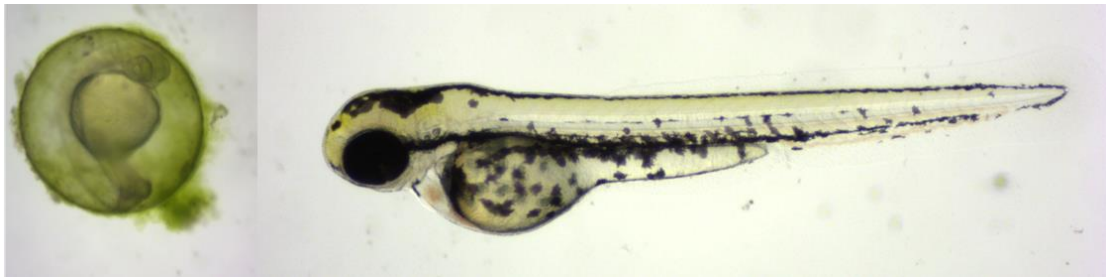




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Επιδράσεις της έκθεσης των εμβρύων και λεκιθοφόρων νυμφών
zebrafish σε υποθησιγόνα επίπεδα εκχυλίσματος του
κυανοβακτηρίου *Microcystis aeruginosa*. Αερόβια κολυμβητική
ικανότητα και γονιμότητα



Αθηνά-Νικολίτσα Κέκελου

Μεταπτυχιακή Εργασία

Ηράκλειο 2022

Επιβλέπων Καθηγητής

Κουμουνδούρος Γεώργιος (Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Κουμουνδούρος Γεώργιος (Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Πήττα Παρασκευή (Κύρια Ερευνήτρια, ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.)

Σωμαράκης Στυλιανός (Κύριος Ερευνητής, ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.)



Πρόλογος

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος «Περιβαλλοντική Βιολογία» στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Οι πειραματικές διαδικασίες για την πραγματοποίησή της έλαβαν χώρα στο εργαστήριο Θαλάσσιας Βιολογίας – Βιολογίας Ιχθύων με επιβλέποντα καθηγητή τον Γ. Κουμουνδούρο. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τη συμβουλευτική και καθοδηγητική βοήθεια που μου προσέφερε αλλά και για τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω και τα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής για τον χρόνο, τις παρατηρήσεις και τα σχόλια τους.

Φυσικά θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην συνεργάτιδά μου, μεταδιδακτορική ερευνήτρια Αναστασία Δημητριάδη για την βοήθεια και καθοδήγηση στην διεξαγωγή των πειραμάτων. Τέλος ένα ευχαριστώ στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, τους διδακτορικούς φοιτητές Γεώργιο Γελαδάκη και Χαρά Κουρκούτα αλλά και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ekaterina Gudkova.

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με την Ελληνική (Οδηγία 63/2010) και Ευρωπαϊκή (Οδηγία 56/2013) νομοθεσία σχετικά με την καλή διαβίωση των ζώων (απόφαση με ΑΠ 115470-16/5/19).

Περίληψη

Οι ανθίσεις των τοξικών κυανοφυκών εντείνονται από την κλιματική αλλαγή και τον ευτροφισμό. Το είδος *Microcystis aeruginosa* είναι ένα κοσμοπολίτικο είδος κυανοβακτηρίου που παράγει πλήθος βιοενεργών ενώσεων, μερικές από τις οποίες έχουν τοξική δράση. Η έντονη τοξικότητα του είδους οφείλεται στην ενδοτοξίνη MC-LR η οποία έχει την ικανότητα να συσσωρεύεται στους ιστούς των ιχθύων, επηρεάζοντας πληθώρα συστημάτων και λειτουργιών. Η τοξική δράση της MCLR ενισχύεται από άλλες ουσίες που παράγονται από το κυανοβακτήριο. Στην παρούσα εργασία, για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, διερευνήθηκε το κατά πόσο η σύντομη (διάρκειας 2 ημερών) έκθεση του εμβρυϊκού σταδίου των ιχθύων σε υποθησιγόνα επίπεδα εκχυλίσματος (200 mg L^{-1}) του *M. aeruginosa* μπορεί να έχει μακροχρόνιες (3 μήνες μετά την έκθεση) επιδράσεις στη γονιμότητα των ιχθύων. Σε συνέχεια προηγούμενης εργασίας του εργαστηρίου (Sergi et al., 2022), επιπρόσθετα διερευνήθηκε το κατά πόσο η έκθεση του λεκιθοφόρου νυμφικού σταδίου των ιχθύων σε υποθησιγόνα επίπεδα εκχυλίσματος (200 mg L^{-1}) του *M. aeruginosa* επηρεάζει την κολυμβητική ικανότητα των ιχθύων κατά το στάδιο της μεταμόρφωσης. Για κάθε ερευνητικό ερώτημα πραγματοποιήθηκε μία πειραματική σειρά με δυο ανεξάρτητες επαναλήψεις.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έκθεσης κατά το εμβρυϊκό στάδιο έδειξαν ότι η αρχική έκθεση των ψαριών στο εκχύλισμα *M. aeruginosa* μείωσε σημαντικά τη σχετική γονιμότητά τους (536.9 ± 46.5 έναντι 701.9 ± 46.54 αυγών ανά g βάρους θηλυκού ατόμου στον πληθυσμό ελέγχου) ($p < 0.05$, ANOVA). Η μείωση αυτή της γονιμότητας συνοδεύτηκε από συγκριτικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *fshr* και *bmp15* στις ωοθήκες ($p < 0.05$, ANOVA). Αντίθετα τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *vtg1*, *vtg2* και *cyp1a* του ήπατος δεν επηρεάστηκαν από την αρχική έκθεση των εμβρύων ($p > 0.05$, ANOVA). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έκθεσης κατά το λεκιθοφόρο νυμφικό στάδιο έδειξαν ότι η αρχική έκθεση των ψαριών στο εκχύλισμα *M. aeruginosa* μείωσε σημαντικά την αερόβια κολυμβητική τους ταχύτητα (RU_{crit}) κατά το στάδιο της μεταμόρφωσης (9.24 ± 1 έναντι $11.25 \pm 1.3 \text{ TL s}^{-1}$ στον πληθυσμό ελέγχου) ($p < 0.05$, ANOVA). Αντίθετα με την RU_{crit} , η μορφολογία της καρδιάς και η ανάπτυξη του σκελετού δεν επηρεάστηκαν από την αρχική έκθεση των λεκιθοφόρων νυμφών. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συζητούνται ως προς τις επιπτώσεις των τοξικών ανθίσεων στους υδρόβιους οργανισμούς, καθώς και τους πιθανούς υποκείμενους μηχανισμούς επιδράσεων του εκχυλίσματος *M. Aeruginosa* στη γονιμότητα και κολυμβητική ικανότητα του zebrafish.

Abstract

Cyanobacterial blooms are intensifying in parallel with climate change and eutrophication. *Microcystis aeruginosa* comprises a species of freshwater cyanobacteria which can form a plethora of bioactive compounds, some of which have toxic effects. The toxicity of cyanobacteria is mainly attributed to the endotoxin microcystin-LR (MCLR), which bioaccumulates in fish tissues and affects many systems and functions. MCLR action has been shown to be enhanced by other substances which are produced by the cyanobacteria. The aim of the present study was to examine whether the sublethal embryonic exposure to *Microcystis aeruginosa* extract (200 mg d.m. L⁻¹) affects the fecundity of female zebrafish. Moreover, following the recent publication of Sergi et al. (2022), this study examined whether the sublethal yolk-sac larval exposure to *Microcystis aeruginosa* extract (200 mg d.m. L⁻¹) affects the swimming performance of metamorphosing zebrafish. For both scientific questions, trials were performed in two independent replicates.

Embryonic exposure trials revealed a significant decrease of the relative fecundity of fish in response to the early exposure to *M. aeruginosa* (536.9±46.5 vs 701.9±46.54 eggs per g of female weight in the control group) (p<0.05, ANOVA). This result was associated with a significant increase in the gene expression levels of the ovarian *fshr* and *bmp15* (p<0.05, ANOVA). In contrary, the expression levels of the liver *vtg1*, *vtg2* and *cyp1a* were not affected by fish pre-exposure to *M. aeruginosa* extracts (p>0.05, ANOVA). Concerning the yolk-sac larval exposure trials, they revealed a significant decrease of the aerobic swimming performance (RU_{crit}) of the metamorphosing zebrafish in response to the early exposure to *M. aeruginosa* (9.24±1 vs 11.25±1.3 TL s⁻¹ in the control group) (p<0.05, ANOVA). In contrary to the effect on RU_{crit}, heart morphology and skeleton development were unaffected by the initial exposure of the fish. The results of the present study are discussed with respect to the effects of harmful algal blooms on aquatic organisms, as well as to the underlying mechanisms of the *M. aeruginosa* effects on zebrafish fecundity and swimming performance.

Περιεχόμενα

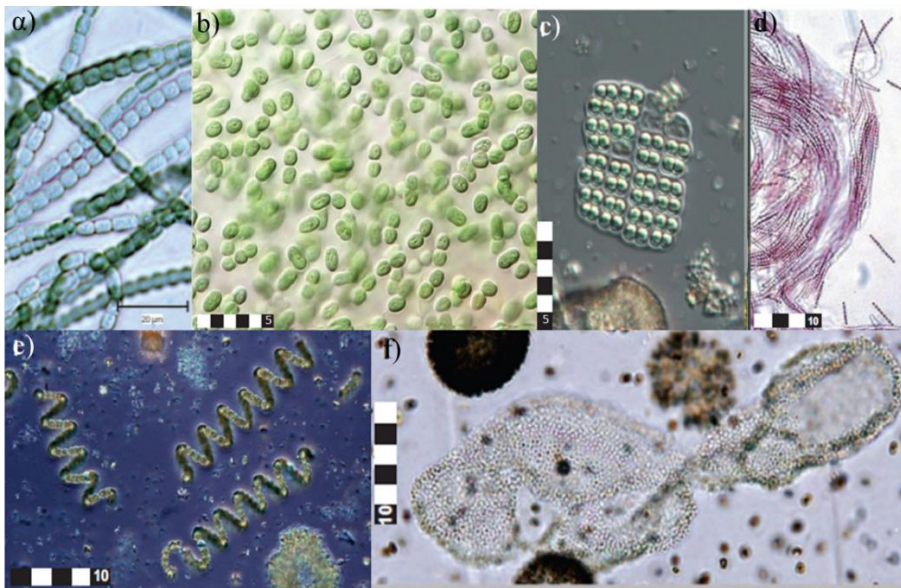
Πρόλογος.....	3
Περίληψη.....	4
Abstract	5
1. Εισαγωγή.....	8
1.1 Ανθίσεις κυανοβακτηρίων.....	8
1.2 Τοξίνες και λοιπές βιοενεργές ενώσεις	10
1.3 Το κυανοβακτήριο <i>Microcystis aeruginosa</i>	11
1.4 Μεθοδολογία μελέτης του των επιδράσεων του <i>M. aeruginosa</i> στους οργανισμούς	13
1.5 Επιδράσεις του <i>M. aeruginosa</i> στους ιχθύες.....	13
1.6 Οντογένεση του zebrafish	15
1.7 Κολυμβητική ικανότητα των ιχθύων.....	16
1.8 Γονιμότητα των ιχθύων	17
1.9 Σκοπός παρούσας εργασίας.....	17
2. Υλικά και μέθοδοι	19
2.1 Παρασκευή εκχυλίσματος <i>M. aeruginosa</i>	19
2.2 Πειράματα έκθεσης των εμβρύων zebrafish σε υποθησιγόνα επίπεδα εκχυλίσματος του κυανοβακτηρίου <i>M. aeruginosa</i> . Εκτίμηση των επιπτώσεων της έκθεσης στη γονιμότητα των ενήλικων θηλυκών.....	19
2.2.1 Έλεγχος σχετικής γονιμότητας θηλυκών ατόμων και ποιότητας απογόνων	20
2.2.2 Μοριακή ανάλυση RT-qPCR για τη μελέτη γονιδιακής έκφρασης	21
2.2.3 Έλεγχος ποιότητας απογόνων	23
2.3 Πειράματα έκθεσης των λεκιθοφόρων νυμφών zebrafish σε υποθησιγόνα επίπεδα εκχυλίσματος του κυανοβακτηρίου <i>M. aeruginosa</i> . Εκτίμηση των επιπτώσεων της έκθεσης στην κολυμβητική ικανότητα των μεταμορφούμενων νυμφών	24
2.3.1 Έλεγχος της κολυμβητικής ικανότητας των μεταμορφούμενων νυμφών	25
2.3.2 Μελέτη του σχήματος της καρδιάς.....	28
2.3.3 Μελέτη των σκελετικών δυσπλασιών	30
3. Αποτελέσματα	32
3.1 Επιπτώσεις της εμβρυϊκής έκθεσης στη γονιμότητα των ενήλικων θηλυκών.....	32
3.1.1 Συνθήκες έκθεσης των εμβρύων στο διάλυμα εκχυλίσματος <i>M. aeruginosa</i>	32
3.1.2 Σχετική γονιμότητα	32
3.1.3 Επίπεδα γονιδιακής έκφρασης στις ωοθήκες και στο ήπαρ	33
3.1.4 Επίδραση της αρχικής έκθεσης σε εκχύλισμα <i>M. aeruginosa</i> σε χαρακτηριστικές ποιότητες των απογόνων	35
3.2 Επιπτώσεις της έκθεσης του λεκιθοφόρου νυμφικού σταδίου στην κολυμβητική ικανότητα των μεταμορφούμενων νυμφών.....	36
3.2.1 Εκτίμηση υποθησιγόνων επιπέδων του εκχυλίσματος <i>M. aeruginosa</i> για το λεκιθοφόρο νυμφικό στάδιο	36

3.2.2	Συνθήκες έκθεσης των λεκιθοφόρων νυμφών στο διάλυμα εκχυλίσματος <i>M. aeruginosa</i>	37
3.2.3	Επίδραση του εκχυλίσματος <i>M. aeruginosa</i> στην κολυμβητική ικανότητα.....	37
3.2.4	Επίδραση του εκχυλίσματος <i>M. aeruginosa</i> στη μορφολογία της καρδιάς	39
3.2.5	Επίδραση του εκχυλίσματος <i>M. aeruginosa</i> στην ανάπτυξη σκελετικών παραμορφώσεων	39
4.	Συζήτηση	42
4.1	Επίδραση του εκχυλίσματος <i>M. aeruginosa</i> στην γονιμότητα των ιχθύων.....	43
4.2	Επίδραση του εκχυλίσματος <i>M. aeruginosa</i> στην κολυμβητική ικανότητα των ιχθύων	44
4.3	Συμπερασματικά.....	45
5.	Βιβλιογραφία.....	46

1. Εισαγωγή

1.1 Ανθίσεις κυανοβακτηρίων

Τα κυανοφύκη, ή αλλιώς κυανοβακτήρια, είναι υδρόβιοι μικροοργανισμοί με μεγάλο εύρος κατανομής που ευδοκιμούν σε όλα τα φωτεινά περιβάλλοντα εκτός από αυτά με πολύ όξινο pH (ντι του διοξειδίου του άνθρακα) για τη φωτοσύνθεση. Χαρακτηριστικά που καθιστούν κυρίαρχα τα κυανοβακτήρια (έναντι των ευκαρυωτικών μικροφυκών) σε περιβάλλοντα με έντονο φως και μειωμένο επίπεδα CO₂ (Stewart et al. 1969). Γενικά, διαφορετικά τάξα κυανοφυκών πρωταγωνιστούν στα γλυκά, υφάλμυρα και θαλάσσια υδάτινα περιβάλλοντα (O'Neil et al. 2012). Η διάμετρος των κυττάρων των κυανοβακτηρίων διαφέρει μεταξύ των τάξων, από 0.2 έως 40 μm. Ορισμένες πιο επιμήκεις μορφές έχουν παρατηρηθεί ότι φτάνουν σε μήκος έως και τα 100 μm. Τα περισσότερα είδη κυανοβακτηρίων σχηματίζουν πολυκύτταρα συσσωματώματα με ποικιλία σχημάτων και μεγεθών (Εικόνα 1).

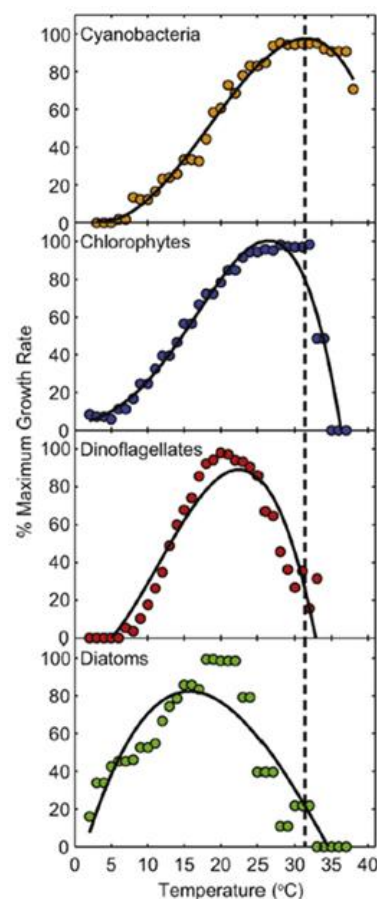


Εικόνα 1. Κυτταρικοί τύποι και διαφορετικοί σχηματισμοί χαρακτηριστικών κυανοβακτηρίων που δημιουργούν ανθήσεις. α) *Anabaena sensu stricto* sp., β) *Aphanocapsa* sp., γ) *M. erismopediella* sp., δ) *Pseudanabaena* sp. (red), ε) *Dolichospermum* sp. D. Crassum, ς) *Aphanocapsa* sp (τροποποιημένη εικόνα από Chorus Ingrid & Welker Martin 2021).

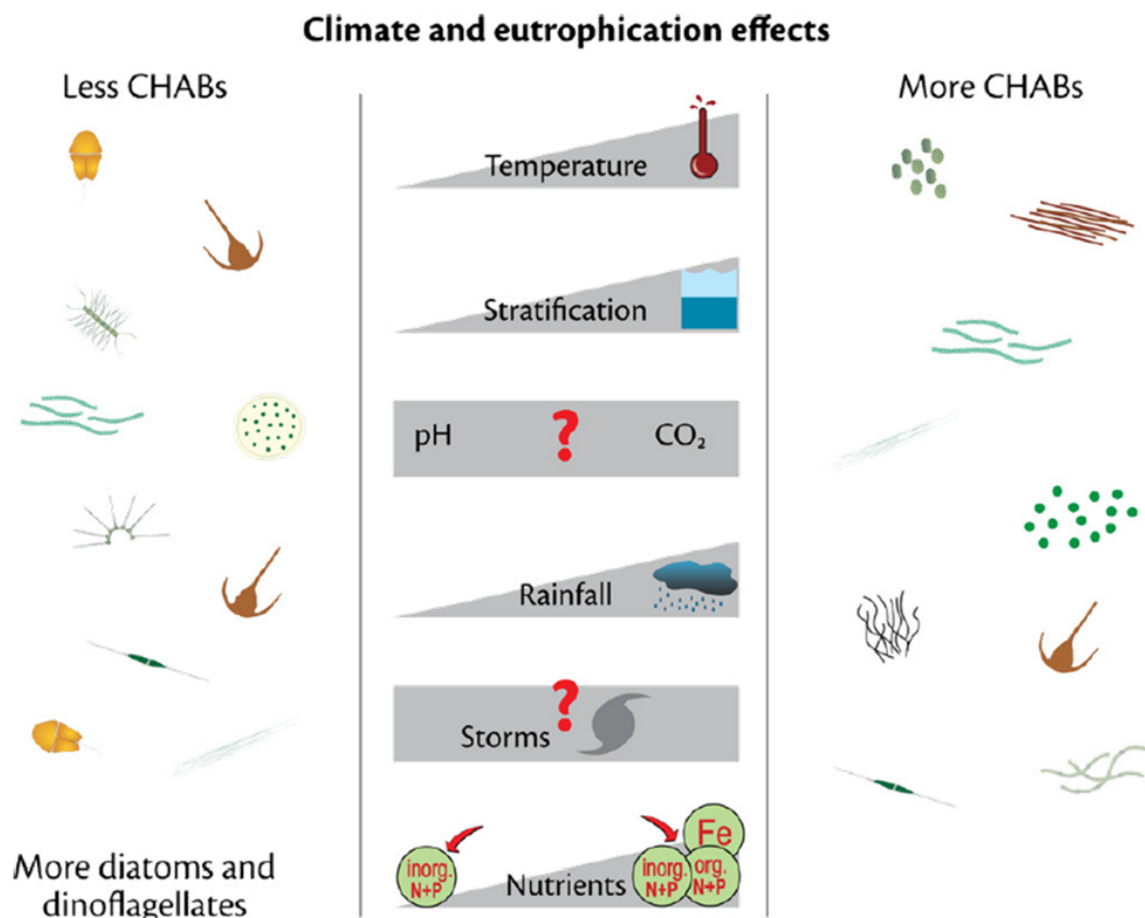
Οι οργανισμοί αυτοί έχουν την δυνατότητα να παράγουν πολλούς δευτερογενείς μεταβολίτες που δεν απαιτούνται για τον βασικό κυτταρικό μεταβολισμό. Σε αυτές τις ενώσεις συγκαταλέγονται και οι τοξίνες των κυανοβακτηρίων. Πολλές από αυτές έχει φανεί ότι είναι βιοενεργές και μπορούν να προσβάλουν διάφορα συστήματα, χωρίς ωστόσο η ακριβής λειτουργία τους να έχει αναλυθεί πλήρως. Η παρουσία και μόνο των κυανοβακτηρίων στο νερό δεν θέτει αυτόματα σε κίνδυνο τη δημόσια υγεία. Η συγκέντρωση των τοξινών για να χαρακτηριστεί ως θνησιγόνα ή υποθνησιγόνα εξαρτάται από την ταξινομική σύνθεση του φυτοπλαγκτού καθώς και την βιομάζα των κυανοβακτηρίων. Η πιθανότητα

εμφάνισης ανθίσεων (blooms) κυανοβακτηρίων αυξάνεται σημαντικά σε ευτροφικές συνθήκες. Ο σχηματισμός επιφανειακών ανθίσεων είναι μια από τις κυριότερες οπτικές εκφράσεις της ανάπτυξης κυανοβακτηρίων. Οι ανθίσεις τέτοιου τύπου στο νερό μπορούν να έχουν μεγάλη ποικιλία χρωμάτων, πέρα από το τυπικό πράσινο ή μπλε-πράσινο χρώμα, λόγω ποικίλων χρωστικών που έχουν τα ίδια τα κυανοβακτήρια (όπως χλωροφύλλες, φυκοκυανίνη, φυκοερυθρίνη και καροτενοειδή) (Chorus Ingrid & Welker Martin 2021).

Συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες συμβάλλουν στην κυριαρχία και εξάπλωση ορισμένων τάξεων κυανοβακτηρίων σε βάρος άλλων φυτοπλακτονικών ομάδων. Η κατανόηση των συνθηκών αυτών είναι σημαντική για την διαχείριση και την πρόβλεψη κυανοβακτηριακών ανθίσεων. Οι πιο καθοριστικές συνθήκες για την ανάπτυξη και τον ανταγωνισμό των ομάδων αυτών, είναι η διαθεσιμότητα σε θρεπτικά και φως, η θερμοκρασία, η στρωματοποίηση και ανάδευση των υδάτων, το βάθος των υδάτων και το pH. Ακόμα βιοτικοί παράγοντες όπως η βόσκηση από το ζωοπλαγκτόν και το φιλτράρισμα από διηθηματοφάγους οργανισμούς, αλλά και μόλυνση από φάγους και παράσιτα επίσης μπορούν να συμβάλουν στην κυριαρχία κάποιων τάξεων και τελικά στην άνθισή τους (Paerl et al. 2016). Η κλιματική αλλαγή είναι ένα φαινόμενο που αναμένεται να επηρεάσει και να αλλάξει πολλές από αυτές τις συνθήκες, συμβάλλοντας τελικά στην αύξηση της έκτασης και έντασης των ανθίσεων των κυανοβακτηρίων (Εικόνα 2). Όμως τα υδατικά περιβάλλοντα που κυρίως θα επηρεαστούν από την κλιματική αλλαγή είναι τα ευτροφικά οικοσυστήματα καθώς η επάρκεια P και N είναι καθοριστική για την αύξηση και άνθιση των κυανοβακτηρίων. (Εικόνα 3) (O'Neil et al. 2012).



Εικόνα 2. Βέλτιστη θερμοκρασία αύξησης ανά τάξη φυτοπλαγκτού. (Paerl et al. 2016)



Εικόνα 3. Ο ευτροφισμός και οι πιθανές επιπτώσεις της κλιματικής αλλαγής στην αφθονία των κυανοβακτηριακών επιβλαβών ανθήσεων (CyanoHAB) (από O'Neil et al. 2012).

1.2 Τοξίνες και λοιπές βιοενεργές ενώσεις

Γενικά, τοξίνες θεωρούνται οι ενώσεις που προκαλούν προβλήματα υγείας σε ζώα και ανθρώπους, ενώ οι βιοενεργές ενώσεις μπορούν να έχουν αντιμικροβιακές και κυτταροτοξικές ιδιότητες και συχνά παρουσιάζουν ενδιαφέρον για φαρμακευτικά και ερευνητικά εργαλεία (Codd et al. 2005). Πολλές από αυτές τις ενώσεις έχουν και τοξικές ιδιότητες, ενώ οι μακροπρόθεσμες επιπτώσεις τους στους οργανισμούς και το οικοσύστημα είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστες (Tonk 2007). Οι κυανοτοξίνες παράγονται από πολλά είδη κυανοβακτηρίων που ανήκουν σε διαφορετικά γένη. Συνεπώς είναι αναμενόμενο να τις συναντάμε σε πολλά περιβάλλοντα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, που όταν ανιχνεύονται πάνω από ορισμένα επίπεδα θεωρούνται επικίνδυνες για το οικοσύστημα και τον άνθρωπο. Τα πιο συχνά τάξα που συναντώνται να κάνουν και ανθίσεις και να απελευθερώνουν κυανοτοξίνες στην στήλη του νερού είναι τα *Microcystis*, *Planktothrix*, *Dolichospermum*, *Raphidiopsis* και *Aphanizomenon*. Η δράση των τοξινών που παράγουν τα κυανοβακτήρια χαρακτηρίζεται συνήθως ως ηπατοτοξική ή νευροτοξική (Paerl 2014), αν και οι τοξίνες αρκετών

τάξων μπορούν να έχουν διαφορετική δράση στους οργανισμούς που προσβάλλουν (Εικόνα 4) (Boopathi & Ki 2014).

Toxins	Variants	Toxin producing cyanobacterial genera	Toxic mechanism
Microcystin	Over 85 variants	<i>Anabaena</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Merismopedia</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Synechococcus</i> and <i>Planktothrix</i>	Hepatotoxic, inhibits eukaryotic protein phosphatases
Nodularin	8 variants	<i>Nodularia</i> and <i>Nostoc</i>	Hepatotoxic, inhibits eukaryotic protein phosphatases
Cylindrospermopsin	3 variants, Cylindrospermopsin 7-epicylindrospermopsin 7-deoxycylindrospermopsin	<i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Raphidiopsis</i> , <i>Umezakia</i> and <i>Sphaerospermopsis</i>	Hepatotoxic, cytotoxic, neurotoxic; inhibition of glutathione synthesis, protein synthesis and cytochrome P450
Anatoxin-a	3 variants, Anatoxin-a, homoanatoxin-a Anatoxin-a(s)	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> and <i>Oscillatoria</i>	Neurotoxic, mimics the neurotransmitter acetylcholine
Saxitoxin	20 variants	<i>Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Raphidiopsis</i> and <i>Scytonema</i>	Neurotoxic, blocks voltage-gated Na ⁺ channels

Εικόνα 4. Βασικές ομάδες κυανοτοξινών και πληροφορίες για την ποικιλία στελεχών ή τάξων που τις παράγουν, καθώς και για τον μηχανισμό μέσω του οποίου δρουν (από Boopathi & Ki 2014).

Οι κυανοτοξίνες ακόμα διαχωρίζονται ανάλογα με το αν παράγονται και εκκρίνονται στο περιβάλλον (εξωτοξίνες) ή αν παραμένουν μέσα στο κύτταρο μέχρι και την λύση του (ενδοτοξίνες) (Svrcek & Smith 2004). Οι τελευταίες απελευθερώνονται στο περιβάλλον μετά τη λύση των κυττάρων, καθιστώντας έτσι το τέλος των ανθίσεων ακόμη πιο βλαβερό για τους οργανισμούς (Saraf et al. 2018a, Svrcek & Smith 2004).

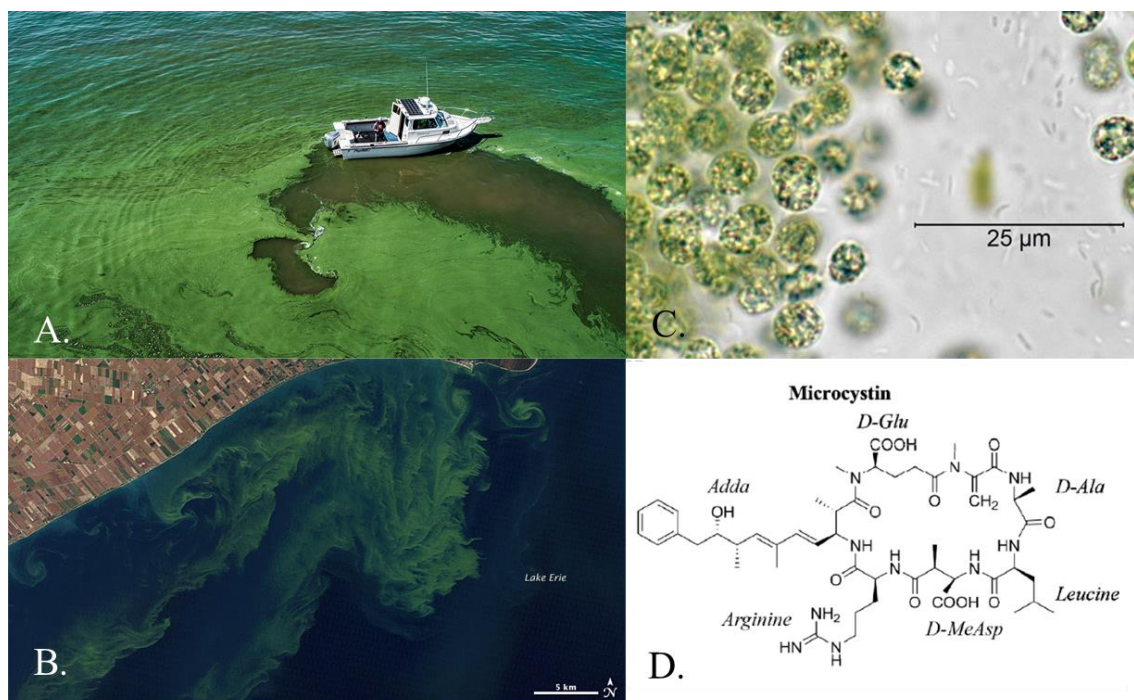
1.3 Το κυανοβακτήριο *Microcystis aeruginosa*

Το *M. aeruginosa* είναι ένα κυανοβακτήριο του γλυκού νερού με παγκόσμια κατανομή, που συναντάται στη στήλη του νερού, κυρίως σε ευτροφικές αλλά και μεσοτροφικές λίμνες. Πολλές εργασίες έχουν δείξει την αύξηση της εξάπλωσης ανθίσεων σε βάρος άλλων μικροφυκών από το συγκεκριμένο κυανοβακτήριο λόγω κλιματικής αλλαγής (Ninio et al. 2020, O'Neil et al. 2012). Σύμφωνα με κάποιους συγγραφείς, το είδος εμφανίζει ανοχή σε ύδατα υψηλότερης αλατότητας (Codd et al. 2005, Tonk 2007). Το γένος *Microcystis* δεν μπορεί να σταθεροποιήσει το ατμοσφαιρικό άζωτο, αλλά μπορεί να επωφεληθεί από την αποδόμηση της βιομάζας συνυπαρχόντων τάξεων και την ακόλουθη απελευθέρωση N στο νερό (Chorus Ingrid & Welker Martin 2021).

Το γένος *Microcystis* παράγει μια από τις πιο άφθονες και διαδεδομένες ομάδες τοξινών στα γλυκά ύδατα, τις μικροκυστίνες (MCs) (Christophoridis et al. 2018). Πρόκειται για ενδοτοξίνες που

απελευθερώνονται μετά τη λύση των κυττάρων αυξάνοντας την τοξικότητα των ανθίσεων (Saraf et al. 2018a). Οι μικροκυστίνες παράγονται σε παγκόσμια κλίμακα από τα γένη *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Oscillatoria* και *Plankothrix* (Hiskia et al. 2014), αλλά οφείλουν το όνομά τους στο ότι βρέθηκαν για πρώτη φορά σε κυανοβακτήρια του είδους *M. aeruginosa* (Codd et al. 2005). Οι μικροκυστίνες είναι μονοκυκλικά επταπεπτίδια που περιλαμβάνουν μία ασυνήθιστη β-αμινομάδα, την ADDA (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid (Boorathi & Ki 2014) η οποία και ευθύνεται για την τοξικότητά τους (Christophoridis et al. 2018) (Εικόνα 5-D).

Η φυσιολογική σημασία των μικροκυστινών για τα κυανοβακτήρια είναι μάλλον πολυδιάστατη. Επηρεάζουν σημαντικές διαδικασίες όπως η μεταγωγή σήματος (Dittmann et al. 2001), δρουν ως χηλικοί παράγοντες μεταλλικών ιόντων (Utkilen & Gjølme 1995), προσφέρουν προστασία από θηρευτές όπως το ζωοπλαγκτόν (Rohrlack et al. 2001) ή περιορίζουν την ανάπτυξη άλλων φωτοσυνθετικών οργανισμών (αλληλοπάθεια) (Pflugmacher 2002). Σχετικά με τις λειτουργίες τους μέσα στα κύτταρα των οργανισμών που τις παράγουν, συμμετέχουν στην αφομοίωση της ηλιακής ακτινοβολίας (Chorus & Welker 2021), στην αποθήκευση αζώτου σε περιόδους ανεπάρκειας αυτού και τέλος, στη δημιουργία αποικιών (Kehr et al. 2006).



Εικόνα 5. Ανθίσεις του *M. aeruginosa* (A-B). Κυτταρική αποικία του *M. aeruginosa* (C) και χημική δομή της μικροκυστίνης (D) (τροποποιημένη εικόνα από Boorathi & Ki 2014, Wilhelm et al. 2020).

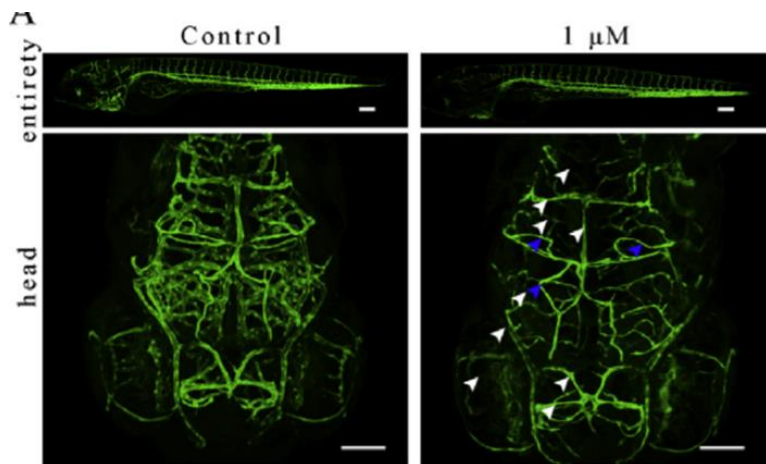
1.4 Μεθοδολογία μελέτης του των επιδράσεων του *M. aeruginosa* στους οργανισμούς

Οι αρνητικές επιπτώσεις των ανθίσεων του *M. aeruginosa* στους οργανισμούς έχουν μελετηθεί ερευνώντας τις επιδράσεις είτε της καθαρής MCLR, είτε του εκχυλίσματος των κυανοβακτηρίων από καλλιέργειες (Saraf et al. 2018b) ή από συλλογή δείγματος από το πεδίο (Papadimitriou et al. 2012). Η χρήση καθαρής τοξίνης MCLR περισσότερο ενδείκνυται σε επίπεδο τοξικολογικών μελετών, προστασίας της δημόσιας υγείας αλλά και κατανόησης των μηχανισμών δράσης των μικροκυστινών, με κυτταρικό ή μοριακό επίπεδο. Για μια οικοτοξικολογική μελέτη όμως, έχει μεγαλύτερο ενδιαφέρον η μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων από τα κυανοβακτήρια που παράγουν την MCLR, προσομοιάζοντας έτσι τις συνθήκες των κυανοβακτηριακών ανθίσεων. Μάλιστα, η επίδραση του εκχυλίσματος είναι πολύ πιο έντονη και δυσμενής για τους οργανισμούς από ότι η καθαρή τοξίνη, λόγω ενδεχομένως κάποιων άλλων μεταβολιτών που δρουν συνεργατικά με τις κυανοτοξίνες (Oberemm et al. 1997, Pietsch et al. 2001). Σε αυτές τις ουσίες περιλαμβάνονται ουσίες με δράση ανάλογη του ρετινοϊκού οξέος, οι οποίες εμπλέκονται σε μονοπάτια σηματοδότησης των αναπτυξιακών σταδίων των σπονδυλωτών (Jonas et al. 2015). Βιοενεργές ουσίες που μπορεί να βρίσκονται στα εκχυλίσματα του κυανοβακτηρίου σε συνδυασμό με τις μικροκυστίνες δυνητικά προκαλούν παραμορφώσεις στην ουρά, τη σπονδυλική στήλη, το στόμα, τη λέκιθο και την καρδιά των νυμφών των ιχθύων, συμβάλλοντας έτσι στην αύξηση της θνησιμότητάς τους (Pipal et al. 2019). Αναφορές έχουν γίνει επίσης και για την παρουσία οιστρογόνων ανάμεσα στις βιοενεργές ουσίες (Jonas et al. 2015), αλλά και λιπαρών οξέων ή λιποπολυσακχαριτών των κυανοβακτηρίων (Rogers et al. 2011). Γενικά, οι βιοενεργές ουσίες είναι γνωστό πως μπορούν να επηρεάζουν την έκφραση ποικιλίας γονιδίων στα οποία δεν παρεμβάλλεται η καθαρή MCLR (Rogers et al. 2011).

1.5 Επιδράσεις του *M. aeruginosa* στους ιχθύες

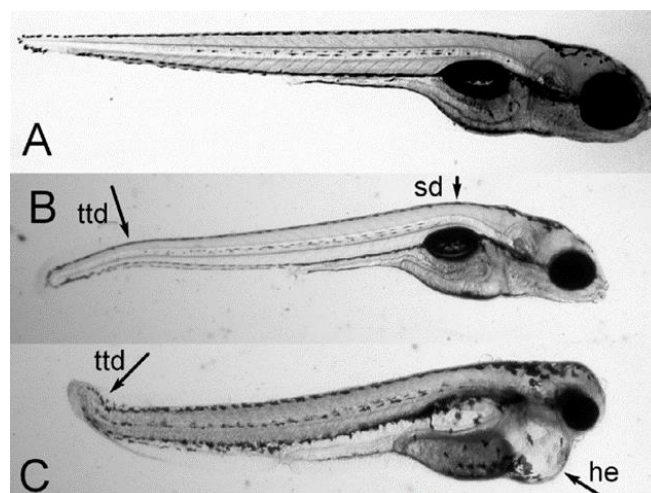
Οι επιδράσεις της MCLR στα ψάρια έχει μελετηθεί από πλήθος εργασιών της τελευταίας δεκαετίας. Η έμφαση έχει δοθεί στις άμεσες (*short-term effects*) αποκρίσεις των ψαριών έναντι σε θνησιγόνων ή σε υποθνησιγόνων επιπέδων (Zeng et al. 2014). Ως προς τα αναπτυξιακά στάδια που έχουν μελετηθεί, αυτά κυρίως αφορούν στο εμβρυϊκό και λεκιθοφόρο νυμφικό, λόγω του ότι αποτελούν την πιο ευαίσθητη περίοδο του κύκλου ζωής των ψαριών. Η ευαισθησία των σταδίων αυτών οφείλεται εν μέρει στη μειωμένη ικανότητα μετακίνησής τους στη στήλη του νερού, η οποία και καθιστά αδύνατη την αποφυγή μεγάλων συγκεντρώσεων της τοξίνης (Saraf et al. 2018b). Παράλληλα, έχοντας λεπτή επιδερμική στοιβάδα, μεγαλύτερη επιφάνεια σώματος σε σχέση με τον όγκο τους και μεγαλύτερο μεταβολικό ρυθμό, προσλαμβάνουν συγκριτικά ευκολότερα την τοξίνη στο σώμα τους (Song et al. 2011). Τέλος, το υποανάπτυκτο ανοσοποιητικό τους σύστημα και οι μικρής διαφοροποίησης

μηχανισμοί αποτοξικοποίησης (Wang et al., 2019) ενισχύουν περαιτέρω την ευαισθησία τους στις κυανοτοξίνες.



Εικόνα 6. Αναστολή της αγγειογένεσης σε στο κεφάλι και στο σώμα του zebrafish. Τα λευκά βέλη υποδεικνύουν απουσία και τα μπλε παραμορφώσεις αγγείων (τροποποιημένη εικόνα από Wang et al. 2019)

Η δράση της MCLR διαφέρει ανάλογα με το εξεταζόμενο αναπτυξιακό στάδιο, το είδος του ψαριού, καθώς και την μεθοδολογία χορήγησης της τοξίνης (Liu et al. 2001, Saraf et al. 2018, Wang et al. 2019). Έκθεση σε θνησιγόνα επίπεδα της MCLR κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια αναστέλλει την αγγειογένεση (Wang et al. 2019) (Εικόνα 6) και έχει νευροτοξική δράση, επηρεάζοντας τη συμπεριφορά των εκτεθειμένων οργανισμών μέσω της μείωσης που προκαλεί στα επίπεδα της ακετυλοχολίνης και ντοπαμίνης (Wu et al. 2016). Παραμορφώσεις της νωτοχορδής (Papadimitriou et al. 2012), περικαρδιακό οίδημα, αλλαγή του καρδιακού ρυθμού (Jonas et al. 2015), μείωση της γονιμότητας (Hou et al. 2016, Liu et al. 2018a) και της κολυμβητικής ικανότητας (Sergi et al. 2022) είναι κάποιες από τις επιπτώσεις που μπορεί να έχει η MCLR στα ψάρια.



