grouped with clones obtained using culture independent methods (Table 3, Fig. 2A). Sequences affiliated with *Legionellales* and *Pseudoalteromonas* were only found in the Cretan Sea library, whereas *Thioalcalovibrio* and *Chromatiaceae* were only found in the Therm30 clone library. The library from the deeper sediment of the South Ionian Sea did not contain any sequences affiliated with established groups containing cultured representatives (Fig. 2A). The sequence that grouped with *Thioalcalovibrio* was most closely related to the known sulfur-oxidizers *Thioalcalovibrio denitrificans* and



**Figure 2.** Continued

*Thioalcalovibrio versutus*, whereas sequences affiliated with *Legionellales* were most closely related to sequences retrieved from hydrocarbon seep sediments (Fig. 2A). The members of *Thiotrichales* were most closely related to *Beggiatoa* sp. A single clone grouped in the *Betaproteobacteria* (Fig. 2A).

16.9% of the sequenced clones were affiliated with *Deltaproteobacteria* and grouped mainly in 4 families containing cultured representatives (i.e. *Desulfobulbaceae*, *Bdellovibrionaceae*, *Polyangiaceae*, and *Desulfobacteraceae* (Table 3, Fig. 2B). Three closely related sequences from library Therm01 were tentatively identified as *Deltaproteobacteria* but could not be affiliated to any known group. The closest match in Genbank (94% similar) was the uncultured deltaproteobacterium clone Sva0103 originating from an Arctic sediment library [46]. One cluster (NB1) was observed distinct from cultured species and was related to *Polyangiaceae* and *Desulfobacteraceae* (Fig. 2B). Sequences affiliated with *Desulfobulbaceae* were most closely related to hydrocarbon seep bacteria, and to *Desulfocapsa sulfoxigens* and *Desulfofustis glycolicus*. Several of the sequenced clones from all four sediments were most closely related to various sulfate-reducing bacteria. The representatives of *Desulfobacteraceae* all originated from the Thermaikos Gulf, were closely related to either hydrocarbon seep sediment bacteria, bacteria forming a benzene mineralizing consortium and *Desulfobacterium indolicum* (Fig. 2B).

Sequences affiliated with *Alphaproteobacteria* accounted for 5.8% of the total clones, but also varied largely among the libraries (Table 3). Most clones affiliated with *Alphaproteobacteria* grouped in three families (Fig. 2C). All sediments except the most contaminated and productive station (Therm01; Table 1) contained sequences affiliated with *Hypomicrobiaceae*, *Rhodobacteraceae*, and *Methylocystaceae* (Fig. 2C).

Sequences affiliated with *Holophaga/Acidobacteria* were abundant in all four libraries (Table 3). Between 11 and 16 % of the sequences from the shallow stations Therm01,

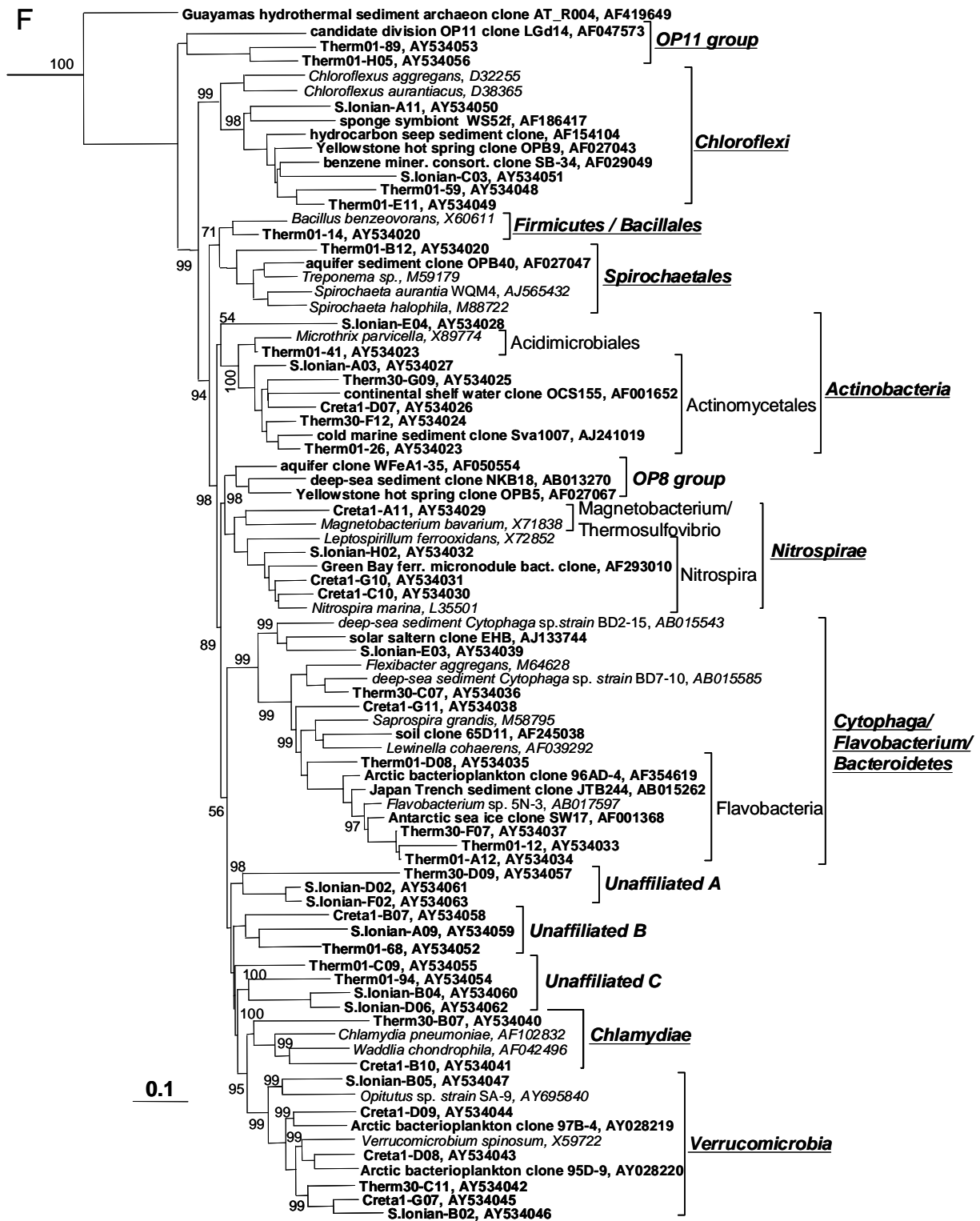


Figure 2. Continued

Therm30 and Creta1 were affiliated with this group, whereas the corresponding number for the deep station in South Ionian Sea was 24% (Table 3). This division was introduced as a new phylum in the domain *Bacteria* in the late 1990's and is related to *Planctomycetales* and *Chlamydiae* [34].

Clones affiliated with the order *Planctomycetales* accounted for 11.1% of the total sequenced clones (7.9, 13.3, 10.2 and 14% for libraries from Therm01, Therm30, Creta1 and

S.Ionian, respectively; Table 3). The sequence divergence within the group was high and a new sediment cluster could be identified (Therm01/Creta1), with a minimum sequence similarity exceeding 94% (Fig. 2E).

**Table 2.** Comparison of total screened clones, number of phylotypes, estimated total sequence richness and coverage for large 16S rDNA clone libraries for sediment bacteria. The sediment depths at the sampling site, number of different samples/sub-libraries, RFLP screening procedure, Chao-1 species richness estimator and the coverage of the libraries are included. Coverage was estimated by dividing the number of unique phylotypes detected from the RFLP screening with the total species richness estimate obtained using the Chao-1 procedure.

Sampling area	Sed. Depth	No. of sampling sites	No. of clones	Phylotypes	Restriction enzymes	Species Richness	% Coverage	Data source
<i>This study</i>								
Thermaikos Gulf-Therm01	30 m	1	94	80	HhaI/HaeIII	440	18.2	this study
Thermaikos Gulf-Therm30	86 m	1	190	165	HhaI/HaeIII	958	17.2	this study
Cretan Sea-Creta1	100 m	1	190	152	HhaI/HaeIII	478	31.8	this study
South Ionian Sea-S.Ionian	2790 m	1	190	171	HhaI/HaeIII	1306	13.1	this study
<i>Previous studies</i>								
Continental Shelf, Antarctica	761 m	3	1046	496	-	4350	~22.6-35.6	Bowman, 2003
E. Antarctica, Vestfold Hills	coastal	6	555	202	NciI/RsaI/HinFI	-	~15-36	Bowman, 2000
Arctic Ocean, Spitsbergen	coastal	1	353	140	HaeIII	-	71.95	Ravenschlag, 1999
Deep Sea sediments	1159-6379 m	7	149	75	RsaI/MspI	-	-	Li, 1999
French Guiana, S. America	coastal	1	96	63	HinFI/HaeIII/DdeI/HhaI	-	-	Madrid, 2001
Sagami Bay, Japan	1159 m	1	77	57	HhaI/RsaI/HaeIII	~126	45	Urakawa, 1999
Sagami Bay, Japan	1516 m	1	62	17	HhaI/RsaI/HaeIII	~21	84	Urakawa, 1999
Tokyo Bay, Japan	43 m	1	58	21	HhaI/RsaI/HaeIII	~29	74	Urakawa, 1999

Only 3.4% of the total sequenced clones were affiliated with the phylum *Bacteroidetes* (Table 3). Four different phylotypes from the Thermaikos Gulf grouped with the *Flavobacteria* and three of these were related to the Antarctic sea ice bacterium clone SW17 (>94% sequence similarity; Fig. 2F). One clone from the South Ionian Sea grouped with a halophilic eubacterium EHB derived from a solar saltern and three phylotypes grouped with *Cytophaga* clones obtained from the deepest cold-seep area in the Japan Trench (Accession no: AB015585, AB015262) and from the Suruga Bay (Accession no: AB015543) [31, 32].

*Verrucomicrobia*, *Chloroflexi*, *Nitrospirae*, *Chlamydiae*, and *Spirochaetales*, were minor components in each of the 4 libraries (between 0.5 and 2.9 %; Table 3). Clones affiliated with *Verrucomicrobia* were found in the libraries from Therm30, Creta1 and S.Ionian, whereas this phylum was absent in the polluted Therm01 sediment. The clones were most closely related to 16S rDNA clones derived from an Arctic Ocean bacterioplankton sample [7] (Fig. 2F). Sequences affiliated with the phylum *Nitrospirae* were retrieved from the two most hydrocarbon-contaminated sediments (Creta1, S.Ionian) and grouped in the class *Nitrospira* (Fig. 2F).

Finally, two clones from the Thermaikos Gulf and the Cretan Sea were affiliated with the phylum *Chlamydiae*, and a single clone obtained from the Thermaikos Gulf was affiliated with the *Spirochaetales* (Fig. 2F). Few sequences from the 4 sediments grouped in the candidate divisions hitherto only described using culture independent techniques, e.g. less than 1.0% of the total screened clones were affiliated with candidate division OP11 (Fig. 2F).

All libraries contained sequences affiliated with the phylum *Actinobacteria* (2.0-4.4 %; high-GC gram-positive bacteria). This group contained members of *Acidimicrobiales* and *Actinomycetales* (Fig. 2F). A single sequence from the Therm01 library was affiliated within the order *Acidimicrobiales*, with the filamentous sludge bacterium '*Microthrix parvicella*' as its closest relative. Most of the *Actinobacteria* sequences were affiliated with the order *Actinomycetales* that also included a clone derived from an anoxic sediment located in the

Arctic Ocean (Accession no: AJ241019) [46]. A single sequence from the contaminated Therm01 sediment grouped in the phylum *Firmicutes* (low-GC gram-positives) and was most closely related to *Bacillus benzeovorans* [41] (Fig. 2F).

**Table 3.** 16S rDNA phylotype distribution in the sediment clone libraries Therm01, Therm30, Creta1, S.Ionian and estimations for the combined clone libraries for the Eastern Mediterranean Sea sediments.

<i>Taxonomic groups</i>	% of phylotypes in the clones libraries				estimations for all libraries
	Therm01	Therm30	Creta1	S.Ionian	Eastern Mediterranean
<i>Beta- Gamma- Proteobacteria</i>	31.7	28.9	36.7	20.0	29.5
<i>Deltaproteobacteria</i>	23.8	17.8	12.2	12.0	16.9
<i>Acidobacteria</i>	11.1	15.6	12.2	24.0	15.5
<i>Planctomycetales</i>	7.9	13.3	10.2	14.0	11.1
<i>Alphaproteobacteria</i>	3.2	8.9	8.2	4.0	5.8
<i>Bacteroidetes</i>	4.8	4.4	2.0	2.0	3.4
<i>Actinobacteria</i>	3.2	4.4	2.0	4.0	3.4
<i>Verrucomicrobia</i>	0.0	2.2	6.1	4.0	2.9
<i>Chloroflexi</i>	3.2	0.0	0.0	4.0	1.9
<i>Nitrospirae</i>	0.0	0.0	6.1	2.0	1.9
<i>Chlamydiae</i>	0.0	2.2	2.0	0.0	1.0
<i>Firmicutes</i>	1.6	0.0	0.0	0.0	0.5
<i>Spirochaetales</i>	1.6	0.0	0.0	0.0	0.5
OP11 group	3.2	0.0	0.0	0.0	1.0
Nonaffiliated groups	4.8	2.2	2.0	10.0	4.9

### 3.3 Bacterial Diversity

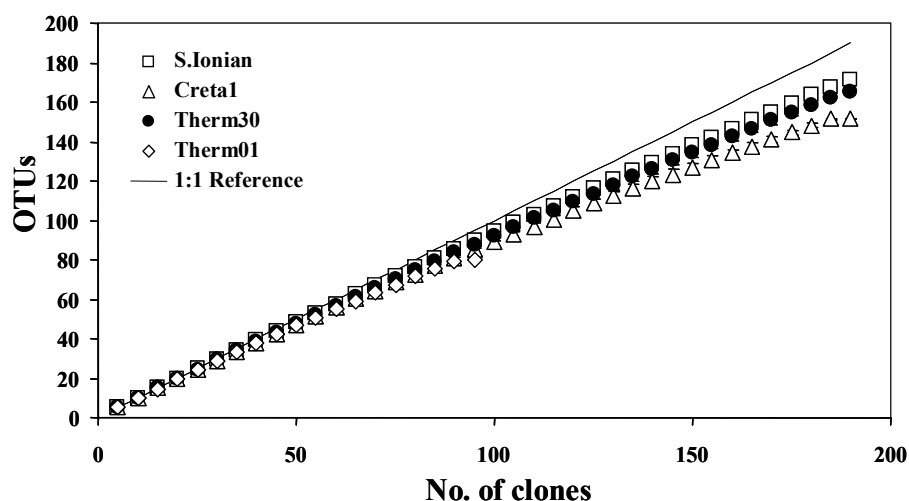
The number (richness) and frequency (evenness) of 16S rDNA-based phylotypes were evaluated by RFLP analysis of between 94 and 190 randomly selected clones from each of the 4 sediment libraries. We were only able to manually compare and classify the RFLP patterns for single libraries (max. 190 clones) since it was necessary to run out similar clones ‘‘side by side’’ in order to determine if they represented unique patterns. This pairwise screening was extremely time-consuming and due to the large size of the combined library (664 clones), no attempts were made to compare the RFLP patterns between the different libraries. Species richness based on RFLP banding patterns was therefore only calculated for individual clone libraries. Eighty different OTUs (e.g. unique RFLP patterns) were identified among the 94 screened clones from the Therm01-library, whereas 165, 152, and 171 different OTUs were determined from the 190 clones screened for each of the three additional sediments (i.e. Therm30, Creta1 and S.Ionian; Table 1). The Chao-1 richness estimator was highest for the

**Table 4.** Comparisons of the 16S rDNA clone libraries Therm01, Therm30, Creta1, S.Ionian. Analysis was carried out using the LIBSHUFF software. Values of  $\Delta C$  indicated that differences between homologous and heterologous coverage curves were significant for all crosswise comparisons at  $P < 0.05$ . Similarities ( $S$ ) using mixed-community T-RFLP data from Polymenakou et al. [42] are also presented for comparison. The similarity  $S = 2J / (N_A + N_B)$ , where  $J$  is the number of common bands or terminal restriction fragments in samples  $A$  and  $B$ , and  $N_A$  and  $N_B$  are the total number of bands in the sample  $A$  and  $B$  respectively [42].

Stations	Therm30		Creta1		S.Ionian	
	LIBSHUFF	T-RFLP	LIBSHUFF	T-RFLP	LIBSHUFF	T-RFLP
	$\Delta C (P=0.001)$	$S$	$\Delta C (P=0.001)$	$S$	$\Delta C (P=0.001)$	$S$
Therm01	4.510	0.612	4.510	0.565	4.510	0.409
Therm30			12.811	0.503	12.811	0.481
Creta1					11.574	0.384

South Ionian Sea and station Therm30 ( $1,306 \pm 187$  and  $958 \pm 134$  OTUs respectively; Table 2), whereas lower values were obtained for Therm01 and Creta1 ( $440 \pm 88$  and  $478 \pm 60$  OTUs respectively; Table 2). However, all these estimates of total sequence richness are

underestimates since the screening of the libraries suggested that our libraries only contained a minor fraction of the total bacterial 16S rDNAs and that nearly every new clone screened represented a novel RFLP pattern (Fig. 3).



**Figure 3.** Rarefaction analysis of 16S rDNA sequence heterogeneity in clone libraries from four geographically separated sediments situated in the Eastern Mediterranean Sea (Therm01, Therm30, Creta1, and S.Ionian). Total number of screened clones are plotted against unique operational taxonomic units (OTUs) identified by RFLP screening using two four-cutter restriction enzymes (*HhaI* and *HaeIII*). Error bars (hidden in symbol) indicate the standard deviation and the diagonal line represent the 1:1 relationship where each screened clone is unique.

In an attempt to determine the significance of differences between the clone libraries based on available sequence data, we applied LIBSHUFF statistics (Fig. 4). A comparison of all libraries revealed that bacterial community composition differed significantly between the four sampling sites ( $P = 0.001$  for each combination; Table 4; Fig. 4). More detailed information on differences between clone libraries was obtained by examining the distribution of  $(C_X - C_{XY})^2$  as a function of evolutionary distance ( $D$ ). The coverage curves for representative pairs of clone libraries clearly show major differences also at low levels of genetic distance ( $D > 0.2$ ; Fig. 4) and these differences were even more obvious for sediments from different regions (e.g. Thermaikos Gulf and South Ionian Sea; Fig. 4B). Due to the uncertainties associated with comparing RFLP banding patterns between the four screened libraries, we used previously published Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) results as a measure of compare bacterial community composition in the sediments [42]. The maximum similarity value for the T-RFLP pattern was observed for the two adjacent stations within the Thermaikos Gulf ( $S = 0.612$ ; Table 4) whereas these community fingerprints were least similar for the Cretan and South Ionian seas ( $S = 0.384$ ; Table 4), corroborating the results from the LIBSHUFF clone library comparisons.

#### 4. Discussion

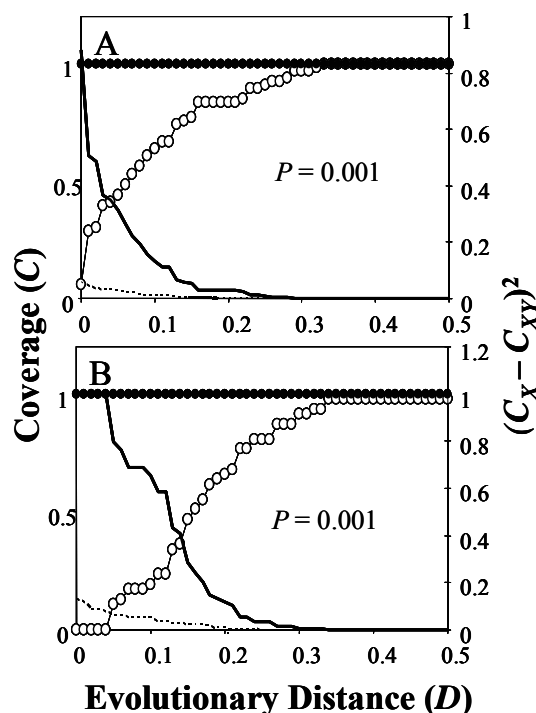
The observed differences in microbial community composition among the sampled sediments are likely associated with their geographic location since different water masses are subject to contrasting environmental influences. For example, station Therm01 is subject to anthropogenic influences from Thessaloniki harbor and also receives a major input of riverine water from a hydroelectric dam-construction [29]. The deeper South Ionian Sea has high levels of petroleum hydrocarbons with strong influences from the southern Adriatic and the Levantine Sea [37].

Clones affiliated with *Gammaproteobacteria* occurred more frequently in the three shallow sediments compared to the deep, low-chlorophyll sediment of the South Ionian Sea. These more shallow sediments also had multiple clones affiliated with the novel cluster Therm/Creta1 (Fig. 2A). *Gammaproteobacteria* were also the dominant bacterial group in the previously published clone libraries from Antarctic shelf

sediments [10] and an Arctic sediment [46]. Sequences affiliated with *Desulfobacteraceae* were only observed in the two libraries from the Thermaikos Gulf, possibly indicating that this family is mainly associated with the more productive and shallow sediments of this sub-basin.

The libraries from the two sediments with the highest petroleum hydrocarbon levels (Therm01 and S.Ionian) contained few alphaproteobacterial sequences (3.2 and 4% of total sequences, respectively) whereas the frequency of alphaproteobacterial sequences was much higher in libraries from the sediments with lower petroleum concentration (Creta1, 8.2%, and Therm30, 8.9%). The lower abundance of alphaproteobacterial clones in these libraries could be associated with the presence of various hydrocarbon contaminants or with differences in productivity of the water column. This is in agreement with Horner-Devine et al. [26] who showed that *Alphaproteobacteria* richness is linked to productivity levels in aquatic ecosystems.

In addition to the observed differences in microbial community composition between sampling locations, all clone libraries were found to be highly diverse. Torsvik and coworkers used DNA:DNA reassociation kinetics to assess the total community genome complexity in various environments and found that bacterial communities in pristine marine sediments can have a total community genome complexity exceeding values obtained for complex microbial soil communities (~11,400 compared to ~8,800 genome equivalents) [58]. In addition to being highly diverse, sediment bacterial communities consist largely of uncultivated representatives [11]. Hence culture independent tools play a pivotal role in the analysis of diversity and distribution of these organisms that often regulate major biogeochemical cycles as well as the degradation and transformation of pollutants. Similar to other methods, based on the use of PCR to enrich multiple alleles of specific genes from complex mixtures of genomes, 16S rDNA clone libraries suffer from methodological constraints that may skew the distribution of phylotypes in the library relative to the community it was derived from [63]. Such bias may result from stochastic events during the first cycles of the PCR [64], preferential amplification of certain sequences [38] and a leveling effect in later stages of the PCR leading to a 1:1 bias in product ratios [55]. Hence we cannot assume that the quantitative distribution of phylotypes in the library is a direct quantitative representation of the community it was derived from even if care is taken to minimize the bias (e.g. replicate PCR reactions, few amplification cycles). This is also evident if we consider that the number of rRNA operons in single cells may vary from 1 to 15 between different taxa [2, 3].



**Figure 4.** Results of selected LIBSHUFF comparisons of clones from (A) Therm01 ( $X$ ) to Therm30 ( $Y$ ) and (B) Therm30 ( $X$ ) to S.Ionian ( $Y$ ) clone libraries. Homologous (O) and heterologous (●) coverage curves for 16S rDNA are presented. Solid lines indicate  $\Delta C$  or  $(C_X - C_{XY})^2$  for the original samples at each value of evolutionary distance ( $D$ ). Broken lines indicate the 950<sup>th</sup> value (or  $P = 0.05$ ) of  $\Delta C$  for the randomized samples. The applied LIBSHUFF software has been created by Singleton et al. [52].



PCR-induced formation of chimeric molecules, heteroduplexes and mutations resulting from Taq-error may also bias the library and introduce 'artificial' diversity. This interference can be largely avoided by lowering the number of amplification cycles and carrying out 'reconditioning PCR' [57]. Finally, rRNA heterogeneity within genomes can be as high as 1% for bacteria [2, 3]. This variability between operons may obscure discrimination of phylotypes that are more than 99% similar since they may represent a single bacterial population.

In the present study we used RFLP screening with two four-cutting restriction enzymes (*HhaI* and *HaeIII*) to assess the richness in the respective library. Such a screening, with 1-4 restriction enzymes, is normally used to screen large clone libraries prior to sequencing of selected clones for phylogenetic analysis and it has been shown that parallel use of 4 such restriction enzymes can discriminate among sequences that are more than 98% similar [39]. Hence our richness estimates ranging from 440 to 1306 unique phylotypes are minimum estimates that should be largely insensitive to the 'artificial' microdiversity potentially introduced in the PCR. The use of variable definitions of a phylotype or OTU in different studies of sediment clone libraries may also be part of the reason behind the variability in estimated species richness and coverage among different sediment 16S rRNA libraries (Table 2). A previous attempt to rarefy bacterial 16S rDNA clone libraries from marine sediments by direct comparison of sequence homology (98% similarity) has clearly shown that sediment communities are highly diverse, e.g. libraries do not rarefy as more clones are screened and almost every sequenced clone is unique in the respective library [10]. Richness estimates based on capture-recapture statistics indicate a combined phylotype richness of 4.350 unique bacterial phylotypes from a single Antarctic sediment core and a coverage that ranges from 23-36% (3 sediment horizons). In contrast, Ravensschlag and coworkers [46] used RFLP screening with a single four-cutter restriction enzyme to delineate a phylotype and arrived at a coverage of >70% when 353 clones were screened (Table 2). The high sequence richness in all four sediment libraries in the present study indicates that thousands of clones need to be screened to rarefy any individual sediment clone library. This observation confirms that existing 16S rDNA clone libraries have only scratched the surface of the enormous bacterial diversity contained in sediments. Finally, not a single 16S rDNA sequence in our four sediment libraries was found in more than one of the four libraries.

The significance of differences between clone libraries was examined with LIBSHUFF statistics. Paired reciprocal comparisons indicated that each of the libraries differs significantly from the others, and this is in agreement with direct interpretation of phylogenetic trees (Fig. 2). The LIBSHUFF program is a good test of library overlap; however Stach et al. [53] reported that it is not sensitive to the phylogenetic grouping of taxa and therefore LIBSHUFF statistics may indicate identical communities ( $P = 1.00$ ) when libraries are composed of closely related taxa [53]). Despite methodological constraints regarding sample size in our study, the LIBSHUFF statistics scouts variation in differences between different pairs of clone libraries. Hence libraries from geographically remote regions were found to be much more different than those originating from the same general area (e.g. Thermaikos Gulf). This observation was also corroborated by an independent analysis of microbial community composition using T-RFLP analysis [42]. Bacterial community composition was found to differ greatly among the sampling locations probably as a consequence of either substantial regional variability or extremely high overall richness and evenness in Mediterranean sediment bacterial communities, or a combination of the two.

To conclude, we assessed the bacteria community composition in different sediments of the Eastern Mediterranean Sea. All four communities were highly diverse and the estimated total sequence richness was found to be comparable to estimates for microorganisms inhabiting terrestrial ecosystems [59, 66]. The quantitative distribution of different taxonomic groups (phyla/class) was overall very similar among the communities but notable differences were observed between deep and shallow sediments. All four libraries were found to be significantly different containing sequences affiliated with various environmental clones from hydrocarbon seeps, sulfate-reducers, sulfur-oxidizers and ammonia oxidizers. A large proportion of the obtained phylotypes represent bacteria that are only distantly related to any sequences in Genbank, implying that many more prokaryotic lineages await discovery as

high-throughput tools for analyzing large clone libraries are being put to use in studies of the complex microbial communities that inhabit marine sediments.

### Acknowledgments

The officers and the crew of the R/V's Aegaeo and Philia are acknowledged for their assistance during the sampling. This work was supported by the Swedish Research Council (grant 2002-4580 to S.B.) and the Swedish Research Council for Environment, Agricultural Sciences and Special Planning (grant 2002-0291 to S.B.). Sampling cruises were supported by the commission of the European Communities (through the Energy and Environment projects INTERPOL and ADIOS) and the Greek Ministry of Development (General Secretariat of Research and Technology).

### References

1. Acinas, SG, Antón, J, Rodríguez-Valera, F (1999) Diversity of free-living and attached bacteria in offshore western Mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 65: 514-522
2. Acinas, SG, Klepac-Ceraj, V, Hunt, D, Pharino, C, Ceraj, I, Distel, D, Polz, MF (2004) Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. *Nature* 430: 551-554.
3. Acinas, SG, Marcelino, LA, Klepac-Ceraj, V, Polz, MF (2004) Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *J Bacteriol* 186:2629-2635
4. Acinas, SG, Rodríguez-Valera, F, Pedrós-Alió, C (1997) Spatial and temporal variation in marine bacterioplankton diversity as shown by RFLP fingerprinting of PCR amplified 16S rDNA. *FEMS Microbiol Ecol* 24: 27-40
5. Altschul, SF, Madden, TL, Schaffer, AA, Zhang, J, Zhang, Z, Miller, W, Lipman, D (1997) Gapped BLAST and PSI\_blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402
6. Amann, RI, Ludwig, W, Schleifer, KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59: 143-69
7. Bano, N, Hollibaugh, JT (2002) Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean. *Appl Environ Microbiol* 68: 505-518
8. Barnett, PRP, Watson, J, Connelly, D (1984) A multiple corer for taking virtually undisturbed sediment samples from shelf bathyal and abyssal sediments. *Oceanol Acta* 7: 399-408
9. Boivin-Jahns, V, Ruimy, R, Bianchi, A, Daumas, S, Christen, R (1996) Bacterial diversity in a deep-subsurface clay environment. *Appl Environ Microbiol* 62: 3405-3412
10. Bowman, JP, McCuaig, RD (2003) Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. *Appl Environ Microbiol* 69: 2463-2483
11. Bowman, JP, Rea, SM, McCammon, SA, McMeekin, TA (2000) Diversity and community structure within anoxic sediment from marine salinity meromictic lakes and a coastal meromictic marine basin, Versfold Hills, Eastern Antarctica. *Environ Microbiol* 2: 227-237
12. Brinkhoff, T, Sievert, SM, Kuever, J, Muyzer, G (1999) Distribution and diversity of sulfur-oxidizing *Thiomicrospira* spp. at a shallow-water hydrothermal vent in the Aegean Sea (Milos, Greece). *Appl Environ Microbiol* 65: 3843-3849
13. Chao, A (1984) Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Stat* 11: 265-270
14. Coolen, MJ, Cypionka, H, Sass, AM, Sass, H, Overmann, J (2002) Ongoing modification of Mediterranean Pleistocene sapropels mediated by prokaryotes. *Science* 28: 2407-2410
15. Danovaro, R, Dell'Anno, A, Fabiano, M, Pusceddu, A, Tselepides, A (2001) Deep-sea ecosystem response to climate changes: the eastern Mediterranean case study. *Trends Ecol Evol* 16: 505-510

16. Danovaro, R, Dell'Anno, A, Pusceddu, A, Fabiano, M (1999) Nucleic acid concentrations (DNA, RNA) in the continental and deep-sea sediments of the eastern Mediterranean: relationship with seasonally varying organic inputs and bacterial dynamics. *Deep-Sea Res Part I* 46: 1077-1094
17. Danovaro, R, Dinet, A, Duineveld, G, Tselepides, A (1999) Benthic response to particulate fluxes in different trophic environments: a comparison between the Gulf of Lions-Catalan Sea (western-Mediterranean) and the Cretan Sea (eastern-Mediterranean). *Prog Oceanogr* 44: 287-312
18. Danovaro, R, Marrale, D, Dell'Anno, A, Della Croce, N, Tselepides, A, Fabiano, M (2000) Bacterial response to seasonal changes in labile organic matter composition on the continental shelf and bathyal sediments of the Cretan Sea. *Prog Oceanogr* 46: 345-366
19. Dugdale, RC, Wilkerson, FR (1988) Nutrient sources and primary production in the Eastern Mediterranean. *Oceanol Acta* 9: 178-184
20. Felsenstein, J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791
21. Felsenstein, J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17: 368-376
22. Gogou, A, Apostolaki, M, Stephanou, EG (1998) Determination of organic molecular markers in marine aerosols and sediments: one-step flash chromatography compound class fractionation and capillary gas chromatographic analysis. *J Chromatogr A* 799: 215-231
23. Gogou, A, Bouloubassi, I, Stephanou, EG (2000) Marine organic geochemistry of the Eastern Mediterranean: 1. Aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in Cretan Sea surficial sediments. *Mar Chem* 68: 265-282
24. Gray, JP, Herwig, RP (1996) Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 62: 4049-4059
25. Hedges, JI, Stern, JH (1984) Carbon and nitrogen determinations of carbonate-containing solids. *Limnol Oceanogr* 29: 657-663
26. Horner-Devine, MC, Leibold, MA, Smith, VH, Bohannon, BJM (2003) Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecol Lett* 6: 613-622
27. Hugenholtz, P, Goebel, BM, Pace, NR (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* 180: 4765-4774
28. Ignatiades, L (1969) Annual cycles, species diversity and succession of phytoplankton in lower Saronikos Bat, Aegean Sea. *Mar Biol* 3: 196-200
29. Karageorgis, AP, Anagnostou, CL (2001) Particulate matter spatial-temporal distribution and associated surface sediment properties: Thermaikos Gulf and Sporades Basin, NW Aegean Sea. *Cont Shelf Res* 21: 2141-2153
30. Lane, DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, Goodfellow, M (eds) *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, Wiley and Sons, Chichester, pp 115-175
31. Li, L, Kato, C, Horikoshi, K (1999) Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths. *Biodivers Conserv* 8: 659-677
32. Li, L, Kato, C, Horikoshi, K (1999) Microbial diversity in sediments collected from the deepest cold-seep area, the Japan Trench. *Mar Biotechnol* 1: 391-400
33. Lorenzen, C, Jeffrey, J (1980) Determination of chlorophyll in sea water. *UNESCO Technical Papers in Marine Science* 35: 1-20
34. Ludwig, W, Bauer, SH, Bauer, M, Held, I, Kirchhof, G, Schulze, R, Huber, I, Spring, S, Hartmann, A, Schleifer, KH (1997) Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. *FEMS Microbiol Lett* 153: 181-190
35. Madrid, VM, Aller, JY, Aller, RC, Chistoserdov, AY (2001) High prokaryote diversity and analysis of community structure in mobile mud deposits off French Guiana: identification of two new bacterial candidate divisions. *FEMS Microbiol Ecol* 37: 197-209