Εικόνα 7. Νύμφες zebrafish στις 120 hpf. (A) φυσιολογική μορφολογία. (B, C) νύμφες μετά από έκθεση σε τοξίνη, με παραμορφώσεις νωτοχορδής ή και περικαρδιακό οίδημα (Jonas et al. 2015).

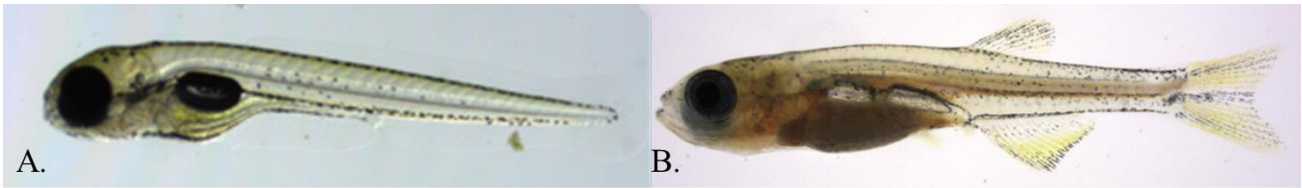
1.6 Οντογένεση του zebrafish

Ως οργανισμός μοντέλο στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε το zebrafish (*Danio rerio*). Πρόκειται για είδος του γλυκού νερού που χρησιμοποιείται ως οργανισμός μοντέλο στην αναπτυξιακή και μοριακή βιολογία, στην οικοτοξικολογία ή ακόμα και στη βιολογία των ιχθύων. Η οντογένεσή του είναι έχει περιγραφεί αναλυτικά για το σύνολο σχεδόν των συστημάτων (Kimmel et al. 1995, Parichy et al. 2009). Η οντογένεση στο zebrafish, αλλά και στα περισσότερα είδη ψαριών, μπορεί να χωριστεί στα εξής στάδια: στάδιο του εμβρύου (embryonic stage), στάδιο της λεκιθοφόρου νύμφης (yolk-sac larval stage), στο στάδιο της νύμφης (larval stage), στάδιο του ιχθυδίου (juvenile stage) και στο ενήλικο στάδιο (adult stage). Τα δύο πρώτα στάδια συνιστούν την αυτότροφη περίοδο, ενώ τα ακόλουθα την ετερότροφη (Kendall et al. 1984). Η διάρκεια του κάθε σταδίου καθώς και ο χρονισμός των οντογενετικών γεγονότων διαφέρει από είδος σε είδος και είναι σε άμεση εξάρτηση με το περιβάλλον, και ειδικά με τη θερμοκρασία (Christou et al. 2018, Kendall et al. 1984, Kimmel et al. 1995). Τα έμβρυα και οι λεκιθοφόρες νύμφες του zebrafish (Εικόνα 8) διαβιούν στο βένθος, και αποτελούν ίσως την πιο κρίσιμη περίοδο της ζωής του, κατά τη διάρκεια της οποίας σχηματίζεται το βασικό σωματικό πρότυπο και τα βασικά όργανα για την επιβίωση των νυμφών. Η έναρξη της ετερότροφης περιόδου συμπίπτει με την έναρξη της διαβίωσης στη στήλη του νερού (Kimmel et al. 1995).



Εικόνα 8. Α) Έμβρυο zebrafish αμέσως μετά την γονιμοποίηση. Β) Λεκιθοφόρος νύμφη zebrafish αμέσως μετά την εκκόλαψη (Kimmel et al., 1995).

Στην ετερότροφη περίοδο, η νύμφη έχει καταναλώσει τα λεκιθικά αποθέματα και αρχίζει να τρέφεται με πλαγκτονικούς οργανισμούς. Κατά τη διάρκεια του νυμφικού σταδίου έντονες μορφολογικές αλλαγές λαμβάνουν μέρος, όπως η ανάπτυξη του χρωματικού προτύπου του σώματος, των πτερυγίων και του σκελετού, της νηκτικής κύστης, του σχήματος του σώματος, των λεπιών κ.άλ. (Parichy et al. 2009) (Εικόνα 9). Η μεταμόρφωση (metamorphosis) αποτελεί μια πολύ σημαντική περίοδο για την οντογένεση των ψαριών, καθώς σηματοδοτεί το πέρασμα από το στάδιο της νύμφης στο στάδιο όπου τα άτομα αποτελούν μορφολογική μικρογραφία των ενηλίκων, χωρίς όμως την αναπαραγωγική ωρίμανση και τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου (Parichy et al. 2009).



Εικόνα 9. Α) zebrafish στο στάδιο της νόμφης, όπου έχουν καταναλωθεί τα λεκιθικά αποθέματα και έχει πληρωθεί η νηκτική κύστη με αέρα. Β) νόμφη zebrafish κοντά στην ολοκλήρωση της μεταμόρφωσης. (φωτογραφίες από την παρούσα εργασία)

Η έναρξη του ενήλικου σταδίου τοποθετείται στις ~90 dpf. Το ενήλικο στάδιο καθορίζεται από την ικανότητα παραγωγής γαμετών και την εμφάνιση των δευτερογενών φυλετικών χαρακτηριστικών (εμφανής κοιλιά στα θηλυκά και πιο επίμηκες σχήμα σώματος στα αρσενικά, κιτρινωπός χρωματισμός των αρσενικών) (Εικόνα 10). Τα τελευταία γίνονται ορατά μετά το μέγεθος των 17.5 ± 0.6 mm SL για τα αρσενικά και των 18.3 ± 0.7 mm SL για τα θηλυκά άτομα (Parichy et al. 2009).



Εικόνα 10. Α) Ενήλικο θηλυκό zebrafish. Β) Ενήλικο αρσενικό zebrafish. (φωτογραφίες από την παρούσα εργασία)

1.7 Κολυμβητική ικανότητα των ιχθύων

Η κολυμβητική ικανότητα είναι καθοριστική για την αρμοστικότητα και την επιβίωση των υδρόβιων οργανισμών (Cano-Barbacid et al. 2020). Παίζει καθοριστικό ρόλο στη διασπορά, μετανάστευση, επιλογή οικοτόπων, διατροφή και στην αναπαραγωγή (Wolter & Arlinghaus 2003). Η κολυμβητική ικανότητα διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες: την ικανότητα διαρκούς κολύμβησης (cruising ή sustained swimming), παρατεταμένης κολύμβησης (prolonged ή endurance swimming) και την ικανότητα για κολύμβηση εκτίναξης (burst swimming) (Videler 1993).

Η διαρκής κολύμβηση τροφοδοτείται με αερόβιο μεταβολισμό και μπορεί να διατηρηθεί για μεγάλα χρονικά διαστήματα, ενώ η κολύμβηση εκτίναξης είναι αναερόβια (Beamish 1978). Η παρατεταμένη κολύμβηση τροφοδοτείται από αερόβιο και σε ένα μικρό βαθμό από αναερόβιο μεταβολισμό. Μετά την εργασία του Brett (1967), πολλοί συγγραφείς επέλεξαν την μέτρηση της κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης (U_{crit}), ως μια καλή εκτίμηση της παρατεταμένης κολυμβητικής ικανότητας. Η U_{crit} επηρεάζεται από το σχήμα, το ολικό μήκος και το βάρος του σώματος (Cai et al. 2020). Η πειραματική μεθοδολογία είναι επίσης πολύ σημαντική για την εκτίμηση της U_{crit} , με τη χρονική περίοδο αύξησης και το βήμα αύξησης της ταχύτητας να επηρεάζουν σημαντικά την απόδοση των ψαριών. Όταν οι

παραπάνω συνθήκες είναι σταθερές αυτό που μπορεί να επηρεάσει την κολυμβητική ικανότητα είναι οι περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η θερμοκρασία, το pH, η αλατότητα ή η διατροφή (Randall & Brauner 1991, Koumoundouros et al. 2002, Kourkouta et al. 2021) και το οντογενετικό στάδιο (Koumoundouros et al., 2009) ενώ πολλές φορές υπεύθυνοι για την μείωση της U_{crit} μπορεί να είναι διάφοροι ρύποι όπως μέταλλα, θρεπτικά, πετρελαιοειδή, μικροπλαστικά ή νανο-υλικά (Hicken et al. 2011, Bobori et al., 2020, Cano-Barbacil et al. 2020, Dimitriadi et al., 2021).

Η κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης έχει χρησιμοποιηθεί και ως δείκτης της λειτουργίας και της δομής της καρδιάς σε διάφορα είδη ψαριών, συμπεριλαμβανομένου του zebrafish, εργασίες όπως αυτή των Hicken et al. (2011), Incardona et al. (2015), G. Liu et al. (2018b), Dimitriadi et al. (2018).

1.8 Γονιμότητα των ιχθύων

Τα ψάρια χαρακτηρίζονται από πολλά διαφορετικά πρότυπα αναπαραγωγής τα οποία έχουν προσαρμοστεί και εξελιχθεί ανάλογα με τις απαιτήσεις κάθε είδους. Η θερμοκρασία ανάπτυξης είναι ένας παράγοντας που επιδρά στην αναπαραγωγή (Dimitriadi et al. 2018) όπως και η φωτοπερίοδος (Pankhurst & Porter 2003) και η διαθεσιμότητα τροφής (Donelson et al. 2010). Εκτός από τη θερμοκρασία, τη φωτοπερίοδο και τη διαθεσιμότητα τροφής, άλλοι παράγοντες που επιδρούν στους αναπαραγωγικούς χαρακτήρες είναι η πυκνότητα του πληθυσμού, η υποξία, ρύποι και το μέγεθος των γονέων (Uusi-Heikkilä et al. 2012, Jonsson & Jonsson 2014, Liu et al., 2018b) Στα ψάρια, το περιβάλλον πρώιμης ανάπτυξης έχει αποδειχθεί να επιδρά στην αρμοστικότητα και την αναπαραγωγική επιτυχία των ψαριών επηρεάζοντας χαρακτήρες όπως η αναλογία φύλου, το μέγεθος των αβγών, η γονιμότητα και η ηλικία πρώτης αναπαραγωγικής ωρίμανσης (Dimitriadi et al. 2018, Jonsson and Jonsson, 2014).

1.9 Σκοπός παρούσας εργασίας

Συνοψίζοντας, γνωρίζουμε ότι ο ευτροφισμός σε συνδυασμό με την κλιματική αλλαγή συμβάλλουν στην επιδείνωση του προβλήματος των κυανοβακτηριακών ανθίσεων (Codd et al. 2005, Paerl 2014), με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται μεγάλες ποσότητες κυανοτοξινών στο υδρόβιο περιβάλλον. Για το λόγο αυτό, έχει διεξαχθεί πλήθος εργασιών αναφορικά με τις επιπτώσεις της μικροκυστινών στα ψάρια, αλλά και στα θηλαστικά ή αμφίβια. Οι περισσότερες από αυτές τις εργασίες μελετούν την άμεση επίδραση της τοξίνης στους εξεταζόμενους οργανισμούς, ενώ μελετούν κυρίως την δράση της καθαρής MCLR και όχι των εκχυλισμάτων κυανοβακτηρίων. Παρά το ότι σήμερα είναι γνωστό ότι οι

επιδράσεις των εκχυλισμάτων στους εξεταζόμενους οργανισμούς είναι πιο ισχυρή από εκείνες της καθαρής MCLR (Rogers et al. 2011, Jonas et al. 2015, Saraf et al. 2018b).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Hicken et al. (2011), η έκθεση εμβρύων zebrafish σε πολύ μικρές (υποθησιγόνες) συγκεντρώσεις πετρελαιοειδών οδήγησε σε σημαντικές μόνιμες αλλαγές του σχήματος της καρδιάς και σε αρνητικές επιπτώσεις για την κολυμβητική ικανότητα των ενηλίκων. Αυτή η πρωτότυπη μελέτη για τις μακροχρόνιες επιπτώσεις ρύπων, αλλά το ότι τα νεαρά στάδια των ιχθύων είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στις κυανοτοξίνες (Saraf et al. 2018b) αποτέλεσαν τη βάση για το σχεδιασμό της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής. Ταυτόχρονα συνυπολογίστηκαν και τα αποτελέσματα των Sergi et al. (2022), οι οποίοι έδειξαν ότι η έκθεση των εμβρύων zebrafish σε υποθησιγόνα επίπεδα εκχυλίσματος *M. aeruginosa* έχει παρόμοιες επιπτώσεις με εκείνες των Hicken et al. (2011) για τα πετρελαιοειδή.

Έτσι, στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνήσει το κατά πόσο η έκθεση εμβρύων ή λεκιθοφόρων νυμφών zebrafish σε υποθησιγόνα επίπεδα εκχυλίσματος του κυανοβακτηρίου *M. aeruginosa* έχει επιπτώσεις για τη δομή και λειτουργία των ψαριών στα επόμενα στάδια της ζωής τους. Στο πρώτο ερώτημα που τέθηκε, η έκθεση πραγματοποιήθηκε κατά το εμβρυϊκό στάδιο και τρεις περίπου μήνες αργότερα ελέγχθηκε η επίδρασή της στη σχετική γονιμότητα των ενήλικων θηλυκών. Στο δεύτερο ερώτημα που εξετάστηκε, η έκθεση πραγματοποιήθηκε κατά το λεκιθοφόρο νυμφικό στάδιο και ένα μήνα περίπου αργότερα ελέγχθηκε η επίδρασή της στην κολυμβητική ικανότητα, στο σχήμα της καρδιάς και στη δομή του σκελετού των μεταμορφούμενων νυμφών. Τα αποτελέσματα του δεύτερου ερωτήματος, συνδυαζόμενα με τα αποτελέσματα των (Sergi et al. 2022) αποσκοπούσαν στο να απαντήσουν το αν οι λεκιθοφόρες νύμφες (δεν έχουν ποια την προστασία του χορίου αλλά είναι ακόμα αυτότροφο και μη ενεργητικό στάδιο του οργανισμού) είναι το ίδιο ή λιγότερο ευαίσθητες με τα έμβρυα στην έκθεση σε υποθησιγόνες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος *M. aeruginosa*.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Παρασκευή εκχυλίσματος *M. aeruginosa*

Για την παρασκευή του εκχυλίσματος *M. aeruginosa* χρησιμοποιήθηκαν 240 mg ξηρής μάζας από καλλιέργεια του κυανοβακτηρίου διαλυμένα με nanopure νερό με αναλογία πέντε προς ένα. Η τελική συγκέντρωση του εκχυλίσματος που εκτέθηκαν τα έμβρυα ήταν 200 mg ξηρής μάζας L⁻¹. Η συγκέντρωση της MC-LR στο εκχύλισμα ήταν 0,86 mg L⁻¹, όπως αυτή εκτιμήθηκε από το Εργαστήριο Περιβαλλοντικών Αναλύσεων του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης & Νανοτεχνολογίας του Δημόκριτου (Sergi et al. 2022).

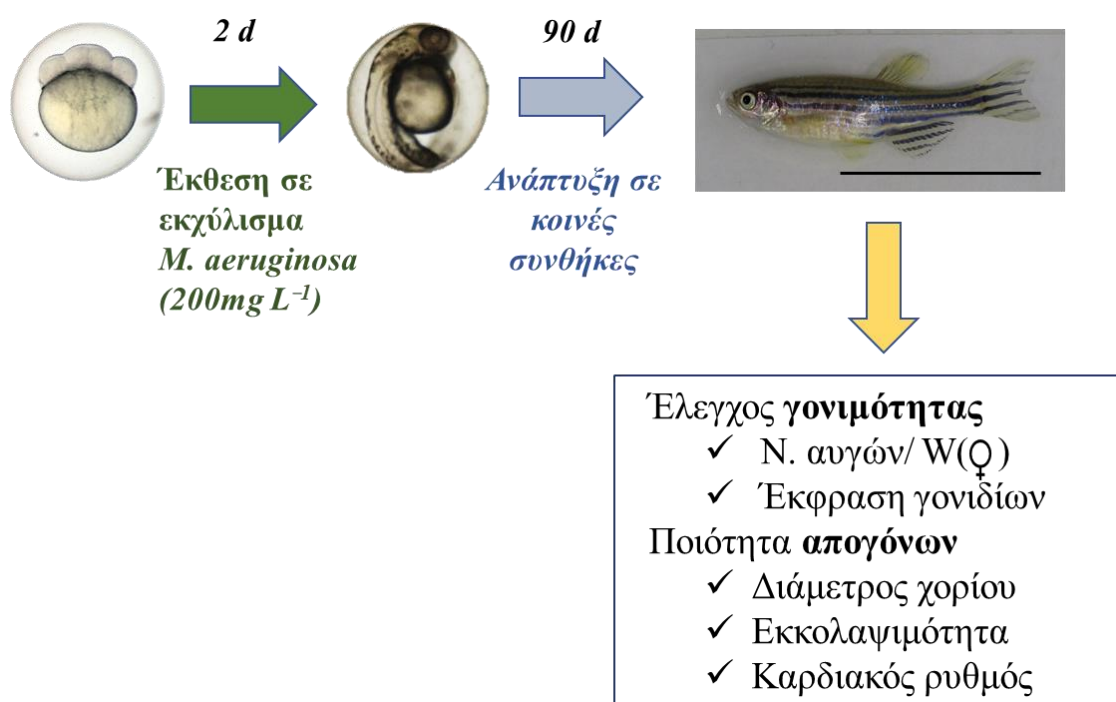
Για τη διαδικασία παρασκευής του εκχυλίσματος, ακολουθήθηκε η μέθοδος των (Ács et al. 2013). Πιο συγκεκριμένα, η ξηρή μάζα των κυττάρων των κυανοβακτηρίων ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας, ενυδατώθηκε με nanopure νερό με αναλογία πέντε προς ένα, και υποβλήθηκε σε τρεις κύκλους παγώματος (-80°C) και ξεπαγώματος με σκοπό τη διάρρηξη των κυττάρων. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκαν στο διάλυμα 8 κύκλοι υπερήχων των 20 δευτερολέπτων (υπό χαμηλή θερμοκρασία σε τρήμα πάγου) ώστε να διαρρηχθούν πλήρως τα κύτταρα των κυανοβακτηρίων. Το τελικό διάλυμα με τα διαρρηγμένα κύτταρα φυγοκεντρήθηκε για 20 λεπτά στα 12.000 g, σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (4°C). Ακολούθως απομονώθηκε το υπερκείμενο διάλυμα που περιείχε την τοξίνη MC-LR και άλλες βιοενεργές ενδοκυτταρικές ουσίες. Το υπερκείμενο υποβλήθηκε ακολούθως διαδοχικά σε διήθηση με φίλτρα διαμέτρου 1 μm, 0.45 μm και 0.02 μm, για να καθαριστεί πλήρως από ανεπιθύμητα υπολείμματα των κυττάρων. Τελικά, το διάλυμα χωρίστηκε σε δόσεις και καταψύχθηκε στους -20 °C.

2.2 Πειράματα έκθεσης των εμβρύων zebrafish σε υποθνησιγόνα επίπεδα εκχυλίσματος του κυανοβακτηρίου *M. aeruginosa*. Εκτίμηση των επιπτώσεων της έκθεσης στη γονιμότητα των ενήλικων θηλυκών

Γονιμοποιημένα αυγά *D. rerio* συλλέχθηκαν από κοινό απόθεμα γεννητόρων άγριου τύπου (ZF WT2 F18, Wageningen Agricultural University, The Netherlands) δύο ώρες μετά τη γονιμοποίηση, στο στάδιο του βλαστιδίου. Τα αυγά διαχωρίστηκαν σε δύο ομάδες, την ομάδα ελέγχου όπου η συγκέντρωση εκχυλίσματος ήταν 0 mg ξ.μ. L⁻¹ και την ομάδα έκθεσης σε συγκέντρωση 200 mg ξ.μ. L⁻¹. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για τα διαλύματα ήταν νερό που προήλθαν οι γεννήτορες. Για κάθε συνθήκη πραγματοποιήθηκαν τρεις τεχνικές επαναλήψεις όπου για κάθε επανάληψη χρησιμοποιήθηκαν 200 αυγά ενώ το πείραμα πραγματοποιήθηκε δύο φορές για τη μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Όλα τα πειράματα έγιναν σε θερμοκρασία 28 °C, αγωγιμότητα 500-

600 $\mu\text{S cm}^{-1}$ και συνεχή παροχή φυσαλίδων αέρα έτσι ώστε ο κορεσμός του οξυγόνου στο νερό να είναι μεγαλύτερος από 90% (Sergi et al., 2022).

Κάθε 12 ώρες, τα αυγά μεταφέρονταν σε καινούρια διαλύματα των δύο συνθηκών και μετρούνταν οι αβιοτικοί παράγοντες (O_2 , θερμοκρασία, pH, αγωγιμότητα) και η θνησιμότητα. Τα αυγά παρέμειναν στις συνθήκες αυτές μέχρι πριν την εκκόλαψη, δηλαδή για 48 ώρες μετά τη γονιμοποίηση (hrf). Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε κοινό περιβάλλον ανάπτυξης και καθαρό νερό. Στις κοινές συνθήκες τα άτομα που εκκολάφθηκαν παρέμειναν για διάστημα τριών μηνών, οπότε και εξετάστηκε κι η γονιμότητα των θηλυκών ατόμων και έπειτα η ποιότητα των απογόνων (Εικόνα 11). Η εκτροφή των νυμφών και ιχθυδίων, καθώς και η διαχείριση των γεννητόρων έγινε σύμφωνα με τη μεθοδολογία των (Sergi et al., 2022).

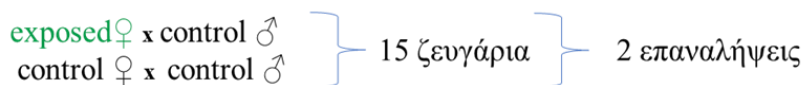


Εικόνα 11. Σχεδιασμός της πρώτης πειραματικής σειράς.

2.2.1 Έλεγχος σχετικής γονιμότητας θηλυκών ατόμων και ποιότητας απογόνων

Για τον έλεγχο της γονιμότητας των θηλυκών ατόμων ακολουθήθηκε η μεθοδολογία των Uusi-Heikkilä et al. (2012). Για κάθε συνθήκη και πειραματική επανάληψη (δύο επαναλήψεις) επιλέχθηκαν 15 ζευγάρια ενηλίκων ατόμων. Κάθε ζευγάρι της συνθήκης ελέγχου αποτελούνταν από ένα θηλυκό και αρσενικό άτομο που δεν είχαν εκτεθεί προηγουμένως στο εκχύλισμα *M. aeruginosa*. Κάθε ζευγάρι

της δεύτερης ομάδας αποτελούνταν από ένα θηλυκό άτομο που προηγουμένως είχε εκτεθεί στο εκχύλισμα και ένα αρσενικό από την ομάδα ελέγχου (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Σύσταση των ζευγαριών αναπαραγωγής για τον έλεγχο της γονιμότητας.

Μετά τη σύστασή τους, τα ζευγάρια έμειναν για δυο ημέρες απομονωμένα χωρίς κανένα χειρισμό, ώστε να εγκλιματιστούν στις νέες συνθήκες. Την 3^η ημέρα σε κάθε ενυδρείο τοποθετήθηκαν συλλέκτες αυγών. Την 4^η ημέρα το πρωί ξεκίνησε η ημερήσια συλλογή, φωτογράφιση και καταμέτρηση των αυγών από κάθε ζευγάρι. Η φωτογράφιση έγινε με ψηφιακή μηχανή (Canon PowerShot G9) και η καταμέτρηση με τη βοήθεια του προγράμματος tpsDig. Την 8^η ημέρα (5^η ημέρα ωοτοκίας) ολοκληρώθηκε η καταγραφή των αυγών, οπότε και φωτογραφήθηκαν και ζυγίσθηκαν τα άτομα κάθε ζευγαριού. Ζευγάρια που δεν έδωσαν καμία από της πέντε ημέρες αυγά δεν συμπεριλήφθηκαν στους μέσους όρους των μετρήσεων. Η σχετική γονιμότητα κάθε θηλυκού ατόμου υπολογίσθηκε με βάση το λόγο του αριθμού των αυγών που εναπόθεσε στη διάρκεια των πέντε ημερών προς το βάρος του σώματός του.

2.2.2 Μοριακή ανάλυση RT-qPCR για τη μελέτη γονιδιακής έκφρασης

Στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν γονίδια που εμπλέκονται στη διαδικασία της ωρίμανσης των ωαρίων και εκφράζονται είτε στον ωοθηκικό ιστό τα *fshr*, *bmp15* (*fshr* -γονίδιο του υποδοχέα της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης, follicle-stimulating hormone, FSH, *bmp15* -ρυθμιστικό ρόλο στην ωρίμανση ωαρίων στις γονάδες του zebrafish, bone morphogenetic protein-15), είτε στον ηπατικό τα *vtg1*, *vtg2* (vitellogenin 1-βιτελλογενίνη 1, vitellogenin 2-βιτελλογενίνη 2) και το *cyp1a* (γονίδιο που συμβάλει στην αποτοξικοποίηση των ιστών, cytochrome P450, family 1, subfamily A (Choi et al. 2004, Zhao et al. 2015, Liu et al. 2018b, Tan et al. 2008). Ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τα *actinb1* και *gapdh*.

Πραγματοποιήθηκε μια σειρά διαδικασιών με σκοπό την τελική ποσοτική ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης με την μέθοδο της RT-qPCR. Μετά το τέλος του ελέγχου γονιμότητας, τα θηλυκά άτομα θανατώθηκαν με παγόνερο και αμέσως μετά πραγματοποιήθηκε εκτομή δείγματος γονάδων του ήπατος. Οι ιστοί πάγωσαν με υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C. Για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 2-4 άτομα ανά πειραματική ομάδα και επανάληψη (5-7 ανά ομάδα και συνθήκη). Οι εκκινητές (primers) των γονιδίων στόχων σχεδιάστηκαν με τη

βοήθεια του Primer3 λογισμικού. Οι εκκινητές (primers) είναι ολιγονουκλεοτίδια 18-30 βάσεων που οριοθετούν το τμήμα DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Οι αλληλουχίες των εκκινητών (reverse και forward primers) καθώς και το μέγεθος τους (amplicon size) απεικονίζονται στον Πίνακα 1 και επιλέχθηκαν με βάση τις εργασίες των Gioacchini et al. (2010), Hou et al. (2016a), Liu et al. (2018b) και Teng et al. (2020).

Το ολικό RNA απομονώθηκε με τη χρήση του TRIZOL buffer, και υποβλήθηκε σε περαιτέρω καταστροφή των υπολειμμάτων DNA με το ένζυμο Turbo DNase. Για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων πραγματοποιήθηκε quantitative real-time PCR (RT-qPCR). Σαν πρώτο βήμα έγινε η σύνθεση cDNA με την μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription PCR, RT-PCR) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του PrimeScript RT reagent kit της εταιρείας Takara. Η κάθε αντίδραση της qPCR έγινε σε τελικό όγκο 10 μ l, τα οποία αποτελούνταν από 5 μ l SyberMix (2x, KAPA Fast qPCR Kit, Kapa Biosystems), 0,2 μ l διαλύματος από κάθε εκκινητή (reverse και forward), 4,4 μ l RNA-free H₂O και 0,2 μ l από κάθε δείγμα που έχει προκύψει μετά την RT-PCR. Ως αρνητικοί μάρτυρες (negative control) χρησιμοποιήθηκαν οι αντιδράσεις που δεν περιείχαν υπόστρωμα στην RT-PCR. Οι αντιδράσεις έγιναν δυο φορές για κάθε υπό εξέταση δείγμα. Η τελική αντίδραση της RT-qPCR πραγματοποιήθηκε στο θερμικό κυκλοποιητή CFX Connect Real-Time PCR Detection System της BIO-RAD. Ο αριθμός των κύκλων Ct (threshold cycle, η τιμή που αντιστοιχεί στον κύκλο κατά τον οποίο η τιμή του φθορισμού προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο) υπολογίστηκε από τα επίπεδα έκφρασης του φθορισμού για την κάθε αντίδραση.

Πίνακας 1. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν. Δίνεται το μέγεθός τους και ο κωδικός τους στο NCBI.

Primer	Forward primer (5' – 3')	Reverse primer (5' – 3')	NCBI	Amplicon Size (bp)
<i>actb1</i>	GATGCGGAAACTGGCAAAGG	GAGGAGGGCAAAGTGGTAAACG	NM_131031.2	117
<i>gapdh</i>	GATGGTCATGCAATCACAGTCTA	ATCATACTTGGCAGGTTTCTCAA	NM_001115114.1	561
<i>fshr</i>	CGTCTCTTTTGTGCACTGGA	GTGGCAATCCACACTTCCT	NM_001001812.1	181
<i>bmp15</i>	AGGGTGACCGGATCACTATG	TGCTGCCAGACTTTTATAGACC	NM_001020484.1	291
<i>vtg1</i>	GATTAAGCGTACACTGAGACCA	AGCCACTTCTTGTCCAAATACT	XM_009296387.2	100
<i>vtg2</i>	TACTTTGGGCACTGATGCAA	AGACTTCGTGAAGCCCAAGA	NM_001110384.1	152
<i>cyp1a</i>	AGGACAACATCAGAGACATCACCG	CACTAGATAGACAACCGCCAGG	NM_131879.2	179

Τα αποτελέσματα της Real Time PCR αναλύθηκαν με τη μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης (Relative Quantification). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη σύγκριση των Ct τιμών του γονιδίου στόχου με τις Ct τιμές του γονιδίου αναφοράς (μέθοδος $2^{-\Delta'CT}$) (Livak & Schmittgen 2001). Αρχικά, υπολογίστηκε η διαφορά της Ct τιμής του γονιδίου στόχου από τη Ct τιμή του γονιδίου αναφοράς:

$$\Delta'CT = CT_{\text{γονιδίου στόχου}} - CT_{\text{γονιδίου αναφοράς}}$$

όπου, ως CT γονιδίου αναφοράς χρησιμοποιήθηκε ο γεωμετρικός μέσος όρος των CT των *actinb1* και *gapdh*. Τα αποτελέσματα της έκφρασης των γονιδίων εκφράστηκαν ως μέση τιμή του $2^{-\Delta'CT} + 1$ SEM, ενώ υπολογίστηκε και η σχετική αναλογία έκφρασης (*Fold Change*) μεταξύ των δύο πειραματικών συνθηκών.

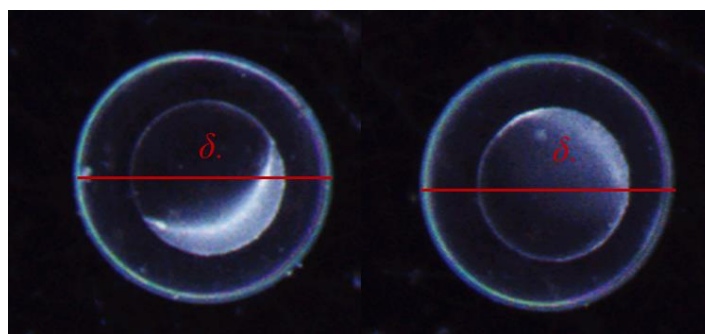
$$Fold\ Change = \frac{average\ \{2^{-\Delta'CT}\ (\text{του δείγματος προς εξέταση})\}}{average\ \{2^{-\Delta'CT}\ (\text{του δείγματος αναφοράς})\}}$$

Η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των δύο ομάδων έγινε με ANOVA (επί των τιμών των $2^{-\Delta'CT}$), αφού προηγουμένως ελέγχθηκαν οι προϋποθέσεις της ομοιογένειας των διακυμάνσεων (Levene test) και η κανονική κατανομή των δεδομένων (Kolmogorov-Smirnov test). Στις περιπτώσεις όπου οι προϋποθέσεις δεν καλύπτονταν χρησιμοποιήθηκε το μη παραμετρικό Mann-Whitney U test.

2.2.3 Έλεγχος ποιότητας απογόνων

Ελέγχθηκε η διάμετρος του χορίου, η εκκολαψιμότητα και ο καρδιακός ρυθμός των εμβρύων των θηλυκών από τις διαφορετικές συνθήκες αρχικής έκθεσης σε εκχύλισμα *M. aeruginosa*.

Η διάμετρος του χορίου υπολογίστηκε σε 600 αυγά ανά συνθήκη από τα ζεύγη γεννητόρων (κάθε πειραματικής συνθήκης και επανάληψης) της ενότητας 2.2.1, με φωτογραφίες σε στερεοσκόπιο, με την βοήθεια του προγράμματος ImageJPro-Plus (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Αυγά zebrafish 4 ώρες μετά την γονιμοποίηση. Αυτοματοποιημένη μέτρηση της διαμέτρου (δ) του χορίου με το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε.

Για τον έλεγχο του καρδιακού ρυθμού, χρησιμοποιήθηκαν τα έμβρυα από 5 ζεύγη γεννητόρων (κάθε πειραματικής συνθήκης και επανάληψης) της ενότητας 2.2.1. Από την ωτοκία κάθε ζευγαριού λήφθηκαν 50 αυγά τα οποία διατηρήθηκαν σε σταθερές και κοινές συνθήκες (100 ml όγκο νερού, 28 °C). Ο καρδιακός ρυθμός υπολογίστηκε λίγο πριν την εκκόλαψη των εμβρύων (48 hpf) με την λήψη βίντεο (διάρκειας 15 sec) με ψηφιακή μηχανή στερεοσκοπίου και το πρόγραμμα INFINITY CAPTURE. Στη συνέχεια καταμετρήθηκαν οι καρδιακοί παλμοί, με αναγωγή στο 1 λεπτό. Η μέτρηση

έγινε για 20 έμβρυα (4 έμβρυα από κάθε ζεύγος γεννητόρων) ανά συνθήκη και ανά πειραματική επανάληψη. Η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των δύο ομάδων έγινε με ANOVA, αφού προηγουμένως ελέγχθηκαν οι προϋποθέσεις της ομοιογένειας των διακυμάνσεων (Levene test) και η κανονική κατανομή των δεδομένων (Kolmogorov-Smirnov test).

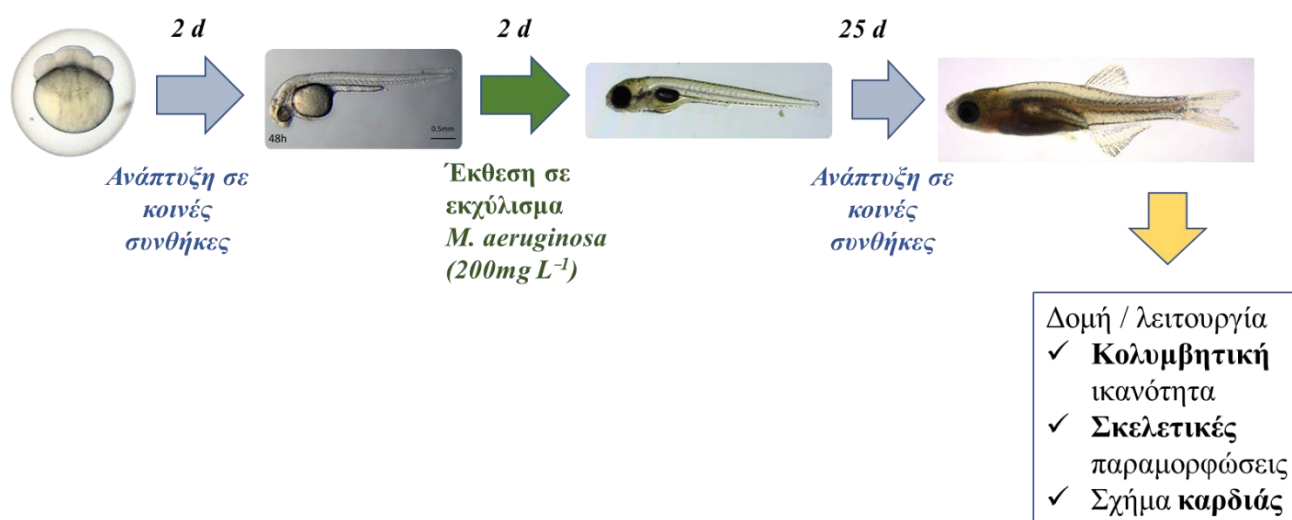
Η επίδραση των πειραματικών συνθηκών στο ρυθμό εμβρυϊκής ανάπτυξης των απογόνων ελέγχθηκε με παρακολούθηση του χρόνου εκκόλαψης ενός τυχαίου δείγματος 180 εμβρύων από κάθε πειραματική συνθήκη και επανάληψη. Τα έμβρυα προήλθαν από την μαζική ωοτοκία πληθυσμού 10 γεννητόρων (αναλογία φύλου 1:1) από κάθε πειραματική συνθήκη και επανάληψη. Η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή στους $28,0 \pm 0,3$ και καταγράφονταν κάθε δώδεκα ώρες. Η καταγραφή των εκκολάψεων άρχισε στις 48 hpf και γίνονταν κάθε δύο ώρες για το διάστημα 48-60 hpf και 72-76 hpf. Για τη διευκόλυνση της καταγραφής, τα έμβρυα επώαστηκαν ανά ομάδες των 15 ατόμων σε well-plates με πυκνότητα 1 άτομο ανά ml. Η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των μέσων τιμών των δύο ομάδων ελέγχθηκε με το μη παραμετρικό Mann-Whitney U test.

2.3 Πειράματα έκθεσης των λεκιθοφόρων νυμφών zebrafish σε υποθνησιγόνα επίπεδα εκχυλίσματος του κυανοβακτηρίου *M. aeruginosa*. Εκτίμηση των επιπτώσεων της έκθεσης στην κολυμβητική ικανότητα των μεταμορφούμενων νυμφών

Ακολουθήθηκε όμοια διαδικασία λήψης εμβρύων και έκθεσης στο εκχύλισμα *M. aeruginosa* με εκείνη της ενότητας 2.2. Στην παρούσα ενότητα ωστόσο η έκθεση έγινε κατά το λεκιθοφόρο νυμφικό στάδιο. Για την εύρεση των υποθνησιγόνων επιπέδων του εκχυλίσματος για αυτό το αναπτυξιακό στάδιο, προηγήθηκε μια προκαταρκτική σειρά πειραμάτων όπου ελέγχθηκε η θνησιμότητα των λεκιθοφόρων νυμφών σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις (0, 100, 200 και 400 mg ξ.μ. L⁻¹) εκχυλίσματος *M. aeruginosa*. Τα αποτελέσματα έδειξαν μη σημαντικές επίδραση των εκχυλισμάτων στην επιβίωση των νυμφών, σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων που ελέγχθηκε (βλ. § 3.2.1). Προκειμένου ωστόσο να είναι εφικτή η σύγκριση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας (έκθεση κατά το λεκιθοφόρο νυμφικό στάδιο) με εκείνα των Sergi et al. (2022), έκθεση κατά το εμβρυϊκό στάδιο, επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 200 mg ξ.μ. L⁻¹.

Γονιμοποιημένα αυγά zebrafish συλλέχθηκαν από κοινό απόθεμα γεννητόρων άγριου τύπου (ZF WT2 F18, Wageningen Agricultural University, The Netherlands). Πέντε ώρες περίπου μετά την ωοτοκία, 500 γονιμοποιημένα έμβρυα συλλέχθηκαν και επώαστηκαν στους 28 °C μέχρι το 50% των ατόμων να έχει εκκολαφθεί (48-50 hpf). Ακολούθως, 300 λεκιθοφόρες νύμφες διαχωρίστηκαν σε δύο ομάδες των 150 ατόμων. Η μια ήταν η ομάδα αναφοράς όπου η συγκέντρωση του εκχυλίσματος *M. aeruginosa*

ήταν $0 \text{ mg } \xi.\mu. \text{ L}^{-1}$, ενώ η άλλη ήταν η ομάδα έκθεσης όπου η συγκέντρωση του εκχυλίσματος *M. aeruginosa* ήταν $200 \text{ mg } \xi.\mu. \text{ L}^{-1}$. Εκεί συνέχισαν την ανάπτυξη τους μέχρι και την κατανάλωση των λεκιθικών αποθεμάτων (96 hpf, 28°C). Κάθε 12 ώρες, κατά τη διάρκεια της έκθεσης, καταγράφονταν οι αβιοτικές συνθήκες (θερμοκρασία, pH, αγωγιμότητα, κορεσμός οξυγόνου) και η θνησιμότητα, ενώ ακολούθως πραγματοποιούνταν αλλαγή των διαλυμάτων έκθεσης. Εφαρμόστηκε συνεχής παροχή φυσαλίδων αέρα στα μέσα έκθεσης, έτσι ώστε ο κορεσμός του οξυγόνου στο νερό να διατηρείται πάνω από 90%. Στο τέλος της έκθεσης, οι νύμφες μεταφέρθηκαν σε κοινές συνθήκες, όπου και αναπτύχθηκαν για περίπου 25 ημέρες. Ακολούθησε ο έλεγχος της δομής και λειτουργίας μεταμορφούμενων νυμφών (Εικόνα 14). Η εκτροφή των νυμφών έγινε σύμφωνα με τη μεθοδολογία των Sergi et al., 2022. Τα πειράματα έγιναν σε δύο επαναλήψεις.



Εικόνα 14. Σχεδιασμός της δεύτερης πειραματικής σειράς.

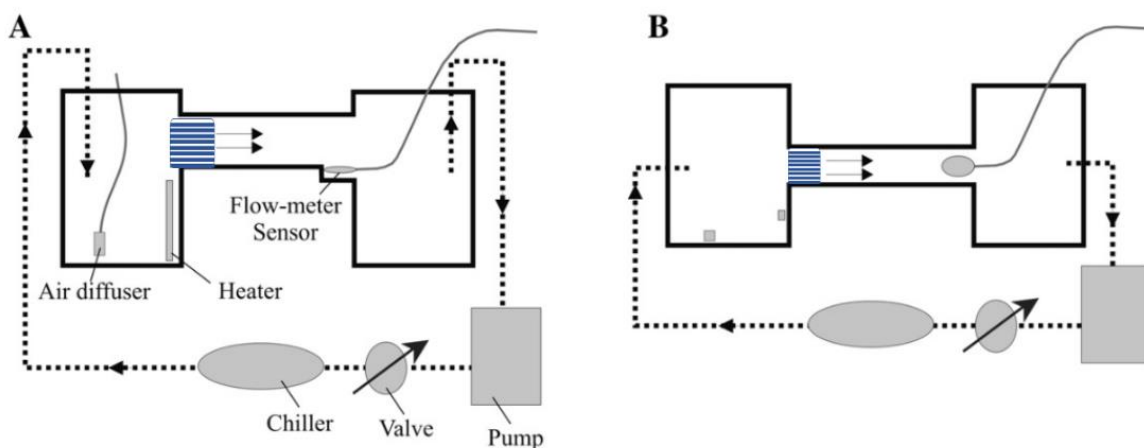
2.3.1 Έλεγχος της κολυμβητικής ικανότητας των μεταμορφούμενων νυμφών

Τα πειράματα για τον έλεγχο της αερόβιας κολυμβητικής ικανότητας μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας έκθεσης έγιναν σε μεταμορφούμενες νύμφες $12,5 \pm 0,9 \text{ mm}$ ολικού μήκους (TL). Πραγματοποιήθηκαν δύο πειραματικές επαναλήψεις εκτίμησης της κολυμβητικής ικανότητας από 10 με 12 άτομα ανά πειραματική ομάδα (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Μέσος ολικό μήκος (TL) και αριθμός των ατόμων (N) από κάθε συνθήκη και πειραματική επανάληψη που συμμετείχαν στα πειράματα εκτίμησης της κολυμβητικής ικανότητας.