36. Maidak, BL, Cole, JR, Lilburn, TG, Parker, CT, Saxman, JrP-R, Farris, RJ, Garrity, GM, Olsen, GJ, Schmidt, TM, Tiedje, JM (2001) The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res* 29: 173-174
37. Malanotte-Rizzoli, P, Manca, BB, Ribera d' Alcalá, M, Theocharis, A, Bergamasco, A, Bregant, D, Budillon, G, Civitarese, G, Georgopoulos, D, Michelato, A, Sansone, E, Scarazzato, P, Souvermezoglou, E (1997) A synthesis of the Ionian Sea hydrography, circulation and water mass pathways during POEM-Phase-I. *Prog Oceanogr* 39: 153-204
38. Morasch, B, Richnow, HH, Schink, B, Meckenstock, RU (2001) Stable hydrogen and carbon isotope fractionation during microbial toluene degradation: mechanistic and environmental aspects. *Appl Environ Microbiol* 67: 4842-4849
39. Moyer, CL (2001) Molecular Phylogeny: applications and implications for marine microbiology. In: Paul, JH (ed) *Methods in Microbiology*, San Diego, Marine Microbiology, Academic Press, pp 375-394
40. Phillips, CJ, Smith, Z, Embley, TM, Prosser, JI (1999) Phylogenetic differences between particle-associated and planktonic ammonia-oxidizing bacteria of the  $\beta$  subdivision of the class *Proteobacteria* in the Northwestern Mediterranean Sea. *Appl Environ Microbiol* 65: 779-786
41. Pichinoty, F, Asselineau, J, Mandel, M (1984) Caractérisation biochimique de *Bacillus benzoovorans* sp. nov., une nouvelle espèce filamenteuse, engainée et mésophile, dégradant divers acides aromatiques et phénols. *Ann Microbiol* 135B: 209-217
42. Polymenakou, PN, Bertilsson, S, Tselepidis, A, Stephanou, EG (2005) Links between geographic location, environmental factors and microbial community composition in sediments of the Eastern Mediterranean Sea. *Microb Ecol* In press
43. Polz, MF, Cavanaugh, CM (1998) Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol* 64: 3724-3730
44. Psarra, S, Tselepidis, A, Ignatiades, L (2000) Primary productivity in the oligotrophic Cretan Sea (NE Mediterranean): seasonal and interannual variability. *Prog Oceanogr* 46: 187-204
45. Pukall, R, Päuker, O, Buntetuß, D, Ulrichs, G, Lebaron, P, Bernard, L, Guindulain, T, Vives-Rego, J, Stackebrandt, E (1999) High sequence diversity of *Alteromonas macleodii*-related cloned and cellular 16S rDNAs from a Mediterranean seawater mesocosm experiment. *FEMS Microbiol Ecol* 28: 335-344
46. Ravenschlag, K, Sahm, K, Pernthaler, J, Amann, R (1999) High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 65: 3982-3989
47. Sambrook, J, Russel, DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbour, New York
48. Sass, AM, Sass, H, Coolen, MJL, Cypionka, H, Overmann, J (2001) Microbial communities in the chemocline of a hypersaline deep-sea basin (Urania basin, Mediterranean Sea). *Appl Environ Microbiol* 67: 5392-5402
49. Schäfer, H, Servais, P, Muyzer, G (2000) Successional changes in the genetic diversity of a marine bacterial assemblage during confinement. *Arch Microbiol* 173: 138-145
50. Sievert, SM, Brinkhoff, T, Muyzer, G, Ziebis, W, Kuever, J (1999) Spatial heterogeneity of bacterial populations along an environmental gradient at a shallow submarine hydrothermal vent near Milos Island (Greece). *Appl Environ Microbiol* 65: 3834-3842
51. Sievert, SM, Kuever, J, Muyzer, G (2000) Identification of 16S ribosomal DNA-defined bacterial populations at a shallow submarine hydrothermal vent near Milos Island (Greece). *Appl Environ Microbiol* 66: 3102-3109
52. Singleton, DR, Furlong, MA, Rathbun, SL, Whitman, WB (2001) Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequences libraries from environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 67: 4374-4376
53. Stach, JEM, Maldonado, LA, Masson, DG, Ward, AC, Goodfellow, M, Bull, AT (2003) Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 69: 6189-6200
54. Strunk, O, Ludwig, W (1996) ARB: A software environment for sequence data, 2.1.1. Department of Microbiology, Technical University of Munich, Munich

55. Suzuki, M, Giovannoni, SJ (1996) Bias caused by template annealing in the amplification mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol* 62: 625-630
56. Teske, A, Hinrichs, K-U, Edgcomb, V, de Vera Gomez, A, Kysela, D, Sylva, SP, Sogin, ML, Jannasch, HW (2002) Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas basin: evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Appl Environ Microbiol* 68: 1994-2007
57. Thompson, JR, Marcelino, LA, Polz, MF (2002) Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequences and elimination by 'reconditioning PCR'. *Nucleic Acids Res* 30: 2083-2088
58. Torsvik, V, Lise Daae, F, Sandaa, R-A, Øvreås, L (1998) Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J Biotechnol* 64: 53-62
59. Torsvik, V, Øvreås, L, Thingstad, TF (2002) Prokaryotic diversity – Magnitude, dynamics and controlling factors. *Science* 296: 1064-1066
60. Tselepidis, A, Zervakis, V, Polychronaki, T, Danovaro, R, Chronis, G (2000) Distribution of nutrients and particulate organic matter in relation to the prevailing hydrographic features of the Cretan Sea (NE Mediterranean). *Prog Oceanogr* 46: 113-142
61. Urakawa, H, Kita-Tsukamoto, K, Ohwada, K (1999) Microbial diversity in marine sediments from Sagami bay and Tokyo bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology* 145: 3305-3315
62. Vergin, KL, Urbach, E, Stein, JL, DeLong, EF, Lanoil, BD, Giovannoni, SJ (1998) Screening of a fosmid library of marine environmental genomic DNA fragments reveals four clones related to members of the order *Planctomycetales*. *Appl Environ Microbiol* 64: 3075-3078
63. von Wintzingerode, F, Göbel, UB, Stackebrandt, E (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Ecol* 21: 213-229
64. Wagner, A, Blackstone, N, Cartwright, P, Dick, M, Misof, B, Snow, P, Wagner, GP, Bartels, J, Murtha, M, Pendleton, J (1994) Surveys of gene families using polymerase chain reaction: PCR selection and PCR drift. *Syst Biol* 43: 250-261
65. Zhang, H, Sekiguchi, Y, Hanada, S, Hugenholtz, P, Kim, H, Kamagata, Y, Nakamura, K (2003) *Gemmatimonas aurantica* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 1155-1163
66. Zhou, J, Xia, B, Treves, DS, Wu, L-Y, Marsh, TL, O'Neill, RV, Palumbo, AV, Tiedje, JM (2002) Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Appl Environ Microbiol* 68: 326-334



**ΚΑΤΑΤΕΘΕΙΣΑ  
ΕΡΓΑΣΙΑ ΙΙΙ**





# Continental Shelf Research ΚΑΤΑΤΕΘΕΙΣΑ ΕΡΓΑΣΙΑ

## Study of the mineralization effect on the distribution of lipids in sediments from the Cretan Sea: Evidence for hydrocarbon degradation and starvation stress

Paraskevi N. Polymenakou<sup>1,2</sup>, Anastasios Tselepidis<sup>1</sup>, Euripides G. Stephanou<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> *Hellenic Centre for Marine Research (Crete), Gournes Pediados, 71003, Heraklion, Greece*

<sup>2</sup> *Environmental Chemical Processes Laboratory (ECPL), Department of Chemistry, University of Crete, 71409 Heraklion, Greece*

\* Corresponding author.

Mailing address: *Environmental Chemical Processes Laboratory (ECPL), Department of Chemistry, University of Crete, 71409 Heraklion, Greece*

Phone.: +30 2810 393628, Fax.: +30 2810 393678, E-mail: stephanou@chemistry.uoc.gr

### Abstract

Sedimentary diagenetic processes alter the composition and distribution of different lipid compounds. In the present study alterations mediated by microbial communities were investigated along a bathymetric gradient (100 m at 35°23'N-25°09'E, 617 m at 35°33'N-25°08'E, 1494 m at 35°44'N-25°08'E) over the continental margin of northern Crete (Greece, Eastern Mediterranean Sea). Bacterial abundances and distribution were studied using phospholipid linked fatty acids (PLFA), in the range of C<sub>8</sub>-C<sub>22</sub>, released from intact phospholipids. Lipid components (aliphatic hydrocarbons, free fatty acids, glycerides and glycolipids) were studied over a 2-month incubation period. Carbon mineralization rates at all stations indicated an uneven distribution of active aerobic bacteria with values decreasing towards the deeper stations. PLFA homologue profiles denoted that aerobic gram negative and sulfur oxidizing bacteria dominated microbial communities while the anaerobic, gram positive and sulfate reducing bacteria occurred only in traces. The *n*-alkane (NA) composition revealed a strong predominance of homologues with odd carbon numbers suggesting an important terrestrial contribution to the sediments. The estimated descriptive ratios of NA, the sum of short chain NA (C<sub>15</sub>-C<sub>20</sub>) and long chain NA (C<sub>21</sub>-C<sub>36</sub>) to 17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-C<sub>30</sub>-hopane, before and after a two-month incubation period, indicated the occurrence of hydrocarbon degradation processes. Increased ratios of saturated to unsaturated fatty acids were also recorded after the incubation indicating the starvation of bacterial communities by the end of the experiments.

**Keywords:** mineralization, sediments, phospholipid-linked fatty acids, hydrocarbons, bacterial communities

### 1. Introduction

The quantity and quality of organic matter in the surface sediment layers depends mainly on the supply from different sources. Such are marine microbiota (e.g. algae, protozoa, bacteria, archaea), phytodetrital material and zooplankton sinking down from the euphotic zone as well as terrestrial plants (Postma et al. 1988; Rütters et al. 2002a; Volkman et al. 2000). The sediments can thus be characterized as the final depository for the accumulation of autochthonous and allochthonous organic matter (Fabiano and Danovaro 1994; Gogou and Stephanou 2004).

The input of organic matter can vary as a result of microbial degradation during diagenesis in the water column and surface sediment (Teece et al. 1998). Many attempts have been made to study microbial communities in the sediments based on cultivation approaches (Suzuki and DeLong 2002; Wieringa et al. 2000) or analysis of lipid biomarkers (Bobbie and White 1980; White et al. 1979; White et al. 1996). The assessment of metabolically diverse microorganisms is very difficult as viable bacterial counts represent only 10% of the total

community (Virtue et al. 1996). Thus, the composition of phospholipids and other lipid biomarkers provides an insight into the community composition (White et al. 1996). In addition, it reflects the physiological/nutritional status of the communities (White 1995) since the phosphate group within phospholipids can be hydrolyzed and released by cellular enzymes within 2-4 days following cell death (White et al. 1979).

It is well known that bacteria play a significant ecological and biogeochemical role in marine ecosystems by regulating the transformation of major bioactive elements (e.g. carbon, nitrogen, phosphorus, oxygen and sulfur) (Danovaro et al. 2000; Guezennec and Fiala-Medioni 1996; Ringelberg et al. 1997), and by affecting the degradability of organic matter (Aller and Aller 1998). Oxidic conditions within the sediments have been reported to stimulate the mineralization processes of the more refractory organic material like aromatic or polymeric compounds (Benner et al. 1984), while redox conditions have a minor influence on the degradability of the more labile organic matter (Otsuki and Hanya 1972).

Organic matter mineralization is the result of the degradation of bulk fractions of varying lability. Lipids are generally less labile than carbohydrates and proteins and tend to be preserved in marine sediments (Teece et al. 1998). However, very little is known about the fate of the different lipid compounds during mineralization processes. Moreover, our knowledge about the metabolically active members of the microbial communities and their role in these processes is rather scarce. This is especially true in deep-sea environments (Danovaro et al. 2000). The present study was designed in an attempt to investigate the effect of sedimentary mineralization processes on lipid composition (aliphatic hydrocarbons, diglycerides, glycolipids, free fatty acids) on the continental shelf and bathyal surface sediments of the Cretan Sea (Eastern Mediterranean Sea). It also aimed at exploring the microbial community composition mediating these processes by using phospholipid-linked fatty acid analysis.

## 2. Description of study site

From a hydrological and physiographic point of view the Cretan Sea is a very dynamic region located in the Eastern basin of the Mediterranean Sea, which is considered to be one of the most oligotrophic regions in the world with a characteristic overall nutrient deficit (Ignatiades 1969; Tselepidis et al. 2000a). The Cretan Sea is the largest in volume and deepest (2500 m) basin of the Aegean Sea (Georgopoulos et al. 2000). It communicates with both the Levantine Basin and the Ionian Sea through the eastern and western straits of the Cretan Arc, respectively (Georgopoulos et al. 2000). The Cretan basin is influenced strongly by the cold and oxygen depleted Trans-Mediterranean water, which has a low salinity but is on the other hand quite rich in nutrients flowing in from the Levantine Sea (Balopoulos et al. 1999; Theocharis et al. 1999). The study area is confined by 35°22'N-35°45'N and 25°00'E-25°20'E, and located at the southern continental margin of the central part of the Cretan basin, extending northwards from the coast of Crete to the deeper parts (>1500 m) of the Cretan basin (Chronis et al. 2000) (Fig. 1a). Previous studies in the investigated area have shown that the Cretan basin consists of a narrow continental shelf (1.5° slope) followed by a steep slope (2°-4°) and a rather flat deeper area with depths exceeding 1700 m (Chronis et al. 2000) (Fig. 1b). In the present study three stations were sampled along a bathymetric gradient in the Cretan Sea, one located on the narrow continental shelf (35°23'N-25°09'E station MPI1 at 100 m depth), another on the relatively steep upper slope (35°33'N-25°08'E station MPI2 at 617 m depth), and the third at the base of the continental slope (35°44'N-25°08'E station MPI3 at 1494 m depth) (Fig. 1b).

Surface sediments at the shallow station are generally sandy and of terrigenous origin, while on the upper and outer slope they are mostly fine grained with high mud contents of biogenic origin. A comprehensive study on the grain size distributions is given by Chronis et al. (2000). The sediments are permanently oxic with relatively high values above the sediment surface (Tselepidis et al. 2000b). Intense organic loading is mostly evident during the summer periods on the shallow sediments (Tselepidis et al. 2000b). The latter authors have also reported organic matter values and other geochemical data (all acquired on a seasonal basis during the CINCS project in 1994-1995), obtained from the same sampling sites

analyzed here. Total carbohydrates were found to represent the main component of the organic matter (43-83%), proteins were quantitatively the second most abundant class of organic compounds, while lipids were the minor component (Tselepidis et al. 2000b).

### 3. Material and Methods

#### 3.1 Samples collection

A Bowers and Connelly Multiple-corer (8 cores, i.d. 9.0 cm) was used to collect undisturbed surface sediment samples from the Cretan Sea in July 2002 (Fig. 1a). Sampling was carried out onboard the R/V *Philia*. Sediment slurries for the incubation experiments and samples for chemical analysis were collected from the same cores. Samples for analysis of lipid biomarkers were sealed in aluminum foil stored frozen at -20°C and processed immediately in the laboratory. Total organic carbon in sediments was analyzed according to Hedges and Stern (1984), using a Perkin Elmer CHN 2400 analyser.

#### 3.2 Mineralization rates

Carbon mineralization rates were assessed by measuring the production of CO<sub>2</sub>, the end product of organic carbon degradation, in the headspace above sediment-water slurries, as described by Dauwe et al. (2001). 20 ml of fresh derived sediment was transferred into 70 ml glass dark incubation bottles, and diluted with 10 ml filtered seawater. The bottles were then sealed tightly, with screw caps containing rubber septa. Headspaces were purged three times for 10 min with synthetic air (N<sub>2</sub>:O<sub>2</sub>, 80:20) to retain oxic conditions during the incubation and to remove traces of CO<sub>2</sub>. Bottles containing only filtered seawater and gas were used as controls. For 2 months all bottles were incubated in the dark at 20°C (*in situ* temperature), and rotated periodically to allow exchange between the slurry and the headspace.

The concentrations of CO<sub>2</sub> in the headspace were determined on a 5890 Hewlett Packard Gas Chromatographer, equipped with a thermal conductivity detector, and a Carboxen 100G column (30×0.53 mm, Supelco). Data recovery was obtained using a HP3365 series II Chemstation (version A.03.01). Calibration standard curves were acquired using ultrapure gas CarbonDioxide (Messer, product Nr. 1527). After the incubations and measurements, the bottles were opened and the pH was measured. All samples were weighed, freeze-dried and weighed again for the determination of the dry weight and the exact volume of the sediment. Incubation experiments were carried out in duplicate. The total amount of carbon dioxide produced was calculated as the sum of the headspace and the dissolved gas. All mineralization rates were expressed as nmol CO<sub>2</sub>(ml of slurry)<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>.

#### 3.3 Total lipids extraction, fractionation and derivatization

Total lipids were extracted from the sediments before and after the incubation experiments using a modified method of Bligh and Dyer (1959). After the incubation experiments the sediments from the replicate bottles were pooled to obtain sufficient material for the lipid extraction. About 3 g of freeze-dried sediment were ultrasonically extracted for 5 min with a solvent mixture of chloroform/methanol/phosphate buffer (2:1:0.8 v/v/v). The mixtures were then allowed to extract in the dark at 4°C under vigorous agitation for 3 h. After partitioning of the solution into organic and aqueous phases with 7.5 ml chloroform and 7.5 ml deionized water, the organic phase was collected and evaporated to near dryness. Total lipids were separated into different lipid classes using solvent systems of different polarities as described by Rütters et al. (2002b). The fractions of aliphatic hydrocarbons, diglycerides, free fatty acids and glycolipids were further analyzed. Replicates of phospholipid fractions prior to incubation periods were separated and analyzed with the methods described previously (Polymenakou et al. 2005a). Aliquots of the fractions of diglycerides, glycolipids and phospholipids, were transesterified to fatty acids methyl esters (FAME) by mild alkaline methanolysis as described by Smoot and Findlay (2001). The fractions of free fatty acids were dried with anhydrous magnesium sulfate, and after evaporation of the solvent, crystalline residues were derivatized with freshly prepared solution of diazomethane in diethyl ether until the yellow color of the reagent stabilized. The derivatized extracts were directly analyzed by GC-MS without further purification.

#### 3.4 Lipid biomarkers analyses

Gas chromatography-Mass Spectrometry was used to identify and quantify the aliphatic hydrocarbon fractions and the fatty acid methyl esters (FAME) of the remaining fractions. A Hewlett Packard Model 6890 GC equipped with a split-splitless injector was directly coupled to a fused silica capillary column (HP-5 MS with 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness, 30 m  $\times$  0.25 mm I.D.) attached to the ion source. Helium was used as a carrier gas. The chromatographic conditions were the following (temperature program for aliphatic hydrocarbons): injector temperature 270°C; temperature program, 70°C (1 min), 70-150°C (10°C/min), 150-290°C (5°C/min), and 290°C (30 min). Temperature program for FAME analysis: injector temperature 270°C; temperature program, 70°C (1 min), 70-140°C (10°C/min), 140-240°C (4°C/min), and 240°C (30 min). In both methods 1  $\mu\text{l}$  of each sample was injected in the splitless mode. Identification of *n*-alkanes was based on comparison of retention times to purchased standards of PolyScience (Preston Industries, Inc., Illinois, USA) and of fatty acids to purchased standards of Supelco (Supelco 37 Component FAME Mix, USA). Quantification of aliphatic hydrocarbons and PLFA were carried out using the internal standards 1-chlorohexadecane and nonadecanoic acid methyl ester, respectively.

## 4. Results

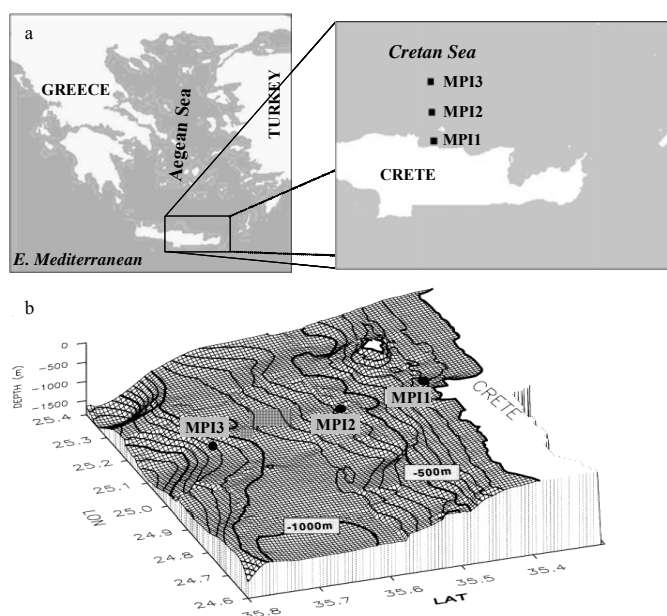
### 4.1 Biogeochemical characteristics of the sampling area

#### Carbon mineralization rates.

Carbon mineralization rates ranged between 2-8.5  $\text{nmol CO}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , and displayed a definite decrease towards the deeper stations, with the maximum recorded value at the shallow station MPI1 and the minimum at the deep station MPI3 (Fig. 2). The organic carbon content was similar for all stations (4.2 - 4.8  $\text{mg g}^{-1}$ ; Table 1) and was comparable to values found in a previous study conducted in the same area (3.0-8.2  $\text{mg g}^{-1}$ ; Gogou et al. 2000) as well as to organic carbon levels found in open sea areas of the NW Mediterranean (3.8-14.7  $\text{mg g}^{-1}$ ; Bouloubassi et al., 1997). The organic carbon concentrations can vary in various environments due to fluctuations

of bulk and specific organic supply as well as to variations in inorganic materials (dilution effect) (Gogou et al. 2000). Therefore, besides the absolute concentrations ( $\text{ng g}^{-1}$  of dry sediment) for the various hydrocarbon classes we estimated also the organic carbon-normalized concentrations ( $\mu\text{g g}^{-1}$  of organic carbon) as described by Gogou et al. (2000).

**Aliphatic hydrocarbons (AHC).** The aliphatic hydrocarbon fraction was dominated by *n*-alkanes and an unresolved complex mixture (UCM) (Fig. 3a). UCM consists of a mixture of branched alkanes, cycloalkanes, monoaromatics, naphthalenes and multi-ring polyaromatic hydrocarbons (Frysiner et al. 2003). Absolute (AHC) and organic carbon-normalized concentrations (AHC/OC) ranged from 2107.4 – 4323.1  $\text{ng g}^{-1}$  and 501.8 – 960.7  $\text{ng g}^{-1}$  (Table 1), respectively. The AHC concentrations measured in our study were comparable to values reported for sediments collected at open sea areas, such as the Western North Atlantic (1.3 – 7.5  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; Farrington and Tripp 1977) and definitely lower than those reported for sediments from the Black Sea (10-150  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; Wakeham 1996).

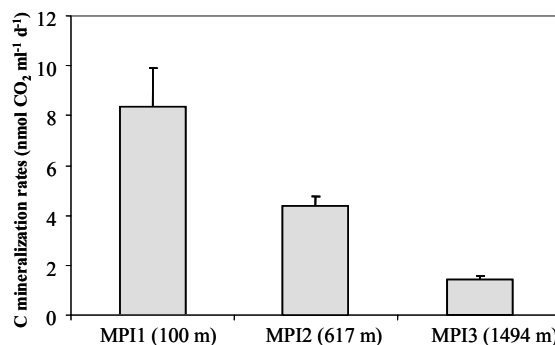


**Figure 1.** a) Map showing the sampling locations on the Cretan Basin. b) Detailed bathymetry map of the study area (adapted from Chronis et al. 2000).

*n*-Alkane (NA) concentration ( $C_{15}$  -  $C_{40}$ ) ranged from 123.2 to 241.3  $\text{ng g}^{-1}$ ; Table 1) and is comparable to values reported for pristine regions of the South Caspian Sea (0.5  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; Tolosa et al. 2004) and the Antarctic islands of South Orkney (0.4  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; Cripps 1994). Organic-carbon normalized concentrations of NA were 53.6  $\mu\text{g g}^{-1}$ , 25.7  $\mu\text{g g}^{-1}$  and 37.6  $\mu\text{g g}^{-1}$  at stations MPI1, MPI2 and MPI3, respectively (Table 1). We also detected *n*-alkenes  $C_{16:1}$ ,  $C_{18:1}$  and  $C_{20:1}$  at all three stations in concentrations ranging from 8.4 to 34.2  $\text{ng g}^{-1}$  (Table 2). The predominance of long chain homologues ( $\Sigma(C_{21}\text{-}C_{36})$ ; Fig. 3a, 3b Table 1) was evident at all stations. The carbon preference index (CPI; *odd-to-even* ratio) of *n*-alkanes is an important parameter to specify their origin (Simoneit 1999). In the present study, CPI values were estimated by using the following equation:

$$\text{CPI} = \Sigma(C_{21}\text{-}C_{35}) / \Sigma(C_{22}\text{-}C_{36})$$

Naturally emitted hydrocarbons exhibit values of  $\text{CPI} > 1$  (Simoneit 1999). Conversely, CPI values near or lower than one are useful indicators of vehicular emissions and other anthropogenic activities (Simoneit 1999). In our study, CPI values ranged from 2.6 – 3.6, with the maximum value recorded at the deepest sampling station MPI3 (Table 2). The sum of the concentrations of the three most abundant terrestrial NA ( $C_{27}$ ,  $C_{29}$  and  $C_{31}$ , Ter; Table 1) was higher in the shallow station MPI1 (104.6  $\text{ng g}^{-1}$ ; Table 1) indicating the contribution of continental run-off to terrestrial organic matter in the study area. However, these values are lower than those found in coastal areas in the NW Mediterranean Sea (2.0-12.9  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; Bouloubassi et al. 1997), which are influenced by riverine inputs. Organic carbon-normalized concentrations of the above mentioned terrestrial NA (23.2, 12.9 and 17.8  $\mu\text{g g}^{-1}$  at stations MPI1, MPI2 and MPI3, respectively) were also higher at the shallow station MPI1 and showed the same variability with their corresponding absolute concentrations. The relative increase of terrestrial NA recorded at the deep sampling station MPI3 (Table 1) suggested the occurrence of sediment resuspension processes at the base of the continental slope (Fig. 1). This observation confirmed previous findings for the same area (Chronis et al. 2000; Gogou et al. 2000).



**Figure 2.** Carbon mineralization rates ( $\text{nmol CO}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) in the Cretan Sea sediments. Error bars indicate standard deviations ( $n=2$ ).

The short-chain *n*-alkanes ( $C_{15}$  –  $C_{20}$ ) attained low concentrations (5.9 – 19.8  $\text{ng g}^{-1}$  dry weight; Table 1) and displayed a decreasing trend towards the deeper station MPI3. The sum of concentrations of the marine *n*-alkanes  $C_{15}$ ,  $C_{17}$  and  $C_{19}$  (Mar, Table 1) as well as the organic carbon normalized concentrations (Mar/OC; 1.6, 0.5 and 0.4  $\mu\text{g g}^{-1}$  at stations MPI1, MPI2 and MPI3, respectively) showed the same trend whereas the maximum concentration of the aquatic algal biomarker  $C_{17}$  (Blumer et al. 1971) was recorded at the shallow station MPI1.

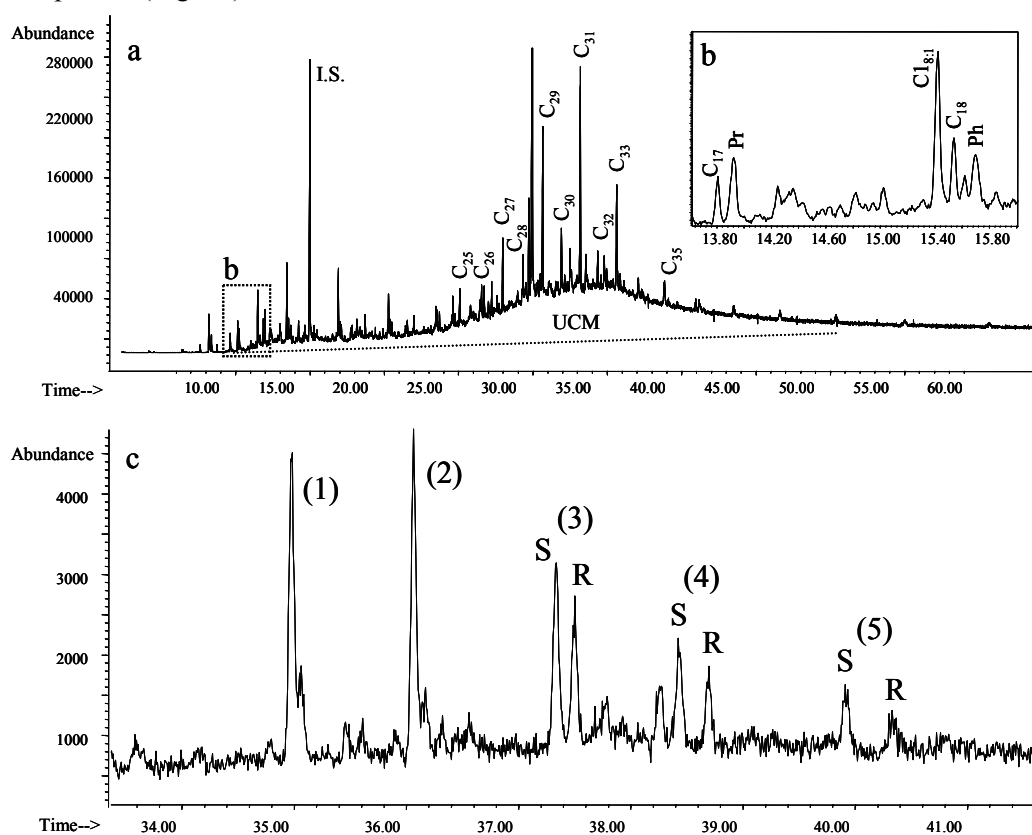
The hump (UCM) observed in the base line of the aliphatic fraction chromatogram, ranging from  $C_{15}$  to  $C_{36}$  (Fig. 3a) indicated the presence of oil pollution in the sediment samples (Gogou et al. 2000). UCM was the major component of the aliphatic hydrocarbon fraction in the Cretan Sea sediments ranging from 1949.5 to 4081.8  $\text{ng g}^{-1}$  (Table 1). These values were in the same range with those previously reported for the same area (2372.0 - 4800.5  $\text{ng g}^{-1}$ ; Gogou et al. 2000) but they were lower than those found in coastal (7 - 488  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; Tolosa et al. 1996) and open areas of the NW Mediterranean (7 - 13  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; Tolosa et al. 1996). The crude oil molecular markers of isoprenoid hydrocarbons pristane and phytane (Figs. 3a, b) were also present in all samples. A wide variety of biomarkers, including tricyclic, tetracyclic and pentacyclic terpanes, have been used for the characterization of the origin of different crude oils (Wang et al. 1999). In the present study, a series of  $C_{29}\text{-}C_{33}$  pentacyclic terpanes (hopanes) could be identified on the basis of their mass spectra and gas chromatography retention time (Gogou et al. 2000). Fig. 3c shows the characteristic selected

**Table 1.** Concentration of aliphatic hydrocarbons and phospholipids determined in Cretan Sea surficial sediments.

AHC: total concentration of aliphatic hydrocarbon; OC: organic carbon; NA: *n*-alkanes; UCM: unresolved complex mixture;  $\Sigma(C_{21}-C_{36})$ : sum of concentrations of NA from C<sub>21</sub> to C<sub>36</sub>; Ter: sum of concentrations of terrestrial NA C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub> and C<sub>31</sub>;  $\Sigma(C_{15}-C_{20})$ : sum of concentrations of NA from C<sub>15</sub> to C<sub>20</sub>; Mar: sum of concentrations of marine NA C<sub>15</sub>, C<sub>17</sub> and C<sub>19</sub>; PLFA: phospholipid linked fatty acids; SFA: saturated fatty acids; ESFA: even numbered saturated fatty acids; OSFA: odd numbered saturated fatty acids; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids; sd: standard deviation. The *trans/cis* ratio was calculated for the monounsaturated fatty acid C<sub>18:1 $\omega$ 9</sub>. Cells g<sup>-1</sup> was calculated using the conversion factor described by Stafford 1977 and White et al. 1979.

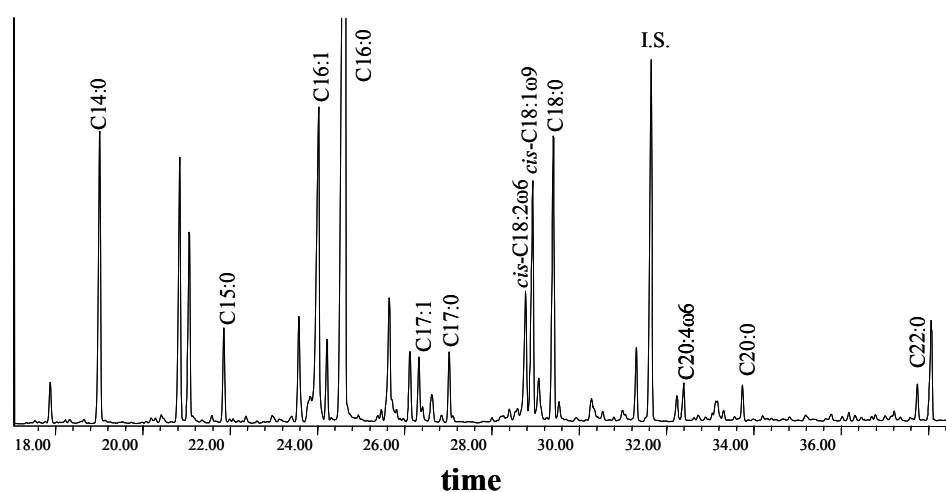
Compounds	MPI1	MPI2	MPI3
Water column depth (m)	100	617	1494
Organic carbon (mg g <sup>-1</sup> )	4.5	4.8	4.2
AHC (ng g <sup>-1</sup> ) [AHC/OC (μg g <sup>-1</sup> )]	4321.1 [960.7]	2986.9 [622.3]	2107.4 [501.8]
NA (ng g <sup>-1</sup> ) [NA/OC (μg g <sup>-1</sup> )]	241.3 [53.6]	123.2 [25.7]	157.9 [37.6]
UCM (ng g <sup>-1</sup> ) [UCM/OC (μg g <sup>-1</sup> )]	4081.8 [907.1]	2863.7 [596.6]	1949.5 [471.3]
$\Sigma(C_{21}-C_{36})$ (ng g <sup>-1</sup> )	198.2	108.9	137.7
Ter (ng g <sup>-1</sup> )	104.6	62.3	74.8
$\Sigma(C_{15}-C_{20})$ (ng g <sup>-1</sup> )	19.8	10.3	5.9
Mar (ng g <sup>-1</sup> )	7.2	2.3	1.8
PLFA (± sd)			
Total (ng g <sup>-1</sup> )	644.2 ± 155.6	537.7 ± 154.1	1368.7 ± 312.5
SFA %	50.6 ± 9.8	62.9 ± 17.2	56.0 ± 11.9
ESFA %	47.5 ± 7.6	54.0 ± 12.2	51.3 ± 9.8
OSFA %	3.1 ± 2.2	8.9 ± 5.0	4.7 ± 2.1
MUFA %	46.3 ± 12.2	30.0 ± 7.5	40.3 ± 8.5
PUFA %	3.1 ± 2.1	7.0 ± 4.0	3.7 ± 2.4
<i>trans/cis</i> ratio	1.6 ± 0.5	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.2
× 10 <sup>8</sup> (cells g <sup>-1</sup> )	1.4	1.2	2.9
PLFA distribution (ng g <sup>-1</sup> ± sd)			
C <sub>8:0</sub>	0.1 ± 0.1	-	-
C <sub>10:0</sub>	0.4 ± 0.3	0.9 ± 0.4	0.1 ± 0.1
C <sub>11:0</sub>	1.0 ± 0.7	-	1.6 ± 2.0
C <sub>12:0</sub>	3.4 ± 2.3	3.1 ± 2.9	2.4 ± 2.1
C <sub>13:0</sub>	0.7 ± 0.7	0.5 ± 0.7	1.4 ± 1.3
C <sub>14:1</sub>	2.1 ± 1.3	1.7 ± 0.2	0.6 ± 0.5
C <sub>14:0</sub>	48.4 ± 4.8	34.7 ± 7.7	134.9 ± 25.1
<i>cis</i> -10- C <sub>15:1</sub>	4.1 ± 1.8	7.1 ± 3.5	2.5 ± 1.7
C <sub>15:0</sub>	11.3 ± 8.9	37.3 ± 16.9	34.0 ± 11.9
C <sub>16:1</sub>	218.2 ± 48.2	77.8 ± 21.4	364.8 ± 62.5
C <sub>16:0</sub>	208.1 ± 27.7	181.7 ± 35.9	492.1 ± 86.4
<i>cis</i> -10- C <sub>17:1</sub>	1.1 ± 0.8	9.4 ± 0.8	4.1 ± 2.9
C <sub>17:0</sub>	5.9 ± 3.5	6.9 ± 6.6	19.6 ± 6.1
C <sub>18:3<math>\omega</math>3</sub>	0.2 ± 0.4	1.7 ± 0.2	6.4 ± 8.2
<i>cis</i> - C <sub>18:2<math>\omega</math>6</sub>	3.6 ± 2.3	1.8 ± 0.3	11.4 ± 6.0
<i>trans</i> - C <sub>18:1<math>\omega</math>9</sub>	31.0 ± 6.7	25.7 ± 5.0	68.7 ± 19.1
<i>cis</i> - C <sub>18:1<math>\omega</math>9</sub>	19.8 ± 11.8	29.7 ± 1.7	74.1 ± 1.3
C <sub>18:0</sub>	37.4 ± 11.6	51.1 ± 1.7	58.5 ± 14.7
C <sub>20:4<math>\omega</math>6</sub>	3.2 ± 1.4	1.3 ± 0.7	7.7 ± 1.7
C <sub>20:3<math>\omega</math>6</sub>	1.4 ± 0.8	6.5 ± 1.1	1.8 ± 2.6
<i>cis</i> -11,14- C <sub>20:2</sub>	9.4 ± 8.0	15.9 ± 8.0	19.9 ± 10.8
<i>cis</i> -11- C <sub>20:1</sub>	18.3 ± 6.6	8.3 ± 6.9	36.5 ± 28.0
C <sub>20:0</sub>	4.6 ± 0.5	5.0 ± 3.8	10.9 ± 1.3
C <sub>21:0</sub>	1.1 ± 0.4	3.3 ± 2.5	7.2 ± 7.1
<i>cis</i> -13,16- C <sub>22:2</sub>	2.2 ± 0.9	10.5 ± 11.4	3.6 ± 3.9
C <sub>22:1<math>\omega</math>9</sub>	3.7 ± 1.6	1.9 ± 0.6	0.7 ± 0.7
C <sub>22:0</sub>	3.9 ± 1.5	14.0 ± 13.0	3.2 ± 4.5

ion chromatogram for hopanes (at  $m/z$  191) detected in our samples. Hopane homologues with carbon atom number  $\geq C_{29}$  exhibited the thermodynamically more stable  $17\alpha(H)$ ,  $21\beta(H)$  configuration (Gogou et al. 2000), whereas the hopane series of  $C_{31}$ - $C_{33}$  occurred as  $22S$  and  $22R$  epimers (Fig. 3c).