Πειραματική επανάληψη	Συγκέντρωση εκχυλίσματος MA (mg ξ.μ. L ⁻¹)	TL (σε mm, ±SD)	N
A	0	12,7±1,2	12
	200	12,7±0,7	12
B	0	12,2±0,8	10
	200	12,6±1,1	12
Συνολικά	0	12,4±1,0	22
	200	12,7±0,9	24

Για τη μελέτη της επίδρασης των υποθνησιγόνων επιπέδων του εκχυλίσματος *M. aeruginosa* στην αερόβια κολυμβητική ικανότητα εκτιμήθηκε η κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης (U_{crit}). Ο υπολογισμός αυτός πραγματοποιήθηκε σε ειδικά σχεδιασμένη κολυμβητική συσκευή (Koumoundouros et al. 2002, 2009, Dimitriadi et al. 2018) (Εικόνα 15), η οποία έχει ένα κανάλι κολύμβησης με διαστάσεις μήκους-πλάτους-ύψους 70 X 5 X 10 cm. Το κανάλι αυτό συνδέεται με δύο δεξαμενές κλειστού τύπου 30 λίτρων. Με τη χρήση αντλιών ρυθμιζόμενης ροής (EHEIM, Model 2217) το νερό μεταφέρεται από τη μία δεξαμενή στην άλλη διαμέσου του καναλιού. Η ταχύτητα της ροής του νερού μέσα στο κανάλι κολύμβησης καταγράφονταν από έναν ηλεκτρομαγνητικό ρευματογράφο (Valeport, Model 801). Δύο αντιστάσεις (FLUVAL tronic, 300 W) διατηρούσαν τη θερμοκρασία σταθερή στους 28°C, ενώ υπήρχε συνεχής παροχή οξυγόνου με χρήση αντλίας αέρα. Για τη διατήρηση της ελασματικής ροής τοποθετήθηκαν πλαστικά καλαμάκια στο πρόσθιο μέρος του καναλιού, ενώ ταυτόχρονα το ύψος του νερού στο κανάλι διατηρούνταν στα 5 cm. Επιπλέον, τα καλαμάκια καλύπτονταν με δίχτυ μικρού ανοίγματος για την πρόληψη της διαφυγής των ατόμων από το κανάλι.



Εικόνα 15. Ειδικά σχεδιασμένη κολυμβητική συσκευή A) πλάγια όψη, B) κάτοψη (Koumoundouros et al. 2009)

Πριν την εκτίμηση της κολυμβητικής ικανότητας, το ολικό μήκος κάθε ατόμου μετριοταν ώστε να εφαρμοστεί κατάλληλα το βήμα αύξησης της ταχύτητας στο κανάλι ροής. Στις μετρήσεις δεν συμπεριλήφθηκαν άτομα με εμφανείς σκελετικές δυσπλασίες (πχ. σκολίωση ή λόρδωση). Όλες οι νύμφες υποβλήθηκαν σε νηστεία για διάστημα 20 ωρών πριν τα τεστ κολύμβησης. Τα άτομα τοποθετούνταν ανά ζεύγη στη συσκευή εναλλάξ από τις δύο συνθήκες των 0 mg ξ.μ. L⁻¹ και των 200 mg ξ.μ. L⁻¹, ενώ ο υπολογισμός της U_{crit} γινόταν για κάθε ένα ξεχωριστά. Οι νύμφες παρέμεναν για 2 λεπτά στο κανάλι σε μηδενική ταχύτητα ροής νερού, ώστε να εγκλιματιστούν στο καινούργιο περιβάλλον. Κάθε 15 λεπτά, η ταχύτητα αυξανόταν κατά 2 μήκη σώματος (TL) ανά δευτερόλεπτο, μέχρις ότου τα άτομα να φτάσουν την κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης. Η ταχύτητα αυτή θεωρείται ότι επιτυγχάνεται όταν το σημείο κόπωσης των ατόμων δεν τους επιτρέπει να κολυπήσουν άλλο. Πρακτικά αυτό σημαίνει ότι παρασύρθηκαν τρεις φορές εκτός καναλιού, εγκαταλείποντάς το εξουθενωμένα και μη ανταποκρινόμενα στα οπτικοακουστικά ερεθίσματα (Koumoundouros et al. 2002, Koumoundouros et al. 2009) Τελικά, από τον παρακάτω τύπο υπολογίζεται η κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης (Brett, 1967).

$$U_{crit} = U_i + (U_{ii} \times \frac{t_i}{t_{ii}})$$

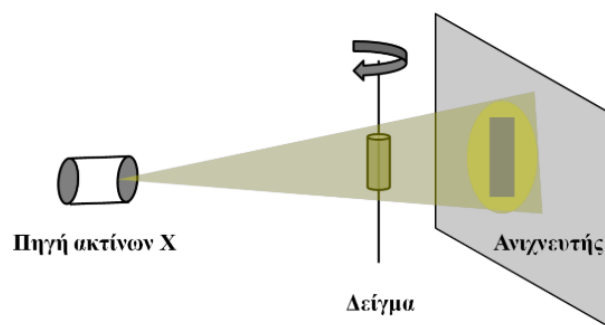
Στον τύπο αυτό το U_i είναι η μεγαλύτερη ταχύτητα κολύμβησης (σε mm) που το κάθε άτομο κατάφερε να διατηρήσει για ολόκληρο το διάστημα των 15 λεπτών, U_{ii} είναι το βήμα αύξησης της ταχύτητας (2 TL σε mm), t_i ο χρόνος (σε λεπτά) που ο οργανισμός παρέμεινε μέσα στο κανάλι στην ταχύτητα που εξαντλήθηκε και t_{ii} το χρονικό διάστημα που μεσολαβούσε μεταξύ δύο βημάτων (15 λεπτά). Μετά την ολοκλήρωση αυτής της πειραματικής διαδικασίας οι νύμφες αναισθητοποιήθηκαν με 2% MS222 (tricaine methane-sulfonate) και φωτογραφήθηκαν με κάμερα ενσωματωμένη σε στερεοσκόπιο (OLYMPUS SZ61). Οι φωτογραφίες λήφθηκαν από την αριστερή πλευρά των ατόμων και χρησιμοποιήθηκαν για τον ακριβή υπολογισμό του ολικού τους μήκους με το πρόγραμμα INFINITY CAPTURE. Αφού μετρήθηκε με ακρίβεια το ολικό μήκος, υπολογίστηκε η σχετική κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης ($RU_{crit} = U_{crit} TL^{-1}$), η οποία αποτελεί κανονικοποίηση της κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης ως προς το ολικό μήκος των οργανισμών (Beamish 1978).

Η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των δύο ομάδων έγινε με ANOVA, αφού προηγουμένως ελέγχθηκαν οι προϋποθέσεις της ομοιογένειας των διακυμάνσεων (Levene test) και η κανονική κατανομή των δεδομένων (Kolmogorov-Smirnov test).

2.3.2 Μελέτη του σχήματος της καρδιάς

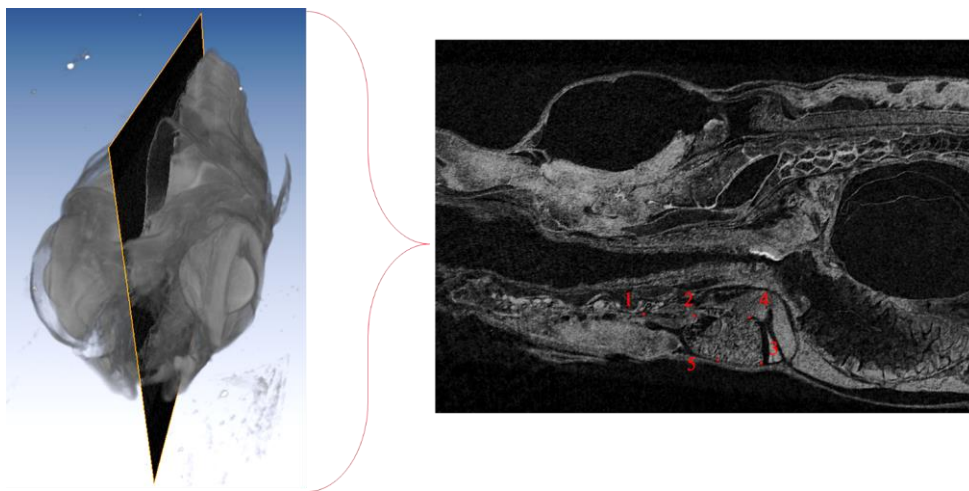
Μετά τις δοκιμές κολύμβησης, τα άτομα θυσιάστηκαν με υπερβολική δόση αναισθητικού (4% MS222) και αποθηκεύτηκαν σε φορμόλη 5% για τη μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος *M. aeruginosa* στο σχήμα της καρδιάς. Η χρώση και τελικά η σάρωση έγινε ατομικά για κάθε δείγμα. Συνολικά σαρώθηκαν 20 δείγματα, 5 άτομα ανά πειραματική συνθήκη και επανάληψη. Τα άτομα που επιλέχθηκαν είχαν όλα RU_{crit} κοντά στην μέση τιμή της ομάδας τους. Για την χρώση, τα δείγματα που επιλέχθηκαν έμειναν για 6 μέρες σε 2,5% φωσφομολυβδαινικό οξύ (phosphomolybdic acid, PMA, Sigma Aldrich) (Descamps et al. 2014). Μετά την 6^η ημέρα υπέστησαν σταδιακή αφυδάτωση σε 70% αιθανόλη (25% αιθανόλη για 3 ώρες, 50% για 3 ώρες, 70% κατά τη διάρκεια της νύχτας, και 70% τελικό διάλυμα). Το PMA είναι ένα υδατικό διάλυμα που προσδένεται σε πρωτεΐνες και συγκεκριμένα στο κολλαγόνο, με αποτέλεσμα να είναι πιο ευδιάκριτοι οι ιστοί (και ειδικά η καρδιά) κατά τη σάρωση στον μικροτομογράφο.

Η σάρωση έγινε σε μικροτομογράφο Skyscan 1172 που βρίσκεται στο Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών Κρήτης (ΕΛΚΕΘΕ). Η σάρωση και η απεικόνιση των υπό εξέταση δειγμάτων στις τρεις διαστάσεις πραγματοποιείται με την χρήση ακτίνων X. Το δείγμα περιστρέφεται μεταξύ μιας σειράς ανιχνευτών και μιας πηγής ακτίνων X υψηλής ενέργειας (Εικόνα 16) και αποτυπώνεται έτσι μια εικόνα προβολής (projection image) από κάθε δυνατή γωνία. Οι εικόνες προβολής είναι εικόνες διαβαθμίσεων του γκρι, στις οποίες φαίνεται η απορρόφηση των ακτίνων X από το αντικείμενο. Οι πυκνές περιοχές σημαίνουν την μικρή διέλευση των ακτίνων X και αντιστοιχούν στο λευκό χρώμα, ενώ λιγότερο πυκνές περιοχές την μεγάλη διέλευση των ακτίνων X και αντιστοιχούν στο μαύρο. Οι παράμετροι σάρωσης που επιλέχθηκαν (1,66 μm μέγεθος ογκοστοιχείου, 180° περιστροφή, 650 ms χρόνος έκθεσης, 50 kV τάση, 198-200 μA ένταση) παρέμειναν σταθεροί για όλα τα δείγματα που σαρώθηκαν.



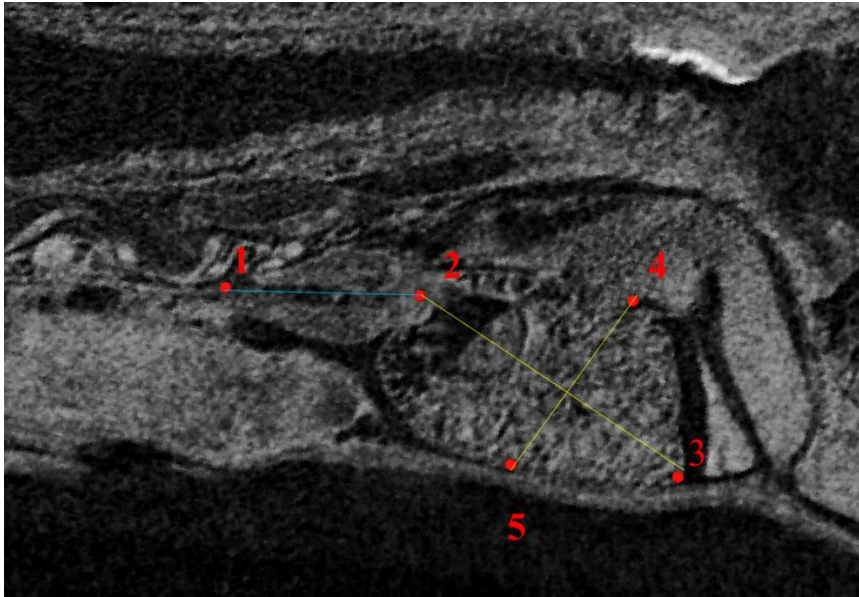
Εικόνα 16. Σχηματική αναπαράσταση λειτουργίας του μικροτομογράφου για την λήψη της επιθυμητής εικόνας. (διδασκτορική διατριβή, Δημητριάδη Α. 2018).

Όταν ολοκληρώθηκαν οι μικροτομογραφίες, έγινε ανακατασκευή των εικόνων προβολής που προέκυψαν από τη σάρωση, με χρήση του λογισμικού NRecon, SKYSCAN, με σκοπό τη δημιουργία εύκολα αναλύσιμων, εγκάρσιων, ψηφιακών τομών TIFF μορφής (Dimitriadi et al. 2018). Οι εικόνες αυτές εισήχθησαν στο πρόγραμμα Amira v.5.2 (VSG, Burlington USA) για την περαιτέρω δισδιάστατη και τρισδιάστατη επεξεργασία τους. Η διαδικασία αυτή έγινε ώστε να υπολογιστούν οι διάφορες παράμετροι που ορίζουν το σχήμα της καρδιάς. Έτσι, για κάθε δείγμα, ορίστηκε στο Amira ένα επίπεδο τομής (Oblique slice) το οποίο διερχόταν από τη βάση του νευροκρανίου, το οπίσθιο άκρο του αυλού του αρτηριακού βολβού και το κέντρο του πρώτου σπονδύλου (Εικόνα 17). Οι συγκεκριμένες θέσεις διέλευσης ορίζουν ένα επίπεδο που διέρχεται από τον αρτηριακό βολβό και την κοιλία της καρδιάς, δομές που έχουν επιλεγεί ως οι καταλληλότερες για τη διεξαγωγή συμπερασμάτων που αφορούν το σχήμα της καρδιάς (Hicken et al. 2011, Dimitriadi et al. 2018).



Εικόνα 17. Τρισδιάστατη εικόνα (αριστερά) που παίρνουμε στο πρόγραμμα Amira μετά την ανακατασκευή των εικόνων προβολής που προέκυψαν από τη σάρωση. Στο κέντρο και δεξιά διακρίνεται η ψηφιακή τομή (oblique slice) που επιτρέπει που διέρχεται οβελιαία από το κέντρο της καρδιάς του ψαριού.

Για τη μορφομετρική ανάλυση, τοποθετήθηκαν πέντε ορόσημα στις θέσεις που απεικονίζονται στην (Εικόνα 18). Η απόσταση 1-2 ορίστηκε ως το μήκος του αρτηριακού βολβού, ενώ ως μήκος κοιλίας η απόσταση 2-3 και ως ύψος η 4-5. Για τη μεταβολή του σχήματος της καρδιάς και συγκεκριμένα της κυκλικότητας της κοιλίας εκτιμήθηκε ο λόγος μήκους προς ύψους της κοιλίας (VL/VD) ο οποίος δείχνει την κυκλικότητα της και είναι κατάλληλος δείκτης της καρδιακής παροχής στο zebrafish (Hicken et al. 2011). Παράλληλα, έγινε κανονικοποίηση όλων των πρωτογενών αποστάσεων ως προς το ολικό μήκος κάθε δείγματος.



Εικόνα 18. Τα πέντε ορόσημα στις θέσεις που επιλέχθηκαν ως κατάλληλες για εκτίμηση του σχήματος της καρδιάς. (1) αρχή του αρτηριακού βολβού, (2) τέλος αρτηριακού βολβού, πριν την βαλβίδα της κοιλίας, (3) απώτατο σημείο της κοιλίας (apex), (4) ανώτερο ευδιάκριτο σημείο της κοιλίας, πριν την κολποκοιλιακή βαλβίδα, (5) αντιδιαμετρικό σημείο του 4, κάθετα στον άξονα 2-3.

Η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των δύο ομάδων έγινε με ANOVA, αφού προηγουμένως ελέγχθηκαν οι προϋποθέσεις της ομοιογένειας των διακυμάνσεων (Levene test) και η κανονική κατανομή των δεδομένων (Kolmogorov-Smirnov test).

2.3.3 Μελέτη των σκελετικών δυσπλασιών

Στο μέσο μήκος των 12 mm TL, από κάθε πληθυσμό λήφθηκε τυχαίο δείγμα 50 ατόμων για τον έλεγχο της ανάπτυξης σκελετικών δυσπλασιών. Οι νύμφες αναισθητοποιήθηκαν (phenoxyethanol 10%) συντηρήθηκαν σε διάλυμα φορμόλης 5%. Ακολούθησε η διπλή χρώση των δειγμάτων με κυανό της Αλσατίας και ερυθρό της Αλιζαρίνης (Εικόνα 19). Συνοπτικά, τα δείγματα ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό και παρέμειναν για μία ώρα σε 50% αιθανόλη, υπό ανάδευση, με σκοπό να απομακρυνθεί η φορμόλη. Κατόπιν, επώαστηκαν, υπό ανάδευση, για 12 περίπου ώρες στο διάλυμα των χρώσεων Alcian Blue / Alizarin Red. Την επόμενη ημέρα έγινε πλύση με απιονισμένο νερό και προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου για 3 λεπτά ώστε να διαρρηχτούν τα μελανοφόρα κύτταρα των οργανισμών και να υπάρχει η απαραίτητη διαφάνεια για την παρατήρηση των επιθυμητών δομών. Ακολούθησαν διαδοχικές αλλαγές διαλύματος γλυκερόλης – καυστικού καλίου, το οποίο καθιστά διάφανους τους μύες. Την τρίτη και τελευταία ημέρα τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε διάλυμα 50% γλυκερόλης στο οποίο και συντηρήθηκαν μέχρι τη μελέτη τους.



Εικόνα 19. Τελική εικόνα ιχθυδίου zebrafish μετά την επεξεργασία του με το διάλυμα των χρώσεων Alcian Blue / Alizarin Red.

Η μελέτη του σκελετού έγινε με την χρήση στερεοσκοπίου. Αν και εξετάστηκαν όλες οι ανατομικές περιοχές (κεφάλι, σπόνδυλοι, περύγια), έμφαση δόθηκε στην περιοχή της σπονδυλικής στήλης και στο ιδιαίτερο τύπο δυσπλασιών που είχαν περιγραφεί από τους Sergi et al. (2022) να αναπτύσσονται ως απόκριση στην έκθεση των εμβρύων σε εκχύλισμα *M. aeruginosa*. Ο στατιστικός έλεγχος των διαφορών της συχνότητας των παραμορφώσεων μεταξύ των δύο πειραματικών ομάδων πραγματοποιήθηκε με χρήση G-test.

3. Αποτελέσματα

3.1 Επιπτώσεις της εμβρυϊκής έκθεσης στη γονιμότητα των ενήλικων θηλυκών

3.1.1 Συνθήκες έκθεσης των εμβρύων στο διάλυμα εκχυλίσματος *M. aeruginosa*

Για τον έλεγχο της γονιμότητας προηγήθηκε η έκθεση των δύο πειραματικών ομάδων στις διαφορετικές συνθήκες εμβρυϊκής έκθεσης. Με την ανανέωση των διαλυμάτων κάθε 12 ώρες και την συνεχή παροχή οξυγόνου και στις δύο ομάδες διατηρήθηκαν πανομοιότυπες αβιοτικές συνθήκες (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Μετρήσεις των αβιοτικών συνθηκών (μέσος όρος±SD) κατά την έκθεση των εμβρύων στο εκχύλισμα *M. aeruginosa*, για το χρονικό διάστημα από 0 hpf έως 48 hpf, στις δύο πειραματικές επαναλήψεις (A, B).

Πειραματική επανάληψη	Συγκέντρωση εκχυλίσματος MA (mg ξ.μ. L ⁻¹)	Κορεσμός O ₂ (%)	pH	Θερμοκρασία (°C)
A	0	89,2±5,3	7,0±0,3	28±0,2
	200	90,1±3,2	7,0±0,2	28±0,2
B	0	93,6±3,0	7,2±0,1	28±0,2
	200	85,4±6,5	7,3±0,3	28±0,2

3.1.2 Σχετική γονιμότητα

Από την καταγραφή της σχετικής γονιμότητας δείχθηκε ότι η έκθεση των εμβρύων σε εκχύλισμα *M. aeruginosa* μείωσε τη σχετική γονιμότητα των ενήλικων θηλυκών κατά 29,9% (450,3±235 αυγά/g έναντι 642,3±255 αυγά/g στην ομάδα ελέγχου) ως 21,1% (604,9±228 αυγά/g έναντι 766,5±175 αυγά/g στην ομάδα ελέγχου) (Εικόνα 20). Η μείωση αποδείχθηκε στατικά σημαντική μόνο όταν ωστόσο ελέγχθηκαν οι δύο επαναλήψεις ως μια (Εικόνα 20) ($F(1,48)=6,2846$, $p=0,0156$).

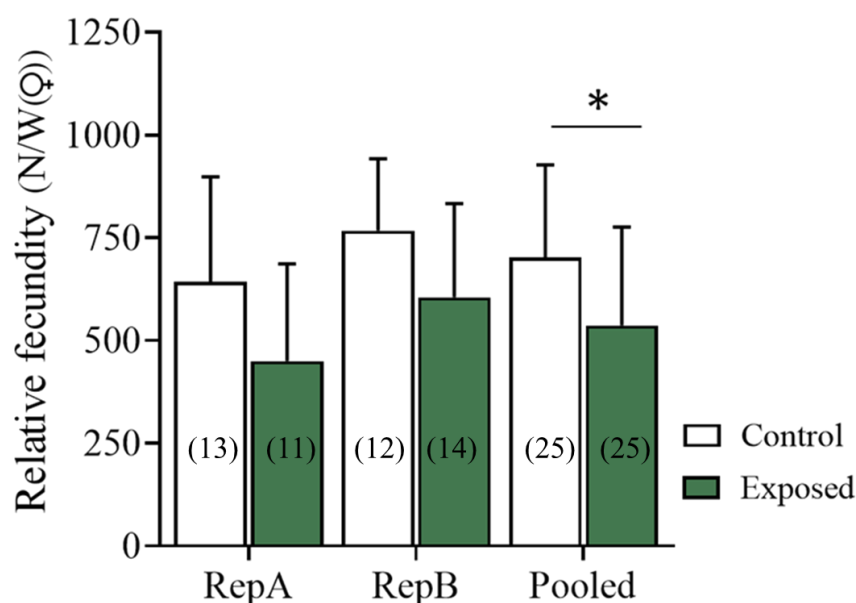
Δεν υπήρξε κάποια σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των δύο πειραματικών ομάδων, ως προς το μέγεθος των ενήλικων που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 4, Πίνακας 5).

Πίνακας 4. Μέσο βάρος (gr.) θηλυκών (F) και αρσενικών (M) (μέσος όρος ±SD) κατά το τέλος του ελέγχου γονιμότητας, στις δύο πειραματικές επαναλήψεις (Rep A, Rep B).

<i>M.aeruginosa</i> (mg ξ.μ. L ⁻¹)	Rep A		Rep B	
	F	M	F	M
0	0,360±0,049	0,333±0,059	0,394±0,046	0,335±0,049
200	0,382±0,058	0,315±0,045	0,409±0,066	0,350±0,019

Πίνακας 5. Μέσο μήκος (mm) θηλυκών (F) και αρσενικών (M) (μέσος όρος \pm SD) κατά το τέλος του ελέγχου γονιμότητας, στις δύο πειραματικές επαναλήψεις (Rep A, Rep B)

<i>M.aeruginosa</i> (mg ξ.μ. L ⁻¹)	Rep A		Rep B	
	F	M	F	M
0	32,88 \pm 1,67	31,165 \pm 0,73	34,12 \pm 1,84	32,10 \pm 0,73
200	33,13 \pm 1,61	31,53 \pm 2,61	35,48 \pm 1,44	33,11 \pm 0,69



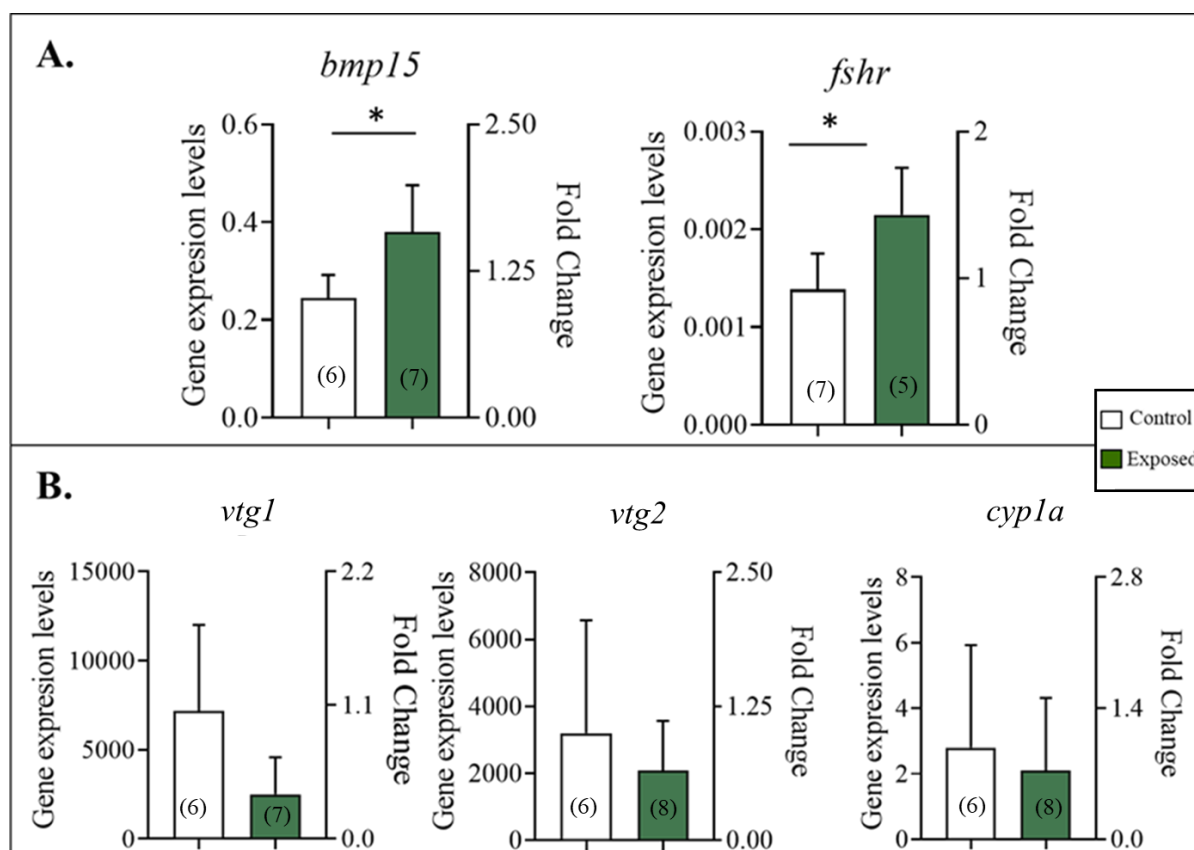
Εικόνα 20. Επίδραση της εμβρυϊκής έκθεσης σε εκχύλισμα *M. aeruginosa* στη σχετική γονιμότητα των ενήλικων θηλυκών. Δίνονται τα αποτελέσματα για τις δύο πειραματικές επαναλήψεις ξεχωριστά (RepA, RepB), αλλά και συνολικά (Pooled). Ο αστερίσκος (*) υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$). Με πράσινο χρώμα είναι η ομάδα που έχει εκτεθεί στην εμβρυϊκή ηλικία και με λευκό η ομάδα ελέγχου. Τα αποτελέσματα του στατιστικού ελέγχου για τις επιμέρους επαναλήψεις (A και B) ήταν $F(1,22)=3,6052$ και $p=0,0708$ και $F(1,24)=3,9862$, $p=0,0573$. Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με 1 SD, σε παρενθέσεις δίνονται τα άτομα που τελικά συμπεριλήφθηκαν στον υπολογισμό της σχετικής γονιμότητας αν συνθήκη και ανά πειραματική επανάληψη.

3.1.3 Επίπεδα γονιδιακής έκφρασης στις ωοθήκες και στο ήπαρ

Η έκφραση των πέντε γονιδίων μελετήθηκε ανάλογα με τον ιστό που είχαν απομονωθεί, ήπαρ και ωοθήκες. Στην Εικόνα 21 απεικονίζεται τα επίπεδα έκφρασης των υπό εξέταση γονιδίων για τις ωοθήκες (A) και για το ήπαρ (B), κανονικοποιημένα ως προς τον γεωμετρικό μέσο όρο των επιπέδων των γονιδίων αναφοράς (*actb1*, *gapdh*). Τα άτομα που είχαν ακραίες τιμές λόγω κάποιων τεχνικών λαθών απομακρύνθηκαν από την τελική ανάλυση.

Τα επίπεδα έκφρασης των επιλεγμένων γονιδίων στον ωοθηκικό ιστό διαφοροποιήθηκαν σημαντικά μεταξύ των 2 πειραματικών ομάδων. Το γονίδιο *fshr* (γονίδιο του υποδοχέα της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης, follicle-stimulating hormone, FSH) εκφράστηκε κατά $1.55 \pm 0,34$ φορές παραπάνω στην ομάδα που κατά την εμβρυϊκή φάση είχε εκτεθεί στο εκχύλισμα *M. aeruginosa*, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η διαφορά αυτή αποδείχθηκε στατιστικά σημαντική (ANOVA, $F(1,10)=9,7241$, $p=0,0109$). Το γονίδιο *bmp15* (ρυθμιστικό ρόλο στην ωρίμανση ωαρίων στις γονάδες του zebrafish, bone morphogenetic protein-15) εκφράστηκε κατά $1,48 \pm 0,38$ φορές παραπάνω στην ομάδα που είχε αρχικά εκτεθεί στο εκχύλισμα *M. aeruginosa*, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Διαφορά που αποδείχθηκε στατιστικά σημαντική (ANOVA, $F(1,11)=9,6781$, $p=0.0099$) (Εικόνα 21A).

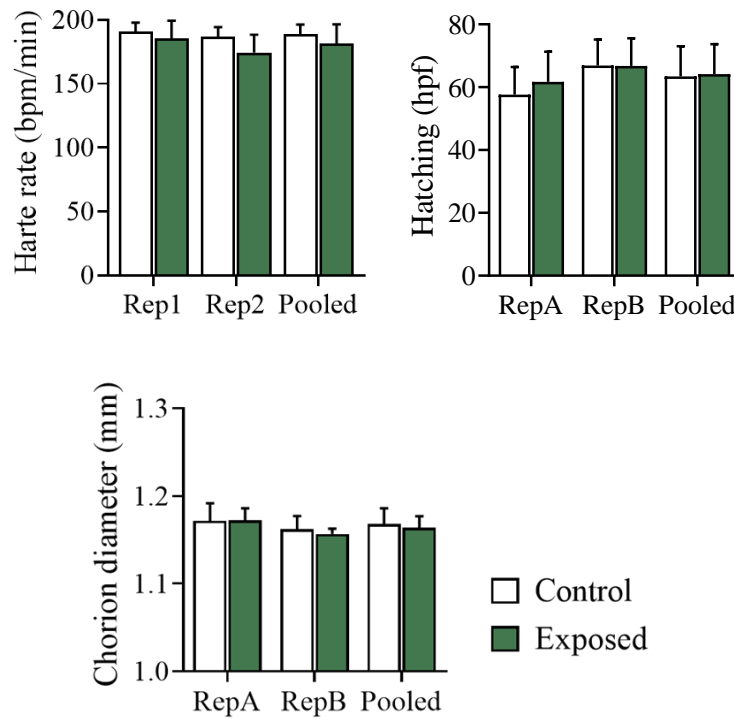
Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στόχων στο ήπαρ δεν διαφοροποιήθηκαν σημαντικά μεταξύ των δύο πειραματικών ομάδων. Ο έλεγχος για την διαφορά της έκφρασης των γονιδίων *vtg1* (*vitellogenin 1*, βιτελλογενίνη 1), *vtg2* (*vitellogenin 2*, βιτελλογενίνη 2) και *cyp1a* (γονίδιο που συμβάλει στην αποτοξικοποίηση των ιστών, *cytochrome P450, family 1, subfamily A*) έγινε με το Mann-Whitney U test και βρέθηκε $p > 0,05$ (Εικόνα 21B).



Εικόνα 21. Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στόχων στις ωοθήκες (A) και στο ήπαρ (B). Ο αστερίσκος (*) υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά με $p < 0,05$. Με πράσινο χρώμα είναι η ομάδα που έχει εκτεθεί σε εκχύλισμα *M. Aeruginosa* και με λευκό η ομάδα ελέγχου. Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με 1 SD.

3.1.4 Επίδραση της αρχικής έκθεσης σε εκχύλισμα *M. aeruginosa* σε χαρακτηριστικές ποιότητες των απογόνων

Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν κάποια σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των δύο πειραματικών ομάδων, τόσο ως προς τον καρδιακό ρυθμό των εμβρύων τους της επόμενης γενιάς, όσο και ως προς το μέσο χρόνο εκκόλαψής τους ή τη διάμετρο του χορίου τους ($p > 0.05$, Mann-Whitney U test, Εικόνα 22).



Εικόνα 22. Επίδραση της αρχικής έκθεσης σε εκχύλισμα *M. aeruginosa* στον ρυθμό καρδιακής λειτουργίας, στη διάμετρο του χορίου και στο μέσο χρόνο εκκόλαψης των εμβρύων της επόμενης γενιάς. Δίνονται τα αποτελέσματα για τις δύο πειραματικές επαναλήψεις ξεχωριστά (RepA, RepB), αλλά και συνολικά (Pooled). Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με 1 SD.

3.2 Επιπτώσεις της έκθεσης του λεκιθοφόρου νυμφικού σταδίου στην κολυμβητική ικανότητα των μεταμορφούμενων νυμφών

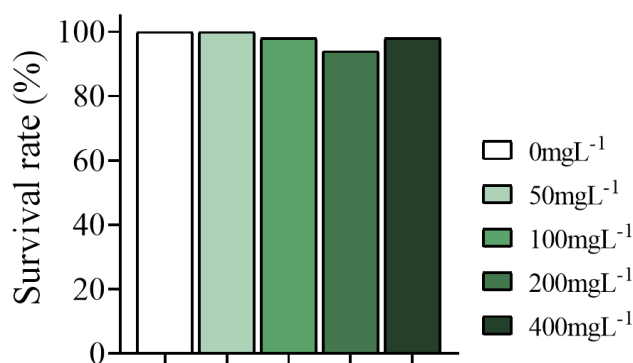
3.2.1 Εκτίμηση υποθνησιγόνων επιπέδων του εκχυλίσματος *M. aeruginosa* για το λεκιθοφόρο νυμφικό στάδιο

Για την εκτίμηση των υποθνησιγόνων επιπέδων του εκχυλίσματος *M. aeruginosa* για τις λεκιθοφόρες νύμφες, δοκιμάστηκαν πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0, 50, 100, 200, 400 mg ξ.μ. L⁻¹). Οι αβιοτικές συνθήκες μετριόντουσαν ανά 12 ώρες, όταν γίνονταν και οι αλλαγές των διαλυμάτων (Πίνακας 4). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε δύο ανεξάρτητες πειραματικές επαναλήψεις (A, B).

Όπως έδειξαν τα αποτελέσματα, ο ρυθμός επιβίωσης των νυμφών δεν διαφοροποιήθηκε σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος που ελέγχθηκαν (Εικόνα 25).

Πίνακας 4. Μετρήσεις των αβιοτικών συνθηκών (μέσος±SD) κατά την έκθεση των λεκιθοφόρων νυμφών στο εκχύλισμα *M. aeruginosa*, για το χρονικό διάστημα από 48 hpf έως 96 hpf, στις δυο πειραματικές επαναλήψεις (A, B).

Πειραματική επανάληψη	Εκχύλισμα <i>M. aeruginosa</i> (mg ξ.μ. L ⁻¹)	Κορεσμός O ₂ (%)	pH	Θερμοκρασία (°C)
A	0	95,7±2,8	7,8±0,2	27,7±0,4
	50	93,7±4,1	7,7±0,2	27,7±0,4
	100	92,7±7,9	7,7±0,2	27,7±0,4
	200	90,7±6,8	7,7±0,2	27,7±0,4
	400	90,5±4,5	7,7±0,1	27,7±0,4
B	0	95,6±1,5	8,0±0,2	28,0±0,2
	50	92,6±2,5	7,9±0,2	28,0±0,2
	100	93,6±1,5	7,9±0,1	28,0±0,2
	200	91,8±1,0	7,9±0,2	28,0±0,2
	400	90,3±1,5	8,0±0,3	28,0±0,2



Εικόνα 23. Ρυθμός επιβίωσης των λεκιθοφόρων νυμφών στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος *M. aeruginosa*, από τις 48 hpf έως τις 96 hpf.

3.2.2 Συνθήκες έκθεσης των λεκιθοφόρων νυμφών στο διάλυμα εκχύλισματος *M. aeruginosa*

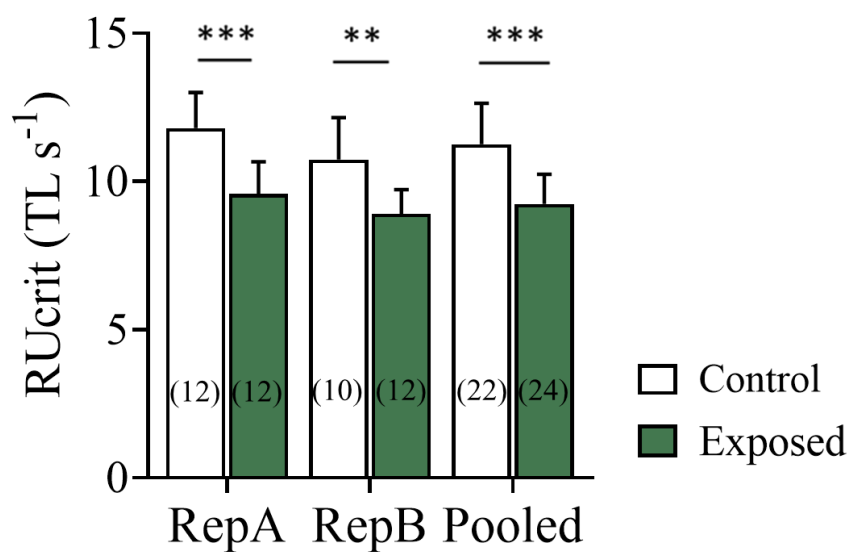
Το κυρίως πείραμα έκθεσης των λεκιθοφόρων νυμφών έγινε στη συγκέντρωση των 200 mg ξ.μ. L⁻¹, αντί των μέγιστου υποθησιγόνου (400 mg ξ.μ. L⁻¹), προκειμένου να είναι εφικτή η σύγκριση των αποτελεσμάτων με των (Sergi et al. 2022). Οι αβιοτικές συνθήκες μετριόντουσαν ανά 12 ώρες, όταν γίνονταν και οι αλλαγές των διαλυμάτων (Πίνακας 5). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε δύο ανεξάρτητες πειραματικές επαναλήψεις (A, B).

Πίνακας 5. Μετρήσεις των αβιοτικών συνθηκών (μέσος±SD) κατά την έκθεση των λεκιθοφόρων νυμφών στο εκχύλισμα *M. aeruginosa*, για το χρονικό διάστημα από 48 hpf έως 96 hpf, στις δυο πειραματικές επαναλήψεις (A, B).

Πειραματική επανάληψη	Εκχύλισμα <i>M. aeruginosa</i> (mg ξ.μ. L ⁻¹)	Κορεσμός O ₂ (%)	pH	Θερμοκρασία (°C)
A	0	93,2±2,3	7,5±0,3	28±0,2
	200	90,1±3,2	7,5±0,2	28±0,2
B	0	95,6±3,0	7,3±0,1	28±0,2
	200	91,4±2,5	7,3±0,3	28±0,2

3.2.3 Επίδραση του εκχύλισματος *M. aeruginosa* στην κολυμβητική ικανότητα

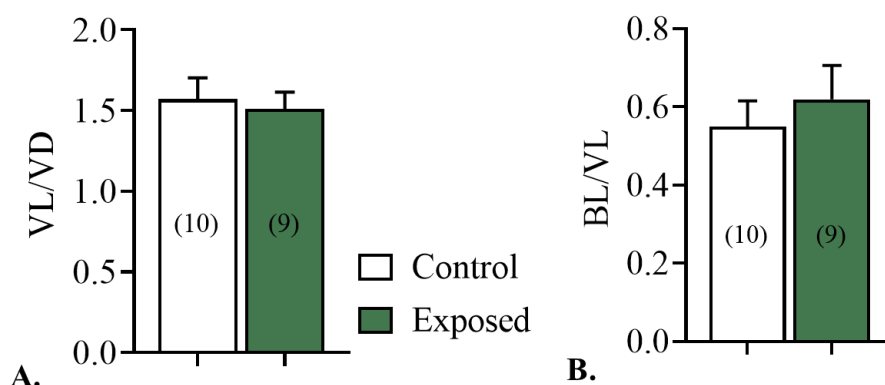
Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης έδειξαν ότι η έκθεση των λεκιθοφόρων νυμφών στο εκχύλισμα *M. aeruginosa* είχε σημαντική επίδραση στην αερόβια άσκηση των μεταμορφούμενων νυμφών, μειώνοντας κατά περίπου 2 TL s⁻¹ την κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης (9,24 ± 0,20 TL sec⁻¹ στην εκτεθειμένη ομάδα έναντι 11,32 ± 0,29 TL sec⁻¹ στην ομάδα ελέγχου, Εικόνα 26-Pooled). Ο έλεγχος με ANOVA έδειξε ότι η διαφοροποίηση της RU_{crit} μεταξύ των δύο πειραματικών ομάδων ήταν στατιστικά σημαντική και στις δύο επαναλήψεις.