**Figure 3.** a) Characteristic gas chromatogram of aliphatic hydrocarbon in station MPI1 before incubation. b) Gas chromatogram presented the isoprenoid hydrocarbons pristane (Pr) and phytane (Ph). c) Ion chromatogram ( $m/z$  191) of hopanes determined in Cretan Sea sediment samples; (1)  $17\alpha(H)$ ,  $21\beta(H)$ - $C_{29}$ -norhopane ( $C_{29}H_{50}$ ); (2)  $17\alpha(H)$ ,  $21\beta(H)$ - $C_{30}$ -hopane ( $C_{30}H_{52}$ ); (3)  $17\alpha(H)$ ,  $21\beta(H)$ -homohopane ( $C_{31}H_{54}$ ,  $22S$  and  $22R$ ); (4)  $17\alpha(H)$ ,  $21\beta(H)$ -bishomohopane ( $C_{32}H_{56}$ ,  $22S$  and  $22R$ ); (5)  $17\alpha(H)$ ,  $21\beta(H)$ -trishomohopane ( $C_{33}H_{58}$ ,  $22S$  and  $22R$ ).

**Bacterial community composition.** Phospholipid ester-linked fatty acids (PLFA) were extracted from each sample and analyzed to obtain information on microbial community



**Figure 4.** Characteristic mass chromatogram of phospholipid fraction in station MPI1 before incubation.

composition that accounts for both culturable and nonculturable microorganisms (Balkwill et al. 1998). PLFA content ranged between 537.7 – 1368.7 ng g<sup>-1</sup> dry weight (d.w.) (Table 1). PLFA values in sediment were converted also from ng g<sup>-1</sup> d.w. to microbial cells g<sup>-1</sup> d.w., based on published values for *Escherichia coli* of 5.9 × 10<sup>12</sup> cells g<sup>-1</sup> d.w. (Stratford 1977) and 100 μmol PLFA g<sup>-1</sup> d.w. (White et al. 1979). The calculated bacterial abundances ranged from 1.2 to 2.9 × 10<sup>8</sup> cells g<sup>-1</sup> d.w. (Table 1). The fatty acids of the PLFA fraction detected in sediments from the Cretan Sea ranged from C<sub>8</sub> to C<sub>22</sub> (Fig. 4; Table 1) and included two different homologue series, namely the saturated *n*-alkanoic acids (SFA; Table 1) differentiated as even numbered (ESFA; Table 1) and odd numbered (OSFA; Table 1) saturated fatty acids, and the *n*-alkenoic acids differentiated as monounsaturated fatty acids (MUFA; Table 1) and polyunsaturated fatty acids (PUFA; Table 1). The main marine bacterial fatty acids detected in our study were C<sub>16:1</sub>, C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:1</sub> and C<sub>18:0</sub> (Fig. 4, Table 1). In our samples branched chain unsaturated fatty acids have also been detected in trace amounts.

Both saturated and unsaturated fatty acids showed similar chain-length distribution for all samples (Fig. 4; Table 1). Throughout the C<sub>8</sub>-C<sub>22</sub> range, the even numbered saturated PLFA (ESFA: 47.5 ± 7.6 % - 54.0 ± 12.2 %; Table 1) were higher than the odd numbered saturated PLFA (OSFA: 3.1 ± 2.2 % - 8.9 ± 5.0 %; Table 1) denoting the predominance of marine (planktonic and microbial) inputs (Eglinton and Hamilton 1967; Gogou and Stephanou 2004). The monounsaturated PLFA (MUFA) varied from 30.0 ± 7.5 % at MPI2 to 46.3 ± 12.2 % at MPI1 (Table 1). The polyunsaturated fatty acids (PUFA) were generally present in small amounts (3.1 ± 2.1 % - 7.0 ± 4.0 %; Table 1). Both *trans* and *cis* isomers were detected in the monounsaturated fatty acids (C<sub>18:1ω9</sub>) with a *trans/cis* ratio ranging from 0.9 ± 0.2 to 1.6 ± 0.5 (Table 1).

#### 4.2 Lipid composition changes after incubation

**Table 2.** Concentration and descriptive ratios of aliphatic hydrocarbons and free fatty acids in the Cretan Sea sediments before (*t*=0 d) and after 2-month (*t*=60 d) incubation.

AHC: aliphatic hydrocarbon total concentration; NA: *n*-alkanes; petrogenic/biogenic: <*n*-C<sub>22</sub>+isoprenoids/*n*-C<sub>15</sub>+*n*-C<sub>17</sub>+>*n*-C<sub>23</sub>; CPI: carbon preference index of NA from C<sub>21</sub> to C<sub>36</sub>; Σ(C<sub>16:1</sub>, C<sub>18:1</sub>, C<sub>20:1</sub>): sum of concentrations of C<sub>16:1</sub>, C<sub>18:1</sub> and C<sub>20:1</sub> *n*-alkenes; C<sub>30</sub>H: 17α(*H*),21β(*H*)-C<sub>30</sub>-hopane; Σ(C<sub>15</sub>-C<sub>20</sub>): sum of concentrations of NA from C<sub>15</sub> to C<sub>20</sub>; Σ(C<sub>21</sub>-C<sub>36</sub>): sum of concentrations of NA from C<sub>21</sub> to C<sub>36</sub>; UCM: unresolved complex mixture; SFFA: saturated free fatty acids; MUFFA; monounsaturated free fatty acids; PUFFA; polyunsaturated free fatty acids.

Sampling sites	MPI1			MPI2			MPI3		
	<i>t</i> =0 d	<i>t</i> =60 d	degr.(%)	<i>t</i> =0 d	<i>t</i> =60 d	degr. (%)	<i>t</i> =0 d	<i>t</i> =60 d	degr. (%)
<i>Aliphatic hydrocarbons</i>									
AHC (ng g <sup>-1</sup> )	4323.1	3573.7	17	2986.9	2041.6	32	2107.4	2117.2	n.d.
NA (ng g <sup>-1</sup> )	241.3	219.4	9	123.2	139.3	n.d.	157.9	137.6	n.d.
petrogenic/biogenic	0.18	0.07	n.d.	0.21	0.19	n.d.	0.10	0.14	n.d.
CPI (C <sub>21</sub> - C <sub>36</sub> )	2.8	3.8		2.6	3.3		3.6	4.2	
Σ(C <sub>16:1</sub> , C <sub>18:1</sub> , C <sub>20:1</sub> ) (ng g <sup>-1</sup> )	34.2	0.0	100	9.3	0.0	100	8.4	0.0	100
NA / C <sub>30</sub> H	29.8	23.2	22	23.8	20.2	15	64.8	22.5	65
Σ(C <sub>15</sub> -C <sub>20</sub> ) / C <sub>30</sub> H	2.4	0.5	79	2.0	1.5	25	2.4	1.3	48
Σ(C <sub>21</sub> -C <sub>36</sub> ) / C <sub>30</sub> H	24.5	21.1	14	21.1	17.5	17	56.5	19.4	66
UCM (ng g <sup>-1</sup> )	4081.8	3354.3	18	2863.7	1902.3	34	1949.5	1979.6	n.d.
UCM / C <sub>30</sub> H	504.4	355.5	30	554.1	276.4	50	799.3	323.9	59
<i>Free fatty acids</i>									
Total (ng g <sup>-1</sup> )	4633.3	2956.0	36	3995.3	3086.7	23	915.0	942.5	n.d.
SFFA (ng g <sup>-1</sup> )	2949.2	2275.3	23	2848.0	2638.4	7	682.9	754.6	n.d.
MUFFA (ng g <sup>-1</sup> )	1503.1	611.2	59	895.9	398.4	56	208.9	154.5	26
PUFFA (ng g <sup>-1</sup> )	181.0	69.5	62	251.3	49.9	80	23.2	33.4	n.d.
C16:1 / C16:0	0.9	0.06	n.d.	0.33	0.11	n.d.	0.4	0.1	n.d.
C18:1 / C18:0	1.4	0.91	n.d.	1.29	0.68	n.d.	1.2	1.5	n.d.

n.d. = not determined

*Aliphatic hydrocarbons.* After incubating the sediment samples for 2 months (*t*=60 d; Table 2) definite differences were observed in the levels of aliphatic hydrocarbons (AHC, Table 2)



at the shallower sampling stations MPI1 and MPI2. The corresponding CPI values definitely increased after the incubation for the MPI1 sample (from 2.8 to 3.8; Table 2) and less for the MPI2 (from 2.6 to 3.3; Table 2) and MPI3 (from 3.6 to 4.2; Table 2) samples, underlying the recalcitrance of terrestrial (vascular plants) *n*-alkanes to degradation. The decrease of biodegradation with increasing molecular weight of aliphatic hydrocarbons has been previously reported in laboratory and field experiments where terrestrial C<sub>27</sub>-C<sub>29</sub> *n*-alkanes demonstrated lower loss rates than the algal C<sub>15-19</sub> *n*-alkanes (Colombo et al. 2005; Grossi et al. 2002). The petrogenic to biogenic alkanes ratio ( $\langle n\text{-C}_{22} + \text{isoprenoids} / n\text{-C}_{15} + n\text{-C}_{17} + \dots + n\text{-C}_{23} \rangle$ ; Colombo et al. 2005; petrogenic/biogenic in Table 2) reflects changes (which occurred after the incubation) in the aliphatic composition of the three different sampling stations. Generally, the petrogenic/biogenic ratio for fresh crude oil is 1.60 (Colombo et al. 2005). The values measured in our study (0.18 at MPI1, 0.21 at MPI2 and 0.10 at MPI3; Table 2) can be considered as baseline values. However, the effect of hydrocarbon degradation was reflected as a decrease in this ratio for the shallower stations MPI1 and MPI2 (Table 2), thus stressing the preferential removal of oil related hydrocarbons vs. the recalcitrant hydrocarbons related with terrestrial vascular plants.

Hopanes are among the most degradation-resistant components in the environment. It has also been proposed that hopanes might be used as a conservative “internal reference” regarding the relative importance of physical weathering vs. the biodegradation of hydrocarbons (Gogou et al. 2000; Philp 1985; Wang et al. 1999). In the present study the depletion of hydrocarbons was followed through the changes that occurred during the incubation for  $\Sigma(\text{C}_{15}\text{-C}_{20})$ ,  $\Sigma(\text{C}_{21}\text{-C}_{36})$  and UCM with respect to 17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-C<sub>30</sub>-hopane (C<sub>30</sub>H) (Table 2). After the incubation, we observed, a clear decrease of the diagnostic ratios NA/C<sub>30</sub>H,  $\Sigma(\text{C}_{15}\text{-C}_{20})/\text{C}_{30}\text{H}$ ,  $\Sigma(\text{C}_{21}\text{-C}_{36})/\text{C}_{30}\text{H}$  and UCM/C<sub>30</sub>H in all sampling stations (Table 2). This observation can be considered as an indication of degradation processes due to the presence of active hydrocarbon degrading bacteria. The degradability of long and short chain *n*-alkanes between the sampling locations ( $\Sigma(\text{C}_{15}\text{-C}_{20})/\text{C}_{30}\text{H}$  and  $\Sigma(\text{C}_{21}\text{-C}_{36})/\text{C}_{30}\text{H}$ ; Table 2) has shown high variability. In the sediment of the shallow station MPI1, 79% of the short chain *n*-alkanes (C<sub>15</sub>-C<sub>20</sub>) have been removed, whereas only 14% of the long chain *n*-alkanes (C<sub>21</sub> – C<sub>36</sub>) were degraded by the end of the experiment. The degradability of both short and long chain *n*-alkanes was similar at the deeper stations MPI2 and MPI3. In the sediment of the station MPI2, 25% of the short and 17% of the long chain *n*-alkanes were removed, whereas in the sample of the deepest station MPI3, 48% of the short and 66% of the long chain *n*-alkanes were also degraded (Table 2). The degradability of short chain *n*-alkanes has been well documented in a previous field study (Grossi et al. 2002). Grossi and coworkers (2002) have shown that the short chain *n*-alkanes  $\leq \text{C}_{25}$  were totally removed from the sedimentary column after 6 months of incubation in an oil contaminated littoral in France. Teece and coworkers (1998) have demonstrated that apart from the short chain *n*-alkanes, *n*-alkenes are the most easily degradable compounds under oxic conditions. Indeed, in our study, *n*-alkenes (C<sub>16:1</sub>, C<sub>18:1</sub> and C<sub>20:1</sub>) disappeared after the two-month incubation period of the sediment of all sampling stations (Table 2). The degradability of UCM (UCM/C<sub>30</sub>H) was also observed during the incubation of the three sampling stations (Table 2). UCM has long been recognized as characteristic indicator of degraded petrogenic residues (Frysinger et al. 2003). UCM degradation has also been observed in contaminated estuary sediments after 6 months of an oil spill (Colombo et al. 2005).

*Lysis products (diglycerides, glycolipids, free fatty acids)*. Both diglycerides and glycolipids fractions were only trace constituents of the sediment extracts before and as well as after incubation. Diglyceride fatty acids, which have been proposed to be indicators of dead or lysed cells, are lysis products of different glycerides (Thiele 1979) and are low in abundances because they are consumed rapidly (Rütters et al. 2000b). Glycolipids originating from some anoxygenic phototrophs are only minor components of the cell's polar lipids (Imhoff and Bias-Imhoff 1995; Rütters et al. 2002b). The opposite applies to cyanobacteria (Smith 1988). Thus, the low contribution of the glycolipid fractions in the sediment extracts may indicate

that photosynthetic organisms represent a minor fraction of the overall biomass in the sediments of the Cretan Sea.

The free fatty acid fractions from the Cretan Sea sediments included typical fatty acids throughout the C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub> range (Fig. 5a), with values of 4633.3, 3995.3 and 915.0 ng g<sup>-1</sup> sediment dry weight at stations MPI1, MPI2 and MPI3, respectively (t=0 d, Table 2). The saturated free fatty acids (SFFA: 682.9 - 2949.2 ng g<sup>-1</sup>; t=0 d, Table 2) were higher than the monounsaturated free fatty acids (MUFFA: 208.9 - 1503.1 ng g<sup>-1</sup>; t=0 d, Table 2). The polyunsaturated free fatty acids (PUFFA) were generally present in small amounts (23.2 - 251.3 ng g<sup>-1</sup>; t=0 d, Table 2). Generally, the polyunsaturated fatty acids have a planktonic origin or are derived from benthic invertebrates, and are considered to be easily degradable compared to monounsaturated homologues as a result of their labile character (Gogou and Stephanou 2004; Wakeham et al. 1995). In a previous study conducted in the same area polyunsaturated free fatty acids were detected in concentrations varying from 35.8 up to 301.9 ng g<sup>-1</sup> (Gogou and Stephanou 2004).

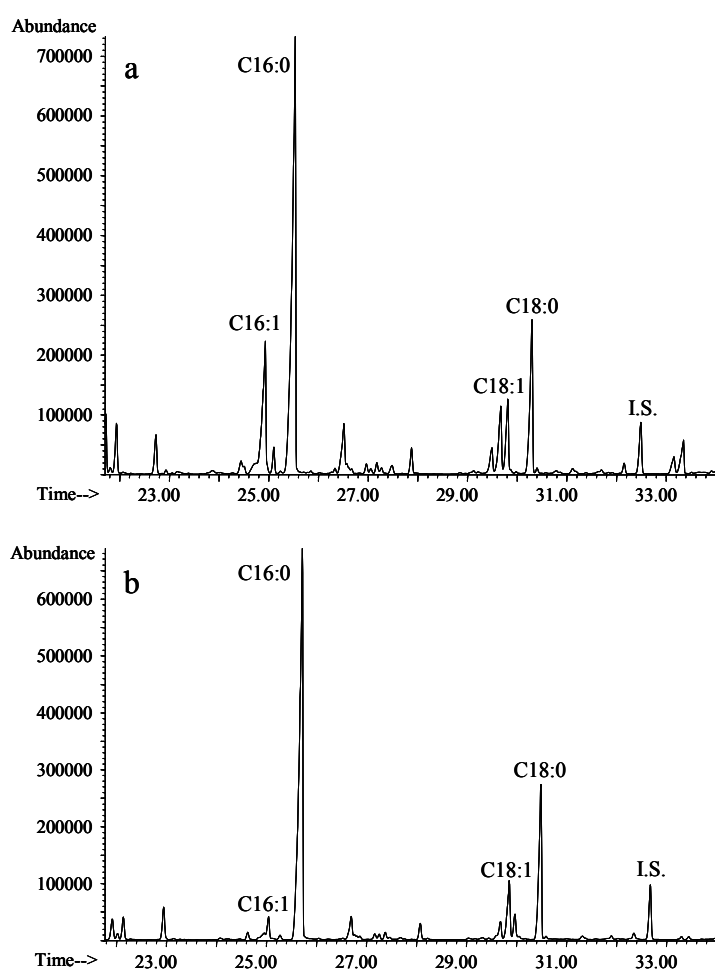
After the incubation, the free fatty acid fractions of the sediment samples exhibited a modified fatty acid profile dominated by the monounsaturated fatty acid C<sub>16:0</sub> (Fig. 5b, Table 2). The concentration of the total free fatty acids remained constant at the deep station MPI3, whereas by the end of the incubation 36% and 23% of the total free fatty acid fraction was removed from stations MPI1 and MPI2, respectively (Table 2). The fraction of saturated free fatty acids (SFFA) has shown the lowest degradation (23% for MPI1 and 7% for MPI2; Table 2) compared to the other fractions. For the total monounsaturated free fatty acid (MUFFA, Table 2) fraction 59% (MPI1), 56% (MPI2) and 26% (MPI3) was degraded by the end of the incubation, while for the polyunsaturated fatty acids (PUFFA, Table 2) the degradation was even higher at stations MPI1 (62%; Table 2) and MPI2 (80%; Table 2).

These results indicate the high lability of these compounds. The ratio of unsaturated to saturated free fatty acids (C<sub>16:1</sub>/C<sub>16:0</sub> and C<sub>18:1</sub>/C<sub>18:0</sub>; Table 2) decreased towards the deeper stations with the exception of station MPI3.

## 5. Discussion

### 5.1 Mineralization rates and organic carbon sources

On a global scale, continental slope sediments can be significant sites of benthic carbon mineralization despite their relatively small area (Jahnke et al. 1990; Martin and Sayles 2004).



**Figure 5.** Characteristic mass chromatogram of the free fatty acid fraction in station MPI1 a) before and b) after 2-month incubation.

In the Cretan Sea sediments oxic processes prevail. Despite the similar amounts of organic carbon found along the continental margin, the decrease in C mineralization rates towards the deeper stations indicates that active microbial communities are prominent in shallow sediments (Fig. 2). This is probably due to the intrinsic differences in the quality of organic carbon which occurs as a result of the different sources of carbon and energy.

Danovaro and coworkers (2000) have shown that bacterial abundance in the Cretan Sea sediments increased up to 3-fold in response to the increased amount of sedimentary proteins indicating that benthic bacteria were constrained more by changes in quality rather than the quantity of the sedimentary organic matter. Previous studies have also shown that bacterial growth efficiency can be constrained by the quality of the available substrates (Vallino et al. 1996). In a study conducted by Nedwell et al. (1993) benthic mineralization rates of organic matter in Antarctic coastal sediments displayed an increasing trend when fresh organic matter entered the ecosystem.

As might be expected in a continental marginal sea, most of the *n*-alkane (NA) distributions as reflected by the CPI values have shown a strong predominance of homologues with odd carbon numbers. The distribution of C<sub>21</sub>-C<sub>36</sub> NA in the Cretan Sea sediments was predominated by the odd carbon numbered homologues *n*-C<sub>27</sub>, *n*-C<sub>29</sub>, and *n*-C<sub>31</sub>, which are representative of vascular plant inputs. These homologues were prominent in all stations indicating the terrestrial contribution to the sediments (Eglinton and Hamilton 1967; Gogou et al. 1998; Volkman et al. 2000). This distribution can also be found in previous reports from coastal environments, reflecting the influence of wind-transported materials of terrestrial origin (Gogou et al. 2000; Jeng and Huh 2004; Tolosa et al. 2004).

In the present study, NA profiles exhibited some differences between shallow and deep stations. Short chain NA (C<sub>15</sub> – C<sub>20</sub>) were most abundant in the shallow sampling site (Table 1). It is evident that due to its geographical position the shallow station MPI1, which exhibited the higher mineralization rates (Fig. 2), serves as a depositional centre receiving relatively large amounts of fresh organic material. Since sedimentation regularly transports organic matter through the water column, autochthonous inputs to the sediment should be expected (Ravenschlag et al. 1999). Short-chain *n*-alkanes (C<sub>15</sub>-C<sub>20</sub>) are known to originate from bacteria and are autochthonous in the marine environment. The higher concentration of C<sub>17</sub>, which is a characteristic component of cyanobacteria (Han et al. 1968; Wieland et al. 2003) and phototrophic eukaryotes (Blumer et al. 1971) recorded in the shallow MPI1 station confirming its autochthonous input. The recorded low concentration of these homologues reflects their labile character and confirms the low productivity of the Cretan Sea as has previously been reported by Gogou et al. (2000). A clear evidence for oil inputs in the study area was provided by the higher abundance of UCM in respect to NA (Table 2) and by the occurrence of hopanes. The hopane pattern (Fig. 3c) which is characteristic of oil-derived hydrocarbons (Philp 1985), as well as the occurrence of pristane and phytane (Figs. 3a, b), confirm the presence of petroleum inputs (Gogou et al. 2000). However, on the basis of our results a clear differentiation on the quality of organic matter between the different stations can not be achieved as the aliphatic fraction represents a low amount of the organic carbon fraction (see AHC/OC; Table 1).

### 5.2 Bacterial community composition

Cellular membrane lipids and their associated fatty acids are useful biomarkers of viable bacterial biomass as they are essential components of every living cell. Phospholipid ester-linked fatty acids (PLFA) have proved to be of great value in describing bacterial community structure in sediments and in understanding bacterial phylogenic and taxonomic classifications (Guezennec and Fiala-Medioni 1996).

In culture experiments, bacteria can be characterized by various respiration types: aerobic bacteria, facultative aerobic bacteria, facultative anaerobic and sulfate reducing bacteria. Discrimination between the different types is based on their different fatty acid profiles (Parkes and Taylor 1983). The different relative amounts of saturated and unsaturated C<sub>16</sub> fatty acids revealed the differences between the four respiration types. Aerobic and facultative aerobic bacteria contained about the same amount of saturated and monounsaturated C<sub>16</sub>,

while the facultative anaerobes and the sulfate reducers had twice as much C<sub>16:1 $\omega$ 7</sub> as saturated C<sub>16</sub> (Guckert et al. 1986; Langezaal et al. 2003). Large amounts of either C<sub>16:1</sub> or C<sub>18:1</sub> are usually characteristic components in the membrane lipids of thio-oxidizing bacteria (Guezennec and Fiala-Medioni 1996; Jannasch et al. 1989; Katayama-Fujimura et al. 1982) and methanotrophic bacteria (Virtue et al. 1996). Monounsaturated PLFAs are also characteristic of gram-negative cell membranes (Macnaughton et al. 1999; Ringelberg et al. 1997). High amounts of branched fatty acids have been determined in sulfate reducing (Edlund et al. 1985; Taylor and Parkes 1983), gram-positive (Kaneda 1997) and anaerobic bacteria (Edlund et al. 1985). The monounsaturated fatty acids are predominantly present in aerobic bacteria, whereas approximately equal amounts of branched fatty acids are present in anaerobic and sulfate reducing bacteria (Rajendran et al. 1997). Consequently, aerobic bacteria contain high amounts of monounsaturated fatty acids and only traces of branched fatty acids (Rajendran et al. 1997).

In the present study, PLFA profiles revealed the dominant contribution of bacterial lipids to total sedimentary lipids (Table 1), indicating that the microbial communities were dominated by bacteria rather than by eukaryotes or archaea (Guezennec and Fiala-Medioni 1996). Furthermore, the low abundance of polyunsaturated fatty acids indicated the low contribution of microeukaryotes to benthic microbial community structure.

The concentration of total PLFA measured in the sediments of the Cretan Sea was comparable to PLFA concentration reported in sediments of a coastal eutrophic bay in Japan (Rajendran et al. 1997), with lowest and highest concentrations of 0.7  $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight in Hiroshima Bay and 1.1  $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight in Etauchi and Osaka Bay, respectively (Rajendran et al. 1997). The calculated bacterial abundances using the *E.coli* conversion factor are similar to values previous reported from the same region ( $1.0 - 4.6 \times 10^8$  cells  $\text{g}^{-1}$ ; Danovaro et al. 2000), as well as from other continental and bathyal sediments of the Eastern Mediterranean ( $0.8 - 11.5 \times 10^8$  cells  $\text{g}^{-1}$ ; Bianchi et al. 2003; Boetius et al. 1996). This factor provides a useful working estimate of biomass, but it must be noted that different species might contain different amounts of PLFAs in their membranes (Balkwill and Ghiorse 1985; Balkwill et al. 1998).

PLFA analyses in the Cretan Sea sediments showed that the relative proportions of fatty acids are mostly dominated by saturated fatty acids (C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:0</sub>) and monounsaturated fatty acids (C<sub>16:1</sub>, C<sub>18:1</sub>) (Fig. 4), and represented by groups of microorganisms which belong to the aerobic gram negative bacteria (Table 1). Our results have clearly indicated that the aerobic and facultative aerobic, as well as methane and sulfur oxidizing bacteria comprise the most abundant organisms in the oligotrophic sediments of the Cretan Sea. The trace amounts of branched fatty acids indicated the low contribution or absence of anaerobic, gram positive and sulfate reducing bacteria. These homologues are known to occur in members of the gram positive bacterium *Bacillus* (Kaneda 1977; Rajendran et al. 1997), in the sulfate reducing bacterium *Desulphovibrio desulfuricans* (Boon et al. 1977; Rajendran et al. 1997), as well as in anaerobic bacteria. Analysis of the 16S rDNA clone library constructed from the MPII station (Polymenakou et al. 2005b) revealed that the gram positive bacteria (e.g. *Firmicutes*, *Actinobacteria*) were almost absent (Polymenakou et al. 2005b). In contrast, the dominant taxonomic groups in the Cretan Sea were the gram negative *Proteobacteria*, *Holophaga/Acidobacteria* and *Planctomycetes*, which contained cultured representatives of the genera *Beggiatoa*, *Thioalcalovibrio*, *Pseudomonas* and *Chromatium* (Polymenakou et al. 2005b).

PLFA patterns observed in the Cretan Sea sediments have been found to dominate the fatty acid profile of the *Thiomicrospira crunega*, a chemoautotroph sulfur oxidizing bacterium, isolated from a deep-sea hydrothermal vent (Guezennec and Fiala-Medioni 1996). Brinkhoff and coworkers (1999) also found that the chemolithoautotrophic sulfur oxidizing bacteria (SOB) are the greatest primary producers in the shallow-water vent system off Milos Island (Greece) (Brinkhoff et al. 1999). They demonstrated that *Thiomicrospira* is an important member of the sulfur-oxidizing community contributing significantly to the ecology of the ecosystem (Brinkhoff et al. 1999).

### 5.3 Evidence for hydrocarbon degradation

The effects of biodegradation on biomarkers have been investigated by many authors. Several *in vitro* and *in situ* studies have shown that hopane and sterane compounds are very resistant to biodegradation (Colombo et al. 2005; Wang et al. 1999). Short chain homologues are degraded faster than longer homologues, as well as pristane (Pr) and phytane (Ph) (Colombo et al. 2005; Grossi et al. 2002). The early effect of microbial degradation is monitored by the ratios of biodegradable to less degradable compounds such as the C<sub>17</sub>/Pr and C<sub>18</sub>/Ph ratios (Grossi et al. 2002). However, it has been demonstrated, that changes in these ratios may substantially underestimate the extent of biodegradation since isoprenoids are also known to be biodegraded (Wang et al. 1999). Therefore, highly degradation-resistant components such as 17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-C<sub>30</sub>-hopane (C<sub>30</sub>H) are selected to serve as a conservative internal standards for determining rate and extent of weathering on spilled residual oils (Colombo et al. 2005; Prince et al. 1994).

In the present study, a series of descriptive ratios (e.g. NA/C<sub>30</sub>H,  $\Sigma$ (C<sub>15</sub>-C<sub>20</sub>)/C<sub>30</sub>H,  $\Sigma$ (C<sub>21</sub>-C<sub>36</sub>)/C<sub>30</sub>H) were estimated in order to investigate the occurrence of hydrocarbon degradation processes in the sediments of the Cretan Sea (Table 2). All ratios significantly decreased after a 2-month incubation period. Our observation suggests that the activity of benthic communities might have a significant effect on the fate of hydrocarbons in the oligotrophic Cretan Sea.

Hydrocarbon-utilizing bacteria are capable of metabolizing virtually all naturally formed and a wide range of industrially produced hydrocarbons. Hopanes are more resistant than other petroleum components such as the resolved alkanes or the UCM (Prince et al. 1994). The descriptive ratio of UCM to C<sub>30</sub>H was also estimated (Table 2). This ratio clearly indicated that the UCM concentration at all stations decreased after an incubation period of 2 months. Previous studies have shown that photooxidation is also a very important process for the degradation of some UCM components such as alkylaromatics (Dutta and Harayama 2000). However, the option that benthic microorganisms might have had a degradation effect on the UCM content of the studied sediments cannot be excluded. Some additional evidence for the hydrocarbon degradation processes in the sediments of the Cretan Sea is provided by the detection of the dioxygenase genes. These genes possess the capability to oxidize UCM components such as monoaromatics or multi-ring polyaromatic hydrocarbons (Frysiner et al. 2003; Mesarch et al. 2000) and have been successfully amplified directly from the sediment samples of the Cretan Sea using polymerase chain reaction and the appropriate primers set as described by Mesarch et al. (2000) (Polymenakou et al. unpublished results). It is well known, that the first enzymes in the metabolic pathways of alkanes are monooxygenases, while aromatic hydrocarbons are attacked by either monooxygenases or dioxygenases (for reviews see Harwood and Parales 1996; Heider et al. 1999).

### 5.4 Evidence for Starvation Stress

In order to assess the physiological status of microbial communities before incubation the *trans/cis* ratio in phospholipid profiles was estimated. The high contribution of *trans* isomers in bacterial lipids is mostly associated with survival strategies such as starvation, which tend to occur under physiological stress (Guckert et al. 1986; Guezennec and Fiala-Medioni 1996; Kieft et al. 1997). In our case, the *trans/cis* ratio of the monounsaturated fatty acids (C<sub>18:1 $\omega$ 9</sub>) at the shallow station MPI1 was 1.6. This observation suggested that microbial communities in this area were under stress. In contrast, at stations MPI2 and MPI3 the above ratio was near 1, indicating that microbial communities had overcome such a stress despite the low availability of carbon and energy. Therefore, to examine if the microbial communities were subjected to physiological stress during incubations the relative amounts of the monounsaturated and saturated free fatty acids were analyzed. After the 2-month incubation period the ratio of unsaturated to saturated free fatty acids were lower at all stations (see C<sub>16:1</sub>/C<sub>16:0</sub> and C<sub>18:1</sub>/C<sub>18:0</sub>; Table 2). The maximum decrease was recorded at the shallow station MPI1 indicating that the microbial community was more effective in degrading the monounsaturated fatty acids C<sub>16:1</sub> and C<sub>18:1</sub>, following the trend observed in carbon mineralization rates (Fig. 2; Table 2). The obtained free fatty acid patterns clearly indicated

that bacterial communities in the sediments of the Cretan Sea were further subjected to starvation stress (Fig. 5). Changes in fatty acid patterns of the three sediments are consistent with previous observations of stressed gram-negative bacteria (Kieft et al. 1994). This may indicate a long-term adjustment or acclimation to the relatively nutrient-poor sediments after the incubation, when the available sources of carbon and energy have been consumed and converted to CO<sub>2</sub>. These ratios normally associated with stressed cells are often lacking in profiles observed directly from nature even when the environments are nutrient limiting (Kieft et al. 1997).

## 6. Conclusions

As in many other oxic environments, the sediments of the Cretan Sea are characterized by microbial communities dominated by aerobic and facultative aerobic gram negative bacteria as well as by sulfur oxidizing bacteria. Based on the fatty acid distribution of the phospholipid fraction, aerobic gram positive, sulfate reducing and anaerobic bacteria, as well as eukaryotes have either minor contribution or are absent in microbial community structure.

Benthic microbial activity, as was recorded by carbon mineralization rates, was higher in the shallowest station, due to the presence of less refractory organic material. The lipid biomarker data suggested mixed marine and terrestrial sources of organic matter. The estimated descriptive ratios of the aliphatic hydrocarbons before as well as after the 2-month incubation period suggested the occurrence of hydrocarbon degrading bacteria in the sediments of the oligotrophic Cretan Sea. In addition, the high ratios of saturated to unsaturated free fatty acids constitute strong evidence that bacterial communities undergo starvation stress after the mineralization of organic matter.

Microbial activity drives geochemical processes in many environments and for this reason geochemical outcomes are often controlled by microbial ecology rather than bulk geochemical processes. However, the complexity of linked controls on these processes or the organisms involved is not yet fully understood. Therefore, in order to thoroughly understand the biogeochemical function and ecology of microbial communities we must expand our knowledge on the occurrence of different populations within sediments by using powerful tools like culture independent molecular techniques. Complementary laboratory investigations with long term incubations (up to 12 months) can also provide useful data on the role of bacteria in organic matter circulation during diagenetic processes.

## Acknowledgments

The officers and the crew of the R/V *Philia* are acknowledged for their assistance during the sampling. The authors are especially grateful to N. Lampadariou and E. Hatziyianni for assisting in sample collection and the incubation experiments on board. This work was supported by the Commission of the European Communities (through the Energy and Environment projects INTERPOL: EU - DG XII, EVK3 - 2000 - 00526 and ADIOS: EU - DG XII, EVK3 - 2000 - 00604) and the Greek Ministry of Development (General Secretariat of Research and Technology).

## References

- Aller, R.C., Aller, J.Y., 1998. The effect of biogenic irrigation intensity and solute exchange on diagenetic reaction rates in marine sediments. *Journal of Marine Research* 56, 905-936.
- Balkwill, D.L., Ghiorse, W.C., 1985. Characterization of subsurface bacteria associated with two shallow aquifers in Oklahoma. *Applied and Environmental Microbiology* 50, 580-588.
- Balkwill, D.L., Murphy, E.M., Fair, D.M., Ringelberg, D.B., White, D.C., 1998. Microbial communities in high and low recharge environments: implications for microbial transport in the Vadose Zone. *Microbial Ecology* 35, 156-171.
- Balopoulos, E.Th., Theocharis, A., Kontoyiannis, H., Varnavas, S., Voutsinou-Taliadouri, F., Iona, A., Souvermezoglou, A., Ignatiades, L., Gotsis-Skretas, O., Pavlidou, A., 1999.

- Major advances in the oceanography of the southern Aegean Sea-Cretan Straits system (Eastern Mediterranean). *Progress in Oceanography* 44, 109-130.
- Benner, R., Maccubbin, A.E., Hodson, R.E., 1984. Anaerobic biodegradation of the lignin and polysaccharide components of lignocellulose and synthetic lignin by sediment microflora. *Applied Environmental Microbiology* 47, 998-1004.
- Bianchi, A., Tholosan, O., Garcin, J., Polychronaki, T., Tselepides, A., Buscail, R., Duineveld, G., 2003. Microbial activities at the benthic boundary layer in the Aegean Sea. *Progress in Oceanography* 57, 219-236.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry Physiology* 37, 911-917.
- Blumer, M., Guillard R.R.L., Chase, T., 1971. Hydrocarbons of marine phytoplankton. *Marine Biology* 8, 183-189.
- Bobbie, R.J., White, D.C., 1980. Characterization of benthic microbial community structure by high-resolution gas chromatography of fatty acid methyl esters. *Applied and Environmental Microbiology* 39, 1212-1222.
- Boetius, A., Scheibe, S., Tselepides, A., Thiel, H., 1996. Microbial biomass and activities in deep-sea sediments of the Eastern Mediterranean: trenches are benthic hotspots. *Deep-Sea Research* 43, 1439-1460.
- Boon, J.J., De Leeuw, J.W., van der Hoek, G.L., Vosjan, J.H., 1977. Significance and taxonomic value of iso and anteiso monoenoic fatty acids and branched  $\beta$ -hydroxy acids in *Desulfovibrio desulfuricans*. *Journal of Bacteriology* 129, 1183-1191.
- Bouloubassi, I., Lipiatou, E., Saliot, A., Tolosa, I., Bayona, J.M., Albaiges, J., 1997. Carbon sources and cycle in the Western Mediterranean: II. The use of molecular markers to determine the origin of organic matter. *Deep Sea Research* 44, 781-799.
- Brinkhoff, T., Sievert, S.M., Kuever, J., Muyzer, G., 1999. Distribution and diversity of sulfur-oxidizing *Thiomicrospira* spp. at a shallow-water hydrothermal vent in the Aegean Sea (Milos, Greece). *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3843-3849.
- Chronis, G., Lykousis, V., Anagnostou, C., Karageorgis, A., Stavrakakis, S., Poulos, S., 2000. Sedimentological processes in the southern margin of the Cretan Sea (NE Mediterranean). *Progress in Oceanography* 46, 143-162.
- Cripps, G.C., 1994. Hydrocarbons in the Antarctic marine environments: monitoring and background. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 55, 3-13.
- Colombo, J.C., Barreda, A., Bilos, C., Cappelletti, N., Migoya, M.C., Skorupka, C., 2005. Oil spill in the Rio del la Plata estuary, Argentina: 2-hydrocarbon disappearance rates in sediments and soils. *Environmental Pollution* 134, 267-276.
- Danovaro, R., Marrale, D., Dell'Anno, A., Della Croce, N., Tselepides, A., Fabiano, M., 2000. Bacterial response to seasonal changes in labile organic matter composition on the continental shelf and bathyal sediments of the Cretan Sea. *Progress in Oceanography* 46, 345-366.
- Dauwe, B., Middelburg, J.J., Herman, P.M.J., 2001. Effect of oxygen on the degradability of organic matter in subtidal and intertidal sediments of the North Sea area. *Marine Ecology Progress Series* 215, 13-22.
- Dutta, T.K., Harayama, S., 2000. Fate of crude oil by the combination of photooxidation and biodegradation. *Environmental Science and Technology* 34, 1500-1505.
- Edlund, A., Nichols, P.D., Roffey, R., White, D.C., 1985. Extractable and lipopolysaccharide fatty acid and hydroxyl acid profiles from *Desulfovibrio* species. *Journal of Lipid Research* 26, 982-988.
- Eglinton, G., Hamilton, R.J., 1967. Leaf epicuticular waxes. *Science* 156, 1322.
- Fabiano, M., Danovaro, R., 1994. Composition of organic matter in sediments facing a river estuary (Tyrrhenian Sea): relationships with bacteria and microphytobenthic biomass. *Hydrobiologia* 277, 71-84.
- Farrington, J.W., Tripp, B.W., 1977. Hydrocarbons in western north Atlantic surface sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 41, 1627-1641.

- Fryssinger, G.S., Gaines, R.B., Xu, L., Reddy, C.M., 2003. Resolving the unresolved complex mixture in petroleum-contaminated sediments. *Environmental Science and Technology* 37, 1653-1662.
- Georgopoulos, D., Chronis, G., Zervakis, V., Lykousis, V., Poulos, S., Iona, A., 2000. Hydrology and circulation in the Southern Cretan Sea during the CINCS experiment (May 1994-September 1995). *Progress in Oceanography* 46, 89-112.
- Gogou, A.I., Apostolaki, M., Stephanou, E.G., 1998. Determination of organic molecular markers in marine aerosols and sediments: one step flash chromatography compound class fractionation and capillary gas chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A* 799, 215-231.
- Gogou, A., Bouloubassi, I., Stephanou, E.G., 2000. Marine organic geochemistry of the Eastern Mediterranean: 1. Aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in Cretan Sea surficial sediments. *Marine Chemistry* 68 (4), 265-282.
- Gogou, A., Stephanou, E.G., 2004. Marine organic geochemistry of the Eastern Mediterranean: 2. Polar biomarkers in Cretan Sea surficial sediments. *Marine Chemistry* 85, 1-25.
- Grossi, V., Massias, D., Stora, G., Bertrand, J.C., 2002. Burial, exportation and degradation of acyclic petroleum hydrocarbons following a simulated oil spill in bioturbated Mediterranean coastal sediments. *Chemosphere* 48, 947-954.
- Guckert, J.B., Hood, M.A., White, D.C., 1986. Phospholipid ester-linked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: Increases in the trans / cis ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids. *Applied and Environmental Microbiology* 52, 749-801.
- Guezennec, J., Fiala-Medioni, A., 1996. Bacterial abundance and diversity in the Barbados Trench determined by phospholipid analysis. *FEMS Microbiology Ecology* 19, 83-93.
- Han, J., McCarthy, E.D., Calvin, M., Benn, M.H., 1968. Hydrocarbon constituents of the blue-green algae *Nostoc muscorum*, *Anacystis nidulans*, *Phormidium luridum* and *Chlorogloea fritschii*. *Journal of Chemical Society C*, 2785-2791.
- Harwood, C.S., Parales, R.E., 1996. The  $\beta$ -keto adipate pathway and the biology of self-identity. *Annual Review in Microbiology* 50, 553-559.
- Hedges, J.I., Stern, J.H., 1984. Carbon and nitrogen determinations of carbonate-containing solids. *Limnology and Oceanography* 29, 657-663.
- Heider, J., Spormann, A.M., Beller, H.R., Widdel, F., 1999. Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews* 22, 459-473.
- Ignatiades, L., 1969. Annual cycles, species diversity and succession of phytoplankton in lower Saronikos bay, Aegean Sea. *Marine Biology* 3, 196-200.
- Imhoff, J.F., Bias-Imhoff, U., 1995. Lipids, quinines and fatty acids of anoxygenic phototrophic bacteria. In: Blankenship, R.E., Madigan, M.T., Bauer, C.E. (Eds.), *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Adv. Photosynth., vol. 2. Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, pp. 179-205.
- Jahnke, R.A., Reimers, C.E., Craven, D.B., 1990. Intensification of recycling of organic matter at the sea floor near ocean margins. *Nature* 348, 50-54.
- Jannasch, H.W., Nelson, D.C., Wirsén, C.O., 1989. Massive natural occurrence of unusually large bacteria (*Beggiatoa* sp.) at a hydrothermal deep-sea vent site. *Nature* 342, 834-836.
- Jeng, W.-L., Huh, C.-A., 2004. Lipids in suspended matter and sediments from the East China Sea Shelf. *Organic Geochemistry* 35, 647-660.
- Kaneda, T., 1977. Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched chain preference. *Bacteriology Reviews* 41, 391-418.
- Katayama-Fujimura, Y., Tsuzaki, N., Kuraishi, H., 1982. Ubiquinone, fatty acid and DNA base composition determination as a guide to the taxonomy of the genus *Thiobacillus*. *Journal of General Microbiology* 128, 1599-1611.
- Kieft, T.L., Ringelberg, D.B., White, D.C., 1994. Changes in ester-linked phospholipids fatty acid profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 3299-3299.



- Kieft, T.L., Wilch, E., O'Connor, K., Ringelberg, D.B., White, D.C., 1997. Survival and phospholipids fatty acid profiles of surface and subsurface bacteria in natural sediment microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1531-1542.
- Langezaal, A.M., Ernst, S.R., Haese, R.R., van Bergen, R.F., van der Zwaan, G.J., 2003. Disturbance of intertidal sediments: the response of bacteria and foraminifera. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 58, 249-264.
- Macnaughton, S.J., Stephen, J.R., Venosa, A.D., Davis, G.A., Chang, Y.J., White, D.C., 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3566-3574.
- Martin, W.R., Sayles, F.L., 2004. Organic matter cycling in sediments of the continental margin in the northwest Atlantic Ocean. *Deep-Sea Research I* 51, 457-489.
- Mesarch, M.B., Nakatsu, C.H., Nies, L., 2000. Development of catechol 2,3-dioxygenase-specific primers for monitoring bioremediation by competitive quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 678-683.
- Nedwell, D.B., Walker, T.R., Ellis-Evans, J.C., Clarke, A., 1993. Measurements of seasonal rates and annual budgets of organic carbon fluxes in an Antarctic coastal environment at Signy Island, South Orkney Islands, suggest a broad balance between production and decomposition. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3989-3995.
- Otsuki, A., Hanya, T., 1972. Production of dissolved organic matter from dead green algae cells. 1. Aerobic microbial decomposition. *Limnology and Oceanography* 17, 248-257.
- Parkes, R.J., Taylor, J., 1983. The relationship between fatty acid distribution and bacterial respiratory types in contemporary marine sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 16, 173-189.
- Philp, R.P., 1985. Fossil fuel biomarkers: applications and spectra. Elsevier, Amsterdam.
- Prince, R.C., Elmendorf, D.L., Lute, J.R., Hsu, C.S., Halth, C.E., Senius, J.D., Dechert, G.J., Douglas G.S., Butler, E.L., 1994.  $17\alpha(H),21\beta(H)$ -Hopane as a conserved internal marker for estimating the biodegradation of crude oil. *Environmental Science and Technology* 28, 142-145.
- Polymenakou, P.N., Bertilsson, S., Tselepidis, A., Stephanou, E.G., 2005a. Links between geographic location, environmental factors and microbial community composition in sediments of the Eastern Mediterranean Sea. *Microbial Ecology* in press
- Polymenakou, P.N., Bertilsson, S., Tselepidis, A., Stephanou, E.G., 2005b. Bacterial community composition in sediments from the Eastern Mediterranean Sea: a comparison of four 16S rDNA clone libraries. *Microbial Ecology* in press
- Postma, H., 1988. Tidal flat areas. In: Jansson, B.O. (Ed.), *Lecture Notes on Coastal and Estuarine Studies*. Vol. 22. Springer, Berlin. Pp. 103-121.
- Rajendran, N., Matsuda, O., Rajendran, R., Urushigawa, Y., 1997. Comparative description of microbial community structure in surface sediments of eutrophic bays. *Marine Pollution Bulletin* 34, 26-33.
- Ravenschlag, K., Sahn, K., Pernthaler, J., Amann, R., 1999. High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3982-3989.
- Ringelberg, D.B., Sutton, S., White, D.C., 1997. Biomass, bioactivity and biodiversity: microbial ecology of the deep subsurface: analysis of ester-linked phospholipid fatty acid. *FEMS Microbiology Reviews* 20, 371-377.
- Rütters, H., Sass, H., Cypionka, H., Rullkötter, J., 2002a. Microbial communities in a Wadden Sea sediment core-clues from analyses of intact glyceride lipids and release fatty acids. *Organic Geochemistry* 33, 803-816.
- Rütters, H., Sass, H., Cypionka, H., Rullkötter, J., 2002b. Phospholipids analysis as a tool to study complex microbial communities in marine sediments. *Journal of Microbiological Methods* 48, 149-160.
- Simoneit, B.R.T., 1999. A review of biomarker compounds as source indicators and tracers for air pollution. *Environmental Science and Pollution* 6, 159-169.
- Smith, P.F., 1988. Archaeobacteria and other specialized bacteria. In: Ratledge, C., Wilkinson, S.G., (Eds.), *Microbial Lipids*. Academic Press, London, pp. 299-488.

- Smoot, J.C., Findlay, R.H., 2001. Spatial and seasonal variation in a reservoir sedimentary microbial community as determined by phospholipids analysis. *Microbial Ecology* 42, 350–358.
- Stratford, D.C., 1977. *An Atlas of Medical Microbiology: Common Human Pathogens*, Blackwell Scientific, Edinburg.
- Suzuki, M.T., DeLong, E.F., 2002. Marine Prokaryote Diversity. In: Staley, J.T., Reysenbach, A.L., (Eds.), *Biodiversity of Microbial Life*. Wiley-Liss, New York, pp. 209-234.
- Taylor, J., Parkes, R.J., 1983. The cellular fatty acids of the sulfate reducing bacteria, *Desulfobacter* sp., *Desulfobulbus* sp, and *Desulfovibrio desulfuricans*. *Journal of General Microbiology* 129, 3303-3309.
- Teece, M.A., Getliff, J.M., Leftley, J.W., Parkes, R.J., Maxwell, J.R., 1998. Organic degradation of the marine prymnesiophyte *Emiliana huxleyi* under oxic and anoxic conditions as a model for early diagenesis: long chain alkadienes, alkenones and alkyl alkenoates. *Organic Geochemistry* 29, 863-880.
- Theocharis, A., Balopoulos, E., Kioroglou, S., Kontoyiannis, H., Iona, A., 1999. A synthesis of the circulation and hydrography of the South Aegean Sea and the Straits of the Cretan Arc (March 1994-January 1995). *Progress in Oceanography* 44, 469-509.
- Thiele, O.W., 1979. *Lipide, Isoprenoide mit Steroiden*. Thieme Verlag, Stuttgart, 415 pp.
- Tolosa, I., Bayona, J.M., Albaiges, J., 1996. Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons and sulfur/oxygen derivatives in Northwestern Mediterranean sediments: spatial and temporal variability, fluxes and budgets. *Environmental Science and Technology* 30, 2495-2503.
- Tolosa, I., de Mora, S., Sheikholeslami, M.S., Villeneuve, J.-P., Bartocci, J., Cattini, C., 2004. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in coastal Caspian Sea sediments. *Marine Pollution Bulletin* 48, 44-60.
- Tselepides, A., Zervakis, V., Polychronaki, T., Danovaro, R., Chronis, G., 2000a. Distribution of nutrients and particulate organic matter in relation to the prevailing hydrographic features of the Cretan Sea (NE Mediterranean). *Progress in Oceanography* 46, 113-142.
- Tselepides, A., Polychronaki, T., Marrale, D., Akoumianaki, I., Dell'Anno, A., Pusceddu, A., Danovaro, R., 2000b. Organic matter composition of the continental shelf and bathyal sediments of the Cretan Sea. *Progress in Oceanography* 46, 311-344.
- Vallino, J.J., Hoppkinson, C.S., Hobbie, J.E., 1996. Modeling bacterial utilization of dissolved organic matter: optimization replaces Monod growth kinetics. *Limnology and Oceanography* 41, 1591-1609.
- Virtue, P., Nichols, P.D., Boon, P.I., 1996. Simultaneous estimation of microbial phospholipid fatty acids and diether lipids by capillary gas chromatography. *Journal of Microbiological Methods* 25, 177-185.
- Volkman, J.K., Rojans, D., Rullkötter, J., Scholz-Böttcher, B.M., Liebezeit, G., 2000. Sources and diagenesis of organic matter in tidal flat sediments from the German Wadden Sea. *Continental Shelf Research* 20, 1139-1158.
- Wakeham, S.G., 1995. Lipid biomarkers for heterotrophic alteration of suspended particulate organic matter in oxygenated and anoxic water columns of the ocean. *Deep Sea Research II* 42, 1749-1771.
- Wakeham, S.G., 1996. Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in Black Sea sediments. *Marine Chemistry* 53, 187-205.
- Wang, Z., Fingas, M., Page, D.S., 1999. Oil spill identification. *Journal of Chromatography A* 843, 369-411.
- White, D.C., 1995. Chemical ecology: possible linkage between macro- and microbial ecology. *Oikos* 74, 174-181.
- White, D.C., Davis, W.M., Nickels, J.S., King, J.D., Bobbie, R.J., 1979. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia* 40, 51-62.
- White, D.C., Stair, J.O., Ringelberg, D.B., 1996. Quantitative comparisons of in situ microbial diversity by signature biomarker analysis. *Journal of Industrial Microbiology* 17, 185-196.

- Wieland, A., Kühl, M., McGowan, L., Fourçans, A., Duran, R., Caumette, P., García de Oteyza, T., Grimalt, J.O., Solé, A., Diestra, E., Esteve, I., Herbert, R.A., 2003. Microbial mats on the Orkney Islands revisited: microenvironment and microbial community composition. *Microbial Ecology* 46, 371-390.
- Wieringa, E.B.A., Overmann, J., Cypionka, H., 2000. Detection of abundant sulfate-reducing bacteria in marine oxic sediment layers by a combined cultivation and molecular approach. *Environmental Microbiology* 2, 417-427.



**ΕΡΓΑΣΙΑ ΥΠΟ  
ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙV**



## Manuscript ΕΡΓΑΣΙΑ ΥΠΟ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

### ***n*-Alkanes and microbial community fatty acid profiling along a salinity and oxic/anoxic gradient in deep-sea sediments from the South Ionian Sea (Eastern Mediterranean)**

Paraskevi N. Polymenakou <sup>1,2</sup>, Euripides G. Stephanou <sup>2</sup>, Anastasios Tselepidis <sup>1</sup>, Stefan Bertilsson <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Hellenic Center for Marine Research, Gournes Pediados, GR-71003, Heraklion, Greece

<sup>2</sup> Environmental Chemical Processes Laboratory, Department of Chemistry, University of Crete, GR-71409, Heraklion, Greece

<sup>3</sup> Limnology/Department of Ecology & Evolution, EBC, Uppsala University, Norbyv. 20, SE-75236, Uppsala, Sweden

**Running Title:** Microorganisms and organic matter in hypersaline anoxic sediments

#### **Abstract**

The Eastern Mediterranean Sea contains multiple deep hypersaline anoxic basins. The brines and sediments enclosed in these basins have a limited exchange with the overlying seawater due to strong salinity gradients. Hence it can be expected that the microbial communities contained in these extremely saline sediments should differ from the surrounding oxic sites, but there may also be substantial variation among the hypersaline basins. We used phospholipid linked fatty acid (PLFA) analysis to assess the microbial community composition in brine sediments from the Bannock, L'Atalante, Discovery and Urania basins as well as several oxic reference sediments near these hypersaline basins. The redox potential of the studied sediments varied from -136 to 543 mV and the salinity varied from 38 to 380 psu. Principal component analysis of chemical characteristics, including salinity, Eh, organic carbon and nitrogen content, and C/N ratio grouped the sediments in two major clusters. One group contained the oxic out-brine stations whereas the other contained the anoxic stations of Bannock, L'Atalante and Urania basins. The suboxic station of the Discovery basin was separated from both of these groups. *n*-Alkane composition was determined to discriminate between terrestrial and marine sources of sediment organic matter at the different sites. The high C<sub>35</sub>/C<sub>31</sub> ratios at the anoxic basins was most likely due to co-elution of lycopane with C<sub>35</sub> indicating a significant input of marine plankton. Hierarchical cluster analysis of PLFA signatures revealed significant differences between oxic and anoxic sediments. Redox potential and total organic nitrogen content displayed the highest rank correlation with the microbial community composition for anoxic basins. Salinity did not seem to play a significant role in controlling microbial community composition.

#### **1. Introduction**

Hypersaline ecosystems represent some of the most unusual and extreme environments on earth (Eder et al., 2001; Grant et al., 1998). Anoxic deep-sea brine sediments located along various tectonic rifts represent one special type of such an ecosystem. Brine sediments are found in the Red Sea (e.g. Kebrit Deep, Shaban Deep, Atlantis II Deep; Eder et al., 2001) in the Gulf of Mexico (e.g. the Orca basin; Shokes et al., 1977) and in the Eastern Mediterranean Sea (e.g. L'Atalante, Discovery, Urania, Bannock, Tyro basins; Jongsma et al., 1983; Medruff, 1995). The Urania, L'Atalante, and Discovery basins (discovered in late 1993 and early 1994), are located between the crest of the Mediterranean Ridge and the Matapan Trench southwest of Crete (Corselli et al., 1996; Medruff, 1995; Vengosh et al., 1998; Wallmann et al., 2002) whereas the

Bannock basin (De Lange et al., 1990; Vengosh et al., 1998) is located near the Sirte Abyssal Plain on the southern edge of the Mediterranean Ridge (Schijf et al., 1995).

Two models have been hypothesized for the development of these Mediterranean brine pools. The first model propose that most brines originate from dissolution of 5-8 million year-old Messinian evaporates (Schijf et al., 1995) which were exposed to seawater during the collision of the African and Euracian tectonic plates (Bregant et al., 1990; Camerlenghi et al., 1990; Vengosh et al., 1998; Sass et al., 2001). The second model suggests that the formation of original brines is more likely related to Miocene evaporated sea water (during the desiccation of the Mediterranean Sea) trapped in the sediments and modified by diagenetic reactions and advection-diffusion processes (Vengosh et al., 1994).

High pressure, hypersaline conditions, variable pH values and the absence of light are some key characteristics of these deep anoxic brines (Brusa et al., 2001; Corselli et al., 1996; De Lange et al., 1990). Previous studies have revealed an active microflora containing both aerobic and anaerobic bacteria in the sediments of these brine pools (Brusa et al., 1997; Van der Wielen et al., 2005). Activities of methanogens and sulfate reducing bacteria have been observed at these sites (Van der Wielen et al., 2005), but little is known about origin and quality of the substrates that support growth of these bacteria. The chemocline immediately above the brines harbour a microbial community that is mainly chemolithoautotrophic (Sass et al., 2001). It is known that these communities can express enzymes involved in degradation of aromatic hydrocarbons (Brusa et al., 2001).

Microbial communities play a key role in the dynamics of all major bioactive elements (e.g. carbon, nitrogen, sulfur) as well as in the degradation of organic pollutants (Boschker et al., 2001; Kieft et al., 1997; White et al., 1983) and energy transfer within food webs (Smoot and Findlay, 2001). Hence to understand the function of these unique ecosystems and the impact they may have on the surrounding environment, the composition and ecology of the indigenous microflora needs to be assessed. Studies linking the composition of sediment microbial communities to environmental variables, location and organic matter supply may serve as a foundation for these efforts.

Quantitative analysis of *in situ* microbial community structure in sediments is a major challenge, particularly in these extreme deep-sea systems. One convenient way to overcome problems associated with skewing of the original community, by either cultivation or PCR-based gene assays, is to directly measure some chemical components that are specific for the different groups of microorganisms. Phospholipid linked fatty-acids (PLFA) is one such group of widely used microbial biomarkers (Bååth and Anderson, 2003; Guezennec and Fiala-Medioni, 1996; Rajendran et al., 1993). Analyses of PLFA composition in marine sediments provide information on the quantitative composition of the viable microbial communities. Many PLFAs are restricted to certain microorganisms and PLFAs are also characterized by a rapid turnover in these environments (Guezennec and Fiala-Medioni, 1996; White et al., 1979). Hence the total amount of PLFAs will also reflect the total microbial biomass (Aries et al., 2001; White et al., 1998).

In the present study we used PLFA profiling to compare the microbial community composition in sediments from four different hypersaline anoxic basins in the Eastern Mediterranean Sea (Bannock, L'Atalante, Urania and Discovery) as well as nearby oxic reference sediments from outside of these hypersaline environments. Sediment content of various *n*-alkanes was used to discriminate between terrestrial or marine sources of sediment organic matter. Possible links between microbial community composition and sediment characteristics were explored by principal component analysis.

## **2. Materials and methods**

### *2.1 Sediment collection*

Sediment samples were collected from the hypersaline anoxic basins (in-brine stations) of Discovery (DI), L'Atalante (LA), Urania (U-1) and Bannock (B-1) of the Eastern Mediterranean



Sea and adjacent to the anoxic basins (out-brine stations) of Urania (U-2, U-3) and Bannock (B-2) on board the R/V Urania in November 2003 during the BIODEEP project (Table 1; Fig. 1). A station located in the South Ionian Sea (SI) was sampled in November 2001 on board the R/V Aegaeo during the ADIOS project. This station was used as reference, away from the brine area (off-brine station) (Table 1; Fig. 1). A Bowers and Connelly Multiple-corer (8 cores, i.d. 9.0 cm; Barnett et al., 1984) was used to collect undisturbed sediment samples. Mixed surface sediments (0-1 cm) from each sample were used for all analyses. Subsamples for analysis of phospholipids and petroleum hydrocarbons were sealed in aluminum foil and stored at -20°C until further analysis. Sediment redox potential was measured using calibrated combined redox electrodes (Mettler Toledo, Switzerland). Salinity was measured with a hand refractometer (Atago, Tokyo, Japan) after low-speed centrifugation. Replicate sediment samples were used for organic carbon and nitrogen analyses according to Hedges and Stern (1984), using a Perkin Elmer CHN 2400 analyser. All measurements were carried out in triplicate.

### 2.2 Aliphatic hydrocarbon analysis

Liquid and salts content of the collected samples was extremely high resulting in a significant decrease of their freezing point. Therefore, samples were placed at -80°C and carefully freeze-dried and homogenized. About 1 g of freeze-dried sediment was extracted in a Soxhlet apparatus with a solvent mixture of hexane:dichloromethane (1:1 v/v) overnight and then evaporated to 1 ml. The aliphatic hydrocarbons were eluted with 15 ml of hexane on columns (0.5 cm inner diameter) packed with 1.5 g of silica gel (Silica gel 60 (0.063-200µm); Merck) and evaporated to near dryness under a gentle stream of N<sub>2</sub>. Samples were stored in sealed vials at -20°C until analysis by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS).

### 2.3 Phospholipid linked fatty acid (PLFA) analysis

Total lipids were extracted from the sediments using a modified method of Bligh and Dyer (1959). About 1 g of freeze-dried sediment was sonicated for 5 min with a solvent mixture of chloroform/methanol/buffer (1:2:0.8 v/v/v). The buffer was 50 mM phosphate buffer at pH 7.4. The mixtures were then vigorously agitated for 3 h in the dark at 4°C. Following a centrifugation-step, the supernatant was separated into organic and aqueous phases with 7.5 ml chloroform and 7.5 ml deionized water. The aqueous phase was recovered for three additional extraction cycles with chloroform. Organic extracts were combined and evaporated to near dryness under a gentle stream of N<sub>2</sub>, and stored at -20°C until further analysis. A glass column (0.5 cm inner diameter) was packed with 1.0 g of silica gel (Silica gel 60, 0.063-200 µm mesh, Merck) activated at 150°C for 3 h. Lipid extracts were placed on top of each column and phospholipids were separated from neutral and glycolipids with 15 ml methanol (Keinänen et al., 2003; Petsch et al., 2003). Fractions containing phospholipid linked fatty acids were saponified, methylated and extracted as methyl esters by mild alkaline methanolysis (Smoot and Findlay, 2001). Briefly, phospholipid fractions were dissolved in 0.5 ml of a 1:1 (v/v) solution of toluene and methanol and transmethylated with drops of 0.2 N methanolic potassium hydroxide at 37°C for 15 min. Immediately after addition of 0.5 ml glacial acetic acid (0.2 N), samples were subjected to phase partitioning by addition of 2 ml chloroform and 2 ml deionized water. The organic phase was transferred to a clean glass vial and evaporated to dryness (Smoot and Findlay, 2001).

### 2.4 GC/MS analysis

Identification and quantification of aliphatic hydrocarbons and fatty acid methyl esters (FAME) was performed with a Hewlett Packard Model 6890 GC equipped with a mass selective detector (MS). The chromatographic conditions were as follows: HP-5 MS fused silica capillary column (with 0.25 µm film thickness, 30 m × 0.25 mm I.D.) attached to the ion source; split-splitless injector; helium as a carrier gas; injector temperature 270°C. Temperature program for *n*-alkanes: 70°C (1 min), 70-150°C (10°C/min), 150-290°C (5°C/min), and 290°C (30 min). Temperature

program for FAME analysis: 70°C (1 min), 70-140°C (10°C/min), 140-240°C (4°C/min), and 240°C (30 min). In both methods 1 µl of each sample was injected in the splitless mode. Identification of *n*-alkanes was based on mass spectrum and retention times compared to purchased standards (Polysciences). Fatty acids were also identified by comparing retention times to purchased standards (FAME Mix, Supelco). Quantification of *n*-alkanes and PLFA were carried out using the internal standards 1-chlorohexadecane and nonadecanoic acid methyl ester, respectively. The classical fatty acid terminology is used: total number of carbon atoms:number of double bonds, followed by the position ( $\omega$ ) of the double bond from the methyl end of the molecule. All results are presented as mean  $\pm$  standard deviation. The sum of a number of bacterial PLFAs were used as a proxy for bacterial biomass: C14:0, 14-MeC14:0, 12-MeC14:0, C15:0, 12-MeC15:0, 14-MeC15:0, *cis*-C16:1 $\omega$ 7, *cis*-C16:1 $\omega$ 9, *trans*-C16:1 $\omega$ 7, *trans*-C16:1 $\omega$ 9, C16:0, 13-MeC16:0, 15-MeC16:0, 14-MeC16:0, C17:1, C17:0, *cis*-18:1 $\omega$ 7, *cis*-18:1 $\omega$ 9, *trans*-18:1 $\omega$ 9, C18:0 and C20:1. The PLFA C18:2 $\omega$ 6,9 was used as an indicator of fungal biomass (Bååth and Anderson, 2003).

### 2.5 Statistical analysis

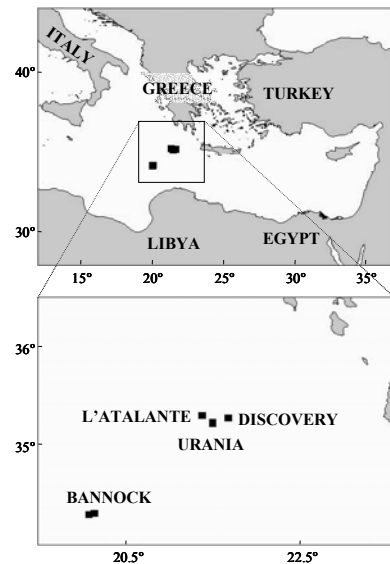
Sediment characteristics were compared by principal component analysis (PCA) using the environmental parameters (redox potential, salinity, organic carbon content, organic nitrogen content, C/N ratio) and *n*-alkane distribution. PCA was carried out using the PRIMER 5.2.2 software package (Plymouth Routines In Multivariate Ecological Research). Pairwise comparison of PLFA composition between environmental samples was used to generate a similarity matrix. Subsequent hierarchical cluster analysis was performed using the PRIMER 5.2.2 software. The relation between measured environmental variables and microbial community structure was investigated using BIOENV analysis, included in the PRIMER software (Clarke and Ainsworth, 1993). BIOENV analyzes the correlation between similarity matrices for environmental variables and the different similarity matrices computed for PLFA analysis. These correlations are repeated for all possible combinations of the measured environmental variables and the set of environmental variables that produce the highest correlation (R) are those that most accurately explain the community fingerprints.

## 3. Results and Discussion

### 3.1 Chemical parameters

The redox potential at the sediment surface ranged from -136 to 543 mV and sediments from outside the hypersaline basins were always oxic ( $> 438$  mV). Sediments outside of the hypersaline basins had a salinity of 38 psu, whereas corresponding values for the 4 hypersaline basins ranged from 160 to 380 psu (Table 1). Water column depth above the sampled sediments ranged from 2840 to 3533 m (Table 1). The lowest organic carbon content,  $0.37\% \pm 0.09\%$ , was observed in the Urania basin (Table 1). These results are in accordance with previous findings for the Urania basin (0.4%; Hübner, 2002). The highest sediment carbon content,  $1.63\% \pm 0.09\%$ , was observed in Discovery basin sediments (Table 1). This range is similar to a previous survey of these basins (0.28-1.01%; Van der Wielen et al., 2005) and comparable to values reported in other regions of the Eastern Mediterranean Sea (0.38-1.47%; Polymenakou et al., 2005).

Principal Component Analysis (PCA) was used to compare the different sediment characteristics (Fig. 2a). Eigenvalues were developed based on a correlation matrix.



**Figure 1.** Map of the eastern Mediterranean Sea, showing the locations of Bannock, L'Atalante, Urania and Discovery Basins.

The results indicated that 76% of the total variance in the environmental parameters (redox potential, salinity, total organic carbon, total organic nitrogen, C/N ratio) could be explained by only two principal components (PC) where PC1 and PC2 explained 41% and 35% of the total variance, respectively (Fig. 2a). The sediments clustered in 2 distinct groups. Group A contained

**Table 1.** Station positions, water column depth (m), redox potential (mV), salinity (psu) and total organic carbon (TOC) and nitrogen (TON) content (% sediment dry weigh) of the sediment samples are presented. Sd indicate standard deviation among replicate samples ( $n=3$ ). TON concentration at station AB10MC was not determined.

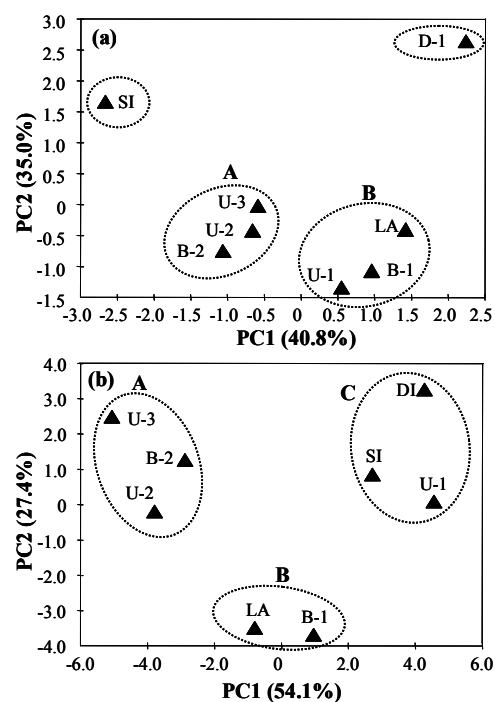
Station	Position		Basin	Type	Depth (m)	Eh (mV)	Salinity (psu)	TOC (%)		TON (%)		C/N	
	Long	Lat						mean	sd	mean	sd	mean	sd
SI	20°48'77	34°52'75	South Ionian	off-brine	2840	543	38	1.30	0.69	0.07	0.01	18.14	7.79
B-1	20°00'75	34°17'46	Bannock	in-brine	3295.3	-82	240	0.42	0.09	0.04	0.01	12.42	0.35
B-2	20°00'39	34°16'51	Bannock	out-brine	3179	443	38	0.58	0.03	0.06	0.00	10.70	0.24
DI	21°41'42	35°16'62	Discovery	in-brine	3532.5	10	380	1.63	0.09	nd	nd	nd	nd
LA	21°23'16	35°18'19	L'Atalante	in-brine	3354.7	-136	290	0.67	0.09	0.06	0.01	12.92	0.75
U-1	21°30'64	35°13'78	Urania	in-brine	3326	-95	160	0.37	0.09	0.03	0.01	13.67	0.20
U-2	21°30'64	35°13'78	Urania	out-brine	3320	475	38	0.67	0.09	0.07	0.00	10.50	0.38
U-3	21°30'63	35°13'87	Urania	out-brine	3310	438	38	0.76	0.09	0.09	0.02	10.66	2.99

the oxic out-brine stations B-2, U-2, and U-3 whereas group B contained the anoxic in-brine stations U-1, B-1, and LA (Fig. 2a). The suboxic in-brine Discovery station (DI) was clearly separate from the other anoxic stations, corroborating observations by van der Wielen and coworkers (2005). The South Ionian off-brine reference station (SI) also grouped separate from the oxic group A (Fig. 2a), most likely as a result of its higher organic carbon content (1.30%; Table 1) and high C/N ratio (18.14; Table 1) compared to the other stations.

### 3.2 *n*-Alkanes (NA)

Several tracers have been evaluated in order to quantify terrestrial versus marine sources of organic carbon inputs to the ocean. Many constituents of the cuticular waxes in higher plants (e.g. *n*-alkanes with a marked predominance of odd carbon numbered chains; Bouloubassi et al., 1997) have been used extensively as molecular markers of terrestrially derived sedimentary organic carbon (Bouloubassi et al., 1997; Farrington and Tripp, 1977; Gogou et al., 2000; Saliot et al., 1991). In the present study, *n*-alkanes (NA) distribution was examined to compare the importance of marine and terrestrial organic carbon inputs (Damsté et al., 1995) to sediments in the deep hypersaline anoxic basins of the South Ionian Sea.

The organic carbon content can vary among sediments due to fluctuations in bulk organic matter as well as due to specific inputs of organic compounds and variations in inorganic materials (dilution effect) (Gogou et al., 2000). To account for a possible dilution effect, we



**Figure 2.** (a) Principal component analysis of surface sediment characteristics (water column depth, redox potential (Eh), salinity, organic carbon, organic nitrogen, C/N ratio) in the South Ionian Sea (Eastern Mediterranean). (b) Principal component analysis of *n*-alkane distribution in the South Ionian Sea (Eastern Mediterranean).

present NA concentrations both in  $\text{ng g}^{-1}$  of dry sediment as well as estimates normalized for carbon content concentrations ( $\mu\text{g g}^{-1}$  of organic carbon) as described by Gogou et al. (2000).

**Table 2.** Characteristic parameters of aliphatic hydrocarbons determined in the sediment samples of South Ionian Sea. NA: *n*-alkane concentration;  $\Sigma(\text{C}_{14}\text{-C}_{20})$ : sum of concentrations of NA from  $\text{C}_{15}$  to  $\text{C}_{20}$ ;  $\Sigma(\text{C}_{21}\text{-C}_{36})$ : sum of concentrations of NA from  $\text{C}_{21}$  to  $\text{C}_{36}$ ; Mar: sum of concentrations of marine NA  $\text{C}_{15}$ ,  $\text{C}_{17}$  and  $\text{C}_{19}$ ; Ter: sum of concentrations of terrestrial NA  $\text{C}_{27}$ ,  $\text{C}_{29}$  and  $\text{C}_{31}$ ; TC: absolute terrestrial contribution; OC: organic carbon; CPI: carbon preference index of NA from  $\text{C}_{21}$  to  $\text{C}_{36}$ .

Sampling sites	SI	B-1	B-2	DI	LA	U-1	U-2	U-3
<i>Parameters</i>								
NA ( $\text{ng g}^{-1}$ )	2318.0	4408.6	4975.0	1179.3	4776.0	1562.0	5675.3	5445.3
NA/OC ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	178.7	1058.5	860.0	72.4	716.6	422.2	852.1	715.5
$\Sigma(\text{C}_{14}\text{-C}_{20})$ ( $\text{ng g}^{-1}$ )	194.6	358.4	719.5	252.7	252.8	76.8	702.9	1156.8
$\Sigma(\text{C}_{14}\text{-C}_{20})/\text{OC}$ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	15.0	86.1	124.4	15.5	37.9	20.8	105.5	152.0
$\Sigma(\text{C}_{21}\text{-C}_{36})$ ( $\text{ng g}^{-1}$ )	2123.4	4050.2	4255.4	926.6	4523.2	1485.2	4972.4	4288.5
$\Sigma(\text{C}_{21}\text{-C}_{36})/\text{OC}$ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	163.7	972.4	735.6	56.9	678.6	401.4	746.6	563.5
Mar ( $\text{ng g}^{-1}$ )	55.8	145.2	279.7	78.1	125.2	39.9	333.8	523.3
Mar/OC ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	4.3	34.9	48.4	4.8	18.8	10.8	50.1	68.8
Ter ( $\text{ng g}^{-1}$ )	578.7	679.6	1655.4	159.0	956.3	299.5	1438.4	1415.4
Ter/OC ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	44.6	163.2	286.2	9.8	143.5	80.9	216.0	186.0
TC ( $\text{ng g}^{-1}$ )	477.4	602.9	1561.2	20.5	723.9	96.7	1136.8	1100.4
TC/OC ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	36.8	144.7	269.9	1.3	108.6	26.1	170.7	144.6
CPI ( $\text{C}_{21}$ - $\text{C}_{36}$ )	1.4	1.7	2.2	1.0	1.4	0.9	1.9	1.9
$\text{C}_{29}/\text{C}_{31}$	0.8	0.7	0.9	1.4	0.9	0.9	0.8	0.9
$\text{C}_{35}/\text{C}_{31}$	0.3	1.2	0.2	0.6	1.0	0.6	0.4	0.3

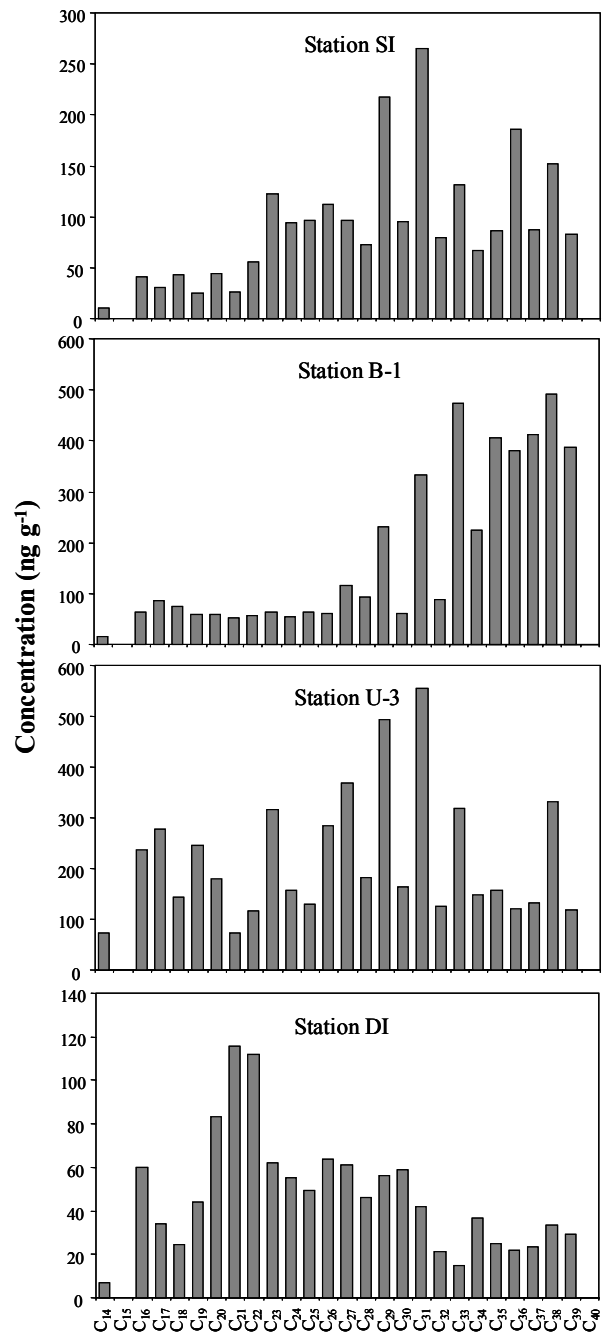
Concentrations of *n*-alkanes with chain lengths between  $\text{C}_{14}$  and  $\text{C}_{40}$  (NA) normalized to sediment weight and sediment carbon ranged from  $1180 - 5675 \text{ ng g}^{-1}$  dry weight and  $72 - 1059 \text{ ng g}^{-1}$  dry weight, respectively (Table 2). The lowest NA concentration was recorded for the Discovery in-brine station ( $1179.3 \text{ ng g}^{-1}$ ; Table 2) and this level is within the range reported for coastal marine sediments in the North Aegean Sea ( $0.2\text{--}3.3 \mu\text{g g}^{-1}$  dry weight; Polymenakou et al., 2005) and lower than those reported for the Western Mediterranean Sea ( $2.0 - 27.1 \mu\text{g g}^{-1}$  dry weight; Bouloubassi et al., 1997). NA concentrations normalized to organic carbon were also comparable to concentrations reported for various regions in the Eastern Mediterranean Sea (e.g.  $791.0\text{--}822.8 \mu\text{g g}^{-1}$  of OC; Polymenakou et al., 2005).

Short chain NA ( $\text{C}_{14}\text{-C}_{20}$ ) were found in low concentrations compared to long chain ( $> \text{C}_{20}$ ) homologues (Table 2, Figure 3). Most long chain homologues ranged from  $\text{C}_{21}$  to  $\text{C}_{36}$  and these were dominant at all stations (Table 2, Figure 3). The Carbon Preference Index (CPI) is a useful indicator of hydrocarbon origin. CPI values were estimated in the range  $\text{C}_{21}\text{-C}_{36}$  following the equation  $\text{CPI} = \Sigma(\text{C}_{21}\text{-C}_{35}) / \Sigma(\text{C}_{22}\text{-C}_{36})$ . Naturally emitted hydrocarbons or fresh terrestrial materials will have a CPI greater than 1 whereas CPI values around or below 1 imply anthropogenic inputs, petroleum contamination or input of degraded planktonic material (Bouloubassi et al., 1997; Simoneit, 1999). The estimated values in our study ranged from 0.9 to 2.2 reflecting the occurrence of contrasting organic carbon sources among the studied sediments. The hypersaline sediments in the Discovery and Urania basins had the lowest CPIs (0.9-1.0) suggesting negligible inputs of terrigenous organic matter. The absolute terrestrial contribution (TC, Table 2) was estimated using the equation described by Damsté et al. (1995):  $\text{TC} = 3/2 [(\text{C}_{29}$

+ C<sub>31</sub>) - 2/3 (C<sub>28</sub> + C<sub>30</sub> + C<sub>32</sub>)]. Previous studies have shown that CPI may overemphasize the terrestrial components of the sediment samples (Damsté et al., 1995) but this did not seem to be the case for our studied sediments since there was a strong positive correlation between CPI and TC ( $R^2 = 0.93$ ,  $n=8$ ).

The *n*-alkane homologues of marine origin (Mar: the sum of concentrations of C<sub>15</sub>, C<sub>17</sub>, and C<sub>19</sub>, Table 2) were minor constituents (2.4 – 9.6%) of the total NA reflecting the low productivity of the study area and the high degradability of these compounds. The sum of concentrations of the three most abundant terrestrial NA (defined as the sum of C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub>, C<sub>31</sub>: Ter; Table 2) ranged from 159.0 to 1655.4 ng g<sup>-1</sup> and the organic carbon normalized concentrations ranged from 9.8 to 286.2 µg g<sup>-1</sup> (Ter and Ter/OC respectively; Table 2). Terrestrial NA concentrations (both absolute and OC-normalized) varied substantially among the sampling stations with higher recorded values at the out-brine stations B-2, U-2, and U-3 while the lowest terrestrial NA contribution was observed for the Discovery basin (Table 2). The latter content of terrigenous signature *n*-alkanes was similar to levels observed in the oligotrophic Cretan Sea (28 – 417 ng g<sup>-1</sup>; Gogou et al., 2000). In contrast to the other sampling stations, the sediment from the Discovery basin had a NA composition dominated by C<sub>20</sub>, C<sub>21</sub>, and C<sub>22</sub> (26.3% of total NA; Fig. 3). These compounds only contributed between 2.1 and 6.8% of the total NA for the other sediments. The C<sub>29</sub>/C<sub>31</sub> ratio provides additional support for a different composition of NA in the Discovery basin sediments (Table 2). The ratio is < 1 for all sampling sites except the Discovery basin (1.4; Table 2). Differences in the C<sub>29</sub>/C<sub>31</sub> ratio are mostly associated with different sources of terrigenous organic material; e.g. continental run-off or atmospheric transport (Gogou et al., 1996; Gogou et al., 2000).

Surface sediments from the in-brine stations were characterized by significantly higher C<sub>35</sub>/C<sub>31</sub> ratios compared to the non-hypersaline stations (Table 2). These higher ratios are probably derived from the co-elution of lycopane with C<sub>35</sub> *n*-alkane (Damsté et al., 2003). This may be a result of enhanced preservation of this compound under anoxic conditions. McCaffrey



**Figure 3.** Distribution of *n*-alkane (NA) homologue in deep-sea South Ionian sediment samples at stations SI, U-3, B1 and DI.

et al. (1991) have shown that lycopane is most likely to be derived from marine phytoplankton rather than methanogenic archaea that should be abundant in these anoxic environments. The phototrophic origin of this compound was later corroborated by analysis of its carbon isotope signature Damsté et al. (2003) and the compound has been proposed as an indicator of anoxic conditions in ancient environments. Hence this observation suggests that the anoxic basins of the South Ionian Sea have served as sinks for sedimenting planktonic material that has been preserved over time.

The organic carbon sources in the different sediments were also compared by PCA. The results indicated that 81.5% of the total variance in *n*-alkane distributions were represented by only two principal components (PC). PC1 and PC2 explained 54.1% and 27.4% of the total variance (Fig. 2b) and produced 3 distinct clusters. Group A contained the oxic out-brine reference stations B-2, U-2 and U-3, whereas group B contained two of the anoxic in-brine stations (LA and B-1), whereas U-1 clustered with the Discovery in-brine station (DI) and the South Ionian reference station (SI). These results suggest the occurrence of three different types of organic carbon sources (Fig. 2b). Stations within group A are characterized by high terrestrial inputs (e.g. TC/OC = 144.6 – 269.9  $\mu\text{g g}^{-1}$ , CPI = 1.9 – 2.2; Table 2, Fig. 2b) whereas Bannock and L'Atalante basins (stations of group B) have a higher input of preserved materials of planktonic origin (e.g. high C<sub>35</sub>/C<sub>31</sub> ratio; Table 2). The generally high levels of acyclic hydrocarbons at these stations suggest that the South Ionian Sea may be a focal point for accumulation of terrestrial as well as marine organic matter in sediments but the organic matter could also originate from the subjacent geological layers (Brusa et al., 2001 from (Corselli, personal communication, 1999)).

### 3.3 Microbial community composition

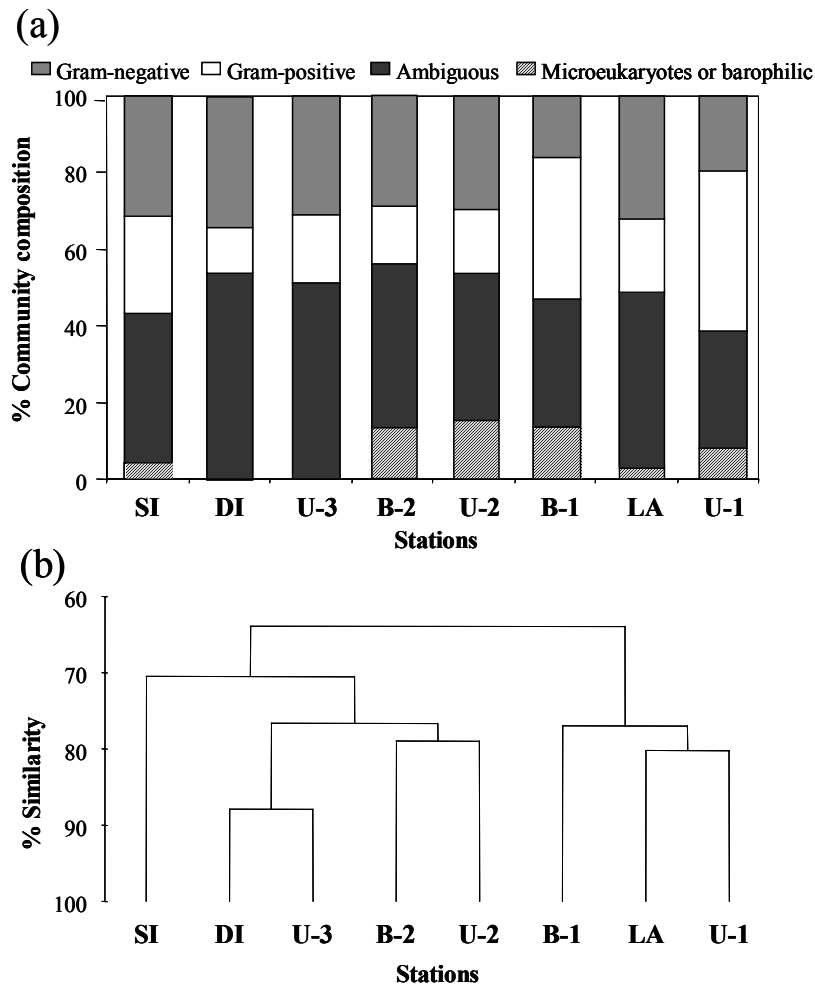
Phospholipids form the main part of the cell membrane where they protect the cell against the environment. Many attempts have been made to study microbial communities in the sediments based on phospholipid-linked fatty acids (PLFA) biomarkers (Bobbie and White, 1980; White et al., 1979; White et al., 1996). Biomass estimates from PLFA analyses are usually assumed to represent viable microbial cells since phospholipids are degraded within 2-4 days after cell death (White et al., 1979). This rapid degradation is likely a result of phospholipase activity (Harvey et al., 1986). Eukaryote microorganisms such as plants, algae, diatoms and higher animals synthesize different kinds of phospholipids (Gurr and James, 1980; Parkes and Taylor, 1983). Also Archaea differ from bacteria in their phospholipid composition; i.e. they contain ether-linked rather than ester-linked lipids (Add reference). In the present study, PLFA profiles revealed a dominant contribution of bacterial lipids to total sedimentary lipids indicating that the microbial communities were dominated by bacteria rather than by microeukaryotes (Guezennec and Fiala-Medioni, 1996) (Table 3).

The concentration of total PLFA measured in the sediments (757.36 – 3807.90  $\text{ng g}^{-1}$ ; Table 3) was comparable to the reported PLFA concentration in sediments from the Thermaikos Gulf (North Aegean Sea) (219-2714  $\text{ng g}^{-1}$ ; Polymenakou et al., 2005) and the Cretan Sea (South Aegean Sea) (524-1238  $\text{ng g}^{-1}$ ; Polymenakou et al., 2005). The estimated content of bacterial lipids, as a proxy for bacterial biomass, ranged from 651.01 to 3300.83  $\text{ng g}^{-1}$  dry weight (Table 3). The bacterial lipid content in sediments from the Discovery basin was lower than corresponding values for the other anoxic basins. This observation is in agreement with van der Wielen et al., (2005) who recorded lower microscopic counts of bacteria in the Discovery basin compared to the L'Atalante, Bannock and Urania basins. It is possible that an environment characterized by low microbial activity could preserve PLFAs and thereby bias estimates of viable microbial biomass (Summit et al., 2000). However, the employed extraction procedures discriminate between phospholipids and free fatty acids, and the latter should not interfere with biomass estimates.

**Table 3.** Mean percentages (*mean*) and standard deviations (*sd*) of the different functional groups in sediment samples of the South Ionian Sea ( $n=3$ ). Total amount of PLFA ( $\text{ng g}^{-1}$ ) and bacterial biomass ( $\text{ng g}^{-1}$ ) PLFAs are also presented. SFA: saturates, MUFA: monounsaturates, B-FA: branched chain, PUFA: polyunsaturates.

PLFA (%)	SI		B-1		B-2		DI		LA		U-1		U-2		U-3	
	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>
<i>SFA (ambiguous)</i>																
C <sub>14:0</sub>	3.76	0.02	5.69	2.77	3.56	0.35	7.42	0.29	8.36	1.10	4.43	1.01	3.53	0.62	3.70	1.11
C <sub>15:0</sub>	1.27	0.11	1.24	0.48	1.39	0.03	0.98	0.24	1.46	0.38	0.69	0.06	1.07	0.29	1.29	1.10
C <sub>16:0</sub>	22.11	0.13	20.30	2.10	27.72	0.53	34.78	1.97	26.79	1.44	18.60	4.29	21.16	0.49	34.47	7.39
C <sub>17:0</sub>	0.93	0.23			1.11	0.32			1.12	0.72	0.91	0.41	1.40	0.90	2.32	3.28
C <sub>18:0</sub>	10.03	2.83	5.00	1.59	7.34	0.39	10.91	4.92	4.59	1.54	5.01	0.00	9.92	1.34	9.34	3.87
C <sub>20:0</sub>	1.00	0.10	1.22	0.37	1.72	0.12			3.61	3.83	0.96	0.16	1.34	0.05		
<i>MUFA (Gram negative)</i>																
<i>cis</i> -C <sub>16:1<math>\omega</math>7</sub>	1.90	0.00									0.30	0.23	0.62	0.87		
<i>cis</i> -C <sub>16:1<math>\omega</math>9</sub> + <i>trans</i> -C <sub>16:1<math>\omega</math>7</sub>	5.43	0.32	5.82	0.03	2.63	2.89	9.66	0.02	13.86	0.58	5.29	1.04	4.52	1.62	5.52	3.96
<i>trans</i> -C <sub>16:1<math>\omega</math>9</sub>	3.08	0.58			1.80	0.26	1.68	0.98	1.56	0.76	1.90	0.43	2.14	0.58	2.26	0.39
C <sub>17:1</sub>	2.42	0.02							0.65	0.30						
<i>cis</i> -C <sub>18:1<math>\omega</math>7</sub>	7.46	1.33	4.52	0.20	7.72	0.81	7.90	0.73	5.99	1.06	4.86	0.53	9.68	1.63	7.24	0.38
<i>cis</i> -C <sub>18:1<math>\omega</math>9</sub>	9.94	0.94	5.61	0.13	16.74	2.02	14.96	1.19	10.01	1.11	7.21	0.40	12.54	2.17	16.08	0.98
<i>trans</i> -C <sub>18:1<math>\omega</math>9</sub>	1.03	0.35														
<i>B-FA (Gram positive)</i>																
14-MeC <sub>14:0</sub>	5.85	0.05	2.79	1.23	3.53	1.28	3.92	0.40	4.19	0.49	4.65	0.07	3.71	0.87	2.58	0.73
12-MeC <sub>14:0</sub>	7.60	0.00	4.83	0.10	5.90	1.97	5.14	2.58	5.38	0.48	6.64	2.01	5.65	2.07	5.56	1.51
12-MeC <sub>15:0</sub>									0.70	0.25						
14-MeC <sub>15:0</sub>	1.56	0.06							0.86	0.07	0.65	0.03	0.53	0.74		
13-MeC <sub>16:0</sub>			3.04	0.32	5.67	1.46	2.65	0.85	2.38	0.08	1.81	1.52	6.97	1.34	7.26	1.15
15-MeC <sub>16:0</sub>	4.16	0.32	26.46	6.23					3.93	4.52	28.17	4.86				
14-MeC <sub>16:0</sub>	6.41	0.02							1.67	0.64					2.38	0.61
<i>PUFA (Microeuk./barophilic)</i>																
C <sub>18:3<math>\omega</math>3</sub>	0.49	0.06	2.21	0.84	3.47	1.05			1.06	0.54	1.13	0.06	0.41	0.01		
C <sub>18:2<math>\omega</math>6,9</sub>	1.21	0.07			6.04	3.45			1.83	0.48	4.33	2.03	6.89	1.51		
C <sub>20:4</sub>	0.17	0.02	2.73	0.42	1.51	1.47					2.48	0.94	2.20	1.47		
C <sub>20:3<math>\omega</math>11,14,17</sub>	1.30	0.78	8.55	1.51									5.74	2.06		
C <sub>20:2<math>\omega</math>11,14</sub>	0.87	0.18			2.15	0.23										
<b>Total PLFA (<math>\text{ng g}^{-1}</math>)</b>	1352.10	208.04	3807.90	655.18	757.36	323.73	1019.26	152.06	2933.83	1375.76	2736.56	964.86	1287.56	180.24	941.83	91.98
<b>Bacterial biomass (<math>\text{ng g}^{-1}</math>)</b>	1296.77	191.99	3300.83	640.53	651.01	250.07	1019.26	152.06	2849.16	1337.45	2504.68	805.46	1086.76	87.70	941.83	91.98

The fatty acid profiles for the studied sediments consist of saturated, monounsaturated, polyunsaturated and branched-chain fatty acids indicating the presence of aerobic and anaerobic bacteria (Table 3). This is in agreement with a previous study conducted in the anoxic basins Urania, Discovery and Atalante where viable aerobic and anaerobic microorganisms were detected (Brusa et al., 1997). The saturated fatty acids ranged from  $33 \pm 7\%$  to  $54 \pm 7\%$  of the total fatty acids and were dominated by C16:0 and C18:0 which are ubiquitous in organisms (Rajendran et al., 1993) (Table 3; Fig. 4a).



**Figure 4.** (a) Microbial community composition of the sediment samples based on different groups of fatty acids. (b) Cluster analysis dendrogram based on comparison of phospholipids linked fatty acid (PLFA) profiling from the different surface sediment samples.

Monounsaturated fatty acids (e.g. C16:1 $\omega$ 9) have been implied as indicators of gram-negative bacteria (Ratledge and Wilkinson, 1988). The contribution of monounsaturated fatty acids to total fatty acids varied between sampling sites with lower concentrations of gram-negative bacteria at the Discovery station (16% of the total fatty acids; Fig. 4a) and the hypersaline Urania station (U-1; 20% of total fatty acids; Fig. 4a). These low proportions of monounsaturated fatty acids are probably due to the higher temperatures within the anoxic basins. Previous studies have shown that bacteria, like higher plants and poikilothermic animals, increase their proportion of monounsaturated fatty acids in membrane lipids in response to decreased environmental temperatures (Fang et al., 2000; Fulco, 1983).



Unsaturations at  $\omega 7$  and  $\omega 9$  were found for both the 16 carbon and 18 carbon fatty acids with concentrations ranging from 0 to 16.7% (Table 3). Both the *cis* and *trans* geometry were detected in the monounsaturated fatty acids C16:1 $\omega$ 7, C16:1 $\omega$ 9 and C18:1 $\omega$ 9 (Table 3). Monounsaturated fatty acids with 16 carbons are characteristic components of Type I methanotrophs (Makula, 1978; Martz et al., 1983). These hypersaline ecosystems have an active methanogenic microflora (Van der Wielen et al., 2005) and the presence of methane-oxidizing bacteria at the oxic/anoxic interface can therefore be expected.

White et al. (1996) reported that polyunsaturated PLFAs are almost exclusive to eukaryotes and polyunsaturated C18:2 fatty acids have been used as fungal biomarkers (Frostegard and Bååth; 1996). However, previous studies have shown that in the deep biosphere, polyunsaturated PLFA may indicate the presence of barophilic bacteria. DeLong and Yayanos (1985) suggested that the polyunsaturated PLFA play an important role in maintaining optimal membrane fluidity and could hence be critical for the adaptation of these organisms to life in the deep-sea environment. The presence of one such polyunsaturated indicator, C18:2 $\omega$ 6,9, was higher at the in-brine station U-1 ( $128 \pm 97 \text{ ng g}^{-1}$ ) and the nearby out-brine station U-2 ( $90 \pm 32 \text{ ng g}^{-1}$ ). This marker was absent from stations B-1, DI and U-3. The overall minor contribution of polyunsaturated fatty acids to total fatty acids (0 to 15%) suggests that microeukaryotes are less abundant in these systems. (Fig. 4a).

Branched saturated fatty acids indicate the presence of gram-positive bacteria (Zelles, 1999). The levels of branched saturated fatty acids indicated that the abundance of gram-positive bacteria relative total bacterial biomass varied substantially between the sampling sites. Gram-positive bacteria appeared to be dominant in the anoxic basins of Bannock (B-1) and Urania (U-1) with concentrations of 37% and 42% of the total fatty acid content, respectively (Table 3; Fig. 4a).

Our results support previous findings that the deep hypersaline anoxic basins of the Mediterranean are not biological dead-ends but contain viable and active microbial communities (Van der Wielen et al., 2005).

### 3.4 The effect of oxic/anoxic conditions and salinity

The community structure of benthic microbial communities has attracted much interest over the last decade (Epstein, 1997). Previous studies of sediment microbial community composition in oxic surface sediments of the Eastern Mediterranean Sea (Thermaikos Gulf, Cretan Sea, South Ionian Sea and Levantine) have shown that organic carbon content and chlorophyll-*a* appear to play a major role in regulating the composition of these benthic bacterial communities (Polymenakou et al., 2005). However, similar studies of environmental factors controlling benthic microbial communities in extreme environments such as hypersaline anoxic basins are scarce.

A pairwise similarity matrix based on phospholipid fatty acid profiles was generated for the eight studied sediments. Hierarchical cluster analysis based on the derived similarity grouped the sediment communities largely according to their redox potential (Fig. 4b). All anoxic in-brine stations (U-1, B-1, LA) were clearly separated from all other sediments. The suboxic in-brine station of the Discovery basin (DI) grouped with the oxic out-brine stations. The Eh values of these stations varied between 10 and 475 mV (Table 1). It is evident that the microbial community in the Discovery basin is most different from the other hypersaline anoxic stations, both in the microbial community composition (Fig. 4b) and prevailing environmental conditions (Fig. 2). This observation corroborate previous comparisons of the 4 hypersaline basins where 16S rRNA analysis of bacterial and archaeal microorganisms revealed large differences between the Discovery station and the other anoxic sites (van der Wielen et al., 2005). The ionic composition could be one explanation for the major differences observed; the brine in the Discover basin contains very high concentrations of  $\text{Mg}^{2+}$  ions (5M), whereas the three other hypersaline basins have much higher  $\text{Na}^+$  concentrations (van der Wielen et al., 2005). Based on a detailed comparison of 16S rRNA clone libraries, van der Wielen et al. (2005) hypothesized that

the physical separation of the basins may have resulted in the evolution of specific microbial communities in each of the hypersaline basins.

BIOENV analysis was conducted, in order to assess the effect of the different environmental parameters (e.g. oxic/anoxic conditions, salinity, organic carbon and nitrogen content, C/N ratio, PLFA content) on the distribution of microbial communities. As recommended by Clarke and Ainsworth (1993), all measured environmental parameters were included in the BIOENV analysis without any prior transformations. The highest rank correlation with PLFA data ( $R=0.498$ ) was obtained with Eh values confirming the cluster results and signifying the low importance of salinity levels on microbial community composition. This could indicate that the microbes that inhabit these sediments are halotolerant rather than halophilic. This has been described previously for strains isolated from the water/brine interface of the Urania basin (Brusa et al., 2001). The above clustering of benthic microbial communities is largely due to differences in Eh values. Thus, in order to examine microbial community shifts in each environment (oxic and anoxic) BIOENV analysis was also conducted within each group taking into account all replicate samples. In the anoxic group the highest rank correlation with PLFA data was obtained with redox potential and total organic nitrogen content ( $R=0.871$ ). Organic carbon content did also display a high rank correlation with microbial community composition ( $R=0.868$ ). These results highlight the key role of organic matter inputs in regulating benthic microbiota in these anoxic sediments. The importance of this controlling factor has previously been observed for oxic sediments from the same sector of the Mediterranean Sea (Polymenakou et al., 2005). However, the communities in the oxic sediments seemed to be more correlated to variables such as depth and microbial biomass as reflected by PLFA content ( $R=0.796$ ), whereas organic carbon content had a minor contribution.

### Acknowledgments

We acknowledge officers and the crew of the R/Vs *Urania* and *Aegeao* for their assistance during the sampling cruises. Nikolaos Lampadariou and Dimitris Podaras are also acknowledged for their help on samples collection on-board. The authors are grateful to anonymous referees who their comments and suggestions greatly improved the manuscript. This work was jointly supported by the Commission of the European Communities (through projects BIODEEP (**B**IOtechnologies from the **DEEP**): EU - DG XII, EVK3 - 2000 - 22057 and ADIOS (**A**tmospheric **D**eposition and **I**mpact of pollutants, key elements and nutrients on the **O**pen Mediterranean Sea): EU - DG XII, EVK3 - 2000 - 00604) and the Greek Ministry of Development (General Secretariat of Research and Technology).

### References

- Aries, E., Doumenq, P., Artaud, J., Acquaviva, M., Bertrand, J. C., 2001. Effects of petroleum hydrocarbons on the phospholipid fatty acid composition of a consortium composed of marine hydrocarbon-degrading bacteria. *Organic Geochemistry* 32, 891–903.
- Bååth, E., Anderson, T.-H., 2003. Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 955-963.
- Barnett, P.R.P., Watson, J., Connelly, D., 1984. A multiple corer for taking virtually undisturbed sediment samples from shelf bathyal and abyssal sediments. *Oceanologica Acta* 7, 399-408.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 911–917.
- Bobbie, R.J., White, D.C., 1980. Characterization of benthic microbial community structure by high-resolution gas chromatography of fatty acid methyl esters. *Applied and Environmental Microbiology* 39, 1212-1222.
- Boschker, H.T.S., Graaf, W.D., Köster, M., Meyer-Reil, L.A., Cappenberg, T.E., 2001. Bacterial populations and processes involved in acetate and propionate consumption in anoxic brackish sediment. *FEMS Microbiology Ecology* 35, 97-103.

- Bouloubassi, I., Lipiatou, E., Saliot, A., Tolosa, I., Bayona, J.M., Albaiges, J., 1997. Carbon sources and cycle in the Western Mediterranean: II. The use of molecular markers to determine the origin of organic matter. *Deep Sea Research* 44, 781-799.
- Bregant, D., Catalano, G., Civitarese, G., Luchetta, A., 1990. Some chemical characteristics of the brines in Bannock and Tyro basins: salinity, sulphur compounds, Ca<sup>2+</sup>, F<sup>-</sup>, pH, Al, PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>, SiO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>. *Marine Chemistry* 31, 35-62.
- Brusa, T., Borin, S., Ferrari, F., Sorlini, C., Corselli, C., Daffonchio, D., 2001. Aromatic hydrocarbon degradation patterns and catechol 2,3-dioxygenase genes in microbial cultures from deep anoxic hypersaline lakes in the eastern Mediterranean sea. *Microbiological Research* 156, 49-58.
- Brusa, T., Del Puppo, E., Ferrari, A., Rodondi, G., Andreis, C., Pellegrini, S., 1997. Microbes in deep-sea anoxic basins. *Microbiological Research* 151, 45-56.
- Camerlenghi, A., 1990. Anoxic basins of the eastern Mediterranean: geological framework. *Marine Chemistry* 31, 1-19.
- Clarke, K.R., Ainsworth, M., 1993. A method of linking multivariate community structure to environmental variables. *Marine Ecology Progress Series* 92, 205-219.
- Corselli, C., Basso, D., De Lange, G.J., Thomson, J., 1996. Mediterranean Ridge Accretionary Complex yields rich surprises. *EOS Transactions, American Geophysical Union* 77, 227-228.
- Damsté, J.S.S., Frewin, N.L., Kenig, F., De Leeuw, J.W., 1995. Molecular indicators for palaeoenvironmental change in a Messinian evaporitic sequence (Vena del Gesso, Italy). I: Variations in extractable organic matter of ten cyclically deposited marl beds. *Organic Geochemistry* 23, 471-483.
- Damsté, J.S.S., Kuypers, M.M.M., Schouten, S., Schute, S., Rullkötter, J., 2003. The lycopane/C<sub>31</sub> *n*-alkane ratio as a proxy to assess paleoacidity during sediment deposition. *Earth and Planetary Science Letters* 209, 215-226.
- De Lange, G.J., Boelrijk, N.A.I.M., Catalano, G., Corselli, C., Klinkhammer, G.P., Middelburg, J.J., Müller, D.W., Ullman, W.J., van Gaans, P., Woittiez, J.R.W., 1990. Sulphate-related equilibria in the hypersaline brines of the Tyro and Bannock Basins, eastern Mediterranean. *Marine Chemistry* 31, 89-112.
- DeLong, E.F., Yayanos, A.A., 1985. Adaptation of membrane lipids of deep-sea bacterium to changes in hydrostatic pressure. *Science* 228, 1101-1103.
- Eder, W., Jahnke, L.L., Schmidt, M., Huber, R., 2001. Microbial diversity of the brine-seawater interface of the Kebrut deep, Red Sea, studied via 16S rRNA gene sequences and cultivation methods. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3077-3085.
- Epstein, S.S., 1997. Microbial food webs in marine sediments. I. Trophic interactions and grazing rates in two tidal flat communities. *Microbial Ecology* 34, 188-198.
- Farrington, J.W., Tripp, B.W., 1977. Hydrocarbons in western north Atlantic surface sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 41, 1627-1641.
- Fang, J., Barcelona, M.J., Nogi, Y., Kato, C., 2000. Biochemical implications and geochemical significance of novel phospholipids of the extremely barophilic bacterial from the Marianas Trench at 11,000 m. *Deep-Sea Research I* 47, 1173-1182.
- Frostegard, A., Bååth, E., 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility of Soils* 22, 59-65.
- Fulco, A.J., 1983. Fatty acid metabolism in bacteria. *Progress in Lipid Research* 22, 133-160.
- Gogou, A., Bouloubassi, I., Stephanou, E.G., 2000. Marine organic geochemistry of the Eastern Mediterranean: 1. Aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in Cretan Sea surficial sediments. *Marine Chemistry* 68, 265-282.
- Gogou, A., Stratigakis, N., Kanakidou, M., Stephanou, E.G., 1996. Organic aerosols in Eastern Mediterranean: components source reconciliation by using molecular markers and atmospheric back trajectories. *Organic Geochemistry* 25, 79-96.

- Grant, W.D., Gemmell, R.T., McGenity T.J., 1998. Halophiles. In: Horikoshi, K., Grant, W.D. (Eds.), *Extremophiles: Microbial Life in Extreme Environments*. Wiley-Liss, New York, N.Y., pp. 93-132.
- Guezennec, J., Fiala-Medioni, A., 1996. Bacterial abundance and diversity in the Barbados Trench determined by phospholipids analyses. *FEMS Microbiology Ecology* 19, 83-93.
- Gurr, M.I., James, A.T., 1980. *Lipid biochemistry and introduction*. Chapman and Hall., London, pp. 387.
- Harvey, H.R., Fallon, R.D., Patton, J.S., 1986. The effect of organic matter and oxygen on the degradation of bacterial membrane lipids in marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 50, 795-804.
- Hedges, J.I., Stern, J.H., 1984. Carbon and nitrogen determinations of carbonate-containing solids. *Limnology and Oceanography* 29, 657-663.
- Hübner, A., 2002. Geochemical and mineralogical investigation of sediments from the anoxic, hypersaline Urania basin (eastern Mediterranean) to characterize marine sedimentation under extreme conditions. Ph.D. Thesis, Fachbereich Geowissenschaften, Freie Universität Berlin.
- Jongsma, D., Fortuin, A.R., Huson, W., Troelstra, S.R., Klaver, G.T., Peters, J.M., van Harten, D., de Lange, G.J., ten Haven, L., 1983. Discovery of an anoxic basin within the Strabo Trench, eastern Mediterranean. *Nature* 305, 795-797.
- Keinänen, M.M., Korhonen, L.K., Martikainen, P.J., Vartiainen, T., Miettinen, I.T., Lehtola, M.J., Nenonen, K., Pajunen, H., Kontro, M.H., 2003. Gas chromatographic-mass spectrometric detection of 2- and 3-hydroxy fatty acids as methyl esters from soil, sediment and biofilm. *Journal of Chromatography B* 783, 443-451.
- Kieft, T.L., Wilch, E., O'Connor, K., Ringelberg, D.B., White, D.C., 1997. Survival and phospholipids fatty acid profiles of surface and subsurface bacteria in natural sediment microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1531-1542.
- Makula, R.A., 1978. Phospholipid composition of methane-utilizing bacteria. *Journal of Bacteriology* 134, 771-777.
- Martz, R.F., Sebacher, D.L., White, D.C., 1983. Biomass measurement of methane-forming bacteria in environmental samples. *Journal of Microbiological Methods* 1, 53-61.
- Medriff Consortium., 1995. Three brine lakes discovered in the seafloor of the eastern Mediterranean. *EOS Transactions, American Geophysical Union* 76, 313-318.
- McCaffrey, M.A., Farrington, J.W., Repeta, D.J., 1991. The organic geochemistry of Peru margin surface sediments: II. Paleoenvironmental implications of hydrocarbon and alcohol profiles. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 55, 483-498.
- Parkes, R.J., Taylor, J., 1983. The relationship between fatty acid distribution and bacterial respiratory types in contemporary marine sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 16, 173-189.
- Petsch, S.T., Edwards, K.J., Eglinton T.I., 2003. Abundance, distribution and  $\delta^{13}\text{C}$  analysis of microbial phospholipid-derived fatty acids in a black shale weathering profile. *Organic Geochemistry* 34, 731-743.
- Polymenakou, P.N., Bertilsson, S., Tselepidis, A., Stephanou, E.G., 2005. Links between geographic location, environmental factors and microbial community composition in sediments of the Eastern Mediterranean Sea. *Microbial Ecology*, in press
- Rajendran, N., Suwa, Y., Urushigawa, Y., 1993. Distribution of phospholipids ester-linked fatty acid biomarkers for bacteria in the sediment of Ise Bay, Japan. *Marine Chemistry* 42, 39-56.
- Ratledge, C., Wilkinson, S.G., 1988. An overview of microbial lipids. In: *Microbial lipids*, Academic Press, London, Vol.I., pp. 3-22.
- Saliot, A., Laureillard, J., Scribe, P., Sicre, M.A., 1991. Evolutionary trends in the lipid biomarker approach for investigating the biogeochemistry of organic matter in the marine environment. *Marine Chemistry* 36, 233-248.

- Sass, A.M., Sass, H., Coolen, M.J.L., Cypionka, H., Overmann, J., 2001. Microbial communities in the chemocline of a hypersaline deep-sea basin (Urania Basin, Mediterranean Sea). *Applied and Environmental Microbiology* 67, 5392-5402.
- Schijf, J., De Baar, H.J.W., Millero, F.J., 1995. Vertical distributions and speciation of dissolved rare earth elements in the anoxic brines of Bannock Basin, eastern Mediterranean Sea. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59, 3285-3299.
- Shokes, R.F., Trabant, P.K., Presley, B., Reid, D.F., 1977. Anoxic, hypersaline basin in the northern Gulf of Mexico. *Nature* 196, 1443-1446.
- Simoneit, B.R.T., 1999. A review of biomarker compounds as source indicators and tracers for air pollution. *Environmental Science and Pollution* 6, 159-169.
- Smoot, J.C., Findlay, R.H., 2001. Spatial and seasonal variation in a reservoir sedimentary microbial community as determined by phospholipids analysis. *Microbial Ecology* 42, 350-358.
- Summit, M., Peacock, A., Ringelberg, D., White, D. C., Baross, J. A., 2000. Phospholipid fatty acid-derived microbial biomass and community dynamics in hot, hydrothermally influenced sediments from middle valley, Juan de Fuca Ridge. In: Zierenberg, R.A., Fouquet, Y., Miller, D.J., Normark, W.R., (Eds.), *Proceedings of the Ocean Drilling Program Scientific Results* 169, 1-19.
- Suzuki, M.T., DeLong, E.F., 2002. Marine prokaryote diversity. In: Staley, J.T., Reysenbach, A.L., (Eds.), *Biodiversity of Microbial Life*. Wiley-Liss, New York, pp. 209-234.
- Van der Wielen, P.W.J.J., Bolhuis, H., Borin, S., Daffonchio, D., Corselli, C., Giuliano, L., D'Auria, G., de Lange, G.J., Huebner, A., Varnavas, S.P., Thomson, J., Tamburini, C., Marty, D., McGenity, T.J., Timmis, K.N., BioDeep Scientific Party., 2005. The enigma of prokaryotic life in deep hypersaline anoxic basins. *Science* 307, 121-123.
- Vengosh, A., De Lange, G.J., Starinsky, A., 1998. Boron isotope and geochemical evidence for the origin of Urania and Bannock brines at the eastern Mediterranean: Effect of water-rock interactions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 62, 3221-3228.
- Vengosh, A., Starinsky, A., Anati D.A., 1994. The origin of Mediterranean interstitial waters-relics of ancient Miocene brines: a re-evaluation. *Earth and Planetary Science Letters* 121, 613-627.
- Wallmann, K., Aghib, F.S., Castradori, D., Cita, M.B., Suess, E., Greinert, J., Rickert, D., 2002. Sedimentation and formation of secondary minerals in the hypersaline Discovery Basin, eastern Mediterranean. *Marine Geology* 186, 9-28.
- White, D.C., Davis, W.M., Nickels, J.S., King, J.D., Bobbie, R.J., 1979. Determination of sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia* 40, 51-62.
- White, D.C., Fredrickson, H.F., Gehron, M.H., Smith, G.A., Martz, R.F., 1983. The groundwater aquifer microbiota: biomass, community structure, and nutritional status. *Developmental and Industrial Microbiology* 24, 189-199.
- White, D.C., Phelps, T.J., Onstott, T.C., 1998. What's up down there? *Current Opinion in Microbiology* 1, 286-290.
- White, D.C., Stair, J.O., Ringelberg, D.B., 1996. Quantitative comparisons of in situ microbial diversity by signature biomarker analysis. *Journal of Industrial Microbiology* 17, 185-196.
- Wieringa, E.B.A., Overmann, J., Cypionka, H., 2000. Detection of abundant sulfate-reducing bacteria in marine oxic sediment layers by a combined cultivation and molecular approach. *Environmental Microbiology* 2, 417-427.
- Zelles, L., 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils* 29, 111-129.



**ΕΡΓΑΣΙΑ ΥΠΟ  
ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ V**





# Manuscript ΕΡΓΑΣΙΑ ΥΠΟ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

## The effect of ‘black carbon’ on natural microbial communities in polluted and pristine sediments of the Eastern Mediterranean Sea: Implications on C pool bioavailability

PARASKEVI N. POLYMENAKOU <sup>1,2</sup>, ANASTASIOS TSELEPIDES <sup>1</sup>, EURIPIDES G. STEPHANOU <sup>2</sup>, STEFAN BERTILSSON <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Hellenic Center for Marine Research, Gournes Pediadou, GR 71003, Heraklion, Greece

<sup>2</sup> Environmental Chemical Processes Laboratory, Department of Chemistry, University of Crete, GR 71409, Heraklion, Greece

<sup>3</sup> Department of Limnology, Evolutionary Biology Center, Norbyv. 20, SE-752 36 Uppsala University, Uppsala, Sweden

### Abstract

Sediment samples collected from polluted and pristine regions of the Eastern Mediterranean Sea (Thracian Sea, Augusta Bay, South Ionian Sea), were subjected to ‘black carbon’, aliphatic hydrocarbon and phospholipid ester-linked fatty acid (PLFA) analysis in order to evaluate the effects of the refractory organic material and the different contamination levels on microbial community composition. Black carbon was found to constitute a significant part of the sedimentary carbon pool in the analyzed sediments. Principal component analysis of the chemical data set revealed a clustering of samples depending on the concentrations of the various parameters. This observation suggests the occurrence of a different trophic state between the sampling stations following a gradient from the most productive and contaminated region of Augusta Bay to the carbon-poor and pristine sediments of the Thracian Sea. PLFA analysis revealed that the various microbial groups (e.g. gram-positive, gram-negative, microeukaryotes) were most abundant in Augusta Bay and in the most impacted station of the Thracian Sea. Moreover, the relative increase in branched and odd fatty acids recorded in these stations is probably associated to the elevated amounts of hydrocarbons indicating that microbial communities have developed the ability to degrade either naturally occurring aliphatic hydrocarbons or hydrocarbons derived from oil contamination. The highest rank correlation with PLFA data ( $R = 0.772$ ) was obtained with two variables, bioavailable organic carbon and chlorophyll contents whereas total organic carbon appeared to be important only in the organic-poor sediments. These results demonstrate that the proportion of refractory organic carbon in sediments of the Eastern Mediterranean Sea has important implications, by affecting the bioavailability of the sedimentary C pool, on benthic microbial community structure.

### 1. Introduction

The input of various fractions of organic matter in surface sediment layers depends mainly on the supply from different sources as well as on microbial degradation during diagenesis both in the water column and in surface sediments (Teece et al., 1998). Black carbon has recently received great attention as a form of refractory organic matter that may preferentially be preserved in sediments (Dickens et al., 2004; Gélinas et al., 2001; Middelburg et al., 1999). Black carbon (BC) is produced by incomplete combustion of a variety of fossil fuel and biomass material (Elmqvist et al., 2004; Middelburg et al., 1999). It is mainly formed on land and carried by rivers or via aerosol transport to the ocean (Dickens et al., 2004; Masiello et al., 1998). Several tracers, such as aliphatic hydrocarbons, have been evaluated in order to ascertain the balance between terrestrial, marine or anthropogenic organic carbon inputs to the ocean. These compounds derive from a variety of allochthonous sources, notably higher plants, and autochthonous sources, including plankton and bacteria (Wakeham, 1996). Aliphatic hydrocarbons are also major components of petroleum products, producing a distribution of *n*-alkanes in which odd and even carbon chain lengths are roughly

equal in abundance and often an unresolved complex mixture (UCM) (Simoneit, 1999; Wakeham, 1996). Moreover, their analysis is often necessary in determining the historic sources of the contamination within an environment. However, these chemical data alone provide limited evidence of any biological damage that may be occurring due to contamination (Fang and Findlay, 1996). It is therefore necessary to combine chemical and biological measurements in order to identify the impact of pollution (Kieft et al., 1997; White et al., 1983; White, 1994).

Natural microbial communities are generally highly diverse and are involved in a variety of biogeochemical processes (Boschker et al., 1998). Bacteria may be the first component of the natural habitat that can be affected by altered environmental conditions (Evans, 1977; Fang and Findlay, 1996). A main ecological role of bacteria lies in the utilization of different fractions of organic matter (Boschker et al., 1998; Boschker et al., 2001). The last decade a number of culture-independent techniques have been developed, offering insights into the composition of uncultivated microbial communities (Head et al., 1998; Macnaughton et al., 1999). Among them, fatty acid profiling is widely used to describe microbial strains or communities or to differentiate among environmental samples by their fatty acid “fingerprint”. Phospholipid derived fatty acid (PLFA) analysis is particularly useful to study the living bacterial biomass, because they are rapidly turned over (decay within 2–4 days after the death of the cell) (White et al., 1979), and thus represent the current living community, both qualitatively and quantitatively (Carpenter-Boggs et al., 1998; Langezaal et al., 2003; Petersen et al., 1991; Vestal & White, 1989). Besides, other main groups such as plants, algae, diatoms and higher animals synthesize different kinds of phospholipids (Gurr & James, 1980; Langezaal et al., 2003; Parkes & Taylor, 1983).

In spite of this, information directly linked to microbial community composition in association to a variety of environmental parameters (e.g. ‘black carbon’, oil contamination) from sediments of the Eastern Mediterranean Sea is limited and therefore urgently needed (Polymenakou et al., 2005a). The Eastern Mediterranean Sea is among the most oligotrophic regions on Earth (Ignatiades, 1969; Krom et al., 1991; Tselepides et al., 2000) and includes areas differentially impacted by anthropogenic activities (Polymenakou et al., 2005a). In order to provide new insights into the influence of the most refractory organic material on microbial community composition, polluted and pristine sites of the Eastern Mediterranean Sea have been chosen for the analysis of black carbon, aliphatic hydrocarbons and phospholipids-linked fatty acids. The main goals of the present study were to evaluate the anthropogenic and biogenic inputs into the Eastern Mediterranean Sea and to determine the major environmental features, including the most refractory organic material, controlling benthic microbial community composition.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Samples collection and sediment characteristics

Sediment samples were collected from 3 different regions of the Eastern Mediterranean Sea (Fig. 1). A detailed description of the sediment samples collected from the South Ionian Sea has been presented elsewhere (Polymenakou et al., 2005b). Sediment samples (0-1 and 8-10 cm) from the Thracian Sea and Augusta Bay have been collected using a Bowers and Connelly Multiple-corer (8 cores, i.d. 9.0 cm) (Barnett et al., 1984) in September 2003 and November 2003, respectively. All sampling was carried out onboard the R/V’s *Aegaeo* and *Urania*. Subsamples for analysis of the different chemical parameters were sealed in aluminum foil and stored at -20°C until further analysis took place. Chlorophyll *a* (Chl-*a*) and phaeopigment (Phaeop.) concentrations were determined according to the fluorometric method of Yentsch and Menzel (1963) and Lorenzen and Jeffrey (1980) using a Turner TD-700 fluorometer. Chloroplastic pigment equivalents (CPE) are considered as the sum of chlorophyll *a* and phaeopigments. Total organic carbon measurements were carried out according to the method of Hedges and Stern (1984), using a Perkin Elmer CHN 2400 analyser. ‘Black carbon’ was estimated using the method described by Gustafsson et al. (1997) where samples were oxidized at 375°C for 24 h in the presence of excess oxygen (air) and further analyzed in the Perkin Elmer 2400 CHN analyzer. Bioavailable organic carbon

(BOC) was estimated by subtracting the amount of 'black carbon' from the total organic carbon content. All solvents used were purchased from Merck (Suprasolv, Darmstadt, Germany). Silica gel 60 (0.063-200mm) was also from Merck. Alkane standards were purchased from PolyScience (Analytical Standards, Merrimac Avenue, Niles, Illinois). Identification of fatty acids was based on comparison of retention times to purchased standards (FAME Mix, Supelco).

### 2.2 Aliphatic hydrocarbons and phospholipids analyses

1 g of preweight freeze-dried sediment material was Soxhlet extracted in *n*-hexane:dichloromethane (1:1 v/v) and 1-chlorohexadecane was added prior to extraction as an internal standard. The solvent was then evaporated to 1 ml and applied on the top of a glass column (0.5 cm i.d.) containing 1.5 g of silica gel, activated at 150°C for 3 h. The fraction of aliphatic hydrocarbons was eluted using 15 ml *n*-hexane in gravity flow. Sulfur content was removed by treating the extract with activated copper.

Samples were processed following published procedures for lipid extraction and phospholipids linked fatty acids (PLFA) recovery (Polymenakou et al., 2005a). Total lipids were extracted from pre-weighed freeze dried sediment material using a modified Bligh and Dyer (1959) method. 3 g of sediment were ultrasonically extracted for 5 min with a mixture of chloroform/methanol/phosphate buffer (2:1:0.8 v/v). The mixtures were extracted in the dark at 4°C. After partitioning of the solution into organic and aqueous phases with 7.5 ml chloroform and 7.5 ml deionized water, the organic phase was collected and evaporated to near dryness.

Microbial community structure was determined by fatty acid methyl esters from phospholipids. Total lipid was fractionated into neutral, glycol-, and polar lipids using glass columns (0.5 cm i.d.), packed with 1.0 g silica gel. All polar lipids (fractions containing phospholipids) were evaporated to dryness under the gentle stream of N<sub>2</sub> and were dissolved in 0.5 ml 1:1 (v/v) toluene-methanol solution and transmethylated under mild alkaline methanolysis (0.2 N methanolic potassium hydroxide). 0.5 ml 0.2 N glacial acetic acid was added followed immediately by phase partitioning with 2 ml chloroform and 2 ml deionized water. The organic phase was removed and evaporated to dryness.

### 2.3 Analysis in GC/MS

Gas chromatography equipped with a Mass Spectrometer was used to qualify and quantify aliphatic hydrocarbons fraction and the fatty acid methyl esters (FAME) of the polar fraction. A Hewlett Packard Model 6890 GC equipped with a split-splitless injector was directly coupled with the fused silica capillary column (HP-5 MS with 0.25 µm film thickness, 30 m×0.25 mm I.D.) to the ion source. Helium was used as a carrier gas. The chromatographic conditions were the following (temperature program for *n*-alkanes): injector temperature 270°C; temperature program, 70°C (1 min), 70-150°C (10°C/min), 150-290°C (5°C/min), and 290°C (30 min). Temperature program for FAME analysis: injector temperature 270°C; temperature program, 70°C (1 min), 70-140°C (10°C/min), 140-240°C (4°C/min), and 240°C (30 min). In both methods 1 µl of each sample was injected in the splitless mode. Identification of *n*-alkanes was based on comparison of retention times to purchased standards of Polyscience and of fatty acids to purchased standards of Supelco (FAME Mix, Supelco). Quantification of *n*-alkanes and PLFA were carried out using the internal standards 1-chlorohexadecane and nonadecanoic acid methyl ester, respectively.

### 2.4 Fatty acid nomenclature

The classical fatty acid terminology is used: total number of carbon atoms:number of double bonds, followed by the position (ω) of the double bond from the methyl end of the molecule. All results are presented as mean ± standard deviation. Bacterial biomass was estimated by the sum of the following PLFAs: C14:0, 14-MeC14:0, 12-MeC14:0, C15:0, 12-MeC15:0, 14-MeC15:0, *cis*-C16:1ω7, *cis*-C16:1ω9, *trans*-C16:1ω7, *trans*-C16:1ω9, C16:0, 13-MeC16:0, 15-MeC16:0, 14-MeC16:0, C17:1, C17:0, *cis*-18:1ω7, *cis*-18:1ω9, *trans*-18:1ω9, C18:0 and C20:1.

### 2.5 Estimation of bacterial biomass

The following conversion factors as described elsewhere (Guezennec and Fiala-Medioni, 1996; Virtue et al., 1996) were used to calculate the microbial biomass in sediments. Assuming that the average bacterium, the size of *Escherichia coli*, contains 100  $\mu\text{mol}$  PLFA/g (dry weight), and 1 g of bacteria is equivalent to  $5.9 \times 10^{12}$  cells (dry weight), it provides  $1.7 \times 10^{-17}$  mol of PLFA per bacterial cell. The average molecular weights of phospholipid fatty acids were 270 amu. Use of this quantitative approach for the determination of microbial biomass, has been verified by studies comparing this method with direct bacterial counts (Balkwill et al., 1988; Virtue et al., 1996).

### 2.6 Statistical analysis

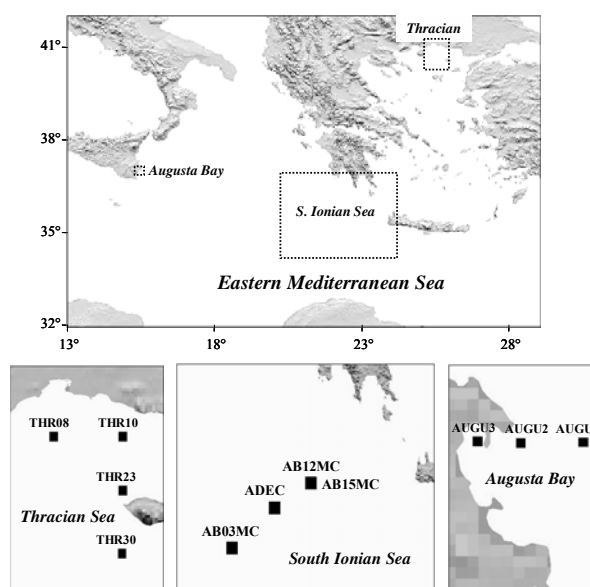
In order to detect differences in chemical characteristics (organic carbon content, black carbon, bioavailable organic carbon, chlorophyll *a*, phaeopigments, CPE, aliphatic hydrocarbons) between the sediment samples, principal component analysis (PCA) was applied to the data set. Prior to analysis the raw data was transformed and extracted into a correlation matrix. The correlation matrix was evaluated and eigenvalues were developed and determined. Analysis was performed with various rotations of the data in order to test the differences of the factor 1 (Blume et al., 2002; Kleikemper et al., 2002). PCA was performed using the PRIMER 5.2.2 software package (Plymouth Routines In Multivariate Ecological Research). Pair wise comparison of PLFA composition between the environmental samples was used to generate a similarity matrix. Subsequently hierarchical cluster analysis was performed using the PRIMER 5.2.2 software. BIOENV analysis, included in the PRIMER software (Clarke and Ainsworth, 1993) was also conducted in order to ascertain the relation between measured environmental variables and microbial community structure.

## 3. Results and Discussion

Polymenakou et al. (2005b) have previously given data on organic carbon content, acyclic hydrocarbons and phospholipids from the South Ionian Sea stations. Station AB03MC is located near the anoxic Bannock basin whereas stations AB12MC and AB15MC are located close to the Urania basin. In contrast, station ADEC is a characteristic offshore site (Polymenakou et al., 2005b). In this paper data from additional stations are presented and discussed in more detail since they represent a completely new data set.

### 3.1 Sediment characteristics

Water column depth ranged from 52.1 m in the Thracian Sea to 3320 m in the South Ionian Sea. The organic carbon content varied between  $0.25 \pm 0.08\%$  at the deep sediment layer (8-10 cm) of the Thracian Sea and  $1.73 \pm 0.06\%$  at station AUGU2 of Augusta Bay (Table 1) and was comparable to values found in other areas of the Eastern ( $0.38 - 1.47\%$ ; Polymenakou et al., 2005a;  $0.23 - 0.99\%$ ; Bianchi et al., 2003) as well as the Western Mediterranean Sea ( $0.38 - 1.47\%$ ; Bouloubassi et al., 1997). On the other hand, 'black carbon' contents ranged from  $0.01 - 0.63\%$  C (Table 1) and were found to correlate very well to total organic carbon contents ( $R^2 = 0.69$ ;  $n = 15$ ). Black carbon (BC) contributed approximately 2.38 to 65.68 % of



**Figure 1.** Map of the Eastern Mediterranean Sea showing the sampling stations in Thracian Sea, South Ionian Sea and Augusta Bay.

the total organic carbon (Table 1), indicating strongly that BC constitutes a significant portion of the sedimentary carbon pool in the Eastern Mediterranean. On the other hand, we did not observe any tendency for deep-sea samples to contain proportionally more black carbon as was found in a previous study (Middelburg et al., 1999). Generally, in the marine environment ‘black carbon’ is considered to be chemically and biologically inert although microbiological breakdown during laboratory experiments has been reported (Middelburg et al., 1999). Previous studies have also shown that the distribution of black carbon in surface sediments may significantly affect the speciation and bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons (Gustafsson et al., 1997). Although Middelburg et al. (1999) reported the first evidence that black carbon can be degraded in sediments in excess of oxygen and nitrate, several studies suggested that BC is the refractory and oxidation-resistant organic C form in the environment (Dickens et al., 2004; Schulze et al., 2000) and does not commonly serve as a C and energy source for microorganisms (Albrecht et al., 1995). In addition, Dickens et al. (2004) suggested that the recycling of black carbon in sediments may be locked away from the biologically mediated carbon cycle for many geologic cycles most likely as the result of the slow rates of formation and destruction. Thus, in the present study, we considered the black carbon content as the most refractory form of organic carbon and estimated the bioavailable organic carbon (BOC) by removing the amount of black carbon from the total organic carbon concentration. BOC contents in the sediments samples varied between 0.11 and 1.13 % C with the maximum recorded value occurring at station AUGU2 of Augusta Bay (Table 1). Chlorophyll *a* and phaeopigment concentrations varied significantly between the sampling stations with the maximum recorded values at the shallow stations of Augusta Bay (1.11 – 1.72  $\mu\text{g g}^{-1}$  and 4.78 – 6.62  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectively; Table 1) and at station THR30 (0-1) of the Thracian Sea (2.30 and 2.87  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectively; Table 1). The latter station was strongly influenced by the relatively less saline and rich in nutrients Black Sea water masses flowing into the North Aegean Sea through the Dardanelles Strait (Poulos et al., 1997). As a result, high amount of chloroplastic pigments (e.g. chlorophyll *a*, phaeopigments; Table 1) tend to accumulate in the specific region.

**Table 1.** Water column depth (m), total organic carbon (TOC), black carbon (BC), proportion of BC to TOC (BC/OC), bioavailable organic carbon (BOC), chlorophyll *a* (Chl-*a*), phaeopigments (Phaeop.), and chloroplastic pigment equivalents (CPE) of the sediment samples are presented. Sd indicate standard deviation among replicate samples ( $n=3$ ).

Station	Sediment depth (cm)	Area	Water column depth (m)	TOC (%)		BC (%)		BC / OC (%)	BOC (%)	Chl- <i>a</i> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )		Phaeop. ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )		CPE ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	
				mean	sd	mean	sd			mean	sd	mean	sd	mean	sd
ADEC	0-1	South Ionian	2840	1.30	0.69	0.21	0.03	16.05	1.09	0.06	0.00	0.35	0.06	0.40	0.06
AB03MC	0-1	South Ionian	3179	0.58	0.03	0.28	0.04	48.91	0.30	0.03	0.01	0.12	0.02	0.15	0.03
AB12MC	0-1	South Ionian	3310	0.76	0.09	0.35	0.08	45.69	0.41	0.05	0.02	0.30	0.04	0.35	0.06
AB15MC	0-1	South Ionian	3320	0.67	0.09	0.33	0.07	50.10	0.33	0.04	0.00	0.27	0.01	0.30	0.01
AUGU1	0-1	Augusta Bay	1700	0.55	0.02	0.27	0.02	48.26	0.29	0.48	0.07	2.95	0.05	3.43	0.02
AUGU2	0-1	Augusta Bay	600	1.73	0.06	0.60	0.10	34.73	1.13	1.72	0.41	6.62	0.47	8.34	0.05
AUGU3	0-1	Augusta Bay	100	1.37	0.07	0.63	0.10	46.13	0.74	1.11	0.00	4.78	0.18	5.90	0.17
THR08	0-1	Thracian Sea	52.1	0.38	0.09	0.08	0.00	20.91	0.30	0.05	0.00	1.01	0.11	1.06	0.10
THR08	8-10	Thracian Sea	52.1	0.55	0.08	0.13	0.01	22.69	0.43	0.02	0.00	0.43	0.12	0.45	0.12
THR10	0-1	Thracian Sea	62.5	0.34	0.09	0.01	0.00	2.38	0.33	0.70	0.18	2.01	0.21	2.70	0.39
THR10	8-10	Thracian Sea	62.5	0.25	0.08	0.01	0.00	4.31	0.24	0.03	0.00	0.69	0.01	0.72	0.02
THR23	0-1	Thracian Sea	81	0.42	0.06	0.05	0.05	12.97	0.36	0.66	0.26	2.12	0.05	2.78	0.21
THR23	8-10	Thracian Sea	81	0.36	0.04	0.08	0.01	24.04	0.25	0.04	0.00	0.51	0.22	0.54	0.22
THR30	0-1	Thracian Sea	223	0.45	0.12	0.15	0.00	34.31	0.29	2.30	0.15	2.87	0.21	5.17	0.06
THR30	8-10	Thracian Sea	223	0.33	0.03	0.22	0.01	65.68	0.11	0.08	0.03	0.37	0.11	0.46	0.14

### 3.2 Anthropogenic and biogenic inputs

Roughly half of the organic matter inputs to the Mediterranean Sea are industrial in origin. The remaining half derives from human sewage and agricultural sources. Approximately 60 to 65 % of organics entering the Mediterranean come from runoff and discharge, and the rest is transported by rivers (Caddy, 1993). All inputs eventually reach the ocean sea floor and influence benthic communities. In the present study, aliphatic hydrocarbon distributions were examined in order to evaluate the anthropogenic, terrigenous and marine organic carbon inputs in different areas of the Eastern Mediterranean Sea (Fig. 1).

**Table 2.** Characteristic parameters of aliphatic hydrocarbons estimated in the sediment samples.

AHC: aliphatic hydrocarbon total concentration; OC: organic carbon; NA: *n*-alkane concentration; UCM: unresolved complex mixture; Pr: pristane; Ph: phytane;  $\Sigma(C_{14}-C_{20})$ : sum of concentrations of NA from C<sub>14</sub> to C<sub>20</sub>;  $\Sigma(C_{21}-C_{36})$ : sum of concentrations of NA from C<sub>21</sub> to C<sub>36</sub>; Mar: sum of concentrations of marine NA C<sub>15</sub>, C<sub>17</sub> and C<sub>19</sub>; Ter: sum of concentrations of terrestrial NA C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub> and C<sub>31</sub>; CPI(C<sub>21</sub>-C<sub>36</sub>): carbon preference index estimated for NA from C<sub>21</sub> to C<sub>36</sub>.

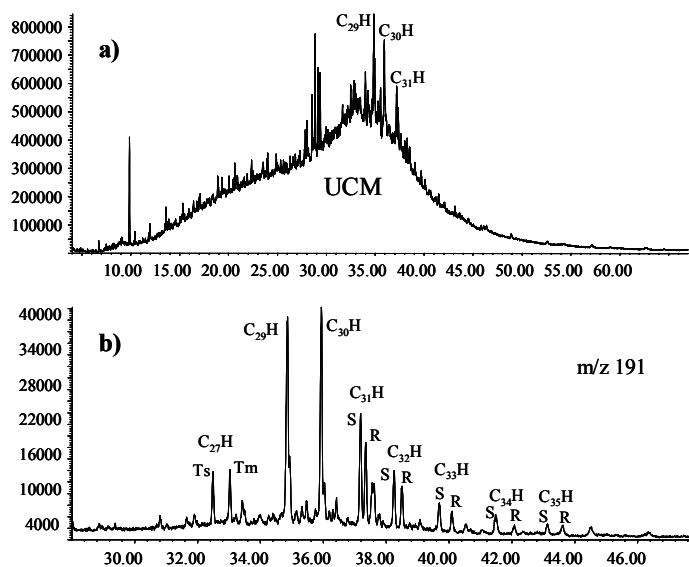
Sampling sites sediment depth (cm)	ADEC	AB03MC	AB12MC	AB15MC	AUGU1	AUGU2	AUGU3	THR08		THR10		THR23		THR30	
	0-1	0-1	0-1	0-1	0-1	0-1	0-1	0-1	8-10	0-1	8-10	0-1	8-10	0-1	8-10
<i>Parameters</i>															
AHC ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	5.1	22.8	54.5	114.1	3.4	462.8	163.3	14.4	8.4	6.9	7.4	1.9	9.8	13.8	1.2
AHC/OC ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	394.2	3939.7	7167.0	17131.4	610.7	26698.4	11911.8	3829.1	1530.4	2041.0	2955.3	445.9	3030.5	3098.0	370.8
NA ( $\text{ng g}^{-1}$ )	2318.0	4975.0	5445.3	5675.3	1829.8	5127.9	4941.2	1899.4	2444.7	1750.9	532.7	1775.8	2293.0	1839.3	812.5
NA/OC ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	178.7	860.0	715.5	852.1	330.6	295.8	360.5	503.4	443.6	515.3	212.9	424.2	705.5	411.4	246.5
UCM ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	2.6	17.8	48.0	103.3	1.3	447.4	155.8	12.4	6.0	5.2	6.9	0.1	7.4	11.9	0.4
UCM/OC ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	200.0	3079.7	6311.7	15513.0	241.0	25809.7	11371.0	3294.1	1086.8	1525.7	2742.4	21.6	2291.1	2661.3	124.3
UCM/NA	1.1	3.6	8.8	18.2	0.7	87.3	31.5	6.5	2.4	3.0	12.9	0.1	3.2	6.5	0.5
Hopanes ( $\text{ng g}^{-1}$ )	199.7	-	1064.0	5103.6	216.2	10277.6	2470.7	119.1	-	-	-	-	110.3	113.0	-
Pr ( $\text{ng g}^{-1}$ )	31.5	102.9	142.0	92.1	86.4	84.0	122.3	93.6	18.1	102.6	59.3	54.4	119.1	39.1	30.2
Ph ( $\text{ng g}^{-1}$ )	14.6	53.7	144.0	100.1	57.0	75.2	108.7	75.8	8.7	43.4	39.1	44.9	41.7	31.8	17.5
$\Sigma(C_{14}-C_{20})$ ( $\text{ng g}^{-1}$ )	194.6	719.5	1156.8	702.9	333.3	720.7	1017.3	496.2	632.8	635.6	143.0	523.3	511.9	353.1	217.1
$\Sigma(C_{21}-C_{36})$ ( $\text{ng g}^{-1}$ )	2123.4	4255.4	4288.5	4972.4	1496.6	4407.2	3923.9	1403.2	1811.9	1115.3	389.6	1252.4	1781.1	1486.3	595.4
Mar ( $\text{ng g}^{-1}$ )	55.8	279.7	523.3	333.8	128.7	342.8	494.9	156.6	220.1	268.4	61.7	222.2	206.3	118.2	87.5
Ter ( $\text{ng g}^{-1}$ )	578.7	1655.4	1415.4	1438.4	572.3	1767.0	1171.0	442.2	704.1	386.0	145.5	473.6	600.8	425.9	226.4
CPI(C <sub>21</sub> - C <sub>36</sub> )	1.4	2.2	1.9	1.9	1.6	1.4	1.9	1.6	1.8	1.8	1.5	1.7	1.5	1.5	1.8
C <sub>29</sub> /C <sub>31</sub>	0.8	0.9	0.9	0.8	1.1	1.1	0.8	1.0	0.9	1.0	1.2	1.2	1.4	1.3	1.1
% Mar to NA	2.4	5.6	9.6	5.9	7.0	6.7	10.0	8.2	9.0	15.3	11.6	12.5	9.0	6.4	10.8
% Ter to NA	25.0	33.3	26.0	25.3	31.3	34.5	23.7	23.3	28.8	22.0	27.3	26.7	26.2	23.2	27.9

The concentrations of different classes of hydrocarbons and bulk parameters at each sampling site are summarized in Table 2. Besides the absolute concentrations ( $\mu\text{g g}^{-1}$  of dry sediment) of the various aliphatic hydrocarbons we also estimated, as described by Gogou et al. (2000), the organic carbon normalized concentrations ( $\mu\text{g g}^{-1}$  of organic carbon). Most chromatograms of the aliphatic fractions were dominated by resolved *n*-alkanes and an unresolved complex mixture (UCM) (Table 2) whereas the aliphatic fraction of station AUGU2 was dominated by UCM and hopanes (Tables 2, 3; Fig. 2a).

Absolute (AHC) and organic carbon normalized concentrations (AHC/OC) of aliphatic hydrocarbons showed large variation between the sampling sites ranging from 1.2 to 462.8  $\mu\text{g g}^{-1}$  and from 370.8 to 26698.4  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectively (Table 2). Generally, total hydrocarbon concentrations exceeding 500  $\mu\text{g g}^{-1}$  are indicative of significant pollution, whereas values below 10  $\mu\text{g g}^{-1}$  are considered unpolluted sediments (Tolosa et al., 2004; Volkman et al., 1992). Maximum values were recorded within the Augusta Bay stations indicating that strong anthropogenic influences dominated the region. These values were comparable to locations

reported to be chronically contaminated by oil, e.g. 60 – 646  $\mu\text{g g}^{-1}$  in Hong Kong (Hong et al., 1995) and 29 – 1820  $\mu\text{g g}^{-1}$  in the Caspian Sea (Tolosa et al., 2004). In contrast, aliphatic hydrocarbons in the Thracian Sea as well in the offshore station of Augusta Bay and the characteristic offshore site of the South Ionian Sea exhibited concentration levels typical of non-polluted regions. Absolute (NA) and organic carbon-normalized concentrations (NA/OC) of *n*-alkanes (in carbon chain length between  $\text{C}_{14}$  and  $\text{C}_{40}$ ) ranged from 532.7 – 5127.9  $\text{ng g}^{-1}$  dry weight and 178.7 – 860.0  $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight, respectively (Table 2). Minimum values of NA were recorded in the deeper sediment layers of the Thracian Sea (e.g. 532.7  $\text{ng g}^{-1}$ ; Table 2) whereas the characteristic offshore site of the South Ionian Sea attained the minimum value of NA/OC (178.7  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; Table 2). For comparison, background concentrations of NA from the Antarctic islands of South Orkney were about 0.4  $\mu\text{g g}^{-1}$  (Cripps, 1994) whereas the sediments of the deep basin of the NW Mediterranean Sea reached NA concentration of up to 1.1  $\mu\text{g g}^{-1}$  (Tolosa et al., 1996). On the other hand, the other South Ionian Sea stations were located near to the hypersaline anoxic basins of Bannock and Urania exhibiting maximum amounts of organic carbon normalized concentrations of NA.

*n*-Alkanes displayed a wide distribution ranging from *n*- $\text{C}_{14}$  to *n*- $\text{C}_{39}$ . Short chain homologues ( $\sum(\text{C}_{14}\text{-C}_{20})$ ; Table 2) mainly derived from phytoplanktonic sources (Gogou et al., 2000) as well as long-chain homologues ( $\sum(\text{C}_{21}\text{-C}_{36})$ ; Table 2) characteristic of terrestrial higher plant waxes (Gogou et al., 2000) were mostly prominent at the shallow station of Augusta Bay and at the deep stations close to the brine area of the South Ionian Sea (Table 2). The high concentration of *n*-alkanes of low carbon chain length ( $\text{C}_{14}$  to  $\text{C}_{20}$ ) in these stations could also indicate a fresh input of light oil (Tolosa et al., 2004). The predominance of long chain homologues compared to short chain compounds was evident at all stations ( $\sum(\text{C}_{14}\text{-C}_{20})$  and  $\sum(\text{C}_{21}\text{-C}_{36})$ ; Table 2) and was described by the Carbon Preference Index (CPI). CPI



**Figure 2.** a) Representative gas chromatographic pattern of aliphatic hydrocarbons in the highly polluted station AUGU2 of Augusta Bay. UCM, unresolved complex mixture. b) Example of ion chromatogram ( $m/z$  191) of hopanes determined in station AUGU2. Names of hopane abbreviations are presented in Table 3.

values corresponding to petroleum contamination or input of degraded planktonic material are around 1, whereas odd to even predominance (CPI>1) suggests inputs of plant wax *n*-alkanes (Gogou et al., 2000; Simoneit, 1999). In the present study, CPI values were estimated following the equation  $CPI = \sum(C_{21}-C_{35}) / \sum(C_{22}-C_{36})$  (Simoneit, 1999). CPI values ranging from 1.4 to 2.2 (Table 2) where similar for all stations, indicating a degraded land-derived organic matter contribution to marine sediments (Gogou et al., 2000). However, a high marine contribution is generally indicated by low CPI values although the absolute terrestrial contribution may remain the same (Damsté et al., 1995). Thus, in order to ascertain the balance between terrestrial and marine organic carbon inputs we estimated the terrestrial contribution in the sediments by summing the three most abundant terrestrial NA, C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub> and C<sub>31</sub> (Ter: Table 2). In our case, the resulting Ter plot shows marked differences with the CPI plot (Fig. 3). For example, the terrestrial component of station AUGU1 is overemphasized by the CPI plot, most likely as the result of the concurrent decrease of even and odd NA in this range. The estimated terrestrial component varies largely between the sampling stations with values ranging from 145.5 to 1767.0 ng g<sup>-1</sup> (Table 2). The results showed that the higher terrestrial contribution occurred in the shallow stations of Augusta bay and the three stations located near the anoxic brine area (Fig. 3). In contrast, the terrestrial components were lower at the shallow stations of the Thracian Sea. The homologues of marine origin (Mar: the sum of concentrations of C<sub>15</sub>, C<sub>17</sub>, and C<sub>19</sub>, Table 2) were also lower in this area exhibiting values between 61.7 and 268.4 ng g<sup>-1</sup> and representing a minor fraction of the total NA (6.4 – 15.3%; Table 2). These results indicated the low productivity of the Thracian Sea and the high degradability of these compounds (Table 2).

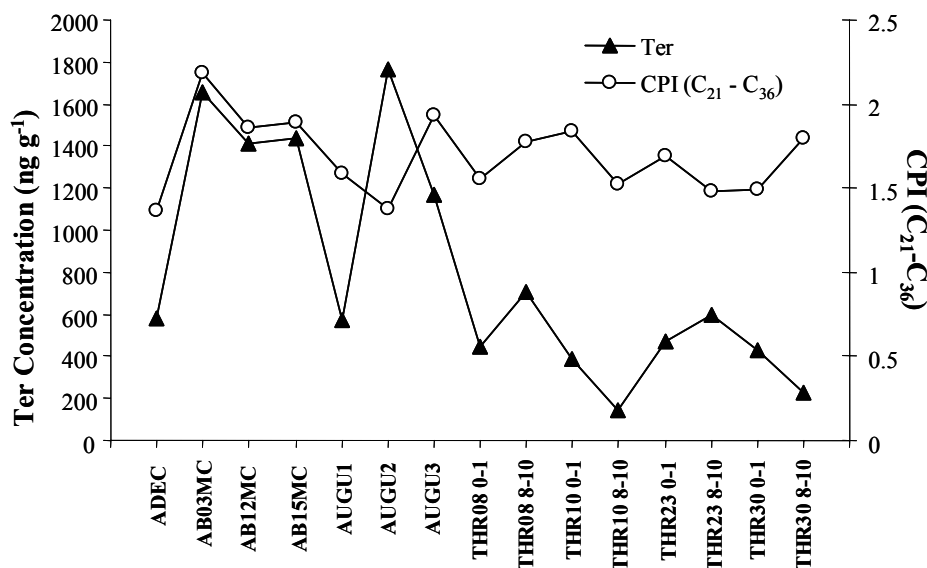
**Table 3.** Concentration of hopanes (ng g<sup>-1</sup>) determined in the sediment samples. Hopane levels of the stations are not presented here were below the detection limit.

Sampling sites sediment depth (cm)	Name	ADEC	AB12MC	AB15MC	AUGU1	AUGU2	AUGU3	THR08	THR23	THR30
		0-1	0-1	0-1	0-1	0-1	0-1	0-1	8-10	0-1
Hopanes (ng g <sup>-1</sup> )	Name									
C <sub>27</sub> H Ts	18α (H)-22,29,30-trisnorhopane	-	-	-	-	410.9	103.0	-	-	-
C <sub>27</sub> H Tm	17α (H)-22,29,30-trisnorhopane	-	-	217.7	-	423.4	106.5	-	16.8	-
C <sub>29</sub> H	17α (H),21β(H)-29-norhopane	32.2	208.9	634.9	64.7	2726.6	531.7	33.3	24.7	26.5
C <sub>30</sub> H	17α (H),21β(H)-hopane	37.4	226.7	840.8	84.8	2535.2	537.3	50.5	43.4	33.2
C <sub>31</sub> H S	17α (H),21β(H)-homohopane	26.6	194.9	659.5	31.3	1165.7	291.4	18.0	14.1	18.9
C <sub>31</sub> H R	17α (H),21β(H)-homohopane	18.2	105.6	441.0	20.8	783.4	211.6	17.3	11.2	13.4
C <sub>32</sub> H S	17α (H),21β(H)-bishomohopane	19.3	160.3	482.3	14.6	625.2	174.1	-	-	12.9
C <sub>32</sub> H R	17α (H),21β(H)-bishomohopane	11.7	80.1	330.7	-	438.9	130.1	-	-	8.0
C <sub>33</sub> H S	17α (H),21β(H)-trishomohopane	13.7	87.4	401.7	-	367.4	98.6	-	-	-
C <sub>33</sub> H R	17α (H),21β(H)-trishomohopane	11.6	-	202.3	-	192.8	63.7	-	-	-
C <sub>34</sub> H S	17α (H),21β(H)-tetrakishomohopane	7.8	-	320.8	-	267.9	96.7	-	-	-
C <sub>34</sub> H R	17α (H),21β(H)-tetrakishomohopane	6.2	-	133.5	-	99.7	36.5	-	-	-
C <sub>35</sub> H S	17α (H),21β(H)-pentakishomohopane	9.1	-	240.9	-	126.7	43.7	-	-	-
C <sub>35</sub> H R	17α (H),21β(H)-pentakishomohopane	5.8	-	197.3	-	113.7	45.7	-	-	-

UCM was the major component of the aliphatic hydrocarbon fraction in most of the stations (Table 2). A latter study has shown that UCM comprises a mixture of branched alkanes, cycloalkanes, monoaromatics, naphthalenes and multi-ring polyaromatic hydrocarbons (Fryzinger et al., 2003) whereas it is very well linked to degraded or weathered petroleum residues (Tolosa et al., 2004). However, UCM distributions in the lower molecular weight range may be associated with bacterial degradation processes of natural organic matter such as algal detritus (Tolosa et al., 2004; Venkatesan & Kaplan, 1982). UCM and UCM/OC concentrations were higher in the sediments of the South Ionian Sea (2.6 – 103.3 μg g<sup>-1</sup> and 200 – 15513 μg g<sup>-1</sup>, respectively) and in Augusta Bay (1.3 – 447.4 μg g<sup>-1</sup> and 241.0 – 25809.7 μg g<sup>-1</sup>, respectively). The lowest values were recorded in the deeper sediment layers of stations THR23 (0.1 and 21.6 μg g<sup>-1</sup>, respectively) and THR30 (0.4 and 124.3 μg g<sup>-1</sup>) of the Thracian Sea (Table 2). UCM levels of the shallow Thracian Sea stations, the deeper station of Augusta Bay and station ADEC of the South Ionian Sea were in the same range with those previously found for the oligotrophic Cretan Sea (0.3 – 4.8 μg g<sup>-1</sup>; Gogou et al., 2000). In contrast, UCM levels from the other stations were comparable to those found in coastal areas



(7-488  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; Tolosa et al. 1996) as well as in open sea areas in the NW Mediterranean (7-13  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; Tolosa et al. 1996). The isoprenoid hydrocarbons pristane and phytane (Table 2) were also present in all samples with values ranging from 8.7 to 144.0  $\text{ng g}^{-1}$  sediment dry weight.



**Figure 3.** Plots of Ter and CPI values determined in the sediment samples. Ter concentration is presented in  $\text{ng g}^{-1}$  dry weight sediment. Ter: sum of concentrations of terrestrial NA  $\text{C}_{27}$ ,  $\text{C}_{29}$  and  $\text{C}_{31}$ ; CPI ( $\text{C}_{21}\text{-C}_{36}$ ): Carbon Preference Index estimated for carbon chain length  $\text{C}_{21}$  to  $\text{C}_{36}$ .

The high abundance of UCM, the high recorded ratio of UCM to NA (UCM / NA; Table 2) together with the occurrence of pristane and phytane provided clear evidence of chronic oil pollution in the study area (Gogou et al., 2000). However, the high recorded amounts of AHC in the shallow stations of Augusta Bay strongly indicate the predominance of anthropogenic activities in the study area whereas in the deep stations close to the brine area of the South Ionian Sea hydrocarbons probably originated from subjacent geological layers since it is most unlikely for anthropogenic impact to have occurred in a water column depth of  $\sim 3300$  m (Brusa et al., 2001; Polymenakou et al., 2005b).

More definite confirmation of oil pollution was obtained by monitoring characteristic fragment ions from compounds unique to petroleum, such as pentacyclic terpenoids (Gogou et al., 2000; Tolosa et al., 2004; Wang et al., 1999). In the present study, a series of  $\text{C}_{27}\text{-C}_{35}$  pentacyclic terpanes (hopanes) could be identified in most of the stations primarily on their mass spectra and GC retention time characteristic of oil-derived hydrocarbons (Phillip, 1985) (Table 3). Fig. 2b shows the characteristic simple ion chromatogram ( $m/z$  191) for hopanes recorded in the most impacted station AUGU2. The homologues with number of carbon atoms  $\geq \text{C}_{29}$  exhibited the thermodynamically more stable  $17\alpha(H)$ ,  $21\beta(H)$  configuration maximizing at the  $\text{C}_{30}$  homologue ( $\text{C}_{29}/\text{C}_{30}$  ratios varied from 0.57 to 0.92). This distribution differs from the Augusta Bay oil where  $\text{C}_{29}/\text{C}_{30}$  ratios for the shallow stations were near 1 (AUGU2: 1.08; AUGU3: 0.99). Oils derived from carbonates usually show  $\text{C}_{29}/\text{C}_{30}$  ratios  $> 1$  compared to oils generated from shales (Tolosa et al., 2004). The hopane series of  $\text{C}_{31}\text{-C}_{35}$  occurred as pairs of the C-22 diastereoisomers ( $22S$  and  $22R$  epimers) (Table 3). The values of the ratio  $22S/(22S + 22R)$  varied from 0.51 to 0.67 and were close to the equilibrium value of 0.6 for mature petroleum (Tolosa et al., 2004).

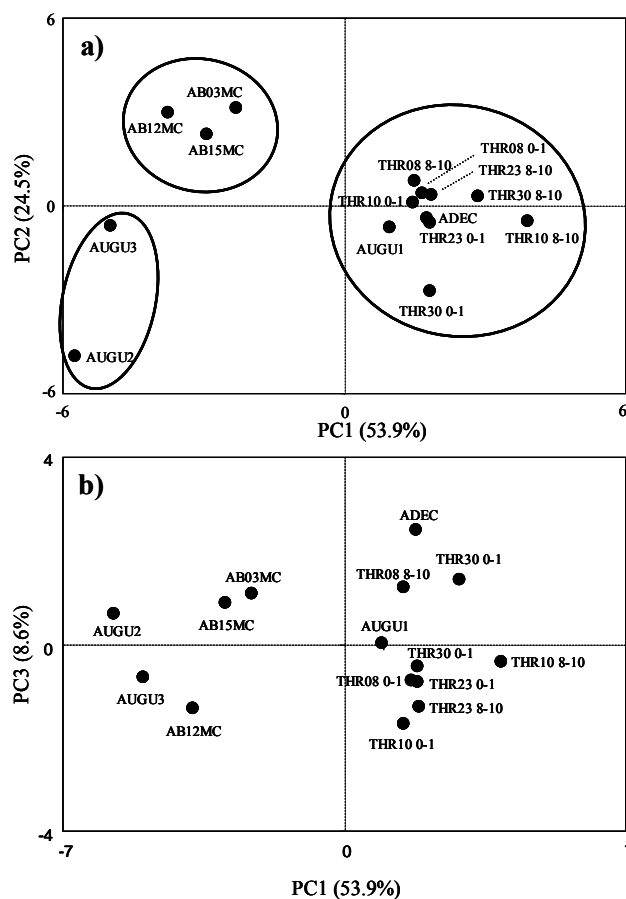
Principal Component Analysis (PCA) on the data set (e.g. total organic carbon, black carbon, bioavailable organic carbon, chlorophyll-a, phaeopigments, CPE, aliphatic hydrocarbon parameters) was also carried out in order to get further insights into the relationships between sampling stations (Fig. 4). The results indicated that 87% of the total variance in environmental parameters can be represented by three principal components (PC) where PC1, PC2 and PC3 explained respectively 53.9%, 24.5% and 8.6% of the total variance (Figs. 4a, b). The first component (PC1) in the score plot discriminates the most contaminated

stations of Augusta Bay and South Ionian Sea which appear in the left half of the plot, with the more pristine sampling stations in the right half (Fig. 4a). Both the deeper station of Augusta Bay and the pristine station of the South Ionian Sea are grouped together with the stations from the Thracian sea. The dominant projection of this component is mostly associated with the general concentrations of the different estimated parameters. Thus, the distribution of samples from left to right reflects a gradient of decreasing concentrations. This observation suggests a different trophic state between the sampling stations following a gradient from the most productive and contaminated region of Augusta Bay to the organic carbon-poor and pristine region of the Thracian Sea. The second principal component (PC2) discriminates the samples of the South Ionian Sea from Augusta Bay as a result of the intermediate levels of aliphatic hydrocarbons and organic carbon contents (Tables 1, 2; Fig. 4a) and is mostly associated with differences in organic carbon normalized concentration of NA. On the other hand, the score plot of PC3 discriminates the environmental samples mostly according to their absolute marine (Mar) and terrestrial (Ter). For example, it is very interesting to note the different projections of stations AUGU3 and ADEC on PC2 and PC3, although their positions on PC1 are similar (Figs. 4a, b). These differences on the score plot of PC3 are mostly associated with the different types of organic matter that the samples contain (Fig. 4b).

### 3.3 Microbial community composition

Sedimentary microbial communities are assemblages of bacterial, microeukaryotes and archaeal populations. Functional groups (e.g. microorganisms with similar metabolic activity) include aerobic and anaerobic heterotrophic bacteria, phototrophic bacteria, heterotrophic microeukaryotes and methanogenic archaea (Smoot and Findlay, 2001). A useful approach to estimate the bacterial biomass and community composition is by measuring chemical components that are specific for the different microbial groups. For instance, different groups of microorganisms synthesize a variety of PLFAs through various biochemical pathways (Bååth and Anderson, 2003; Guezennec and Fiala-Medioni, 1996; Rajendran et al., 1993; White et al., 1979). This makes PLFAs effective taxonomic markers, useful to define community composition. However, there is an overlap in PLFA composition between different species, and as such, it is not possible to define each species with a unique PLFA pattern.

In the present study, phospholipid ester-linked fatty acids (PLFA) were analyzed in order to obtain an impression about the bacterial abundances and community structure and to assess the response of



**Figure 4.** Principal components analysis of the sediment characteristics (total organic carbon, black carbon, bioavailable organic carbon, chlorophyll a, phaeopigments, chloroplastic pigment equivalents, aliphatic hydrocarbons, *n*-alkanes, unresolved complex mixture, sum of short chain *n*-alkanes and sum of long chain *n*-alkanes) a) Score PC1 and PC2 plots. B) PC1 and PC3 plots.

**Table 4.** Mean percentages (*mean*) and standard deviation (*sd*) of PLFAs determined in the sediment samples. Total amount of PLFA (ng g<sup>-1</sup>), bacterial biomass (ng g<sup>-1</sup>), cell numbers (x 10<sup>8</sup> cells g<sup>-1</sup>) and the relative proportions of saturated, monounsaturated, polyunsaturated and branched fatty acids are also presented.

PLFA (%)	AUGU1		AUGU2		AUGU3		THR08 (0-1)		THR08 (8-10)		THR10 (0-1)		THR10 (8-10)		THR23 (0-1)		THR23 (8-10)		THR30 (0-1)		THR30 (8-10)	
	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>
C14:0	4.5	0.6	6.1	0.1	5.9	0.3	6.8	0.7	6.3	0.9	5.0	0.4	4.4	1.1	2.6	1.8	3.8	0.0	5.4	0.5	4.6	0.7
14-MeC14:0	5.2	0.7	4.9	0.0	3.8	0.1	4.2	0.9	1.1	0.4	3.8	0.4	2.8	0.3	3.4	0.4	2.8	0.5	2.1	1.0	1.0	1.4
12-MeC14:0	5.6	0.7	4.9	0.3	4.2	0.2	3.1	1.4	2.1	0.9	3.3	0.3	5.2	0.1	2.8	0.8	6.2	0.1	1.8	0.7	3.4	1.1
C15:0	1.3	0.1	2.0	0.1	1.7	0.5	2.0	0.3	3.7	1.5	1.4	0.0	1.6	0.4	1.8	0.0	2.1	0.7	1.3	0.1	2.1	0.1
10-MeC15:0	0.4	0.2	-	-	-	-	0.5	0.1	0.7	0.9	0.3	0.1	0.6	0.1	0.3	0.1	-	-	0.4	0.1	1.1	0.1
12-MeC15:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.2	1.7	0.3	0.2	-	-
14-MeC15:0	1.9	0.1	2.3	0.1	1.6	0.0	1.7	0.2	0.2	0.3	3.7	0.1	1.1	0.8	2.7	1.2	1.3	0.3	4.3	2.2	-	-
<i>cis</i> -C16:1 $\omega$ 7	1.7	0.2	0.9	0.0	0.9	0.2	0.7	0.9	0.8	1.2	1.2	0.1	1.0	0.3	0.7	1.0	-	-	0.7	0.3	-	-
<i>cis</i> -C16:1 $\omega$ 9 + <i>trans</i> -C16:1 $\omega$ 7	9.4	0.8	10.6	0.7	10.4	1.2	5.3	0.2	2.9	1.3	12.7	0.2	4.6	1.7	9.2	5.3	6.5	2.2	12.7	3.9	4.9	2.7
<i>trans</i> -C16:1 $\omega$ 9	3.5	0.6	2.0	0.1	2.0	0.3	1.9	0.2	0.3	0.5	2.0	0.0	1.1	0.2	1.8	0.5	1.1	0.2	1.1	0.4	0.0	0.0
C16:0	21.1	1.8	24.2	1.4	25.2	0.6	28.3	3.7	29.5	7.4	24.3	0.4	28.1	3.6	25.6	1.8	28.4	0.8	27.4	6.5	29.1	0.1
13-MeC16:0	4.4	0.0	2.3	0.0	1.9	0.2	1.4	1.9	2.1	0.7	2.6	0.1	3.3	0.3	2.4	0.6	3.2	0.5	1.3	0.6	-	-
15-MeC16:0	2.8	2.3	1.2	0.1	1.3	0.1	1.2	1.7	10.8	3.5	1.2	0.1	0.9	0.2	1.9	1.0	0.6	0.3	1.5	0.4	-	-
14-MeC16:0	1.5	0.5	1.1	0.2	1.3	0.4	0.8	1.1	-	-	1.0	0.0	2.6	0.3	1.4	0.3	1.9	0.2	0.8	0.0	17.2	3.2
C17:1	1.6	0.1	1.0	0.3	0.8	0.2	0.5	0.7	-	-	1.2	0.1	1.2	0.2	1.0	0.1	0.7	0.0	0.6	0.1	-	-
C17:0	0.9	0.1	1.1	0.1	1.1	0.1	0.9	1.3	1.4	0.4	1.1	0.1	1.5	0.3	1.6	0.5	1.4	0.3	1.2	0.5	1.6	0.3
C18:3 $\omega$ 3	0.5	0.2	0.4	0.2	0.4	0.1	0.2	0.3	0.9	0.1	0.9	0.6	0.1	0.1	0.3	0.3	-	-	0.5	0.2	-	-
C18:2 $\omega$ 6,9	1.3	0.3	0.6	0.2	0.9	0.1	1.2	0.2	2.4	1.2	0.7	0.3	0.5	0.7	1.3	0.1	0.2	0.3	1.0	0.3	1.1	1.6
<i>cis</i> -C18:1 $\omega$ 7	7.0	0.4	6.0	0.4	6.5	0.4	8.0	1.6	6.5	0.4	6.7	0.3	8.0	1.4	7.5	0.4	7.7	1.9	5.9	1.6	6.5	0.6
<i>cis</i> -C18:1 $\omega$ 9	17.1	1.7	16.7	0.4	17.1	0.7	16.2	0.4	6.9	7.9	13.8	0.3	15.2	4.0	15.7	1.3	11.4	2.6	9.6	1.1	6.6	4.2
<i>trans</i> -C18:1 $\omega$ 9	-	-	4.6	1.0	2.9	0.1	1.0	0.6	-	-	4.4	0.2	1.3	1.8	0.8	0.3	0.5	0.7	3.1	3.6	1.7	2.4
C18:0	4.4	0.7	4.6	0.3	5.3	0.2	9.1	0.1	14.9	8.5	6.1	0.3	14.8	4.5	7.9	2.5	16.9	8.7	6.4	3.4	15.8	1.3
C20:4	0.7	0.1	0.7	0.1	0.9	0.1	1.0	0.3	0.6	0.3	1.1	0.1	-	-	1.5	0.4	-	-	1.6	0.2	0.5	0.7
C20:3 $\omega$ 11,14,17	0.9	0.1	-	-	1.5	0.1	-	-	3.0	1.9	-	-	-	-	2.4	1.1	-	-	5.7	0.2	-	-
C20:3 $\omega$ 8,11,14	-	-	-	-	-	-	0.8	0.6	-	-	0.1	0.0	-	-	0.3	0.1	-	-	0.4	0.3	-	-
C20:2 $\omega$ 11,14	0.8	0.4	0.2	0.3	-	-	1.3	0.5	-	-	0.5	0.0	-	-	1.2	0.8	-	-	0.6	0.4	-	-
C20:1 + C22:6	0.2	0.4	0.7	0.4	1.5	0.6	0.8	0.3	-	-	0.3	0.4	-	-	0.8	0.2	-	-	1.7	1.0	-	-
C20:0	1.2	0.0	0.8	0.1	0.8	0.1	1.2	0.2	2.9	1.8	0.8	0.0	-	-	1.0	0.2	2.0	0.3	0.6	0.1	2.9	0.1
Total PLFA (ng g <sup>-1</sup> )	4457.7	102.9	10656.0	959.5	7085.7	711.7	1371.6	347.9	725.8	272.1	2454.9	552.0	516.0	49.1	2529.0	752.6	488.2	262.8	5295.7	2492.3	273.8	96.8
Bacterial biomass (ng g <sup>-1</sup> )	3943.8	74.8	9738.0	787.7	6262.3	721.4	1190.8	318.0	633.6	264.0	2198.7	456.8	471.8	47.8	2138.5	615.0	447.3	234.3	4330.0	1860.2	253.1	97.0
x 10 <sup>8</sup> cells g <sup>-1</sup>	8.6	0.2	21.3	1.7	13.7	1.6	2.6	0.7	1.4	0.6	4.8	1.0	1.0	0.1	4.7	1.3	1.0	0.5	9.5	4.1	0.6	0.2
Saturated (%)	33.3	2.1	38.9	1.6	40.0	0.0	48.3	2.1	58.7	16.8	38.6	0.3	50.5	9.3	40.5	3.1	54.6	7.2	42.3	10.1	56.1	1.0
Monounsaturated (%)	40.4	3.1	41.8	0.4	40.7	1.6	33.6	0.9	17.5	8.6	42.0	0.2	32.4	9.0	36.7	3.1	27.9	6.2	33.8	7.9	19.7	3.8
Polyunsaturated (%)	4.5	0.8	2.6	0.5	5.2	0.9	5.3	0.4	7.0	3.5	3.6	1.2	0.6	0.8	7.8	0.5	0.2	0.3	11.5	2.2	1.6	2.3
Branched (%)	21.8	4.4	16.7	0.7	14.1	0.7	12.8	2.6	16.9	4.7	15.8	0.7	16.5	1.1	14.9	0.5	17.2	1.3	12.4	4.4	22.6	0.6

microbial communities to the different levels of the estimated environmental parameters (e.g. organic carbon and black carbon contents) in the sediments of Eastern Mediterranean Sea.

The PLFA composition of sediments from Augusta Bay and the Thracian Sea is shown in Table 4. The fatty acids detected in the sediments included saturated, monounsaturated and polyunsaturated as well as branched-chain fatty acids ranging from C14:0 to C20:0 (Table 4). The concentration of total PLFA varied significantly between sampling stations with values ranging between  $273.8 \pm 96.8$  and  $10656 \pm 959.5$  ng g<sup>-1</sup> sediment dry weight with the lower levels recorded in the deeper sediment layers (8-10 cm) of the Thracian Sea indicating that phospholipids are not efficiently buried in sediments. The levels of PLFA measured in the sediments from the Thracian Sea were comparable to the reported PLFA concentration in sediments from Thermaikos Gulf (North Aegean Sea) ( $219-2714$  ng g<sup>-1</sup>; Polymenakou et al., 2005a) and the Cretan Sea (South Aegean Sea) ( $524-1238$  ng g<sup>-1</sup>; Polymenakou et al., 2005a). In contrast, PLFA concentrations from Augusta Bay were much higher, although lower to those reported from eutrophic systems such as the Wadden Sea ( $36.0 - 71.1$  µg g<sup>-1</sup>; Langezaal et al., 2003), and a brackish lagoon in the German Baltic Sea ( $> 40$  µg ml<sup>-1</sup> of sediment; Boschker et al., 2001). The estimated bacterial abundances using the conversion factor of *Escherichia coli* ranged from  $1.0 \pm 0.1$  to  $21.3 \pm 1.7$  10<sup>8</sup> cells g<sup>-1</sup> with the maximum recorded values occurring in the more productive shallow sediments of Augusta Bay (Table 4) and the minimum at the deeper layers (8-10 cm) of the Thracian Sea.

The main marine bacterial fatty acids found were the saturated C16:0, C18:0 and the monounsaturated C16:1 and C18:1 (Table 4). The saturated fatty acids, ranging from  $33.3 \pm 2.1$  % in the offshore station of Augusta Bay to  $58.7 \pm 16.8$  % in the shallower station THR08 (0-1) of the Thracian Sea, are generally ubiquitous in organisms covering a wide range of different genera (Rajendran et al., 1993). The high proportions of saturated fatty acids indicated that a large fraction of the viable microbial communities inhabiting the sediments cannot be defined and attributed to any known functional group.

Monounsaturated PLFAs are typically found in gram-negative cell membranes (Macnaughton et al., 1999; Ringelberg et al., 1997). Previous studies have shown that both C16:1 and C18:1 fatty acids are characteristic indicators of bacterial origin (Langezaal et al., 2003; Oliver and Colwell, 1973) originating from methanotrophs (Virtue et al., 1996). Large amounts of either C16:1 or C18:1 are usually characteristic components in the membrane lipids of thio-oxidizing bacteria (Guezennec and Fiala-Medioni, 1996; Jannasch et al., 1989; Katayama-Fujimura et al., 1982) and are found to dominate the fatty acid profile of *Thiomicrospira crunega*, a chemoautotroph sulfur oxidizing bacterium, isolated from a deep-sea hydrothermal vent (Guezennec and Fiala-Medioni, 1996; Jannasch, 1985). In the present study, monounsaturated fatty acids contribution to total fatty acids varied significantly between the stations of Augusta Bay and the Thracian Sea (Table 4). In Augusta Bay gram-negative bacteria dominated microbial communities with concentrations ranging between  $40.4 \pm 3.1$  and  $41.8 \pm 0.4$  % of the total fatty acids whereas in the Thracian Sea, with the exception of station THR10 (0-1), saturated fatty acids were more abundant (Table 4). Moreover, the deeper layers (8-10 cm) of the Thracian Sea displayed maximum differences between the proportions of saturated and monounsaturated fatty acids (Table 4). There was also a weak tendency for both saturated and monounsaturated fatty acids to correlate with the levels of organic carbon and CPE (Tables 1, 4) indicating probably that the abundances of functional groups, as derived from fatty acid analysis, are mostly associated with the different trophic states of the ecosystem.

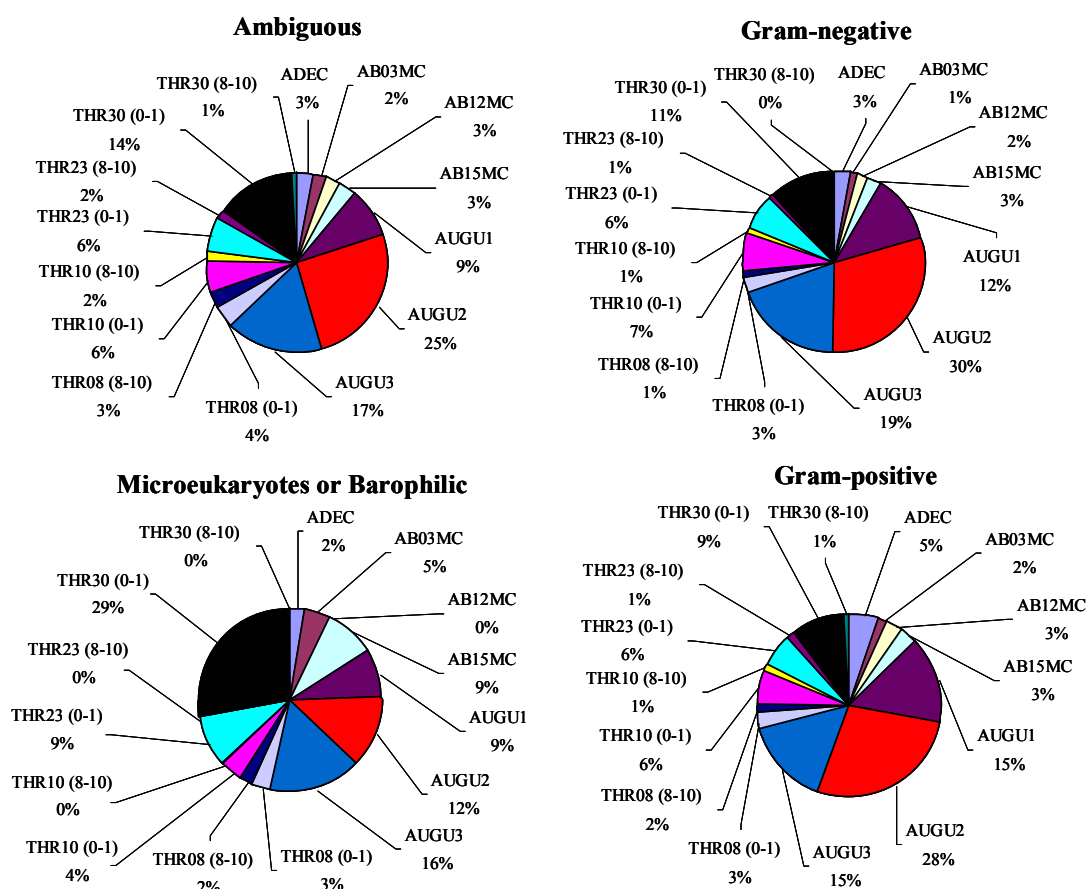
White et al. (1996) reported that polyunsaturated PLFAs are found almost exclusively in eukaryotes whereas DeLong and Yayanos (1985) suggested that the polyunsaturated PLFA can also be used as an indicator of the presence of barophilic bacteria since it can play an important role in maintaining optimal membrane fluidity and adaptation of the organisms to the deep-sea environment (DeLong & Yayanos, 1985). The contribution of polyunsaturated to total fatty acids ranged between  $0.2 \pm 0.3$  to  $7.8 \pm 0.5$  % with the minimum values recorded in the deeper sediment layers of the Thracian Sea (Table 2). The low abundances of polyunsaturated fatty acids strongly indicated that microeukaryotes or barophilic bacteria

represent a minor fraction of the total benthic microbial community structure (Guezennec and Fiala-Medioni, 1996).

Branched saturated fatty acids are generally considered to indicate the presence of gram-positive bacteria (Zelles, 1999). The contribution of gram-positive bacteria to total community composition was similar for all stations with concentrations ranging between  $12.4 \pm 4.4$  and  $22.6 \pm 0.6$  % (Table 4).

### 3.4 The effect of hydrocarbon levels

The study of microbial diversity and community response to elevated environmental factors is a rapidly growing field in microbial ecology. The analysis of microbial biomass and community structure in sediments provides significant information on environmental pollution studies and contaminant stress (Fang and Findlay, 1996).



**Figure 5.** Pie charts of the dominant functional groups (ambiguous, gram-negative, gram-positive, microeukaryotes or barophilic) determined using phospholipids analysis in the different sediment samples.

The abundances of the different functional groups (e.g. gram-negative, gram-positive, mikroeukaryotes or barophilic) were also compared between the sampling stations (Fig. 5) in an attempt to assess community structural shifts along the trophic state gradient in the sediments. The stations of the South Ionian Sea which were previously described (Polymenakou et al., 2005b) have also been included in the analysis.

The different microbial groups were most abundant in Augusta Bay and in the most impacted station of the Thracian Sea (THR30 0-1; Fig. 5). However, lower abundances of the various groups were recorded in the deeper sediment layers most likely as the result of the lower amounts of available organic carbon sources (e.g organic carbon and chloroplastic pigment content). Microeukaryotes were much more abundant in the surface sediment layer of station THR30 (Fig. 5) followed by the shallow sediments of Augusta Bay.

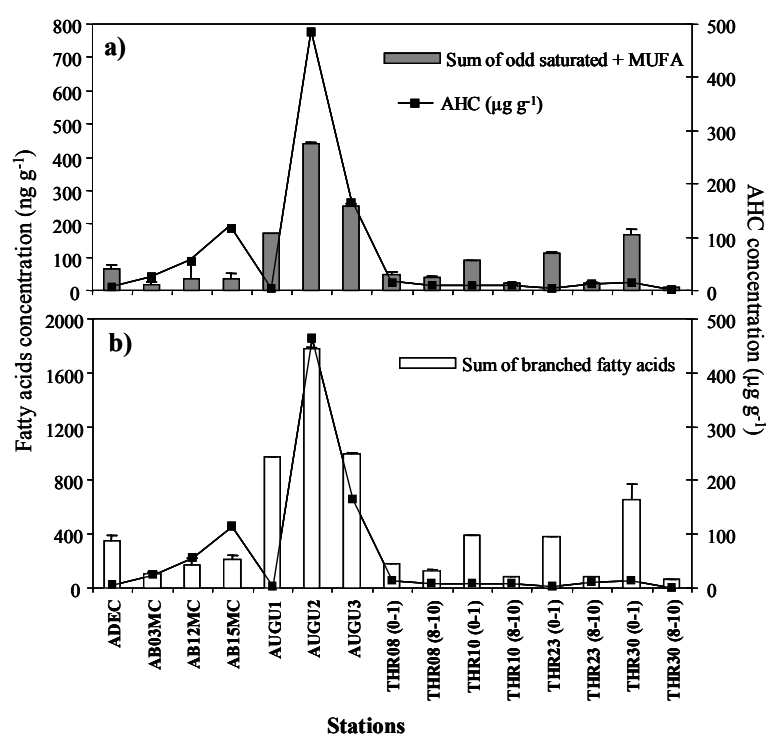
A previous study has shown that marine bacterial strains grown on petroleum produced high levels of odd saturated and monounsaturated fatty acids (Aries et al., 2000). Moreover, Pinturier-Geiss et al. (2002) suggested that the relative increase in phospholipids-linked branched and odd fatty acids can be related to the development of hydrocarbonoclastic bacteria associated with the hydrocarbon-rich sediments. Thus, in the present study, the sum of odd numbered saturated and monounsaturated fatty acids (Fig. 6a) as well as the sum of branched fatty acids (Fig. 6b) were plotted against the aliphatic hydrocarbons (Fig. 6). The relative increase in branched and odd fatty acids recorded in the shallow stations of Augusta Bay and the stations located close to the brine area of the South Ionian Sea are probably associated to the elevated amounts of hydrocarbons (Fig. 6). Usually, the sedimentation processes of carbon-enriched aggregates create short-lived hotspots (Fenchel & Glud, 2000; Tselepidis & Lampadariou, 2004) and probably the observed parallel increase in phospholipids and hydrocarbons could be associated to the formation of benthic hotspots.

In the light of these findings, we propose that microbial communities inhabiting the highly impacted sediments of the Eastern Mediterranean Sea may have developed hydrocarbon degrading bacteria in order to degrade all the available sources of carbon and energy. The question whether these bacterial communities possess the ability to degrade natural hydrocarbons or hydrocarbons derived from oil contamination is intriguing and should be further investigated.

### 3.5 The effect of refractory organic material

Black carbon (BC) is the chemically and biologically inert and ubiquitous form of organic matter (Dickens et al., 2004; Gélinas et al., 2001; Middelburg et al., 1999). The most adaptable communities to the different fractions of organic carbon are microbial communities which are generally highly diverse and are involved in a variety of biogeochemical processes (Boschker et al., 1998; Evans, 1977; Fang and Findlay, 1996). However, the available information on the effect of the most refractory or bioavailable organic carbon on microbial community composition in sediments from the Eastern Mediterranean Sea is rather scarce.

In the present study, a similarity matrix was generated between the different environmental samples based on phospholipid fatty acid profiling. Hierarchical cluster analysis based on the derived similarity produced two distinct groups (Fig. 7). The first group contains all the surface sediment layers from the Thracian Sea, the sediments from Augusta Bay as well as the characteristic open sea station of the South Ionian Sea, whereas the second



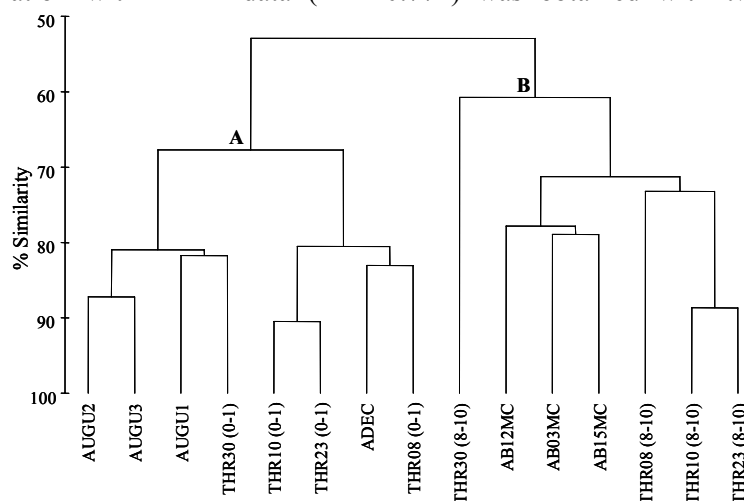
**Figure 6.** Distribution pattern in the different sediment samples of a) the sum of odd saturated and monounsaturated (MUFA) fatty acids and b) the sum of branched fatty acids. Aliphatic hydrocarbons (AHC) are also plotted. Fatty acids and AHC concentrations are presented in  $\text{ng g}^{-1}$  and  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectively.

group contains the deeper sediment layers of the Thracian Sea and the stations located near to the brine area of the South Ionian Sea (Fig. 7).

The produced results group together stations with different contamination levels, and therefore BIOENV analysis was conducted in an attempt to investigate the major environmental factors controlling microbial community composition. BIOENV analyzes the correlation between similarity matrices for environmental variables and the different similarity matrices computed for PLFA analysis. These correlations are repeated for all possible combinations of environmental variables and the set of environmental variables that produce the highest correlation ( $R$ ) are those that most accurately explain the community fingerprints. As recommended by Clarke and Ainsworth (1993), all measured environmental parameters were included in the BIOENV analysis without any prior transformations.

The highest rank correlation with PLFA data ( $R = 0.772$ ) was obtained with two

variables, bioavailable organic carbon and CPE contents, whereas total organic carbon appeared to be of minor importance. Group A, obtained from hierarchical cluster analysis, contains all stations exhibiting the maximum levels of both variables whereas group B contains the poor in organic carbon and chloroplastic pigment sediments. In order to examine microbial community shifts in each environment (rich and poor) BIOENV analysis



**Figure 7.** Cluster analysis dendrogram based on comparison of phospholipids linked fatty acid (PLFA) profiling from the different sediment samples.

was also conducted within each group. In group A the highest rank correlation with PLFA data was obtained with black carbon and CPE ( $R = 0.866$ ) whereas in group B the variables of total organic carbon, chlorophyll *a* and AHC exhibited the maximum rank correlation with microbial community composition ( $R = 0.856$ ).

These results demonstrate that the amount of the refractory form of organic carbon in sediments of the Eastern Mediterranean Sea has important implications on benthic microbial community structure. Previous studies reported that organic carbon does not represent a very good food indicator since it contains an unknown refractory portion that is not available to benthic communities (Tselepides & Lampadariou, 2004) and mainly chloroplastic pigments are considered as good food indicators since they originated from primary production. In the present study, the refractory fraction of organic carbon was estimated and therefore the retrieved bioavailable form of organic carbon was found to very well correlate to benthic microbial community structure. On the other hand, the organic carbon poor sediments of the Thracian and South Ionian Seas are probably inhabited by microbial communities that have developed the ability to use all the available sources of carbon and energy as a response to starvation stress. Obviously, much more work is required before conclusive statements can be made about the importance of the refractory fraction of organic carbon on the bioavailability of the sedimentary carbon pool and on microbial community structure in differentially impacted sediments.

### Acknowledgments

The officers and the crew of the R/Vs *Aegeao* and *Urania* are acknowledged for their assistance during the sampling. We are grateful to anonymous referees who their comments greatly improved the manuscript. This project was granted by the Commission of the

European Communities through projects ANREC (EU – DG XII, QLRT – 2001 - 01216), BIODEEP (EU - DG XII, EVK3 - 2000 – 22057), and ADIOS (EU - DG XII, EVK3 - 2000 - 00604) and the Greek Ministry of Development (General Secretariat of Research and Technology).

## References

- Aries, E., Doumenq, P., Artaud, J., Acquaviva, M., Mille, G., & Bertrand, J.-C. (2000). Determination of potential biomarkers or index of hydrocarbonoclastic bacterial activity by in vitro studies on the lipidic composition of marine bacterial strains grown on *n*-alkanes and petroleum. 4<sup>th</sup> International Symposium on the Interface between Analytical chemistry and Microbiology, June 4-7.
- Bååth, E., & Anderson, T.-H. (2003). Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 955-963.
- Balkwill, D.L., Leach, F.R., Wilson, J.T., McNabb, J.F., & White, D.C. (1988). Equivalence of microbial biomass measures based on membrane lipid and cell wall components, adenosine triphosphate, and direct counts in subsurface aquifer sediments. *Microbiology Ecology*, 16, 73-84.
- Barnett, P.R.P., Watson, J., & Connelly, D. (1984). A multiple corer for taking virtually undisturbed sediment samples from shelf bathyal and abyssal sediments. *Oceanologica Acta*, 7, 399-408.
- Bianchi, A., Tholosan, O., Garcin, J., Polychronaki, T., Tselepidis, A., Buscail, R., & Duineveld, G. (2003). Microbial activities at the benthic boundary layer in the Aegean Sea. *Progress in Oceanography*, 57, 219-236.
- Bligh, E.G., & Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.
- Blume, E., Bischoff, M., Reichert, J.M., Moorman, T., Konopka, A., & Turco, R.F. (2002). Surface and subsurface microbial biomass, community structure and metabolic activity as a function of soil depth and season. *Applied Soil Ecology*, 20, 171-181.
- Boschker, H.T.S., De Graaf, W., Köster, M., Meyer-Reil, L.A., & Cappenberg, T.E. (2001). Bacterial populations and processes involved in acetate and propionate consumption in anoxic brackish sediment. *FEMS Microbiology Ecology*, 35, 97-103.
- Boschker, H.T.S., Nold, S.C., Wellsbury, P., Bos, D., de Graaf, W., Pel, R., Parkes, R.J., & Cappenberg, T.E. (1998). Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by <sup>13</sup>C-labelling of biomarkers. *Nature*, 392, 801-805.
- Bouloubassi, I., Lipiatou, E., Saliot, A., Tolosa, I., Bayona, J.M., & Albaiges, J. (1997). Carbon sources and cycle in the Western Mediterranean: II. The use of molecular markers to determine the origin of organic matter. *Deep Sea Research*, 44, 781-799.
- Brusa, T., Borin, S., Ferrari, F., Sorlini, C., Corselli, C., & Daffonchio, D. (2001). Aromatic hydrocarbon degradation patterns and catechol 2,3-dioxygenase genes in microbial cultures from deep anoxic hypersaline lakes in the eastern Mediterranean sea. *Microbiological Research*, 156, 49-58.
- Caddy, J.F. (1993). Contrast Between recent Fishery Trends and Evidence from Nutrient Enrichment in Two Large Marine ecosystems: The Mediterranean and the Black Seas. In K. Sherman, et al., *Large Marine Ecosystems: Stress, Mitigation, and Sustainability*, (pp. 137-147). Washington, D.C.: American Association for the Advancement of Science
- Carpenter-Boggs, L., Kennedy, A.C., & Reganold, J.P. (1998). Use of phospholipids fatty acids and carbon source utilization patterns to track microbial community succession in developing compost. *Applied Environmental Microbiology*, 64, 4062-4064.
- Clarke, K.R., & Ainsworth, M. (1993). A method of linking multivariate community structure to environmental variables. *Marine Ecology Progress Series*, 92, 205-219.
- Cripps, G.C. (1994). Hydrocarbons in the Antarctic marine environment: monitoring and background. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 55, 3-13.
- Damsté, J.S.S., Frewin, N.L., Kenig, F., & De Leeuw, J.W. (1995). Molecular indicators for palaeoenvironmental change in a Messinian evaporitic sequence (Vena del Gesso, Italy).



- I: Variations in extractable organic matter of ten cyclically deposited marl beds. *Organic Geochemistry*, 23, 471-483.
- DeLong, E.F., & Yayanos, A.A. (1985). Adaptation of membrane lipids of deep-sea bacterium to changes in hydrostatic pressure. *Science*, 228, 1101-1103.
- Dickens, A.F., Gélinas, Y., Masiello, C.A., Wakeham, S., & Hedges, J.H. (2004). Reburial of fossil organic carbon in marine sediments. *Nature*, 427, 336-339.
- Elmqvist, M., Gustafsson, Ö., & Andersson, P. (2004). Quantification of sedimentary black carbon using the chemothermal oxidation method: an evaluation of ex situ pretreatments and standard additions approaches. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2, 417-427.
- Evans, W.C. (1977). Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments. *Nature*, 270, 17-22.
- Fang, J., & Findlay, R.H. (1996). The use of a classic lipid extraction method for simultaneous recovery of organic pollutants and microbial lipids from sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 27, 63-71.
- Fenchel, T., & Glud, R.N. (2000). Benthic primary production and O<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> dynamic in a shallow water sediment: Spatial and temporal heterogeneity. *Ophelia*, 53, 159-171.
- Frysjer, G.S., Gaines, R.B., Xu, L., & Reddy, C.M. (2003). Resolving the unresolved complex mixture in petroleum-contaminated sediments. *Environmental Science and Technology*, 37, 1653-1662.
- Gélinas, Y., Prentice, K.M., Baldock, J.A., & Hedges, J.I. (2001). An improved thermal oxidation method for the quantification of soot/graphitic black carbon in sediments and soils. *Environmental Science and Technology*, 35, 3519-3525.
- Gogou, A., Bouloubassi, I., & Stephanou, E.G. (2000). Marine organic geochemistry of the Eastern Mediterranean: 1. Aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in Cretan Sea surficial sediments. *Marine Chemistry*, 68 (4), 265-282.
- Guezennec, J., & Fiala-Medioni, A., (1996). Bacterial abundance and diversity in the Barbados Trench determined by phospholipid analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 19, 83-93.
- Gurr, M.I., & James, A.T. (1980). Lipid biochemistry, an introduction, (pp. 387). London: Chapman and Hall.
- Gustafsson, Ö., Haghseta, F., Chan, C., MacFarlane, J., & Gschwend, P.M. (1997). Quantification of the dilute sedimentary soot phase: implications of PAH speciation and bioavailability. *Environmental Science and Technology*, 31, 203-209.
- Head, I.M., Saunders, J.R., & Pickup, R.W. (1998). Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology* 35, 1-21.
- Hedges, J.I., & Stern, J.H. (1984). Carbon and nitrogen determinations of carbonate-containing solids. *Limnology and Oceanography*, 29, 657-663.
- Hong, H., Xu, L., Zhang, L., Chen, J.C., Wong, Y.S., & Wan, T.S.M. (1995). Environmental fate and chemistry of organic pollutants in the sediments of Xiamen harbor and Victoria harbor. *Marine Pollution Bulletin*, 31, 229-236.
- Ignatiades, L. (1969). Annual cycles, species diversity and succession of phytoplankton in lower Saronikos Bay, Aegean Sea. *Marine Biology*, 3, 196-200.
- Jannasch, H.W. (1985). The chemosynthetic support of life and the microbial diversity at deep-sea hydrothermal vents. *Proceeding R Society of London*, 225, 277-297.
- Jannasch, H.W., Nelson, D.C., & Wirsen, C.O. (1989). Massive natural occurrence of unusually large bacteria (*Beggiatoa* sp.) at a hydrothermal deep-sea vent site. *Nature*, 342, 834-836.
- Katayama-Fujimura, Y., Tsuzaki, N., & Kuraishi, H. (1982). Ubiquinone, fatty acid and DNA base composition determination as a guide to the taxonomy of the genus *Thiobacillus*. *Journal of General Microbiology*, 128, 1599-1611.
- Kieft, T.L., Wilch, E., O'Connor, K., Ringelberg, D.B., & White, D.C. (1997). Survival and phospholipids fatty acid profiles of surface and subsurface bacteria in natural sediment microcosms. *Applied Environmental Microbiology* 63, 1531-1542.

- Kleikemper, J., Pelz, O., Schroth, M.H., & Zeyer, J. (2002). Sulfate-reducing bacterial community response to carbon source amendments in contaminated aquifer microcosms. *FEMS Microbiology Ecology*, 42, 109-118.
- Krom, M.D., Brenner, S., Kress, N., Gordon, L.I. (1991). Phosphorous limitation of primary productivity in the Eastern Mediterranean Sea. *Limnology and Oceanography*, 36, 424-432.
- Langezaal, A.M., Ernst, S.R., Haese, R.R., van Bergen, R.F., & van der Zwaan, G.J. (2003). Disturbance of intertidal sediments: the response of bacteria and foraminifera. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 58, 249-264.
- Lorenzen, C., & Jeffrey, J. (1980). Determination of chlorophyll in sea water. *UNESCO Technical Papers in Marine Science*, 35, 1-20.
- Macnaughton, S.J., Stephen, J.R., Venosa, A.D., Davis, G.A., Chang, Y.J., & White, D.C. (1999). Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied Environmental Microbiology*, 65, 3566-3574.
- Masiello, C.A., & Druffel, E.R.M. (1998). Black carbon in deep sea sediments. *Science*, 280, 1911-1913.
- Middelburg, J.J., Nieuwenhuize, J., & van Breugel, P. (1999). Black carbon in marine sediments. *Marine Chemistry*, 65, 245-252.
- Oliver, J.D., & Colwell, R.R. (1973). Extractable lipids of gram-negative marine bacteria: fatty acid composition. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 23, 442-458.
- Parkes, R.J., & Taylor, J. (1983). The relationship between fatty acid distribution and bacterial respiratory types in contemporary marine sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 16, 173-189.
- Petersen, S.O., Henriksen, K., Blackburn, T.H., & King, G.M. (1991). A comparison of phospholipids and chloroform fumigation analyses for biomass in soil: potentials and limitations. *FEMS Microbiology Ecology*, 85, 257-268.
- Phillip, R.P. (1985). Fossil fuel biomarkers: applications and spectra. Elsevier, Amsterdam.
- Pinturier-Geiss, L., Méjanelle, L., Dale, B., & Karlsen, D.A. (2002). Lipids as indicators of eutrophication in marine coastal sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 48, 239-257.
- Polymenakou, P.N., Bertilsson, S., Tselepides, A., & Stephanou, E.G. (2005a). Links between geographic location, environmental factors and microbial community composition in sediments of the Eastern Mediterranean Sea. *Microbial Ecology* in press
- Polymenakou, P.N., Stephanou, E.G., & Tselepides, A. (2005b). n-Alkanes and microbial community fatty acid profiling along a salinity and oxic/anoxic gradient in deep-sea sediments from the South Ionian Sea (Eastern Mediterranean). *Deep-Sea Research* submitted
- Poulos, S.E., Drakopoulos, P.G., & Collins, M.B. (1997). Seasonal variability in sea surface oceanographic conditions in the Aegean Sea (Eastern Mediterranean): an overview. *Journal of Marine Journals*, 13, 225-244.
- Rajendran, N., Matsuda, O., Rajendran, R., & Urushigawa, Y. (1997). Comparative description of microbial community structure in surface sediments of eutrophic bays. *Marine Pollution Bulletin*, 34, 26-33.
- Rajendran, N., Suwa, Y., & Urushigawa, Y. (1993). Distribution of phospholipids ester-linked fatty acid biomarkers for bacteria in the sediment of Ise Bay, Japan. *Marine Chemistry*, 42, 39-56.
- Ringelberg, D.B., Sutton, S., & White, D.C. (1997). Biomass, bioactivity and biodiversity: analysis of ester-linked phospholipid fatty acids. *FEMS Microbiology Reviews*, 20, 371-377.
- Schulze, E.D., Wirth, C., & Heimann, M. (2000). Managing forests after Kyoto. *Science*, 289, 2058-2059.
- Simoneit, B.R.T. (1999). A review of biomarker compounds as source indicators and tracers for air pollution. *Environmental Science and Pollution*, 6, 159-169.

- Smoot, J.C., & Findlay, R.H. (2001). Spatial and seasonal variation in a reservoir sedimentary microbial community as determined by phospholipids analysis. *Microbial Ecology*, 42, 350-358.
- Teece, M.A., Getliff, J.M., Leftley, J.W., Parkes, R.J., & Maxwell, J.R. (1998). Organic degradation of the marine prymnesiophyte *Emiliana huxleyi* under oxic and anoxic conditions as a model for early diagenesis: long chain alkadienes, alkenones and alkyl alkenoates. *Organic Geochemistry*, 29, 863-880.
- Tolosa, I., Bayona, J.M., & Albaiges, J. (1996). Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons and sulfur/oxygen derivatives in Northwestern Mediterranean sediments: spatial and temporal variability fluxes and budgets. *Environmental Science and Technology*, 30, 2495-2503.
- Tolosa, I., de Mora, S., Sheikholeslami, M.R., Villeneuve, J.-P., Bartocci, J., & Cattini, C. (2004). Aliphatic and aromatic hydrocarbons in coastal Caspian Sea sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 48, 44-60.
- Tselepides, A., Zervakis, V., Polychronaki, T., Danovaro, R., & Chronis, G. (2000). Distribution of nutrients and particulate organic matter in relation to the prevailing hydrographic features of the Cretan Sea (NE Mediterranean). *Progress in Oceanography*, 46, 113-142.
- Tselepides, A., & Lampadariou, N. (2004). Deep-sea meiofaunal community structure in the Eastern Mediterranean: are trenches benthic hotspots? *Deep-Sea Research I*, 51, 833-847.
- Venkatesan, M.I., & Kaplan, I.R. (1982). Distribution and transport of hydrocarbons in surface sediments of the Alaskan outer continental shelf. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 46, 2135-2149.
- Vestal, J.R., & White, D.C. (1989). Lipid analysis in microbial ecology: quantitative approaches to the study of microbial communities. *BioScience*, 39, 535-541.
- Virtue, P., Nichols, P.D., & Boon, P.I. (1996). Simultaneous estimation of microbial phospholipids fatty acids and diether lipids by capillary gas chromatography. *Journal of Microbiological Methods*, 25, 177-185.
- Volkman, J.K., Holdsworth, D.G., Neil, G.P., & Bavor, Jr., H.J. (1992). Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediments. *The Science of Total Environment*, 112, 203-219.
- Wakeham, S.G. (1996). Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in Black Sea sediments. *Marine Chemistry*, 53, 187-205.
- Wang, Z., Fingas, M., & Page, D.S. (1999). Oil spill identification. *Journal of Chromatography A*, 843, 369-411.
- White, D.C. (1994). Is there anything else you need to understand about the microbiota that cannot be derived from analysis of nucleic acids? *Microbial Ecology*, 28, 163-166.
- White, D.C., Davis, W.M., Nickels, J.S., King, J.D., & Bobbie, R.J. (1979). Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia*, 40, 51-62.
- White, D.C., Fredrickson, H.F., Gehron, M.H., Smith, G.A., & Martz, R.F. (1983). The groundwater aquifer microbiota: biomass, community structure, and nutritional status. *Dev Industrial Microbiology*, 24, 189-199.
- White, D.C., Stair, J.O., & Ringelberg, D.B. (1996). Quantitative comparisons of in situ microbial diversity by signature biomarker analysis. *Journal of Industrial Microbiology*, 17, 185-196.
- Yentsch, C.S., Menzel, D.W., (1963). A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep-Sea Research*, 10, 221-231.
- Zelles, L. (1999). Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils*, 29, 111-129.



**ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ  
ΣΗΜΕΙΩΜΑ**



# Paraskevi N. Polymenakou

*Hellenic Centre for Marine Research*  
*P.O.Box 2214, Heraklion 71003, Crete, Greece,*  
*Tel: +30 2810 337855*  
*Fax: +30 2810 337822, e-mail: [polymen@her.hcmr.gr](mailto:polymen@her.hcmr.gr)*

## Personal Information

---

Date of Birth: 22/09/1975  
Nationality: Greek  
Languages: Greek (native language)  
English (written and spoken)

## Education

---

1994-1998: Bachelor of Science in Biology, University of Crete, Greece  
Diploma subject: "Construction of a chimeric purine transporter in *Aspergillus nidulans*"  
Supervisors: Prf. N.J. Panopoulos, Dr. G. Diallinas

1998-2000: Master studies in Environmental Science and Engineering, Department of Chemistry, University of Crete, Greece  
Subject: "Kinetics of phenol degradation using a new soil bacterium isolate" Supervisor: Prf. E.G. Stephanou

August 1999: Participation in the "Endangered European Environment Master Program", Uppsala University, Uppsala, Sweden

2001-2005: Ph.D., Department of Chemistry, University of Crete, Greece  
Subject: "Environmental control on microbial community composition in different sediments from the Eastern Mediterranean Sea: evaluation of the associated molecular markers"  
Supervisor: Prf. E.G. Stephanou

July 2002: Participation in intensive courses of American Chemical Society "How to develop, validate and troubleshoot GC methods" sponsored by Agilent Technologies

2003: Research visitor at Department of Ecology and Evolution, Uppsala University, Uppsala, Sweden (bacterial community composition and diversity in Mediterranean sediments: under the supervision of Dr. S. Bertilsson)

## Professional Experience

---

1999-2000: Teaching assistant in Biochemistry (Department of Chemistry, University of Crete)

2000-2001: Institute of Molecular Biology and Biotechnology: Participation in PENED program  
2001-to date: Hellenic Centre for Marine Research – Crete (H.C.M.R.)  
Institute of Oceanography: Research assistant

## Scientific Interests / Concentration

---

The Eastern Mediterranean Sea is a region characterized by a variety of extreme environments (e.g. anoxic hypersaline deep basins such as Bannock, L'Atalante, Urania, Discovery, Tyro; hydrothermal vent areas, submarine volcanoes and mud volcanoes, methane and hydrogen sulphide cold seep sites etc.) and represents a unique and easy accessible area to investigate the dynamics of microbial communities. The last few years, the development of culture independent techniques, like the sequence analysis of ribosomal RNA genes (16S rDNA) have proven to be powerful tools for investigating life within a wide range of environments. Especially, the specific identification of the metabolically active microbes is very important since these are responsible for the microbially driven biogeochemical processes. The challenge in the field of Microbial Ecology is to discover new DNA sequences, new bacterial strains and activities mostly associated with organic carbon degradation (e.g. pollutants). My specific research interests are the investigation of:

- The structure (trophic and species diversity) and functioning (metabolism, production) of sediment microbial communities in relation to their environment.
- Links between active vs inactive bacteria and community dynamics (e.g. bacterial C production, C mineralization rates and sediment community oxygen consumption rates)
- Bacterial diversity and bioremediation potential in marine environments / biodegradation of organic pollutants (aromatic hydrocarbons) / measurements and kinetic studies / isolation and identification of bacterial species from the environment

## Participation in recent programs and research projects

---

**EEE.** Endangered European Environment Program SOCRATES/ERASMUS Intensive Program 'An Intensive Approach to the Endangered European Environment', Uppsala Sweden

**Pore-to-Core** scale-up studies of the transport properties of organic pollutants with natural attenuation (EU – Environment and Climate 1994-1998)

**NSTP** (PENED). Participation in the **New Scientists Training Program** supported by the Greek Ministry of Development (General Secretariat for Research and Technology) and EU

**CYCLOPS** (EU - DG XII, EVK3 - CT99 - 0009): **CYCLing Of PhosphoruS** in the Mediterranean.

**ADIOS** (EU - DG XII, EVK3 - 2000 - 00604): **Atmospheric Deposition and Impact** of pollutants, key elements and nutrients on the **Open Mediterranean Sea**.



**BIODEEP** (EU - DG XII, EVK3 - 2000 - 22057): **BIO**technologies from the **DEEP**.  
**INTERPOL** (EU - DG XII, EVK3 - 2000 - 00526): **I**mpact of **N**atural and **T**rawling  
Events on **R**esuspension, dispersion and fate of **POLL**utants  
**ANREC** (EU - DG XII, QLRT-2001-01216): Association of physical and biological  
processes acting on recruitment and post-recruitment of Anchovy

## List of publications in international journals

---

### *Publications*

1. **Polymenakou, P.N.**, Stephanou, E.G. 2005. Effect of temperature and additional carbon sources on phenol degradation by an indigenous soil *Pseudomonad*. *Biodegradation*, 16: 403-413.
2. Pusceddu, A., Fiordelmondo, C., **Polymenakou, P.**, Polychronaki, T., Tselepides, A., Danovaro, R. 2005. Effects of bottom trawling on quantity and biochemical composition of organic matter in coastal marine sediments (Thermaikos Gulf, Aegean Sea, Greece). *Continental Shelf Research*, in press.
3. **Polymenakou, P.N.**, Bertilsson, S., Tselepides, A., Stephanou, E.G. 2005. Links between geographic location, environmental factors and microbial community composition in sediments of the Eastern Mediterranean Sea. *Microbial Ecology*, in press.
4. **Polymenakou, P.N.**, Bertilsson, S., Tselepides, A., Stephanou, E.G. 2005. Bacterial Community Composition in Sediments from the Eastern Mediterranean Sea: a Comparison of Four 16S rDNA Clone Libraries. *Microbial Ecology*, in press.
5. **Polymenakou, P.N.**, Pusceddu, A., Tselepides, A., Polychronaki, T., Giannakourou, A., Danovaro, R., Fiordelmondo, C., Hatziyanni, E. 2005. Benthic microbial abundance and activities in an intensively trawled ecosystem (Thermaikos Gulf, Aegean Sea). *Continental Shelf Research*, in press.

### *Submitted manuscripts*

6. **Polymenakou, P.N.**, Tselepides, A., Stephanou, E.G. 2005. Study of the mineralization effect on the distribution of lipids in sediments from the Cretan Sea: Evidence for hydrocarbon degradation and starvation stress. *Continental Shelf Research*, submitted.

### *Manuscripts in preparation*

7. **Polymenakou, P.N.**, Stephanou, E.G., Tselepides, A., Bertilsson, S. 2005. *n*-Alkanes and microbial community fatty acid profiling along a salinity and oxic/anoxic gradient in deep-sea sediments from the South Ionian Sea (Eastern Mediterranean). *Deep-Sea Research I*, will be submitted.
8. **Polymenakou, P.N.**, Stephanou, E.G., Tselepides, A., Bertilsson, S. 2005. The effect of 'black carbon' on natural microbial communities in polluted and pristine sediments from the Eastern Mediterranean Sea: Implications on C pool bioavailability. *Progress in Oceanography*, will be submitted.

## Participation in Conferences

---

- 23-27 September 1998: Goulas, A., **Polymenakou, V.**, and Diallinas, G. Molecular determinants involved in function and specificity of nucleobase transporters are conserved in bacteria, fungi, plants and metazoa. *Proceedings of the 16<sup>th</sup> SMYTE, Small Meeting on Yeast Transport and Energetics, Costa-Papiernicka, Slovakia*
- September 2000: Damianakis, K.G., **Polymenakou, P.N.**, Theophilou, S., Kouvarakis, A.N., Stephanou, E.G., Panopoulos, N.J. Partial resolution of 1.2.3-Trimethylbenzene metabolic pathway. *German*
- 6-9 May 2003: **Polymenakou, P.N.**, Hatziyanni, E., Tselepides, A., Stephanou, E.G. Effect of incubation experiments on the distribution of different lipid classes (aliphatic hydrocarbons, diglycerides, free fatty acids, glycolipids, phospholipids) in sediments of the Cretan Sea. *7<sup>th</sup> Symposium of Oceanography & Fisheries, Hersonissos, Crete, Greece*
- 21-26 September 2003: **Polymenakou, P.N.**, Bertilsson, S., Tselepides, A., Stephanou, A. High bacterial diversity in different sediments of the Eastern Mediterranean Sea: environmental control of community composition. *International Symposium 'Chemistry & Biology of Marine Organisms', Kolympari, Crete, Greece*
- 7-11 June 2004: **Polymenakou, P.N.**, Bertilsson, S., Tselepides, A., Stephanou, E.G. Comparison of microbial community composition from different sediments of the Eastern Mediterranean Sea using T-RFLP, DGGE and PLFA analysis. *37<sup>th</sup> CIESM Congress, Barcelona, Spain*
- 19-24 June 2005: **Polymenakou, P.N.**, Bertilsson, S., Tselepides, A., Stephanou, E.G. High bacterial diversity in different sediments of the Eastern Mediterranean Sea: comparison of community composition using molecular-based techniques. *American Society for Limnology and Oceanography (ASLO) Summer Meeting 2005, Santiago de Compostela, Spain*