Εικόνα 26. Κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης (RU_{crit}) στις δύο πειραματικές ομάδες και επαναλήψεις. Το λευκό αντιστοιχεί στην ομάδα ελέγχου και το πράσινο στην ομάδα που είχε αρχικά εκτεθεί στο *M. aeruginosa*. Δίνονται τα αποτελέσματα για τις δύο πειραματικές επαναλήψεις ξεχωριστά (RepA, RepB), αλλά και συνολικά (Pooled). Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά με $p < 0,01$ (**) ή $p < 0,001$ (***). Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με 1 SD.

3.2.4 Επίδραση του εκχυλίσματος *M. aeruginosa* στη μορφολογία της καρδιάς

Η μορφολογία της καρδιάς μελετήθηκε από τις ψηφιακές τομές που προέκυψαν από την ανάλυση στο λογισμικό Amira. Ως μορφολογικοί δείκτες εξετάστηκαν η κυκλικότητα της καρδιάς (VL/VD) και το σχετικό μήκος του αρτηριακού βολβού προς το μήκος της κοιλίας (BL/VL). Κανένας από τους δύο χαρακτήρες δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των δύο πειραματικών ομάδων (Εικόνα 26).



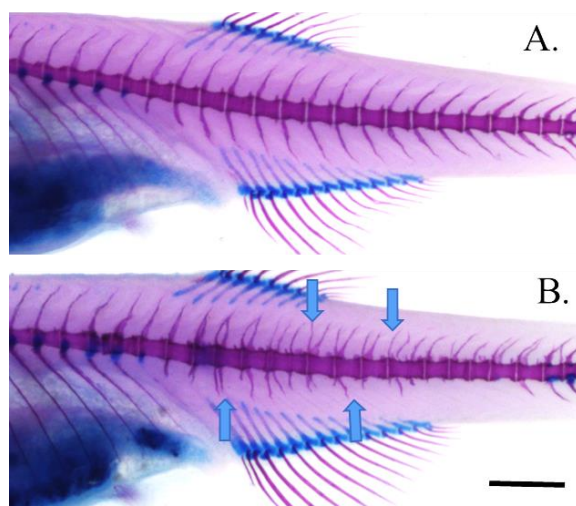
Εικόνα 24. Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων των μορφολογικών δεικτών της καρδιάς από τις δύο ομάδες ενδιαφέροντος, λευκό η ομάδα ελέγχου και πράσινο η ομάδα που έχουν εκτεθεί στο *M. aeruginosa*. VL=vertical length, VD=vertical depth, BL=bulbus length. Τα αποτελέσματα του στατιστικού ελέγχου για το VL/VD και το BL/VL ήταν $F(1,17)=0,96709$, $p=0,3392$ και $F(1,17)=3,5762$, $p=0,0758$ αντίστοιχα. Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με 1 SD.

3.2.5 Επίδραση του εκχυλίσματος *M. aeruginosa* στην ανάπτυξη σκελετικών παραμορφώσεων

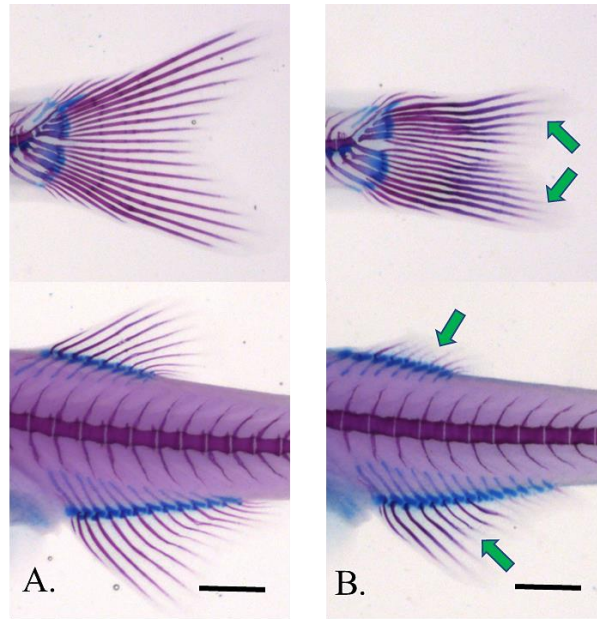
Οι σκελετικές παραμορφώσεις που βρέθηκαν στα δείγματα από τις δύο ομάδες αφορούσαν στους σπονδύλους (σκολίωση, κύφωση, σύντηξη, παραμορφώσεις αποφύσεων, Εικόνα 27), στις βραγχιοστεγείς ακτίνες (κάμψη) και στις ακτίνες των πτερυγίων (ανεπάρκεια οστεοποίησης, Εικόνα 28) (Πίνακας 6). Οι κεκαμμένες βραγχιοστεγείς ακτίνες και σκολίωση ήταν οι συχνότερες δυσπλασίες σε όλους τους πληθυσμούς που εξετάστηκαν (22-44% και 25-35% αντίστοιχα, Πίνακας 6). Η μετατόπιση των σπονδύλων που δημιουργεί ως φαινόμενο την κακή στοίχιση των νευρικών και αιματικών αποφύσεων (Εικόνα 27), εμφάνισε σχετικά χαμηλή συχνότητα (13-17%) σε όλους του πληθυσμούς (Πίνακας 6). Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης δεν έδειξαν κάποια σημαντική διαφοροποίηση των συχνοτήτων των σκελετικών δυσπλασιών μεταξύ των δύο πειραματικών ομάδων (Πίνακας 6).

Πίνακας 6. Ποσοστά εμφάνισης των παραμορφώσεων που ελέγχθηκαν ανά συνθήκη και πειραματική επανάληψη (RepA, RepB). ΕΟΣΠ: έλλειψη οστεοποίησης κέντρων σπονδύλων και των ακτίνων των πτερυγίων. Βρ.Α: βραγχιοστεγείς ακτίνες. Α.Σπ :αποφύσεις σπονδύλων.

Παραμορφώσεις	Rep A (0 mg ξ.μ. L ⁻¹)	Rep A (0 mg ξ.μ. L ⁻¹)	Rep B (0 mg ξ.μ. L ⁻¹)	Rep B (0 mg ξ.μ. L ⁻¹)
Μετατόπιση σπονδύλων (%)	16,3	14,3	13,0	13,5
Σκολίωση (%)	34,9	27,3	30,4	25,0
ΕΟΣΠ (%)	14,0	12,7	13,0	25,0
Σύντηξη σπονδύλων (%)	20,9	20,0	13	13,4
Κεκαμμένες Βρ.Α (%)	44,2	34,5	21,7	30,8
Κεκαμμένες Α.Σπ. (%)	20,9	14,5	8,7	9,6
n	43	55	46	52



Εικόνα 25. Παραμορφώσεις των σπονδύλων. Α) φυσιολογικό άτομο. Β) μετατόπιση σπονδύλων, που δημιουργεί κακή στοίχιση των σπονδυλικών αποφύσεων. Η κλίμακα ισούται με 1mm.



Εικόνα 26. Ανεπάρκεια οστεοποίησης των ακτίνων των πτερυγίων (ΕΟΣΠ). Α) φυσιολογικά πτερύγια. Β) ανεπαρκής οστεοποίηση ακτίνων (βέλη). Οι κλίμακες ισούνται με 1 mm.

4. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε το κατά πόσο η έκθεση εμβρύων ή λεκιθοφόρων νυμφών zebrafish σε υποθησιγόνα επίπεδα εκχυλίσματος του κυανοβακτηρίου *M. aeruginosa* έχει επιπτώσεις για τη δομή (σκελετός, καρδιά) και λειτουργία (κολυμβητική ικανότητα, γονιμότητα) των ψαριών στα επόμενα στάδια της ζωής τους (ιχθύδια ή ενήλικα). Σε αντίθεση με προηγούμενες εργασίες στο πεδίο της τοξικότητας των τοξικών κυανοβακτηρίων για τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια των ψαριών (π.χ. Liu et al. 2001, 2018b, Wang et al. 2019), στην παρούσα εργασία τα πειράματα έκθεσης πραγματοποιήθηκαν για μόλις 48 h και κατά τη διάρκεια ενός διακριτού σταδίου (εμβρυϊκό ή λεκιθοφόρο νυμφικό). Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα των Sergi et al. (2022) ως προς την ευαισθησία του εμβρυϊκού σταδίου στην έκθεση στο *M. aeruginosa*, δείχνοντας επιπρόσθετα μια επίπτωση της αρχικής έκθεσης στην γονιμότητα των ενήλικων θηλυκών. Αναφορικά με τις μακροπρόθεσμες επιπτώσεις της έκθεσης των λεκιθοφόρων νυμφών στο εκχύλισμα *M. aeruginosa*, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν μια σημαντική μείωση της κολυμβητικής ικανότητας των μεταμορφούμενων νυμφών. Όμοια με τη μείωση που είχε δειχθεί στο παρελθόν ως αποτέλεσμα της έκθεσης στο *M. aeruginosa*, κατά το εμβρυϊκό όμως στάδιο (Sergi et al. 2022), χωρίς ωστόσο την αύξηση της κυκλικότητας της καρδιάς και της συχνότητας των σκελετικών παραμορφώσεων (Πίνακας 7). Η διαφοροποίηση των αποκρίσεων του zebrafish ανάλογα με το στάδιο έκθεσης στο *M. aeruginosa*, θα μπορούσε να εξηγηθεί μόνο από τη διαφορετική ευαισθησία αυτών των δύο σταδίων. Κάτι που ενισχύεται και από τα μεγαλύτερα μέγιστα υποθησιγόνα επίπεδα του *M. aeruginosa* για το λεκιθοφόρο νυμφικό στάδιο ($400 \text{ mg } \xi.\mu. \text{ L}^{-1}$, παρούσα εργασία), έναντι του εμβρυϊκού σταδίου ($200 \text{ mg } \xi.\mu. \text{ L}^{-1}$, Sergi et al. 2022).

Πίνακας 7. Συγκριτική παρουσίαση των μακροπρόθεσμων επιπτώσεων της έκθεσης του zebrafish, κατά το εμβρυϊκό ή λεκιθοφόρο νυμφικό στάδιο, σε υποθησιγόνα επίπεδα εκχυλίσματος *M. aeruginosa* ($200 \text{ mg } \xi.\mu. \text{ L}^{-1}$). ns δεν έχει μελετηθεί ακόμα, - μη σημαντική επίδραση.

	Έκθεση στο εμβρυϊκό στάδιο	Έκθεση στο λεκιθοφόρο νυμφικό στάδιο
Ταχύτητα κολύμβησης (κατά τη μεταμόρφωση)	↓ ¹	↓ ²
Κυκλικότητα της κοιλίας της καρδιάς (κατά τη μεταμόρφωση)	↑ ¹	- ²
Συχνότητα σπονδυλικών παραμορφώσεων	↑ ¹	- ²
Θνησιμότητα	- ¹	- ²
Σχετική γονιμότητα θηλυκών	↓ ²	ns

¹ (Sergi et al. 2022), ² παρούσα εργασία

Οι πρώτες ώρες της ανάπτυξης ενός οργανισμού σηματοδοτούνται όλα τα μονοπάτια για την περαιτέρω ανάπτυξη σημαντικών οργάνων για την λειτουργία του οργανισμού όπως το καρδιαγγειακό σύστημα (Wang et al. 2019). Η επιβίωση των ψαριών εξαρτάτε από την συγκέντρωση των ρύπων που επιδρούν σε αυτά και διαφέρει μεταξύ των αναπτυξιακών τους σταδίων. Ενώ η ευαισθησία του κάθε σταδίου είναι διαφορετική ανάλογα τον ρύπο αλλά και το είδος ψαριού που εξετάζεται (Arufe et al. 2004, Martínez et al. 2021). Οι Liu et al. (2001) έδειξαν ότι η επίδραση της MC-LR είναι πιο σημαντική σε νύμφες από ότι σε έμβρυα, και το απέδωσαν στο ότι το έμβρυο έχει το προστατευτικό σύνορο του χορίου που εμποδίζει την είσοδο τον κυανοτοξινών κάτι που ανέφεραν και οι Anderson P.D & Dapollonia S. (1978). Όμως είναι πολλές ενώσεις, που βρίσκονται και στα εκχυλίσματα των κυανοβακτηρίων, τα οποία μπορούν να διαπεράσουν το χόριο (ρετινοειδή κ.α.) και να επιδράσουν στην ανάπτυξη του ψαριού (Song et al. 2011, Wu et al. 2016b, Pipal et al. 2020) . Ακόμα αδιάλυτες ενώσεις που δεν διαπερνούν και τις δυο μεμβράνες του χορίου δημιουργούν πιθανή μείωση στη διάχυση του O₂ μέσω του χορίου (υποξία εντός του χορίου) και αύξηση ενώσεων ROV (*Reactive oxygen species*) άρα και μη ολοκλήρωση της στη φυσιολογική ανάπτυξη του βασικού σωματικού προτύπου κατά την εκκόλαψη (Chen et al. 2020). Ενώ πολλές ενώσεις όπως και η MS-LR προκαλούν μια πρόωρη εκκόλαψη λόγω διάλυσης του χορίου (Liu et al. 2001). Συνεπώς το χόριο είναι μια προστατευτική μεμβράνη του εμβρύου που δεν είναι άτρωτη αλλά απαραίτητη αφού σε αυτά τα στάδια που υπάρχει το χόριο, πραγματοποιούνται οι πιο σημαντικές αναπτυξιακές αλλαγές για τον τελικό σχηματισμό του βασικού σωματικού προτύπου και οποιαδήποτε διαταραχή αυτών μπορούν να επηρεάσουν την ολική δομή και λειτουργία του οργανισμού (Kimmel et al., 1995, James 1997).

4.1 Επίδραση του εκχυλίσματος *M. aeruginosa* στην γονιμότητα των ιχθύων

Η γονιμότητα των ψαριών εξαρτάται από παράγοντες όπως η φωτοπερίοδος, η θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα του οξυγόνου, η ποιότητα τροφής και το σωματικό μέγεθος των θηλυκών ατόμων (Pankhurst & Porter 2003, Uusi-Heikkilä et al. 2012, Donelson et al. 2010, Jonsson & Jonsson 2014). Οι ρύποι με τους οποίους έρχονται σε επαφή τα ψάρια σε κάποια φάση της ζωής τους, μπορούν επίσης να συμβάλλουν στην μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητάς τους (Penglase et al. 2014, Orbea et al. 2017). Το κυανοβακτήριο *M. aeruginosa* κατά το τέλος της άνθησής του ελευθερώνει μια ομάδα βιοενεργών/τοξικών ενώσεων, οι οποίες θα μπορούσαν να επηρεάζουν σημαντικά την αναπαραγωγική ικανότητα των ψαριών. Οι Liu et al. (2018b), διερεύνησαν αυτήν την υπόθεση μετά από έκθεση ενήλικων zebrafish σε εκχύλισμα *M. aeruginosa* και έδειξαν μη σημαντική επίδραση στη γονιμότητα των θηλυκών ατόμων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας ωστόσο, η γονιμότητα

του zebrafish μειώνεται σημαντικά όταν η έκθεση στις τοξίνες του *M. aeruginosa* γίνεται νωρίς στην ανάπτυξη του οργανισμού (εμβρυϊκό στάδιο), πολύ πριν την αναπαραγωγική ωρίμανση.

Στην παρούσα εργασία, η μείωση της σχετικής γονιμότητας των εκτεθειμένων στο εκχύλισμα πληθυσμών συνοδεύτηκε από σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *fshr* (υποδοχέας της fsh) και *bmp15* (bone morphogenetic protein-15) στις ωοθήκες. Ανάλογη αύξηση των επιπέδων έκφρασης του *fshr* έχει δειχθεί ως απόκριση στην έκθεση ενηλίκων zebrafish στις κυανοτοξίνες (Hou et al. 2016b, Liu et al. 2018b). Η υπερέκφραση του *fshr* έχει μελετηθεί σε κυτταρικές σειρές και έχει βρεθεί ότι μπορεί να σχετίζεται με αυξημένο πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων των ωοθηκών (Choi et al. 2004, Song et al. 2020). Δεδομένου ότι η αναπαραγωγική ωρίμανση είναι μια σύνθετη διαδικασία που καθορίζεται από περίπλοκα ενδοκρινικά μονοπάτια του άξονα υποθαλάμου, υπόφυσης, γονάδων (Zhao et al. 2014), η αύξηση της έκφρασης του *fshr* θα μπορούσε να αποτελεί απόκριση του οργανισμού έναντι πιθανώς τροποποιημένων επιπέδων της ωοθηλακιοτρόπου ορμόνης (fsh). Η τελευταία εκκρίνεται από την υπόφυση και δρα στις ωοθήκες, ενεργοποιώντας την είσοδο των ωοθηλακίων στην φάση της λεκιθογενούς αύξησης (Zhang et al., 2015). Το δεύτερο γονίδιο που στην παρούσα εργασία παρουσίασε διαφοροποίηση των επιπέδων έκφρασης μεταξύ των πειραματικών ομάδων, *bmp15*, έχει βρεθεί ότι λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της ανάπτυξης των ωοκυττάρων. Σε τιμές υψηλότερες του φυσιολογικού ο *bmp15* μπορεί να είναι καθοριστικός παράγοντας για την μείωση της γονιμότητας του οργανισμού (Tan et al. 2008, Zhao et al. 2015).

Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *vtg1*, *vtg2* (γονίδια της βιτελλογενίνης) και *cyp1a* (γονίδιο του cytochrome P450 1A) στο ήπαρ δεν διαφοροποιήθηκαν σημαντικά μεταξύ των εκτεθειμένων και μη εκτεθειμένων θηλυκών (παρούσα εργασία). Στην περίπτωση του *cyp1a* το αποτέλεσμα θεωρείται λογικό, λόγω του η υπερέκφραση αυτού παράγοντα αποτελεί μέρος ενός μηχανισμού απομάκρυνσης τοξινών από τον οργανισμό (Liu et al. 2018b). Στην παρούσα εργασία ωστόσο η έκθεση των οργανισμών στις τοξίνες είχε γίνει στο εμβρυϊκό στάδιο, πολύ πριν δηλαδή την μέτρηση των επιπέδων του *cyp1a*.

4.2 Επίδραση του εκχυλίσματος *M. aeruginosa* στην κολυμβητική ικανότητα των ιχθύων

Η κολυμβητική ικανότητα των ιχθύων έχει δειχθεί ότι επηρεάζεται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες των πρώιμων σταδίων ανάπτυξης του οργανισμού (Cano-Barbacid et al. 2020), συμπεριλαμβανομένων των ρύπων και των κυανοτοξινών (Hicken et al. 2011, Sergi et al. 2022). Στην

τελευταία περίπτωση, η μείωση της κολυμβητικής ικανότητας των ψαριών αποδίδεται στην τροποποίηση της λειτουργίας και δομής της καρδιάς των ψαριών από την δράση των τοξικών ουσιών, και στην επακόλουθη μείωση της παροχής αίματος στους σωματικούς μύες (Hicken et al. 2011, Sergi et al. 2022). Στην παρούσα εργασία, η μείωση της κολυμβητικής ικανότητας λόγω της αρχικής έκθεσης στα υποθησιγόνα επίπεδα των κυανοτοξινών δεν συνοδεύτηκε από αλλαγές στη δομή της καρδιάς των ψαριών. Γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί στο ότι η έκθεση έγινε μετά την ολοκλήρωση του σχηματισμού των βασικών δομικών στοιχείων της καρδιάς (όπως η κοιλία και βαλβίδες) (Bakkers 2011, Yalcin et al. 2017, Incardona et al. 2021), με αποτέλεσμα να μην μπορεί η τοξίνη να επηρεάσει στην κυκλικότητα της κοιλίας. Στις 60 hpf ωστόσο, ξεκινά ο σχηματισμός των δοκίδων (trabeculation) του μυοκαρδίου στην κοιλότητα της κοιλίας (Sedmera et al. 2000, Incardona et al. 2021). Οι δοκίδες αυτές σχηματίζουν ένα δίκτυο μέσα στην κοιλότητα το οποίο αποτελείται από κύτταρα του μυοκαρδίου και καλύπτεται από ένα στρώμα ενδοκαρδίου. Οι δοκίδες αυξάνουν την καρδιακή παροχή και την πρόσληψη οξυγόνου στο μυοκάρδιο, με το μέγεθος και σχήμα της καρδιάς να παραμένει αμετάβλητο (Liu et al. 2011). Κατά την οντογένεση, οι δοκίδες υπόκεινται σε έντονη αναδιαμόρφωση μαζί με τον πολλαπλασιασμό του συμπαγούς μυοκαρδίου, τη δημιουργία των στεφανιαίων αρτηριών, και την ολοκλήρωση του συστήματος αγωγιμότητας (conduction system) (Ann Samsa et al. 2013). Στην παρούσα εργασία, η έκθεση των νυμφών στις κυανοτοξίνες έγινε σε ένα διάστημα (48-96 hpf) όπου θα μπορούσε να επηρεαστεί ο σχηματισμός των δοκίδων της κοιλίας, οδηγώντας έτσι και στην μείωση της κολυμβητικής ικανότητας που παρατηρήθηκε. Ενδεχομένως, η μείωση της κολυμβητικής ικανότητας θα μπορούσε να αποδοθεί σε μόνιμες μεταβολές της δομής άλλων οργάνων που εμπλέκονται στην αερόβια κολυμβητική ικανότητα των ψαριών (σωματικοί μύες, βράγχια, Evans 1987).

4.3 Συμπερασματικά

Το *M. aeruginosa* είναι ένα κυανοβακτήριο που είναι υπεύθυνο σε παγκόσμια κλίμακα για τοξικές ανθίσεις σε λίμνες και υγροτόπους. Πολλές εργασίες επικεντρώνονται στην διερεύνηση των προβλημάτων που μπορεί να δημιουργεί στους υδρόβιους οργανισμούς, προσομοιώνοντας το τέλος μιας άνθισης στο πεδίο οπότε και οι βιοενεργές ενώσεις ελευθερώνονται στην στήλη του νερού. Στην εργασία αυτή δείχθηκε ότι η βραχυχρόνια έκθεση των πρώιμων εμβρύων και νυμφών των ψαριών στο *M. aeruginosa*, μπορεί να αλλάξει σημαντικά την δομή και λειτουργία τους για το υπόλοιπο της ζωής τους. Οι ακριβείς υποκείμενοι μηχανισμοί αυτών των αποκρίσεων (μειωμένη γονιμότητα και κολυμβητική ικανότητα) θα μπορούσαν να αποτελέσουν πεδίο έρευνας μελλοντικών εργασιών.

5. Βιβλιογραφία

- Ács, A., Kovács, A.W., Csepregi, J.Z., Tőro, N., Kiss, G., Gyori, J., Vehovszky, Á., Kováts, N., Farkas, A., 2013. The ecotoxicological evaluation of *Cylindrospermopsis raciborskii* from Lake Balaton (Hungary) employing a battery of bioassays and chemical screening. *Toxicon* 70, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.04.019>
- Anderson P.D, Dapollonia S., 1978. Principle of ecotoxicology. *SCOPE* 12, pp. 194–201.
- Ann Samsa, L., Yang, B., Liu, J., 2013. Embryonic Cardiac Chamber Maturation: Trabeculation, Conduction, and Cardiomyocyte Proliferation. *American Journal of Medical Genetics Part C (Seminars in Medical Genetics)* 163, 157–168. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31366>
- Arufe, M.I., Arellano, J., Moreno, M.J., Sarasquete, C., 2004. Toxicity of a commercial herbicide containing terbutryn and triasulfuron to seabream (*Sparus aurata* L.) larvae: A comparison with the Microtox test. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59, 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.12.010>
- Bakkers, J., 2011. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardadiac disease. *Cardiovascular Research* 279–288. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr098>
- Beamish F. W. H. (1978) Swimming capacity, *Fish Physiology*, Academic Press, pp. 101-187
- Bobori, D., Dimitriadi, A., Karasiali, S., Tsoumaki-Tsouroufli, P., Mastora, M., Kastrinaki, G., Feidantsis, K., Printzi, A., Koumoundouros, G., & Kaloyianni, M. (2020). Common mechanisms activated in the tissues of aquatic and terrestrial animal models after TiO₂ nanoparticles exposure. *Environment International*, (138), 105611. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2020.105611>
- Boopathi, T., Ki, J.-S., 2014. Impact of environmental factors on the regulation of cyanotoxin production. *Toxins* 6, 1951–1978. <https://doi.org/10.3390/toxins6071951>
- Brett, J.R., 1967. Swimming Performance of Sockeye Salmon (*Oncorhynchus nerka*) in relation to Fatigue Time and Temperature. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 24(8): pp. 1731-1741. <https://doi.org/10.1139/f67-142>.
- Cai, L., Chen, J., Johnson, D., Tu, Z., Huang, Y., 2020. Effect of body length on swimming capability and vertical slot fishway design. *Global Ecology and Conservation* 22. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e00990>
- Cano-Barbacid, C., Radinger, J., Argudo, M., Rubio-Gracia, F., Vila-Gispert, A., García-Berthou, E., 2020. Key factors explaining critical swimming speed in freshwater fish: a review and statistical analysis for Iberian species. *Scientific Reports*.pp.1-12 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75974-x>
- Chen Z.-Y., Li N.-J., Cheng F.-Y., Hsueh J.-F., Huang C.-C., Lu F.-I., Fu T.-F., Yan S.-J., Lee Y.-H., & Wang Y.-J. (2020). The Effect of the Chorion on Size-Dependent Acute Toxicity and Underlying Mechanisms of

- Amine-Modified Silver Nanoparticles in Zebrafish Embryos. *International Journal of Molecular Sciences* (8), pp.1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms21082864>
- Choi, J.-H., Choi, K.-C., Auersperg, N., Leung, P.C.K., 2004. Overexpression of Follicle-Stimulating Hormone Receptor Activates Oncogenic Pathways in Preneoplastic Ovarian Surface Epithelial Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89, pp. 5508–5516. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0044>
- Chorus, I., & Welker, M. (Eds.). (2021). *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management* (2nd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003081449>
- Christophoridis, C., Zervou, S.K., Manolidi, K., Katsiapi, M., Moustaka-Gouni, M., Kaloudis, T., Triantis, T.M., Hiskia, A., 2018. Occurrence and diversity of cyanotoxins in Greek lakes. *Scientific Reports* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35428-x>
- Christou, M., Iliopoulou, M., Witten, P.E., Koumoundouros, G., 2018. Segmentation pattern of zebrafish caudal fin is affected by developmental temperature and defined by multiple fusions between segments. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 330, pp. 330–340. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jez.b.22825>
- Codd, G.A., Morrison, L.F., Metcalf, J.S., 2005. Cyanobacterial toxins: Risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203, pp. 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.02.016>
- Descamps, E., Sochacka, A., de Kegel, B., van Loo, D., Hoorebeke, L. van, Adriaens, D., 2014. Soft tissue discrimination with contrast agents using micro-CT scanning. *Belgian Journal of Zoology*(144) .
- Dimitriadi, A., Beis, D., Arvanitidis, C., Adriaens, D., Koumoundouros, G., 2018. Developmental temperature has persistent, sexually dimorphic effects on zebrafish cardiac anatomy. *Scientific Reports* (8). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25991-8>
- Dimitriadi, A., Papaefthimiou, C., Genizegkini, E., Sampsonidis, I., Kalogiannis, S., Feidantsis, K., Bobori, D. C., Kastrinaki, G., Koumoundouros, G., Lambropoulou, D. A., Kyzas, G. Z., & Bikiaris, D. N. (2021). Adverse effects polystyrene microplastics exert on zebrafish heart–Molecular to individual level. *Journal of Hazardous Materials*, (416), 125969. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2021.125969>
- Dittmann E, Erhard M, Kaebernick M, Scheler C, Neilan BA, von Döhren H, Börner T., 2001 Altered expression of two light-dependent genes in a microcystin-lacking mutant of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Microbiology* (147), pp. 3113–3119
- Gioacchini, G., Maradonna, F., Lombardo, F., Bizzaro, D., Olivotto, I., Carnevali, O., 2010. Increase of fecundity by probiotic administration in zebrafish (*Danio rerio*). *Reproduction* (140), pp. 953–959. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0145>

- Hicken, C.E., Linbo, T.L., Baldwin, D.H., Willis, M.L., Myers, M.S., Holland, L., Larsen, M., Stekoll, M.S., Rice, S.D., Collier, T.K., Scholz, N.L., Incardona, J.P., Goss, G., 2011. Sublethal exposure to crude oil during embryonic development alters cardiac morphology and reduces aerobic capacity in adult fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (108), pp 7086–7090. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019031108>
- Hiskia, A. Triantis, T.M., Antoniou, M.G., de la Cruz, A.A., O'Shea, K., Song, W., Fotiou, T., Kaloudis, T., He, X., Andersen, J., Dionysiou, D.D. (2014) 'Transformation products of hazardous cyanobacterial metabolites in water' , Transformation Products of Emerging Contaminants in the Environment: Analysis, Processes, Occurrence, Effects and Risks, John Wiley & Sons, pp. 675-708.
- Hou, J., Li, L., Wu, N., Su, Y., Lin, W., Li, G., Gu, Z., 2016a. Reproduction impairment and endocrine disruption in female zebrafish after long-term exposure to MC-LR. *Environmental Pollution* (208), 477–485. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.10.018>
- Incardona, J.P., Carls, M.G., Holland, L., Linbo, T.L., Baldwin, D.H., Myers, M.S., Peck, K.A., Tagal, M., Rice, S.D., Scholz, N.L., 2015. Very low embryonic crude oil exposures cause lasting cardiac defects in salmon and herring. *Scientific Reports*(9). <https://doi.org/10.1038/srep13499>
- Donelson J.M., Munday P.L., McCormick M.I., Pankhurst N.W., Pankhurst P.M., 2010. Effects of elevated water temperature availability on the reproductive performance of a coral reef fish. *Marine Ecology Progress series* (401).
- James M. McKim ,1997. Evaluation of Tests with Early Life Stages of Fish for Predicting Long-Term Toxicity. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* . (34) pp.1148-1154. <https://doi.org/10.1139/f77-172>
- Jonas, A., Scholz, S., Fetter, E., Sychrova, E., Novakova, K., Ortmann, J., Benisek, M., Adamovsky, O., Giesy, J.P., Hilscherova, K., 2015. Endocrine, teratogenic and neurotoxic effects of cyanobacteria detected by cellular in vitro and zebrafish embryos assays. *Chemosphere* (120), pp 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.074>
- Jonsson, B., Jonsson, N., 2014. Early environment influences later performance in fishes. *Journal of Fish Biology*. (85) pp. 151-188 <https://doi.org/10.1111/jfb.12432>
- Kehr, J.-C., Zilliges, Y., Springer, A., Disney, M.D., Ratner, D.D., Bouchier, C., Seeberger, P.H., Tandeau De Marsac, N., Dittmann, E., 2006. A mannan binding lectin is involved in cell-cell attachment in a toxic strain of *Microcystis aeruginosa*. *Molecular Microbiology* (59), pp. 893–906. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05001.x>
- Kendall A.W, Ahlstrom E.H, Moser H.G, 1984. Early life history stages of fishes and their characters. *Ontogeny and systematics of fishes* pp. 11–24.

- Kimmel, C. B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish, *Developmental Dynamics*, 203(3), pp. 253–310.
- Koumoundouros, G., Ashton, C., Sfakianakis, D.G., Divanach, P., Kentouri, M., Anthwal, N., Stickland, N.C., 2009. Thermally induced phenotypic plasticity of swimming performance in European sea bass *Dicentrarchus labrax* juveniles. *Journal of Fish Biology* (74), pp. 1309–1322. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02206.x>
- Koumoundouros, G., Sfakianakis, D.G., Divanach, P., Kentouri, M., 2002. Effect of temperature on swimming performance of sea bass juveniles. *Journal of Fish Biology* (60), 923–932. <https://doi.org/10.1006/jfbi.2002.1902>
- Liu, G., Ke, M., Fan, X., Zhang, M., Zhu, Y., Lu, T., Sun, L., Qian, H., 2018a. Reproductive and endocrine-disrupting toxicity of *Microcystis aeruginosa* in female zebrafish. *Chemosphere* (192), pp. 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.167>
- Liu, Y., Song, L., Li, X., Liu, T., 2001. The toxic effects of microcystin-LR on embryo-larval and juvenile development of loach, *Misguruns mizolepis* Gunthe. *Toxicon*.(40)pp. 395-399
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* (25), pp. 402–408. <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>
- Martínez, G., Peña, E., Martínez, R., Camarillo, S., Burggren, W., Álvarez, A., 2021. Survival, growth, and development in the early stages of the tropical gar *Atractosteus tropicus*: Developmental critical windows and the influence of temperature, salinity, and oxygen availability. *Fishes* (6), pp. 1–26. <https://doi.org/10.3390/FISHES6010005>
- Ninio, S., Lupu, A., Viner-Mozzini, Y., Zohary, T., Sukenik, A., 2020. Multiannual variations in *Microcystis* bloom episodes – Temperature drives shift in species composition. *Harmful Algae* (92). <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101710>
- O’Neil, J.M., Davis, T.W., Burford, M.A., Gobler, C.J., 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* (14), pp. 313–334. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.027>
- Orbea, A., González-Soto, N., Lacave, J.M., Barrio, I., Cajaraville, M.P., 2017. Developmental and reproductive toxicity of PVP/PEI-coated silver nanoparticles to zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* (199), pp. 59–68. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2017.03.004>
- Paerl, H.W., 2014. Mitigating harmful cyanobacterial blooms in a human- and climatically-impacted world. *Life* (4), pp 988–1012. <https://doi.org/10.3390/LIFE4040988>

- Paerl, H.W., Gardner, W.S., Havens, K.E., Joyner, A.R., McCarthy, M.J., Newell, S.E., Qin, B., Scott, J.T., 2016. Mitigating cyanobacterial harmful algal blooms in aquatic ecosystems impacted by climate change and anthropogenic nutrients. *Harmful Algae*. (54) pp. 213-222 <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.09.009>
- Pankhurst, N.W., Porter, M.J.R., 2003. Cold and dark or warm and light: variations on the theme of environmental control of reproduction, *Fish Physiology and Biochemistry* (2)8, pp385–389.
- Papadimitriou, T., Armeni, E., Stalikas, C.D., Kagalou, I., Leonardos, I.D., 2012. Detection of microcystins in Pamvotis lake water and assessment of cyanobacterial bloom toxicity. *Environmental Monitoring and Assessment* (184), pp. 3043–3052. <https://doi.org/10.1007/s10661-011-2169-5>
- Parichy, D.M., Elizondo, M.R., Mills, M.G., Gordon, T.N., Engeszer, R.E., 2009. Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish. *Developmental dynamics*. (238) pp. 2975-3015 <https://doi.org/10.1002/dvdy.22113>
- Penglase, S., Hamre, K., Ellingsen, S., 2014. Selenium and mercury have a synergistic negative effect on fish reproduction. *Aquatic Toxicology* (149), pp 16–24. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2014.01.020>
- Pflugmacher, S., 2002. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-Lr, in aquatic ecosystems. *Environ Toxicol* (17), pp. 407–413. <https://doi.org/10.1002/tox.10071>
- Pietsch, C., Wiegand, C., Amé, M.V., Nicklisch, A., Wunderlin, D., Pflugmacher, S., 2001. The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: evidence for cyanobacterial toxin modulating factors. *Environ Toxicol* (16), pp. 535–542. <https://doi.org/10.1002/tox.10014>
- Pipal, M., Priebojova, J., Koci, T., Blahova, L., Smutna, M., Hilscherova, K., 2020. Field cyanobacterial blooms producing retinoid compounds cause teratogenicity in zebrafish embryos. *Chemosphere* (241). <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.125061>
- Rogers, E.D., Henry, T.B., Twiner, M.J., Gouffon, J.S., McPherson, J.T., Boyer, G.L., Sayler, G.S., Wilhelm, S.W., 2011. Global gene expression profiling in larval zebrafish exposed to microcystin-LR and microcystis reveals endocrine disrupting effects of cyanobacteria. *Environmental Science and Technology* (45), pp. 1962–1969. <https://doi.org/10.1021/es103538b>
- Rohrlack, T., Dittmann, E., Börner, T., Christoffersen, K., 2001. Effects of cell-bound microcystins on survival and feeding of *Daphnia spp.* *Applied and Environmental Microbiology* (67), pp. 3523–3529. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3523-3529.2001>
- Saraf, S.R., Frenkel, A., Harke, M.J., Jankowiak, J.G., Gobler, C.J., McElroy, A.E., 2018a. Effects of Microcystis on development of early life stage Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Comparative toxicity of natural blooms, cultured Microcystis and microcystin-LR. *Aquatic Toxicology* (194), pp 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.10.026>

- Sedmera, D., Pexieder, T., Vuillemin, M., Thompson, R.P., Anderson, R.H., 2000. Developmental Patterning of the Myocardium, *The Anatomical Record* (258)pp.319-337
- Sergi, E., Orfanakis, M., Dimitriadi, A., Christou, M., Zachopoulou, A., Kourkouta, Ch., Printzi, A., Zervou, S.-K., Makridis, P., Hiskia, A., Koumoundouros, G., 2022. Sublethal exposure to *Microcystis aeruginosa* extracts during embryonic development reduces aerobic swimming capacity in juvenile zebrafish. *Aquatic Toxicology* (243). <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106074>
- Song, C., Gao, H.-W., Wu, L.-L., 2011. Transmembrane transport of Microcystin to *Danio rerio* zygotes: insights into the developmental toxicity of environmental contaminants. *Toxicological Sciences* (122), pp. 395–405. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr131>
- Song, K., Dai, L., Long, X., Wang, W., Di, W., 2020. Follicle-stimulating hormone promotes the proliferation of epithelial ovarian cancer cells by activating sphingosine kinase. *Scientific Reports* (10). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70896-0>
- Stewart, W.D.P., Haystead, A., Pearson, H.W., 1969. Nitrogenase Activity in Heterocysts of Blue-Green Algae, *Nature*. (224), pp. 226–228
- Svrcek, C., Smith, D.W., 2004. Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options. *Journal of Environmental Engineering and Science* (3) pp. 155-185 <https://doi.org/10.1139/S04-010>
- Tan, Q., Balofsky, A., Weisz, K., Peng, C., 2008. Role of activin, transforming growth factor- β and bone morphogenetic protein 15 in regulating zebrafish oocyte maturation ☆. *Comparative Biochemistry and Physiology*, (Part A 153), pp. 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.09.016>
- Teng, M., Chen, X., Wang, Chen, Song, M., Zhang, J., Bi, S., Wang, Chengju, 2020. Life cycle exposure to propiconazole reduces fecundity by disrupting the steroidogenic pathway and altering DNA methylation in zebrafish (*Danio rerio*). *Environment International* (135). <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105384>
- Tonk, L. (2007). Impact of environmental factors on toxic and bioactive peptide production by harmful cyanobacteria. PhD theses in Universiteit van Amsterdam.
- Utkilen, H., Gjølme, N., 1995. Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology* (2), pp.797-800.
- Uusi-Heikkilä, S., Kuparinen, A., Wolter, C., Meinelt, T., Arlinghaus, R., 2012. Paternal body size affects reproductive success in laboratory-held zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Biology of Fishes* (93), pp. 461–474. <https://doi.org/10.1007/s10641-011-9937-5>
- Videler J., 1993. Fish Swimming, 1st ed. London.

- Wang, Q., Liu, Y., Guo, J., Lin, S., Wang, Y., Yin, T., Gregersen, H., Hu, T., Wang, G., 2019. Microcystin-LR induces angiodysplasia and vascular dysfunction through promoting cell apoptosis by the mitochondrial signaling pathway. *Chemosphere* (218), pp. 438–448. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.019>
- Wilhelm, S.W., Bullerjahn, G.S., Michael, R., McKay, L., 2020. The Complicated and Confusing Ecology of Microcystis Blooms. *American Society for Microbiology* (11), e00529-20. <https://doi.org/10.1128/mBio>
- Wolter, C., Arlinghaus, R., 2003. Navigation impacts on freshwater fish assemblages: the ecological relevance of swimming performance. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* (13), pp.63–89.
- Wu, Q., Yan, W., Liu, C., Li, L., Yu, L., Zhao, S., Li, G., 2016a. Microcystin-LR exposure induces developmental neurotoxicity in zebrafish embryo. *Environmental Pollution* (213) pp. 793-800 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.048>
- Yalcin, H.C., Amindari, A., Butcher, J.T., Althani, A., Yacoub, M., 2017. Heart function and hemodynamic analysis for zebrafish embryos. *Developmental Dynamics* (246), pp. 868–880. <https://doi.org/10.1002/dvdy>
- Zeng, C., Sun, H., Xie, P., Wang, J., Zhang, G., Chen, N., Yan, W., Li, G., 2014. The role of apoptosis in MCLR-induced developmental toxicity in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology* (149), pp. 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.021>
- Zhao, Y., Xie, L., Yan, Y., 2015. Microcystin-LR impairs zebrafish reproduction by affecting oogenesis and endocrine system. *Chemosphere* (120), pp. 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.028>
- Zhang Zhiwei, Lau Shuk-Wa, Zhang Lingling, & Ge Wei. (2015). Disruption of Zebrafish Follicle-Stimulating Homone Receptor (fshr)But Not Luteinizing Hormone Receptor (lhcg) Gene by TALEN Leads to Faild Follicle Activation in Females Folloed by Sexual Reversal to Males. *Endocrinology*, (156), pp. 3747–3762. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1039>
- Δημητριάδη Α. 2018. Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην καρδιά, στην κολυμβητική ικανότητα και στη γονιμότητα του zebrafish *Danio rerio* (Hamilton 1822). Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης