

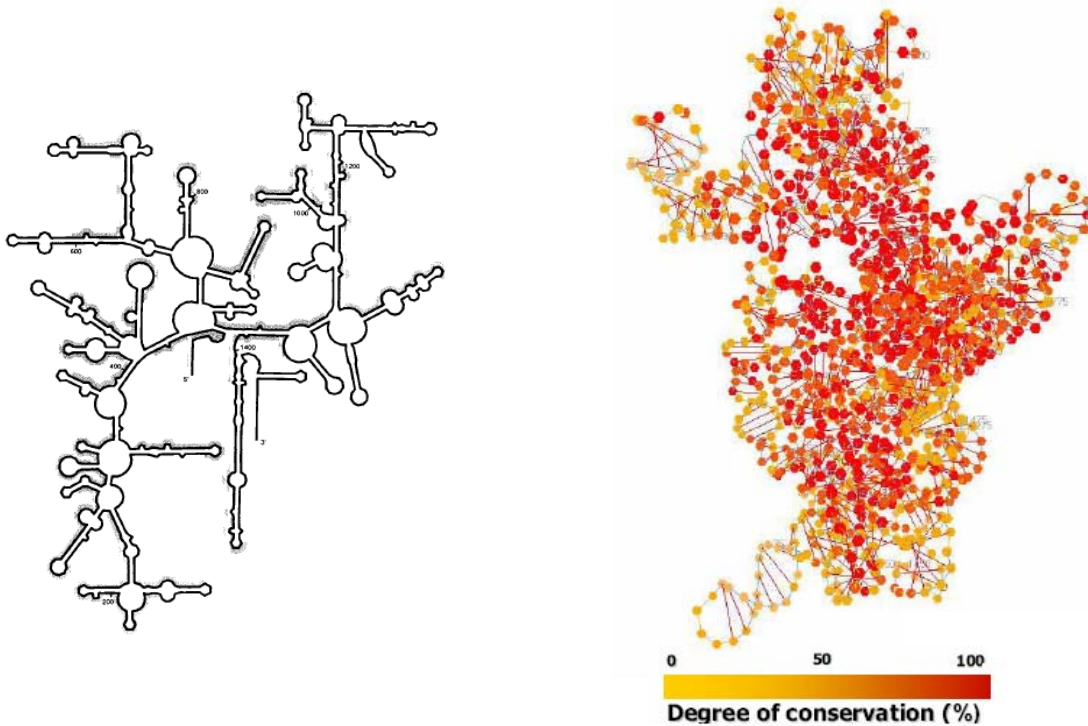
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΜΣ Επιστήμες και Μηχανική Περιβάλλοντος

Κουριδάκη Ιωάννα
Διπλωματούχος Βιολόγος

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΚΤΗΣΗ ΜΔΕ ΣΤΙΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΗ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

‘Συγκριτική φυλογενετική ανάλυση της βακτηριακής ποικιλότητας σε βαθιά
θαλάσσια ιζήματα του Ειρηνικού Ωκεανού και της Ανατολικής Μεσογείου (σταθμός
km3net)’



ΗΡΑΚΛΕΙΟ, 2009

Επιβλέπων Καθηγητής:

Ευριπίδης Γ. Στεφάνου, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Κρήτης

Εξεταστική Επιτροπή:

Ευριπίδης Γ. Στεφάνου, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Κρήτης

Δημήτρης Γανωτάκης, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Κρήτης

Αναστάσιος Τσελεπίδης, Καθηγητής Παν/μίου Πειραιώς

Το Πειραματικό μέρος της Διατριβής εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βενθικής Μικροβιακής Οικολογίας (Ι.ΘΑ.ΒΙ.Γ) του ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ (ΕΛΚΕΘΕ) με Επιβλέπουσα Ερευνήτρια την Δρ. Παρασκευή Πολυμενάκου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Δρ. Παρασκευή Πολυμενάκου για την υπομονή και την πολύτιμη βοήθειά της, καθώς και στον Κο Ευριπίδη Γ. Στεφάνου για την καθοδήγηση και την συμπαράστασή του.

Φώτο εξωφύλλου:

Αριστερά: Δευτεροταγής δομή του 16S ριβοσωμικού RNA (Amann et al, 1995).

Δεξιά: Το συντηρητικό προφίλ της τριτοταγούς δομής του 16S ριβοσωμικού RNA (Kumar et al, 2006)

στην ανηψούλα μου Γιάννα
και στην αδερφούλα της, που με τόση ανυπομονησία περιμένουμε..

Περιεχόμενα

| | |
|--|-----------|
| 1. Περίληψη | 4 |
| 2. Εισαγωγικά Στοιχεία | 5 |
| 2.1 Γενικά. | 5 |
| 2.2 Μοριακές τεχνικές στην μικροβιακή οικολογία..... | 6 |
| 2.3 Τα βαθιά θαλάσσια οικοσυστήματα | 13 |
| 2.4 Η Ανατολική Μεσόγειος | 16 |
| 2.5 Ο Ειρηνικός Ωκεανός | 18 |
| 2.6 Στόχοι παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής | 20 |
| 3. Πειραματικό Μέρος | 20 |
| 3.1 Σταθμοί δειγματοληψίας & Λήψη δειγμάτων | 20 |
| 3.2 Κατασκευή βιβλιοθηκών κλώνων του γονιδίου του 16S ριβοσωμικού RNA | 22 |
| 3.2.1 Εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων | 23 |
| 3.2.2 Απομόνωση & Πολ/σμός του γονιδίου 16S ριβοσωμικού DNA με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) | 23 |
| 3.2.3 Κλωνοποίηση του γονιδίου 16S ριβοσωμικού DNA | 24 |
| 3.2.4 Αλληλούχιση του γονιδίου 16S ριβοσωμικού DNA | 25 |
| 3.2.5 Φυλογενετική ανάλυση | 27 |
| 3.3 Βακτηριακή ποικιλότητα | 28 |
| 3.4 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων | 28 |
| 4. Αποτελέσματα | 28 |
| 4.1 Χημικά χαρακτηριστικά των ιζημάτων..... | 28 |
| 4.2 Βακτηριακή ποικιλότητα | 29 |
| 4.3 Βακτηριακή σύσταση και σύγκριση των βιβλιοθηκών κλώνων του γονιδίου 16S ριβοσωμικού RNA | 30 |
| 5. Συζήτηση | 39 |
| 5.1 Χημικά χαρακτηριστικά των ιζημάτων | 39 |
| 5.2 Βακτηριακή ποικιλότητα | 40 |
| 5.3 Βακτηριακή σύσταση και σύγκριση των βιβλιοθηκών κλώνων του γονιδίου του 16S ριβοσωμικού RNA | 41 |
| 5.3.1 Βιβλιοθήκες Alvin | 41 |
| 5.3.2. Βιβλιοθήκη KM3 | 43 |
| 5.4 Σύγκριση των βενθικών μικροκοινωνιών του Ειρηνικού Ωκεανού και της Ανατολικής Μεσογείου | 45 |
| 5.5 Μελλοντικοί στόχοι | 47 |
| 6. Παράρτημα | 48 |
| 7. Βιβλιογραφία | 50 |
| 8. Εργασία υπό δημοσίευση | 58 |

1. Περίληψη

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη της βακτηριακής σύστασης και ποικιλότητας μεταξύ βαθιών θαλάσσιων ιζημάτων (βάθη: 4000 μέτρα), τα οποία συλλέχθηκαν από τον Ειρηνικό Ωκεανό (ALVIN, 4 δείγματα) και την Ανατολική Μεσόγειο (KM3 net, 1 δείγμα). Πρόκειται για την πρώτη προσπάθεια σύγκρισης βακτηριακών βιοκοινωνιών μεγάλου βάθους των προαναφερθέντων θαλάσσιων οικοσυστημάτων, μεταξύ των οποίων δεν πραγματοποιείται καμία ανταλλαγή υδάτινων μαζών. Στα πλαίσια της μελέτης αυτής, κλωνοποιήθηκαν συνολικά 304 βακτηριακές αλληλουχίες του συντηρημένου γονιδίου 16S ριβοσωμικού RNA, οι οποίες και χρησιμοποιήθηκαν για φυλογενετική ανάλυση και ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε η ανάλυση τριών χημικών παραμέτρων: χλωροφύλλη α, οργανικός άνθρακας και λόγος C/N. Διαπιστώθηκε ότι τα υπό μελέτη μικροπεριβάλλοντα του Ειρηνικού Ωκεανού ήταν μεσοτροφικά σε αντίθεση με αυτό της Ανατολικής Μεσογείου, που ήταν ισχυρά ολιγοτροφικό, ενώ βρέθηκε ότι ο οργανικός άνθρακας είναι ο παράγοντας που συνδέεται άμεσα με την δομή των βακτηριακών μικροκοινωνιών. Επιπλέον, διαπιστώθηκε η υψηλή βιοποικιλότητα και στα πέντε μικροπεριβάλλοντα, με αυτό της Ανατολικής Μεσογείου να χαρακτηρίζεται από την υψηλότερη τιμή. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η σύνθεση των μικροβιακών κοινωνιών των υπό μελέτη θαλασσιών οικοσυστημάτων δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές, καθιστώντας την πίεση ως τον καθοριστικό παράγοντα επιλογής των φυλογενετικών βακτηριακών ομάδων που δομούν τις εκάστοτε μικροβιακές κοινωνίες σε βάθη 4000 μέτρων. Σύμφωνα με την φυλογενετική ανάλυση, οι κλώνοι του γονιδίου του 16S ριβοσωμικού RNA ταξινομήθηκαν στις ακόλουθες φυλογενετικές ομάδες: Acidobacteria, Actinobacteria, Planctomycetes, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Nitrospirae, Chloroflexi, Verucomicrobia, Bacteroidetes και OP11 (υποψήφια ταξινομική ομάδα). Επιπρόσθετα, το ποσοστό των βακτηριακών αλληλουχιών που δεν ταξινομήθηκε σε καμία γνωστή φυλογενετική ομάδα, ήταν ιδιαίτερα υψηλό και για τις πέντε βακτηριακές βιοκοινωνίες. Οι υψηλές τιμές βιοποικιλότητας και το μεγάλο ποσοστό των 'άγνωστων' αλληλουχιών του γονιδίου 16S ριβοσωμικού RNA αποτελούν σαφή ένδειξη μικροπεριβαλλόντων ιδιαίτερης σημασίας ('hot spot'), καθιστώντας αναγκαία την περαιτέρω διερεύνηση τους.

2. Εισαγωγικά στοιχεία

2.1 Γενικά

Τα βακτήρια χαρακτηρίζονται από εκπληκτική ποικιλότητα και αφθονία, παρά το γεγονός ότι πρόκειται για μονοκύτταρους οργανισμούς με το μέγεθός τους να μην ποικίλει ιδιαίτερα. Πράγματι, έχουν εντοπιστεί βακτήρια πολλών διαφορετικών ταξινομικών ομάδων με ποικίλες εν δυνάμει φαινοτυπικές ιδιότητες, φυσιολογικές δραστηριότητες και οικολογικές λειτουργίες. Ο προσδιορισμός των σχέσεων μεταξύ των βακτηριακών κοινωνιών και των περιβαλλοντικών παραμέτρων έχει ιδιαίτερη σημασία για την αποσαφήνιση του ρόλου των βακτηρίων στον κύκλο του άνθρακα και των λοιπών θρεπτικών συστατικών (βλ. DeLong et al. 2006, Gallagher et al., 2004, Lopez-Garcia et al., 2001, Garcia-Martinez et al., 2002 και Sogin et al., 2006). Επιπλέον, τα βακτήρια χαρακτηρίζονται από εκπληκτική αφθονία με τον συνολικό αριθμό των ζώντων προκαρυωτικών κυττάρων να έχει εκτιμηθεί γύρω στα $4 - 6 \times 10^{30}$, από τα οποία τα 1.2×10^{29} δραστηριοποιούνται στον ωκεανό, τα 2.6×10^{29} στο έδαφος και τα $0.25 - 2.4 \times 10^{30}$ στα υποεπιφανειακά εδάφη και ιζήματα (Whitman et al., 1998). Ταυτόχρονα, τα βακτήρια θεωρούνται κοσμοπολίτικοι οργανισμοί, οι οποίοι έχουν καταφέρει να αποικίσουν ακόμη και τα πιο ακραία περιβάλλοντα, όπως τις υδροθερμικές πηγές, χαρακτηριστικά περιβάλλοντα με θερμοκρασίες που προσεγγίζουν τους 300°C (Brock, 1978), όξινα περιβάλλοντα με τιμές pH κοντά στο μηδέν (Baker and Banfield, 2003), λεκάνες υψηλής αλατότητας καθώς και τους πάγους του Ανταρκτικού Ωκεανού (Christner et al., 2001). Στην πραγματικότητα, τα βακτήρια είναι αυτά που καθορίζουν τα περιβαλλοντικά όρια της ζωής (Horner-Devine et al., 2003). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το βακτηριακό είδος *Thermus aquaticus*, που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή προέλευσης της διαδεδομένης πολυμεράσης Taq, η ανακάλυψη της οποίας αποτέλεσε σταθμό για την ανάπτυξη της σύγχρονης μοριακής βιολογίας. Το συγκεκριμένο βακτήριο έχει βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ $70 - 79^{\circ}\text{C}$, συνθήκες απαγορευτικές για σχεδόν όλους τους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς (Brock and Freeze, 1969).

Ο συνδυασμός των παραπάνω ιδιοτήτων (μεγάλη πληθυσμιακή αφθονία, μεταβολικές ικανότητες και η κοσμοπολίτικη παρουσία τους στα διάφορα περιβάλλοντα) καθιστά τους βακτηριακούς οργανισμούς ως αναπόσπαστο κομμάτι των παγκόσμιων βιολογικών διαδικασιών συμπεριλαμβανομένου της αποσύνθεσης των οργανικών συστατικών του εδάφους, του εμπλουτισμού της ατμόσφαιρας με οργανικά και ανόργανα συστατικά, του εμπλουτισμού των ωκεανών με αζωτούχα συστατικά από την ατμόσφαιρα, καθώς και της φωτοσύνθεσης (McInerney et al., 2002). Συνεπώς, η αποσαφήνιση της βακτηριακής ποικιλότητας στα διάφορα περιβάλλοντα αποτελεί την βάση για τα επιστημονικά πεδία της οικολογίας και βιοτεχνολογίας με σημαντικές εφαρμογές τόσο στις διαδικασίες βιοεπιβίωσης ρυπασμένων περιοχών όσο και στην ανακάλυψη καινούριων βιοχημικών

ουσιών και μεταβολικών προϊόντων για ιατρικούς και βιομηχανικούς σκοπούς (Horner-Devine et al., 2003).

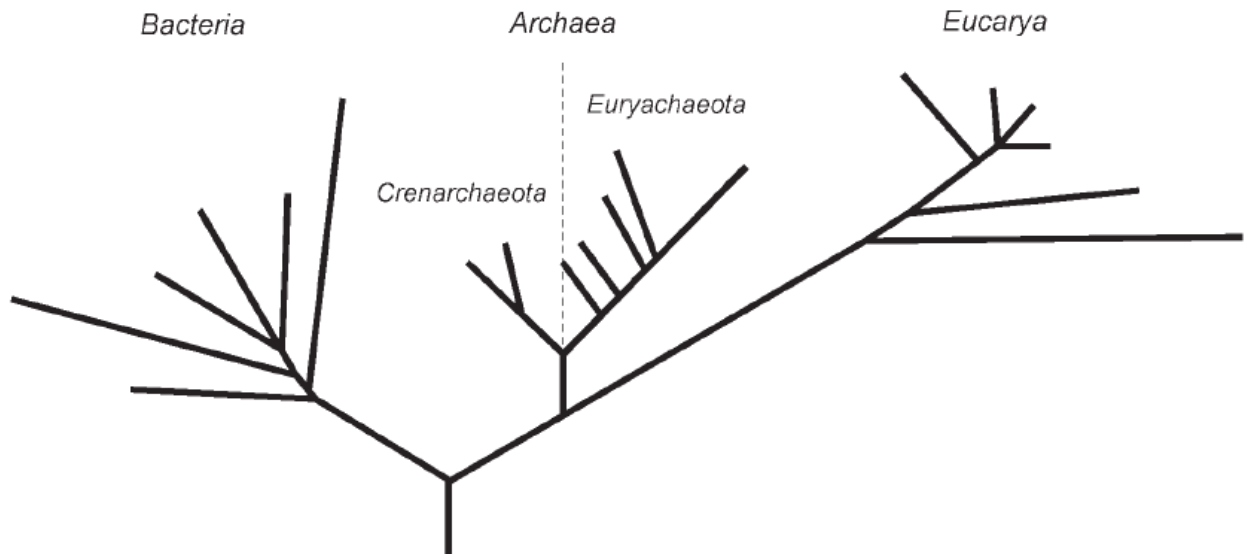
2.2 Μοριακές τεχνικές στην μικροβιακή οικολογία

Μέχρι πρόσφατα, ο κλασικός τρόπος προσδιορισμού της βακτηριακής ποικιλότητας ήταν η χρονοβόρα διαδικασία των καλλιεργειών σε εργαστηριακές συνθήκες. Παρά το γεγονός ότι η καλλιέργεια των βακτηρίων αποσαφηνίζει πλήρως τις μεταβολικές διεργασίες των μικροοργανισμών (Knoblauch et al., 1999), η εφαρμοσιμότητά της είναι περιορισμένη καθώς το μεγαλύτερο μέρος των μικροκοινωνιών (>99%) στα φυσικά περιβάλλοντα δεν μπορεί να καλλιεργηθεί, καθιστώντας αδύνατη την εκτίμηση της πραγματικής σύστασης και ποικιλότητας των βακτηριακών κοινωνιών (Ringelberg et al., 1997). Ταυτόχρονα, τα καλλιεργημένα στελέχη αποτελούν ένα ελάχιστο κομμάτι της υπάρχουσας βιοποικιλότητας (Amann et al., 1995). Από τις αρχές της δεκαετίας του '90, η εισαγωγή των μοριακών τεχνικών αποτέλεσε το πιο χρήσιμο εργαλείο, το οποίο έδωσε την δυνατότητα στους ερευνητές να μελετήσουν το μη καλλιεργήσιμο ποσοστό των βακτηρίων (Fry, 2000).

Πρώτοι οι Zuckerkandl και Pauling (1965) διατύπωσαν την άποψη ότι από την σύγκριση των πρωτοταγών δομών των μακρομορίων μπορούν να προκύψουν πληροφορίες σχετικά με τις φυλογενετικές σχέσεις των οργανισμών. Προφανώς, κάτι τέτοιο ήταν εφικτό με την εφαρμογή και βελτίωση των μοριακών τεχνικών αλληλούχισης. Τα πρώτα μόρια που αναλύθηκαν για αυτό το σκοπό, ήταν τα κυτοχρώματα και οι φερρεδοξίνες (Fitch and Margoliash, 1967). Λίγο αργότερα, αποδείχτηκε ότι η αλληλουχία της μικρής υπομονάδας του ριβοσωμικού RNA (small subunit rRNA, SSU rRNA) θα μπορούσε να αποτελέσει ένα παγκόσμιο φυλογενετικό δείκτη (Fox et al., 1977), εκπληρώνοντας αποτελεσματικότερα τις προϋποθέσεις αυτές σε σχέση με τα περισσότερα μέχρι στιγμής αντίστοιχα περιγραφέντα μόρια. Πράγματι, το γονίδιο του ριβοσωμικού RNA πλεονεκτεί για τους εξής λόγους: 1. Βρίσκεται σε όλους τους οργανισμούς, 2. Έχει συντηρημένες αλληλουχίες που επιτρέπουν τον σχεδιασμό κατάλληλων εκκινητών, 3. Περιέχει σημαντικό ποσό νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κατάλληλο για φυλογενετικές αναλύσεις, 4. Αποτελεί ένα σημαντικό κυτταρικό συστατικό, γεγονός που διευκολύνει την ανίχνευσή του (Muyzer, 1998). Η παρουσία των συντηρημένων αλλά και πολύ μεταβλητών περιοχών στο συγκεκριμένο γονίδιο είναι αποτέλεσμα των διαφορετικών λειτουργικών επιλεκτικών πιέσεων που δρουν στα ανεξάρτητα δομικά συστατικά. Ο ποικίλος αυτός βαθμός της συντήρησης των αλληλουχιών είναι που επιτρέπει τον προσδιορισμό της φυλογένεσης για ένα μεγάλο εύρος σχέσεων που μπορεί να προσεγγίσει και το επίπεδο του 'είδους' (Lundwig and Klenk, 2001).

Το 1987, προτάθηκε για πρώτη φορά το σύστημα φυλογενετικής ταξινόμησης για τους προκαρυωτικούς οργανισμούς, το οποίο και στηρίζεται στην νουκλεοτιδική αλληλουχία της μικρής υπομονάδας του ριβοσωμικού RNA (Woese et al., 1987). Σύμφωνα με τον Woese και τους συνεργάτες (1987), το γονίδιο του 16S rRNA θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την

συγκριτική φυλογενετική ανάλυση τόσο μεταξύ διαφορετικών ειδών, όσο και μεταξύ προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών. Το σύστημα αυτό αποτέλεσε ένα νέο μοντέλο εκτίμησης της συγγένειας μεταξύ οιονδήποτε ειδών με βάση τους κοινούς προγόνους και την εξέλιξή τους. Στην Εικόνα 1 παρουσιάζεται το Παγκόσμιο Φυλογενετικό Δέντρο (Woese et al., 1990), όπου σε αντίθεση με την μέχρι πρότινος ταξινόμηση της κυτταρικής ζωής σε πέντε βασιλεια (Προκαρυώτες, Πρώτιστα, Μύκητες, Φυτά και Ζώα; Whittaker, 1959), περιλαμβάνει τρεις κύριες φυλογενετικές ομάδες (domains).



Εικόνα 1. Παγκόσμιο Φυλογενετικό Δέντρο όπως αυτό προτάθηκε για πρώτη φορά από τους Woese et al (1990; Τροποποίηση από McInerney et al, 2002)

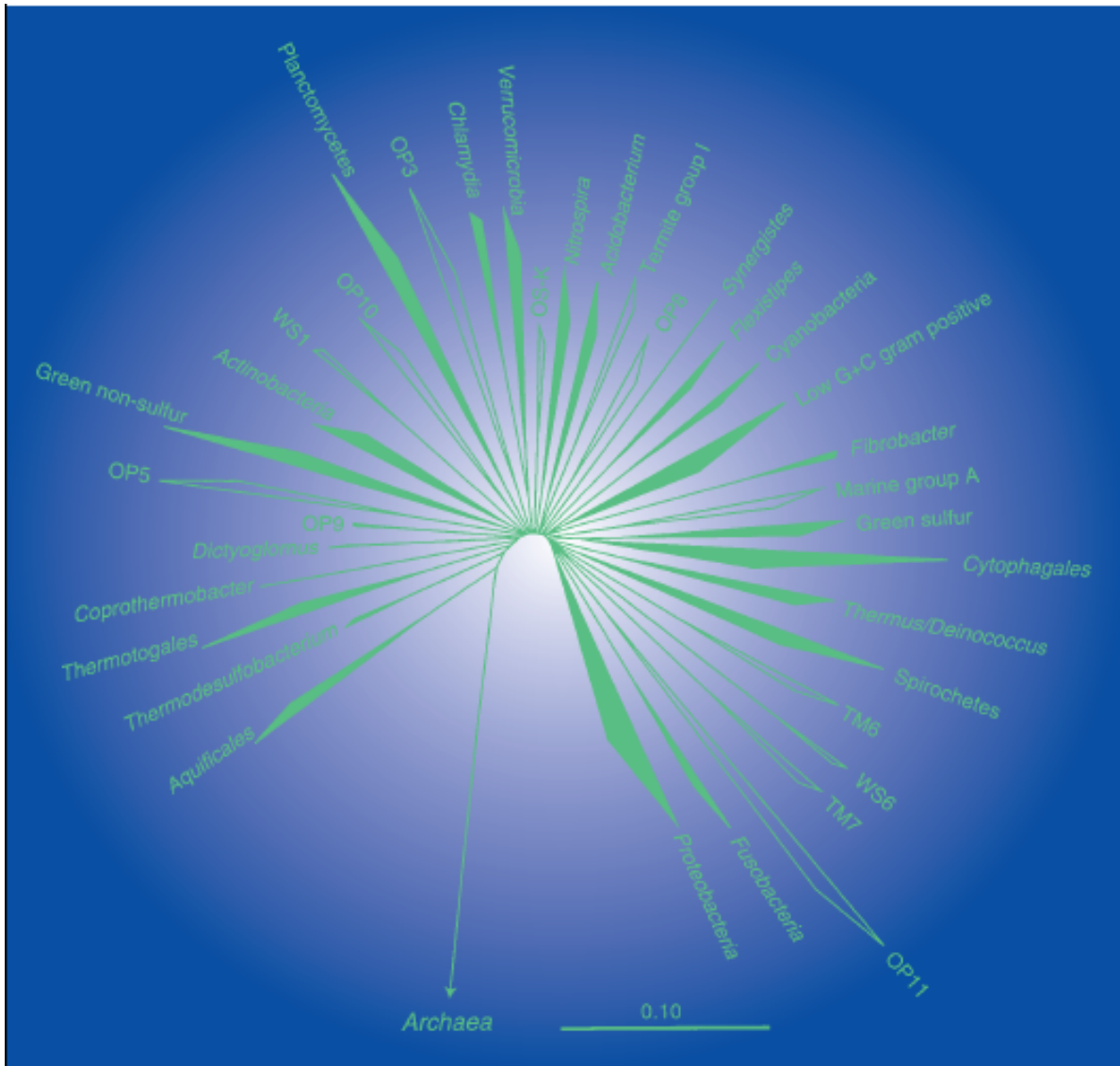
Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1, τα πεδία του Παγκόσμιου Φυλογενετικού Δέντρου είναι τα Βακτήρια (μέχρι πρόσφατα γνωστά ως ευβακτήρια), τα Αρχαία (γνωστά και ως αρχαιοβακτήρια) και τα Ευκάρυα. Τα Βακτήρια και τα Αρχαία αποτελούσαν, σύμφωνα με το παλαιότερο ταξινομικό σύστημα, το βασίλειο των Προκαρυωτών, ενώ τα Ευκάρυα περιλαμβάνουν τους οργανισμούς των υπόλοιπων τεσσάρων βασιλείων του συστήματος αυτού. Στο σημείο αυτό αξίζει να τονιστεί το γεγονός ότι είναι η πρώτη φορά που οι προκαρυωτικοί οργανισμοί αποκτούν παγιωμένη θέση στο δέντρο της Ζωής. Επιπρόσθετα, με την αξιοποίηση του Παγκόσμιου Φυλογενετικού Δέντρου είναι πλέον δυνατή η σύγκριση της γενετικής ποικιλότητας μεταξύ κάθε είδους κυτταρικής ζωής και η αποσαφήνιση του πραγματικού εύρους της προκαρυωτικής βιοποικιλότητας. Ταυτόχρονα, παρέχεται η δυνατότητα για περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου και της επίδρασης των προκαρυωτικών οργανισμών όσον αφορά στην εξέλιξη και στην ποικιλότητα της ζωής πάνω στην Γη (McInerney et al., 2002).

Σύμφωνα με τον Amann και τους συνεργάτες του (1995), κατά την φυλογενετική ανάλυση του γονιδίου του ριβοσωμικού RNA προκύπτουν δύο σημαντικά εμπόδια, τα οποία και

αφορούν στον σχηματισμό χιμαιρικών μορίων ριβοσωμικού DNA και στην ανάκτηση αλληλουχιών rRNA από οργανισμούς με περιορισμένη αφθονία στο δείγμα. Στην πρώτη περίπτωση, τα χιμαιρικά μόρια προκύπτουν από τον συνδυασμό τμημάτων νουκλεοτιδικής αλληλουχίας διαφορετικών γονιδίων κατά την διάρκεια του πολλαπλασιασμού τους με την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (ή PCR). Οι παράγοντες που ενισχύουν την πιθανότητα σχηματισμού μίας χίμαιρας είναι καταρχήν η διαθεσιμότητα τμημάτων αλληλουχιών DNA περιορισμένου μήκους είτε σε δείγματα προετοιμασίας χαμηλού μοριακού βάρους γονιδιωμάτων DNA είτε σε δείγματα που έχουν προκύψει μετά από τον πρώιμο τερματισμό της επιμήκυνσής τους κατά την PCR. Επίσης, χιμαιρικά μόρια μπορούν να παραχθούν από τον συνδυασμό δύο μονόκλωνων μορίων DNA διαφορετικού βακτηριακού γονιδιώματος, μετά το στάδιο της αποδιάταξης με την ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου μεταξύ πολύ συντηρημένων περιοχών των κλώνων. Και στις δύο περιπτώσεις, την δημιουργία ενός χιμαιρικού μορίου διαδέχεται ο πολλαπλασιασμός του με την ίδια αποδοτικότητα με αυτήν των μη χιμαιρικών μορίων. Εάν η παρουσία τους δεν γίνει αντιληπτή, τότε οδηγούμαστε σε λανθασμένα συμπεράσματα σχετικά με την εκτίμηση της βιοποικιλότητας του δείγματος, η οποία πιο συγκεκριμένα προκύπτει υψηλότερη από την πραγματική της τιμή. Έτσι, ο εντοπισμός και η απομάκρυνσή τους είναι απαραίτητη. Πράγματι, τα χιμαιρικά μόρια μπορούν να εντοπιστούν με τους εξής τρόπους: α) διαμέσου του λογισμικού προγράμματος Chimera check (Michigan University, Larsen et al., 1993), β) διαμέσου του ελέγχου της συμπληρωματικότητας των ελίκων τους και γ) με την συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών των διαφορετικών τμημάτων τους με άλλες αλληλουχίες rDNA του δείγματος (Liesack et al., 1991). Όσον αφορά στις αλληλουχίες ριβοσωμικού DNA των βακτηρίων με περιορισμένη πληθυσμιακή αφθονία στο δείγμα (πχ λιγότερο από μία αλληλουχία στις 1000 συνολικά βακτηριακές αλληλουχίες), η δυσκολία στην ανάκτησή τους είναι γεγονός, εάν ληφθεί υπόψη ότι κάθε γονιδιωματική βιβλιοθήκη διαθέτει μόλις μερικές δεκάδες κλώνων. Το πλήθος αυτό μπορεί να αυξηθεί στις μερικές εκατοντάδες ή ακόμη και χιλιάδες με την χρήση ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών εξειδικευμένων για ήδη μελετημένους κλώνους στην PCR. Τα συγκεκριμένα ολιγονουκλεοτίδια μπορούν περαιτέρω να χρησιμοποιηθούν και σαν εξειδικευμένοι εκκινητές στην PCR για τον πολλαπλασιασμό rDNA συγκεκριμένων μικροοργανισμών (Amann et al., 1992), αλλά και μέσω του Πολυμορφισμού Περιορισμένων Τμηματικών Αποστάσεων (RFLP), όπου με τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των προϊόντων της PCR υπάρχει η δυνατότητα απομόνωσης των λιγότερο άφθονων αλληλουχιών (Muyzer et al., 1993).

Η χρήση των βιβλιοθηκών κλώνων 16S rDNA για την εκτίμηση της δομής και της βιοποικιλότητας μίας βακτηριακής κοινωνίας είναι ευρέως διαδεδομένη (Bowman and McGuaig, 2003). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα περισσότερα βακτηριακά είδη είναι γνωστά εξαιτίας της αλληλούχισης ενός μόνο γονιδίου (συνήθως αυτό του 16S rDNA), ενώ κάποια από αυτά αντιπροσωπεύουν άγνωστες μέχρι στιγμής φυλογενετικές ομάδες (Cohan, 2006). Με την χρήση των μοριακών τεχνικών ανακαλύφθηκε ένας μεγάλος

αριθμός καινούριων φύλων. Πράγματι, στην δεκαετία του '90 είχαν περιγραφεί μόλις δέκα φύλα βακτηρίων, ενώ μέχρι σήμερα με την χρήση των μοριακών τεχνικών, τα φύλα αυτά αγγίζουν τα σαράντα (Fry, 2000). Τα δεκατρία από τα σαράντα φύλα δεν έχουν κανένα καλλιεργημένο αντιπρόσωπο (Fry, 2000). Στην Εικόνα 2, παρουσιάζεται το βακτηριακό φυλογενετικό δέντρο με όλα τα γνωστά μέχρι σήμερα βακτηριακά φύλα.



Εικόνα 2. Φυλογενετικό δέντρο των γνωστών μέχρι σήμερα βακτηριακών φύλων (Fry, 2000).

Κάθε κλαδί του δέντρου αντιστοιχεί και σε ένα βακτηριακό φύλο με το πάχος του να εκφράζει την βιοποικιλότητα του φύλου αυτού. Στην περίπτωση που το κλαδί είναι 'κενό', το φύλο δεν εκπροσωπείται από κάποιο καλλιεργημένο στέλεχος, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα κλαδιά, τα οποία και αντιστοιχούν σε φύλα με καλλιεργημένα και μη βακτηριακά στελέχη (Fry, 2000).

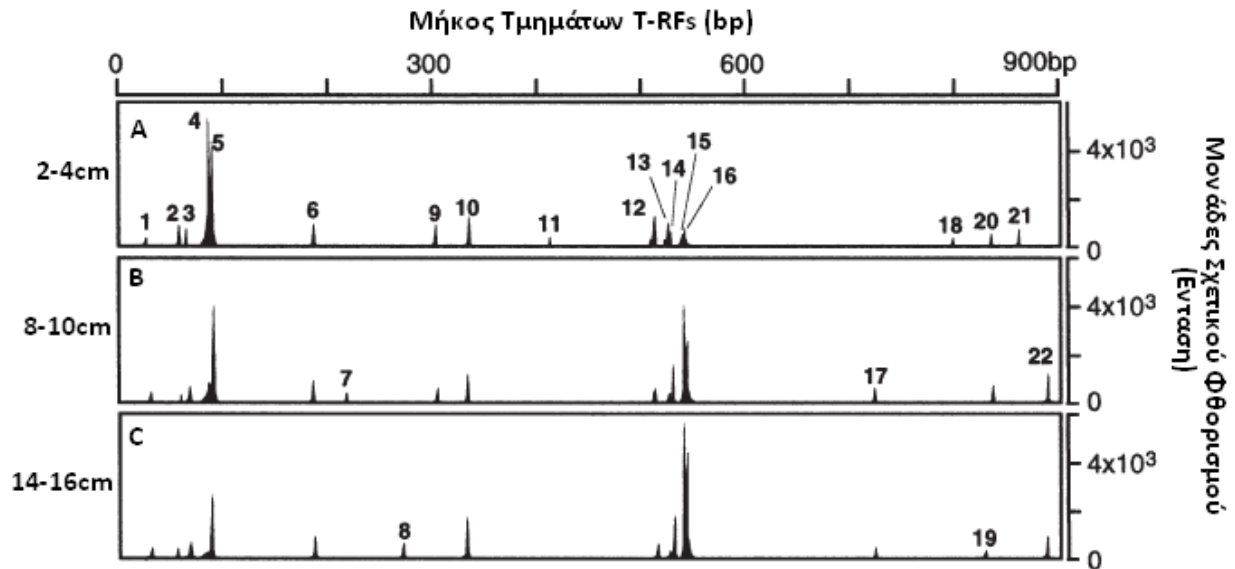
Η ευθυγράμμιση των πρωτοταγών δομών του γονιδίου του ριβοσωμικού RNA αποτελεί το κρίσιμο σημείο στις φυλογενετικές αναλύσεις που στηρίζονται στην σύγκριση των αλληλουχιών, αφού τα φυλογενετικά συμπεράσματα προκύπτουν από την παρουσία ή μη σημειακών αλλαγών σε σχέση με τον κοινό πρόγονο. Υπάρχουν δύο βάσεις δεδομένων ευθυγραμμισμένων αλληλουχιών με την βοήθεια των οποίων μπορούν να ευθυγραμμιστούν νέες αλληλουχίες του γονιδίου του 16S rRNA. Αυτές περιλαμβάνονται στα φυλογενετικά προγράμματα “Ribosomal Database Project” (Cole et al., 2008) και το “ARB Project” (Lundwig et al., 2004).

Το φυλογενετικό πακέτο του προγράμματος ARB διαθέτει εργαλεία για αυτόματη ευθυγράμμιση, έλεγχο δευτεροταγούς δομής, έλεγχο εμπιστοσύνης και ταυτόχρονα, παρέχει την δυνατότητα εισαγωγής νέων δεδομένων. Η διεξαγωγή συμπερασμάτων για τις φυλογενετικές σχέσεις στηρίζεται στο πλήθος και στον χαρακτήρα των σημειακών διαφοροποιήσεων μεταξύ των ευθυγραμμισμένων αλληλουχιών. Η επεξεργασία των δεδομένων αυτών πραγματοποιείται με αλγορίθμους δέντρων, από τους οποίους οι περισσότεροι στηρίζονται σε εξελικτικά μοντέλα. Οι τρεις πιο διαδεδομένες μέθοδοι κατασκευής δέντρων (treeing methods) είναι η μήτρα απόστασης (distance matrix), η μήτρα μέγιστης φειδωλότητας (maximum parsimony) και η μήτρα μέγιστης πιθανότητας (maximum likelihood). Με τις μεθόδους αυτές επιλέγονται τα δέντρα εκείνα, με τα οποία μεγιστοποιείται η αρμονία μεταξύ τοπολογίας και μήκους των κλάδων με τα εκάστοτε δεδομένα, σύμφωνα πάντα με τα κριτήρια του δοθέντος εξελικτικού μοντέλου (Lundwig and Klenk, 2001).

Από όλα τα παραπάνω γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι η μέθοδος ανάλυσης βιβλιοθηκών κλώνων είναι μία πολύ σημαντική και ευρέως διαδεδομένη τεχνική που βασίζεται κυρίως στην ανάγνωση του γονιδίου του 16S ριβοσωμικού RNA. Όμως, εξίσου διαδεδομένες τεχνικές γενετικής αποτύπωσης (fingerprinting) είναι η μέθοδος του ‘Ακράιου Πολυμορφισμού Περιορισμένων Τμηματικών Αποστάσεων’ (Terminal-Restriction Fragment Length Polimorphism; T-RFLP) και η μέθοδος της ‘Πηκτής Ηλεκτροφόρησης Βαθμιδωτής Αποδιάταξης’ (Denaturing Gradient Gel Electroforesis, DGGE). Πολύ συχνά, οι δύο αυτές τεχνικές χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με την ανάλυση βιβλιοθηκών 16S rDNA κλώνων με σκοπό την επαλήθευση των αποτελεσμάτων (βλ. Powell et al., 2003).

Η τεχνική του ‘Ακράιου Πολυμορφισμού Περιορισμένων Τμηματικών Αποστάσεων’ είναι μία διαδεδομένη μοριακή τεχνική γενετικής αποτύπωσης, με την οποία είναι δυνατή τόσο η εκτίμηση της βιοποικιλότητας πολύπλοκων βακτηριακών κοινωνιών όσο και η γρήγορη σύγκριση της σύστασης και βιοποικιλότητας μικροβιακών κοινωνιών που δραστηριοποιούνται σε διαφορετικά περιβάλλοντα (Liu et al., 1997). Η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της ποικιλότητας και δομής πολύπλοκων βακτηριακών κοινωνιών σε ποικίλα περιβάλλοντα (βλ. Clement et al., 1998, Dunbar et al., 2000, Gonzalez et al., 2000 όπως αναφέρονται από τον Sakamoto et al., 2003).

Η τεχνική T-RFLP στηρίζεται στην διαδικασία σήμανσης με φθορίζουσα ουσία του ενός από το ζεύγος εκκινητών που έχουν σχεδιαστεί για την απομόνωση συγκεκριμένων γονιδίων (πχ. 16S rDNA) και τον περαιτέρω πολλαπλασιασμό τους με PCR. Το απομονωμένο πλέον γονίδιο πέπτεται με μία ή περισσότερες περιοριστικές ενδονουκλεάσες με τα παραχθέντα γονιδιακά τμήματα T-RFs να διαχωρίζονται με την χρήση ενός αυτόματου αναλυτή DNA. Στην Εικόνα 3 παρουσιάζεται ένα γράφημα κατανομής δεδομένων T-RFLP του γονιδίου του 16S ριβοσωμικού RNA με την χρήση του περιοριστικού ενζύμου *Hha I*.

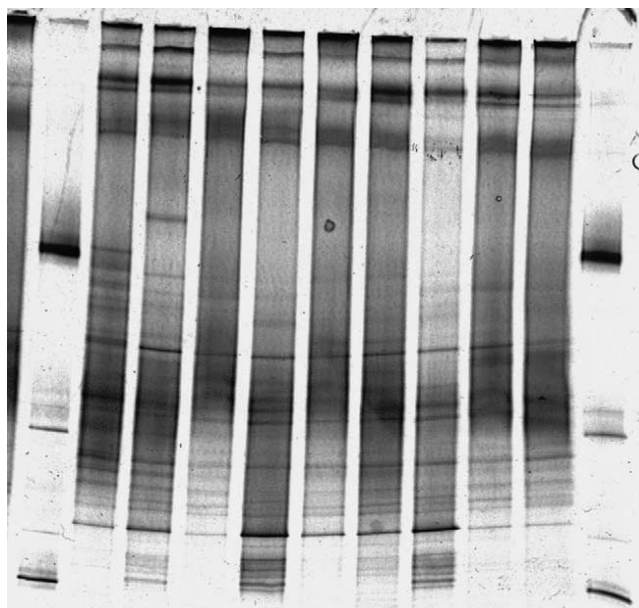


Εικόνα 3. Χαρακτηριστικό πρότυπο κατανομής δεδομένων T-RFLP του γονιδίου 16S rDNA με την χρήση του περιοριστικού ενζύμου *Hha I* (Τροποποίηση από Inagaki et al., 2002)

Η ποικιλότητα μίας μικροβιακής κοινότητας υπολογίζεται μέσω ανάλυσης του πλήθους και του ύψους των κορυφών των TRFs. Ο Inagaki και συνεργάτες (2002) εφάρμοσαν την τεχνική T-RFLP σε συνδυασμό με την κατασκευή βιβλιοθηκών 16S rDNA για να μελετήσουν την βακτηριακή ποικιλότητα σε ποικίλες ζωνώσεις (2-4 cm, 8-10 cm, 14-16 cm) ιζημάτων βάθους 5343 μέτρων που συλλέχθηκαν από μία ψυχρή λεκάνη στην Ιαπωνική Τάφρο (Japan Trench). Σύμφωνα με την Εικόνα 3, εντοπίστηκαν 22 διαφορετικές γενετικές αλληλουχίες ως αποτέλεσμα πέψης του 16S rDNA με το περιοριστικό ένζυμο *Hha I*. Ο Inagaki και συνεργάτες (2002) αναφέρουν χαρακτηριστικά ότι οι κορυφές 4 και 5 αντιστοιχούν σε 16S rDNA κλώνους των Deltaproteobacteria και οι κορυφές 14, 15 και 16 σε 16S rDNA κλώνους των Epsilonproteobacteria. Επιπλέον, διαπίστωσαν ότι η αφθονία των πληθυσμών των Deltaproteobacteria μειώνεται ενώ αυτή των Epsilonproteobacteria αυξάνεται, καθώς αυξάνεται το βάθος των ζωνώσεων του υπό μελέτη δείγματος ιζήματος, αφού αντίστοιχα μειώνεται και αυξάνεται και η ένταση φθορισμού των κορυφών τους.

Η μέθοδος της 'Πηκτής Ηλεκτροφόρησης Βαθμιδωτής Αποδιάταξης' (DGGE) αποτελεί μία ιδιαίτερα διαδεδομένη τεχνική για την μικροβιακή οικολογία (Snape et al., 2001), η οποία

στηρίζεται στον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό ενός μείγματος 16S rDNA τμημάτων με διαφορετικές αλληλουχίες. Στην Εικόνα 4 απεικονίζεται ένα αρνητικό είδωλο μίας πηκτής ηλεκτροφόρησης DGGE, η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό 16S rDNA αλληλουχιών εννέα δειγμάτων ιζημάτων που προέρχονται από ρυπασμένες και μη ρηχές περιοχές του Ατλαντικού Ωκεανού (Powell et al., 2003).



Εικόνα 4. Αρνητικό είδωλο φωτογραφίας πηκτής DGGE, η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό 16S rDNA αλληλουχιών εννέα δειγμάτων ιζήματος. Στις δύο εξωτερικές στήλες έχουν φορτωθεί πρότυπα σύγκρισης (standard control, Powell et al., 2003).

Κάθε δείγμα έχει το δικό του μοτίβο ζωνών, όπως αυτές έχουν διαχωριστεί στην πηκτή ηλεκτροφόρησης. Θεωρητικά, κάθε ζώνη αντιπροσωπεύει μία μοναδική 16S rDNA αλληλουχία και κατ'επέκταση ένα είδος και οι διαφορές στο μοτίβο των ζωνών αντανακλούν διαφορές στην σύσταση της μικροβιακής κοινωνίας (Powell et al., 2003). Οι 16S rDNA αλληλουχίες που έχουν διαχωριστεί με την μορφή ζωνών μέσω της τεχνικής DGGE, μπορούν να απομονωθούν από την πηκτή με σκοπό την περαιτέρω αλληλούχισή τους και ταυτοποίηση του είδους τους. Έτσι, μπορούν να αντληθούν πληροφορίες σχετικά με την κατανομή των ειδών και πιθανές βιοχημικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στο υπό μελέτη δείγμα ιζήματος (Powell et al., 2003). Βέβαια, είναι δυνατόν διαφορετικές αλληλουχίες να σχηματίσουν μία τέτοια ζώνη (Buchholz-Cleven et al, 1997), όπως και 16S rDNA αλληλουχίες ενός είδους να σχηματίσουν περισσότερες από μία ζώνες (Nubel et al., 1996). Επιπρόσθετα, ο τρόπος συλλογής και χειρισμού των δειγμάτων, οι μέθοδοι εκχύλισης DNA καθώς και οι εν δυνάμει μεθοδολογικοί περιορισμοί της PCR μπορούν να επηρεάσουν τον διαχωρισμό των 16S rDNA αλληλουχιών του εκάστοτε δείγματος (Powell et al., 2003).

Μέχρι σήμερα, έχουν εφαρμοστεί διάφορες προσεγγίσεις με τις οποίες τα μοτίβα ζωνών στην πηκτή DGGE μετασχηματίζονται σε ποσοτικά δεδομένα. Σε μερικές περιπτώσεις, οι

αναλύσεις στηρίζονται στην θέση και στην ένταση των ζωνών (Roling et al., 2000, Schauer et al., 2000), ενώ οι DGGE πηκτές έχουν χρησιμοποιηθεί σαν μήτρα παρουσίας/απουσίας (presence/absence matrix; Van Hannen et al., 1999). Πρόσφατα, χρησιμοποιήθηκαν και οι γραφικές μέθοδοι (πχ. ανάλυση κατάταξης), με τις οποίες τα αποτελέσματα απεικονίζονται γραφικά με βάση τον βαθμό ομοιότητάς τους διευκολύνοντας, έτσι, την ερμηνεία τους (Moeseneder et al., 1999).

Ο προσδιορισμός της δομής της μικροβιακής κοινότητας *in situ* και ειδικά σε περιβάλλοντα όπου επικρατούν ακραίες συνθήκες (πχ. ανοξικές λεκάνες υψηλής αλατότητας) αποτελεί μεγάλη πρόκληση στο χώρο της μικροβιακής οικολογίας λόγω των δυσκολιών στη διαδικασία απομόνωσης και καταμέτρησης των βακτηρίων (Rajendran et al., 1993). Για την αποφυγή τέτοιων προβλημάτων, εκτός από την ανάλυση του γονιδίου του 16S rRNA, έχει αναπτυχθεί επίσης η ανάλυση των χημικών συστατικών των βακτηρίων. Οι πιο χρήσιμοι τέτοιοι βιολογικοί δείκτες είναι τα μεμβρανικά λιπίδια και τα συγγενικά τους λιπαρά οξέα, καθώς αποτελούν θεμελιώδες συστατικό κάθε ζωντανού κυττάρου και ταυτόχρονα χαρακτηρίζονται από υψηλή δομική ποικιλότητα και βιολογική (λειτουργική) εξειδίκευση (Salomonova et al., 2003).

Δύο είναι οι τεχνικές ανάλυσης μικροβιακών λιπιδίων: η ανάλυση των φωσφολιπιδίων (polar phospholipid fatty acid, PLFA) και η ανάλυση των συνολικών μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων (total fatty acid methyl ester analysis, FAME, Green and Scow, 2000). Τα PLFAs είναι τυπικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών και σε αντίθεση με τα 'αποθηκευτικού τύπου' λιπίδια (storage lipids) αποδομούνται πολύ γρήγορα αμέσως μετά τον κυτταρικό θάνατο (White, 1979), παρέχοντας πληροφορίες σχετικές με την αποσαφήνιση και ποσοτικοποίηση της ζώσας βακτηριακής βιομάζας (Rutters et al., 2002). Από την άλλη, η ανάλυση FAME αφορά σε όλα τα λιπίδια ενός δείγματος που μπορούν να σαπωνοποιηθούν συμπεριλαμβανομένου και των PLFAs. Επιπλέον, κατά την ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων, τα συνολικά FAMES προέρχονται από όλα τα κύτταρα του δείγματος (νεκρά και ζώντα) ανεξαρτήτως είδους (είδους ζωής, Green and Scow, 2000). Συνεπώς, η ανάλυση PLFA είναι πιο κατάλληλη για μελέτες ζώντων οργανισμών, ενώ γενικά, προτιμάται στην μοντέρνα βιολογία για τον χαρακτηρισμό των μικροβιακών κοινωσιών (Salomonova et al., 2003).

2.3 Τα βαθιά θαλάσσια οικοσυστήματα

Τα βαθιά θαλάσσια ιζήματα συνιστούν ένα από τα μεγαλύτερα οικοσυστήματα που καλύπτει περίπου το 95% των ωκεάνιων πυθμένων και περίπου το 67% της συνολικής γήινης επιφάνειας (Wenzhofer and Glud, 2002). Είναι γνωστό ότι στα βάθη αυτά δεν πραγματοποιείται φωτοσύνθεση, αφού δέχονται μηδαμινή ακτινοβολία, και ταυτόχρονα η θερμοκρασία είναι εξαιρετικά χαμηλή, αφού συνήθως κυμαίνεται από -1 °C ως 4°C (Wenzhofer and Glud, 2002). Παρά τις ακραίες αυτές περιβαλλοντικές συνθήκες, πρόκειται για πολύ σταθερά περιβάλλοντα (Kato et al., 1997), ενώ υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι φιλοξενούν περίπου $0.3 - 8.3 \times 10^6$ είδη οργανισμών (Danovaro et al., 2008) με το μεγαλύτερο

ποσοστό της βιομάζας τους να είναι βακτηριακή (Danovaro et al., 1999). Μάλιστα, τα επιφανειακά στρώματα των βαθιών θαλάσσιων ιζημάτων φιλοξενούν 10 έως 10.000 φορές περισσότερα κύτταρα ανά μονάδα όγκου σε σχέση με τα επιφανειακά και παραγωγικά ωκεάνια νερά, πιθανόν εξαιτίας της δράσης συνδυασμού παραγόντων, όπως η μεγάλη διαθεσιμότητα ενέργειας στην επιφάνεια του ωκεάνιου πυθμένα και της περιορισμένης πίεσης λόγω 'βόσκησης' (Deming and Yager, 1992 και Lochte, 1992).

Τα βαθιά θαλάσσια ιζήματα, αρχικά, σχηματίζονται κατά την διάρκεια συνεχούς εναπόθεσης σωματιδίων από τα παραγωγικά στρώματα της κολώνας του νερού και οι μεγάλες ποσότητες από το οργανικό υλικό που κατακάθεται στον πυθμένα, ανακυκλώνεται από τις βενθικές μικροβιακές βιοκοινωνίες (Ventriani et al., 1999). Έχει παρατηρηθεί ότι η πρωτογενής παραγωγικότητα επηρεάζει την σύνθεση της εκάστοτε βακτηριακής βιοκοινωνίας (Horner-Dievine et al., 2003), εφόσον η εισροή χερσαίου οργανικού υλικού στην ανοικτή θάλασσα είναι σχετικά περιορισμένη, και ως εκ τούτου οι φυτοπλαγκτονικοί και ζωπλαγκτονικοί οργανισμοί συνιστούν την σημαντικότερη πηγή θαλάσσιου ιζηματογενούς οργανικού υλικού (πχ Degens, 1969 όπως αναφέρεται από τον Muller, 1977). Η χλωροφύλλη α έχει συσχετιστεί με την πρωτογενή παραγωγικότητα των υδάτινων οικοσυστημάτων (Lambou et al., 1982 όπως αναφέρεται από τον Horner-Dievine et al., 2003) και ιδιαίτερα με τους υδάτινους μεσοκόσμους (Downing and Leibold, 2002 όπως αναφέρεται από τον Horner-Dievine et al., 2003). Επιπλέον, το 95% του οργανικού υλικού που παράγεται κατά την φωτοσύνθεση στα επιφανειακά θαλάσσια στρώματα, ανακυκλώνεται στα πρώτα 100 – 300 μέτρα (Jannasch and Taylor, 1984; Li et al., 1999) με μόλις το 1% τελικά να καθιζάνει στον πυθμένα (Li et al., 1999) χωρίς να υφίσταται στοιχειοποίηση (βλ. Hartman et al., 1976 όπως αναφέρεται από τον Muller, 1977). Οι μικροβιακές κοινωνίες των ιζημάτων στοιχειοποιούν το οργανικό αυτό υλικό που έχει καθιζήσει, διαδραματίζοντας σπουδαίο ρόλο στον βιογεωχημικό κύκλο των θρεπτικών (Wang et al., 2005). Για τον χαρακτηρισμό του οργανικού υλικού, αξιοποιείται ο λόγος βάρους άνθρακα προς το συνολικό άζωτο (C/N) (Muller, 1977). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο μέσος λόγος C/N του ζωπλαγκτού, ο οποίος κυμαίνεται στο 5.5, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες (Bordowskiy, 1965a και Redfield et al., 1963). Δυστυχώς, παρά τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν τα βενθικά οικοσυστήματα στους βιογεωχημικούς κύκλους, οι γνώσεις μας σχετικά με την λειτουργία τους είναι περιορισμένες ως αποτέλεσμα του ελλειπούς αρχείου μας σχετικά με την βενθική ποικιλότητα, τον βακτηριακό μεταβολισμό και το ενεργό πληθυσμιακό κλάσμα των βακτηριακών μικροκοινωνιών (Luna et al., 2004).

Τα βαθιά θαλάσσια οικοσυστήματα χαρακτηρίζονται από μεγάλο εύρος βενθικών ενδιαιτημάτων, παρέχοντας ποικιλία συνθηκών διαβίωσης στις μικροβιακές βιοκοινωνίες. Σύμφωνα με τους Jorgensen και Boetius (2007), τα βενθικά αυτά οικοσυστήματα κατηγοριοποιούνται σε επιφανειακά ωκεάνια ιζήματα, υδροθερμικές πηγές, ψυχρές λεκάνες, συστήματα ενυδριτών αερίων και βαθιά υποεπιφανειακή βιόσφαιρα. Στο σημείο αυτό θα

πρέπει να τονιστεί το γεγονός ότι το μεγαλύτερο μέρος της πληροφορίας σχετικά με την βενθική μικροβιακή ποικιλότητα προέρχεται από την μελέτη οικοσυστημάτων αυξημένης βαρυτητας, όπως οι υδροθερμικές πηγές, ψυχρές λεκάνες και τα συστήματα ενυδριτών αερίων.

Τα επιφανειακά ωκεάνια ιζήματα περιλαμβάνουν μία επιφανειακή ζώνωση πάχους περίπου ενός μέτρου, της οποίας η οξυγόνωση είναι αποτέλεσμα δραστηριοποίησης των ζώνων-εκσκαφών (Wenzhofer and Glud, 2002). Στην περίπτωση των σκληρών υποστρωμάτων, όπως αυτών της μεσοωκεάνιας ράχης και του Κεντρικού Ειρηνικού Ωκεανού, ο προσδιορισμός του ωκεάνιου πυθμένα σε σχέση με τον υποεπιφανειακό πυθμένα είναι δυσκολότερος καθώς η ανταλλαγή με τα ωκεάνια ύδατα εξαρτάται από το πορώδες των πετρωμάτων (Wenzhofer and Glud, 2002). Σύμφωνα με τις πρώτες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σχετικά με τις παγκόσμιες τάσεις κατανομής και αφθονίας των κυττάρων, η αφθονία των κυττάρων στα επιφανειακά ιζήματα φαίνεται να μην επηρεάζεται από κανένα ωκεανογραφικό παράγοντα, παρά μόνο από την εισροή 'φρέσκου υλικού' (Deming and Baross, 1993, Smith et al., 1997 και Boetius and Damm, 1998). Επιπρόσθετα, όσον αφορά στο γενικότερο μοτίβο κατανομής, ποικιλότητας και κυριαρχίας των λειτουργικών και ταξινομικών ομάδων των βακτηρίων και των αρχαίων στο μεγαλύτερο μέρος της ωκεάνιας επιφάνειας είναι κατά κανόνα άγνωστη (Jorgensen and Boetius, 2007).

Στην βαθιά υποεπιφανειακή βιόσφαιρα, οι μικροβιακές κοινωνίες φιλοξενούν περίπου από 50% έως και τα 83% της συνολικής γήινης μικροβιακής βιομάζας (Whitman et al., 1998), ενώ ταυτόχρονα χαρακτηρίζονται από πολύ μικρούς μεταβολικούς ρυθμούς (D'Hondt et al., 2004). Είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι τα απομεινάρια του εναποτιθέμενου φυτοπλαγκτονικού υλικού, το οποίο θάφτηκε πριν από 10 εκατομμύρια χρόνια, εξακολουθεί ακόμη να υπόκειται διαδικασίες αποσύνθεσης με υπερβολικά περιορισμένους ρυθμούς από μικροβιακούς πληθυσμούς της τάξης των εκατομμυρίων ανά κυβικό εκατοστό (D'Hondt et al., 2004).

Μέχρι πρόσφατα, επικρατούσε η αντίληψη ότι η παρουσία ζωής περιοριζόταν σε ένα λεπτό στρώμα της ωκεάνιας επιφάνειας, όπου η θερμοκρασία και οι χημικές συνθήκες είναι κατάλληλες και η διαθεσιμότητα της τροφής είναι αποτέλεσμα της φωτοσυνθετικής διαδικασίας. Όμως, πριν από τριάντα χρόνια διαπιστώθηκε η ύπαρξη των υδροθερμικών πηγών, οι οποίες και αποτελούν ένα από τα πιο παραγωγικά οικοσυστήματα (Lonsdale, 1977, Jones, 1985 και Nelson et al., 1989). Στα οικοσυστήματα αυτά, οι χημειολιθοαυτότροφοι μικροοργανισμοί είναι οι παραγωγοί, καθώς μπορούν να εκμεταλλευτούν ένα πλήθος χημικών ενώσεων (ανόργανες και οργανικές ενώσεις γνωστές και ως γεωκαύσιμα ή σκοτεινή ενέργεια), ενώ η επιβίωση ενός μεγάλου πλήθους ποικίλων ζώων στηρίζεται στην ενεργειακή ροή μέσω αυτών των χημειολιθοαυτότροφων οργανισμών. Επιπλέον, στις υδροθερμικές πηγές εξαιτίας των υψηλών θερμοκρασιών, υδροστατικών πιέσεων, αναγωγικής ισχύος, τοξικής χημείας, ακραίων τιμών pH και τεράστιων διακυμάνσεων περιβαλλοντικών συνθηκών, φιλοξενεί

ακραιόφιλους οργανισμούς (Takai et al., 2006). Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες βιολογίας και βιοχημείας σε υδροθερμικές πηγές, διαπιστώθηκε η στενή σύζευξη των διαδικασιών βιόσφαιρας και γεώσφαιρας, καθώς και η εκτεταμένη ετερογένεια των οικοσυστημάτων αυτών (Takai et al., 2006 και Tivey, 2007).

Οι ψυχρές λεκάνες αποτελούν τον δεύτερο τύπο χημειοσυνθετικής όασης που ανακαλύφθηκε μετά τις υδροθερμικές πηγές και περιλαμβάνει καμινάδες αερίων, ηφαίστεια ιλύος, λίμνες υψηλής αλατότητας και λεκάνες με υψηλές συγκεντρώσεις υδρογονανθράκων (hydrocarbon seeps) (βλ. Tryon et al., 1999 και Boetius and Suess, 2004). Όπως και στις υδροθερμικές πηγές, έτσι και οι ψυχρές λεκάνες φιλοξενούν μία τεράστια βιομάζα ελεύθερων και συμβιωτικών μικροοργανισμών (Tryon et al, 1999 και Boetius and Suess, 2004). Τέλος, όσον αφορά στις περιοχές με ενυδρίτες αερίων (gas hydrates seepage), ανακαλύφθηκαν με την μορφή τεράστιων υποεπιφανειακών δεξαμενών μεθανίου ως αέρια ενυδριτών. Με την εξέλιξη της τεχνολογίας των βαθιών θαλασσών έγινε δυνατή η ανακάλυψη των ιδιαίτερα ποικίλων οικοσυστημάτων και ενδιαιτημάτων που συνδέονται με τις λεκάνες, οι οποίες και μέχρι σήμερα διαθέτουν ανεξερεύνητη μικροβιακή ποικιλότητα και λειτουργία (Niemann et al., 2006).

2.4 Η Ανατολική Μεσόγειος

Η Ανατολική Μεσόγειος είναι μία από τις πιο ολιγοτροφικές περιοχές παγκοσμίως, όπου σε αντίθεση με τις υπόλοιπες ο φώσφορος αποτελεί τον περιοριστικό παράγοντα ανάπτυξης του φυτοπλαγκτού (Ignatiades, 1969, Krom, 1991 και Tselepidis et al, 2000). Ταυτόχρονα, αποτελεί ένα πολύπλοκο υδρογραφικό και γεωμορφολογικό σύστημα (Malanotte-Rizzoli and Hecht, 1988, Malanotti-Rizzoli et al, 1997 και Theocharis et al, 2002). Παρά το μεγάλο μέσο βάθος της, το οποίο κυμαίνεται στα 2000 μέτρα, η θερμοκρασία του βαθύ υδάτινου στρώματος δεν είναι ποτέ μικρότερη από τους 13.5°C, αποτελώντας μοντέλο μεγάλου βάθους σχετικά ζεστού βαθυπελαγικού οικοσυστήματος (Martin-Cuadrado et al, 2007).

Η Ανατολική Μεσόγειος έχει αποτελέσει αντικείμενο αρκετών μελετών, οι οποίες αφορούν στα υδρογραφικά και γεωλογικά χαρακτηριστικά της (Malanotte-Rizzoli and Hecht, 1988, De Lange et al., 2008 και Passier et al., 1998). Ταυτόχρονα, αρκετές είναι και οι σχετικές μελέτες με την βακτηριακή ποικιλότητα στην στήλη του νερού (Yakimov et al., 2007, Martin-Cuadrado et al., 2007 και De Corte et al, 2008), σε ακραία οικοσυστήματα τύπου ψυχρές λεκάνες (Pancost et al., 2000, Dupre et al., 2007 και Omoregie et al., 2008), λεκάνες υψηλής αλατότητας (Sass et al., 2001 και Polymenakou et al., 2007), ηφαίστεια ιλύος (Heijs et al., 2007). Όσον αφορά, όμως, στην βακτηριακή ποικιλότητα σε οξικά ιζήματα μεγάλου βάθους της Ανατολικής Μεσογείου, αυτή έχει μελετηθεί ελάχιστα. Παρακάτω περιγράφονται περιληπτικά κάποιες εργασίες με ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Ο Luna και συνεργάτες (2004) μελέτησαν την βακτηριακή ποικιλότητα και το ενεργό κλάσμα του βακτηριακού πληθυσμού σε οξικά και ανοξικά ιζήματα βάθους κυμαινόμενου μεταξύ 670 και 2570 μέτρων. Διαπιστώθηκε, καταρχήν, η υψηλή βακτηριακή ποικιλότητα και το γεγονός ότι η κατανομή της ήταν ανεξάρτητη από το βάθος της στήλης του νερού. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι τόσο το μεγαλύτερο πλήθος περιοριστικών τμημάτων του γονιδίου του 16S rRNA (TRFs) όσο και το μεγαλύτερο ενεργό πληθυσμιακό κλάσμα εντοπίστηκαν στα ενδιάμεσα βάθη (1040 μέτρα), γεγονός που σημαίνει ότι η υψηλή συγκέντρωση εν δυνάμει διαθέσιμου οργανικού υλικού θα μπορούσε να συντηρήσει υψηλότερη βακτηριακή ποικιλότητα στα βαθιά ύδατα. Επιπλέον, η ποσοτική και ποιοτική μεταβολή του οργανικού υλικού βρέθηκε ότι μπορεί να καθορίσει μεταβολές στην δομή των μικροκοινωνιών, ενώ η μεταβολή της βακτηριακής δομής με το βάθος εντός του ιζήματος δεν φαίνεται να συνδέεται με την μεταβολή στην συγκέντρωση του οργανικού υποστρώματος. Τέλος, εκφράζεται η υπόθεση ότι ο τύπος του υποστρώματος, και όχι η πίεση, πιθανόν να επηρεάζει την βακτηριακή ποικιλότητα των ιζημάτων.

Από την άλλη, η Polymenakou και συνεργάτες (2005) μελέτησαν την βακτηριακή ποικιλότητα και τη δομή των βιοκοινωνιών με την κατασκευή βιβλιοθηκών κλώνων του γονιδίου του 16S ριβοσωμικού RNA για ιζήματα βάθους 30 έως 2790 μέτρων προερχόμενα από τον Θερμαϊκό Κόλπο, το Κρητικό Πέλαγος και το νότιο Ιόνιο Πέλαγος στην Ανατολική Μεσόγειο. Διαπιστώθηκε η εκπληκτικά υψηλή βιοποικιλότητα καθώς και η συσχέτιση της δομής των μικροβιακών κοινωνιών με τη γεωγραφική τους θέση εξαιτίας των διαφορετικών περιβαλλοντικών συνθηκών. Επιπλέον, παρατηρήθηκε η ιδιαίτερα χαμηλή ομοιότητα μεταξύ των βιβλιοθηκών, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί είτε στην τοπική διαφοροποίηση των βακτηριακών κοινωνιών, είτε στην υπερβολικά υψηλή βακτηριακή ποικιλότητα, είτε ακόμη και στον συνδυασμό τους.

Επιπλέον, η Polymenakou και συνεργάτες (2009) διαπίστωσαν την υψηλή βακτηριακή ποικιλότητα με την παρουσία 15 διαφορετικών ταξινομικών ομάδων σε οξικά ιζήματα στην περιοχή νότια της Κρήτης στην Ανατολική Μεσόγειο σε ρηχούς σταθμούς (250 και 510 μέτρα) και βαθύτερους σταθμούς (2670, 3589 και 3603 μέτρα) που βρίσκονταν στις απολήξεις των υποθαλάσσιων φαραγγίων της Σαμαριάς και του Παξιμαδά. Οι επικρατούσες ταξινομικές ομάδες είναι τα Acidobacteria σε δύο βαθείς σταθμούς και σε ένα ρηχό, ενώ τα Alphaproteobacteria και οι 'άγνωστες αλληλουχίες' επικρατούσαν στους υπόλοιπους δύο σταθμούς. Το σημαντικό ποσοστό των Acidobacteria επιβεβαιώνεται από προηγούμενη μελέτη στα ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου (Polymenakou et al., 2005c). Επιπλέον στην ίδια μελέτη, αξιοσημείωτη ήταν και η σημαντική αφθονία των ταξινομικών ομάδων Gammaproteobacteria και Deltaproteobacteria. Τέλος, διαπιστώθηκε ότι οι βακτηριακές ριβοσωμικές αλληλουχίες των σταθμών αυτών δεν εμφάνισαν ομοιότητα μεγαλύτερη από 93% με γνωστούς κλώνους, ενώ το ποσοστό των 'άγνωστων' αλληλουχιών που εντοπίστηκε,

δηλαδή οι αλληλουχίες που δεν ταξινομήθηκαν σε καμία γνωστή ταξινομική ομάδα, ήταν υψηλό.

Τέλος, ο Heijs και συνεργάτες (2007) μελέτησαν την μικροβιακή βιοποικιλότητα σε οξικά (0-6 εκ) και ανοξικά ιζήματα (6-22εκ, 22-34 εκ) βάθους 1673 μέτρων του ενεργού ηφαίστειου υλός Kazan στην Ανατολική Μεσόγειο. Η ανάλυση χημικών παραμέτρων σε συνδυασμό με την κατασκευή βιβλιοθηκών κλώνων του γονιδίου 16S ριβοσωμικού DNA αποκάλυψαν την διασύνδεση μεταξύ των ανιχνευμένων 16S rRNA μικροβιακών κλώνων και των χημικών διεργασιών (πχ αναερόβια οξείδωση μεθανίου και αναγωγή θειικών sulfate) που λαμβάνουν χώρα στο εν λόγω βενθικό οικοσύστημα, καθώς και την υψηλή βιοποικιλότητά του. Επιπλέον, διαπιστώθηκε η μεταβολή των μικροβιακών αλληλουχιών σε σχέση με το βάθος, με ετερότροφα μικρόβια να επικρατούν στην επιφανειακή ζώνωση των ιζημάτων, βακτήρια υπεύθυνα για την αναγωγή του θείου και αρχαία που πιθανόν να συμμετέχουν στην αναερόβια οξείδωση του μεθανίου, να είναι άφθονα στη βαθύτερη υποεπιφανειακή ζώνη, και τέλος, μικρόβια που μπορούν να συνδεθούν και με τους δύο τρόπους διαβίωσης να δραστηριοποιούνται στην ενδιάμεση ζώνωση.

2.5 Ο Ειρηνικός Ωκεανός

Ο Ειρηνικός Ωκεανός, ο μεγαλύτερος ωκεανός στον κόσμο, έχει έκταση 169.2 εκατομμύρια τετραγωνικά χιλιόμετρα συνιστώντας το 46% της παγκόσμιας υδρόσφαιρας, ενώ έχει λάβει το όνομά του από το λατινικό *Mare Pacificum*, που σημαίνει ειρηνική θάλασσα (Barkley, 1968). Πρόκειται για ένα θαλάσσιο οικοσύστημα με πολύ μεγάλη ποικιλομορφία, καθώς φιλοξενεί μοναδικά οικοσυστήματα, όπως την βαθύτερη λεκάνη στον κόσμο (η τάφρος Marianna με βάθος 10.911 μέτρα όπως αναφέρει ο Barkley, 1968), την μεσοωκεάνια ράχη πάνω στην οποία εντοπίζονται πολυάριθμα ηφαίστεια και υδροθερμικές πηγές, και κοραλλιογενείς ύφαλοι. Ο Ανατολικός Ειρηνικός, αποτελεί ένα ευτροφικό και σχετικά κρύο θαλάσσιο περιβάλλον σε σχέση με την Ανατολική Μεσόγειο, καθώς χαρακτηρίζεται από υψηλή παραγωγικότητα και μεγάλη συγκέντρωση θρεπτικών και χλωροφύλλης στην επιφάνεια του ωκεάνιου πυθμένα του (Schlitzer, 2004).

Ο Ειρηνικός Ωκεανός έχει αποτελέσει αντικείμενο πολυάριθμων μελετών. Όσον αφορά στην βενθική ποικιλότητα και οικολογία, το μεγαλύτερο ποσό πληροφορίας προέρχεται κυρίως από την διερεύνηση ανοξικών ιζημάτων, υδροθερμικών πηγών, ψυχρών λεκανών και συστημάτων ενυδριτών αερίων. Όμως, οι γνώσεις μας για την βακτηριακή ποικιλότητα και μικροκοινωνία που δραστηριοποιείται σε οξικά ιζήματα μεγάλου βάθους είναι περιορισμένη. Ακολουθώς πραγματοποιείται μία επιλεκτική παρουσίαση κάποιων ενδεικτικών προσπαθειών που έχουν γίνει σε σχέση με τα προαναφερόμενα πεδία.

Ο Li και συνεργάτες (1999) ήταν οι πρώτοι που μελέτησαν την βακτηριακή ποικιλότητα οξικών ιζημάτων του Ειρηνικού στην περιοχή της Ιαπωνίας σε συνάρτηση με το βάθος, το οποίο κυμαινόταν μεταξύ 1159 και 6482 μέτρων με την κατασκευή βιβλιοθηκών κλώνων του

γονιδίου του 16S ριβοσωμικού RNA. Από την συγκεκριμένη μελέτη προέκυψε ότι τα μικροπεριβάλλοντα αυτά χαρακτηρίζονται από υψηλή βακτηριακή ποικιλότητα με κυρίαρχη φυλογενετική ομάδα να είναι αυτή των *Pseudomonas* των Gammaproteobacteria. Ταυτόχρονα, εντοπίστηκε και ένα σημαντικό ποσοστό κλώνων που παρουσιάζουν περιορισμένη ομοιότητα (~80%) με αλληλουχίες γνωστών βακτηρίων και συνεπώς αντιπροσωπεύουν μη καλλιεργημένα στελέχη. Επιπλέον, εκφράζεται η αμφιβολία ότι είναι πολύ πιθανόν οι βακτηριακοί κλώνοι του 16S rRNA γονιδίου που εντοπίστηκαν, να μην δραστηριοποιούνται στα ολιγοτροφικά αυτά μικροπεριβάλλοντα, αλλά να έχουν εναποτεθεί μέσω φυσικών κινήσεων, όπως αυτές των ανέμων, κυμάτων και καθίζησης νεκρών οργανισμών.

Ακόμη, ο Kato και συνεργάτες (1997) διαπίστωσαν την κυριαρχία των Gammaproteobacteria και την παρουσία πλαγκτονικών αρχαίων, ευρέως διαδεδομένων στα βαθιά θαλάσσια ύδατα και μη καλλιεργημένων αρχαίων σε οξικά ιζήματα βάθους 10.898 μέτρων στην περιοχή Marianna Trench. Με την μελέτη τους αυτή αποκάλυψαν την παρουσία των γονιδιακών συμπλεγμάτων ρυθμιζόμενων μέσω της πίεσης (pressure regulated clusters, ORF1, ORF2 και ORF3) στο βακτηριακό χρωμοσωμικό γενετικό υλικό, τα οποία πολύ πιθανόν να αποτελούν συστατικό ενός πολύ σημαντικού μηχανισμού προσαρμογής στα μεγάλα βάθη. Συμπερασματικά, ο πυθμένας της βαθύτερης παγκοσμίως ωκεάνιας περιοχής φιλοξενεί βαροφιλικά βακτήρια, πλαγκτονικά αρχαία και κοσμοπολίτικα βακτήρια.

Από την άλλη, ο Li και συνεργάτες (1999b) μελέτησαν την μικροβιακή ποικιλότητα εντός και εκτός αποικιών των τυπικά χημειοαυτότροφων διθύρων (bivalve), γνωστές ως κοινωνίες *Calyptogena* σε ψυχρές λεκάνες βάθους 6.400 μέτρων στα πρηνή της Ιαπωνικής τάφρου (Japan Trench) με φυλογενετική ανάλυση βασισμένη στο γονίδιο του 16S ριβοσωμικού RNA. Στην συγκεκριμένη περιοχή διαπιστώθηκε η κυριαρχία των Deltaproteobacteria και Epsilonproteobacteria, η οποία και συνδέθηκε με τον πιθανό ρόλο τους στον μεταβολισμό και στον κύκλο του θείου στο περιβάλλον αυτό, ενώ ταυτόχρονα, ανιχνεύτηκαν και αλληλουχίες των αρχαίων Euryarchaeota και Crenarchaeota, που συνδέθηκαν με την πιθανή παραγωγή μεθανίου και την πιθανή ανακύκλωση ανόργανων συστατικών μέσω των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων του θείου αντίστοιχα.

Τέλος, ο Xu και συνεργάτες (2007) με την κατασκευή μεταγονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε συνδυασμό με την τυχαία αλληλούχιση περιβαλλοντικού γενετικού υλικού (shotgun), κατάφεραν να ανακτήσουν γενετικές πληροφορίες για τους μικροοργανισμούς που είναι παρόντες στα ιζήματα βάθους 5.274 μέτρων στην περιοχή Pacific Nodule Province, προκειμένου να εντοπιστούν και να απομονωθούν μεγάλα γονιδιακά συμπλέγματα για βιοενεργά συστατικά ή να αποσαφηνιστούν οι φυσιολογικές ιδιότητες μη καλλιεργημένων βακτηρίων μέσω μερικού γενετικού χαρακτηρισμού. Η περιοχή αυτή είναι πλούσια σε πολυμεταλλικά συμπλέγματα, τα οποία αποτελούνται κυρίως από μαγγάνιο, σίδηρο, κοβάλτιο, χαλκό και νικέλιο, ενώ θεωρείται ότι οι μικροοργανισμοί πιθανόν να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην παραγωγή αυτών των πυρήνων. Με την συγκεκριμένη

εργασία, διαπιστώθηκε ότι τα Proteobacteria είναι το επικρατές φύλο, και ταυτόχρονα, μεταξύ των συντηρημένων γονιδίων εντοπίστηκαν τέσσερα γονίδια που κωδικοποιούν μεταφορικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένου πρωτεΐνων πρόσληψης ιόντων σιδήρου, οι οποίες είναι πολύ σημαντικές για τον σχηματισμό των μαγνητοσωμάτων.

2.6 Στόχος παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής

Στην παρούσα μελέτη, επιλέχθηκαν να μελετηθούν βακτηριακές κοινωνίες που δραστηριοποιούνται σε ιζήματα μεγάλου βάθους στην Ανατολική Μεσόγειο και στον Ειρηνικό Ωκεανό, καθώς τα δύο αυτά θαλάσσια οικοσυστήματα παρουσιάζουν μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον. Βασικός στόχος της εργασίας αυτής είναι η συγκριτική μελέτη της ποικιλότητας και σύστασης των μικροβιακών κοινωνιών που δραστηριοποιούνται σε ιζήματα βάθους 4000 μέτρων της Ανατολικής Μεσογείου και του Ειρηνικού Ωκεανού με την κατασκευή βιβλιοθηκών κλώνων του γονιδίου του 16S ριβοσωμικού RNA. Οι επιμέρους στόχοι της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής διαμορφώνονται ως εξής:

- i. Η ποιοτική εκτίμηση της σύνθεσης των βακτηριακών κοινωνιών σε ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου και του Ειρηνικού Ωκεανού.
- ii. Ο εντοπισμός βακτηριακών ταξινομικών ομάδων που πιθανώς επηρεάζουν τους βιογεωχημικούς κύκλους στα υπό μελέτη οικοσυστήματα.
- iii. Η περιγραφή των περιβαλλοντικών χαρακτηριστικών που φαίνεται να επηρεάζουν την κατανομή των βακτηριακών κοινωνιών στα υπό μελέτη οικοσυστήματα.

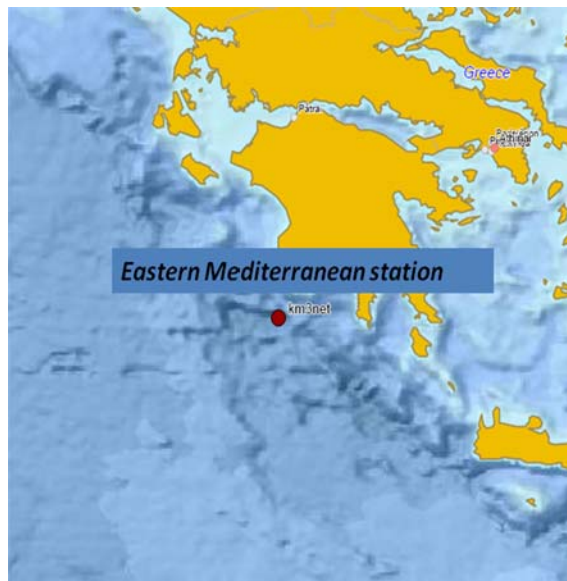
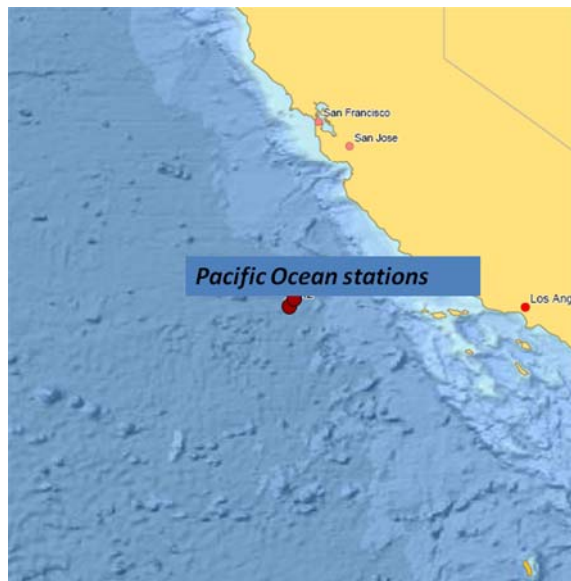
3. Πειραματικό Μέρος

3.1 Σταθμοί δειγματοληψίας και συλλογή δειγμάτων

Στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, επιλέχθηκαν να μελετηθούν δείγματα ιζημάτων οξικού χαρακτήρα (ιζήματα επιφανειακής ζώνωσης 0-1 cm του ωκεάνιου πυθμένα), τα οποία και συλλέχθηκαν από δύο σταθμούς του Ειρηνικού Ωκεανού και έναν σταθμό της Ανατολικής Μεσογείου (Νότιο Ιόνιο Πέλαγος; Χάρτης 1A,B). Τα κωδικά ονόματα των δειγμάτων, τα χαρακτηριστικά των σταθμών δειγματοληψίας καθώς και οι συντεταγμένες τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 και στον Χάρτη 1, αντίστοιχα. Το γεγονός ότι κατασκευάστηκε μία μόνο βιβλιοθήκη κλώνων για την μελέτη της Ανατολικής Μεσογείου οφείλεται σε δυσκολίες τεχνικής φύσεως, εξαιτίας των οποίων δεν ήταν δυνατή η λήψη περισσότερων δειγμάτων από την ευρύτερη θαλάσσια περιοχή. Ωστόσο, δεδομένα βιβλιοθηκών κλώνων από την ευρύτερη περιοχή είναι διαθέσιμα από προηγούμενες εργασίες (Polymenakou et al., 2005 και 2009) και οι αλληλουχίες τους χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων.

| Δείγμα | Χαρακτηριστικά σταθμών | Θερμοκρασία (°C) | Βάθος |
|---------|--|------------------|-------|
| ALVIN24 | Ίζημα μακριά από το σημείο βιοδιατάραξης | 1.48 | 4100μ |
| ALVIN25 | Ίζημα σε σημείο βιοδιατάραξης | 1.48 | 4100μ |
| ALVIN28 | Ίζημα κοντά σε σημείο με αποσυντηθέμενη μάζα μακροφυκών | 1.48 | 4100μ |
| ALVIN29 | Ίζημα μακριά από το σημείο με αποσυντηθέμενη μάζα μακροφυκών | 1.48 | 4100μ |
| KM3 | Βαθιά θαλάσσια λεκάνη | 14.00 | 4040μ |

Πίνακας 1. Κωδικά ονόματα δειγμάτων ιζήματος και σταθμοί δειγματοληψίας.

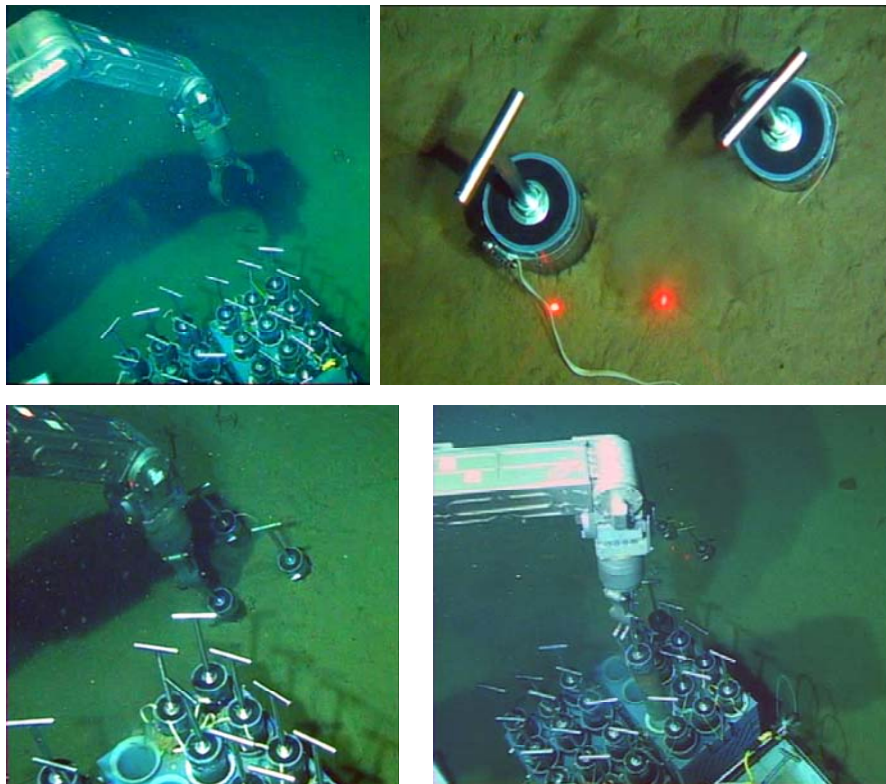


Χάρτης 1. Σταθμοί δειγματοληψίας Α) στον Ειρηνικό Ωκεανό, Β) στο Νότιο Ιόνιο Πέλαγος (Ανατολική Μεσόγειος).



Εικόνα 5. Α) Το υποβρύχιο Alvin, Β) Ο πολλαπλός πυρηνολήπτης Bowers & Connolly

Τα δείγματα ιζήματος που προέρχονται από τους σταθμούς δειγματοληψίας του Ειρηνικού Ωκεανού, συλλέχθηκαν με την βοήθεια του υποβρυχίου Alvin (Woods Hole O.I., Εικόνα 5A) τον Αύγουστο του 2006. Στην Εικόνα 6 παρουσιάζεται η δειγματοληψία όπως αυτή πραγματοποιείται με το βαθυσκάφος Alvin.

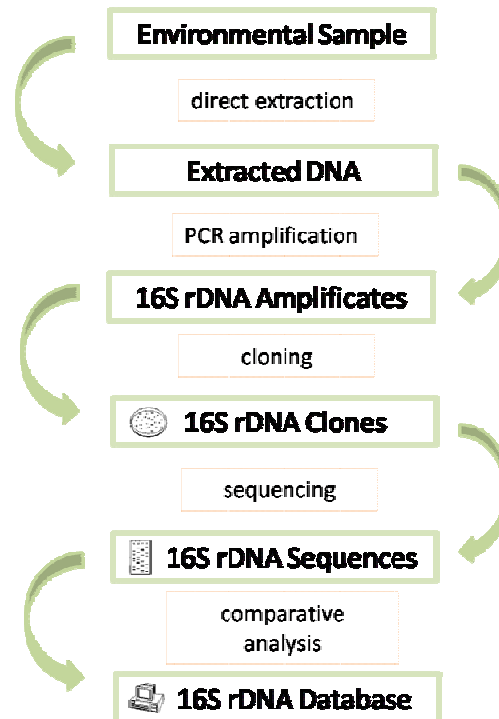


Εικόνα 6. Διαδικασία δειγματοληψίας με το βαθυσκάφος Alvin.

Ακόμη, με τον πολλαπλό δειγματολήπτη Bowers & Conelly (8 πυρηνολήπτες, i.d. 9.0cm, Barnett et al., 1984, Εικόνα 5B), ο οποίος επιτρέπει την αδιατάρακτη λήψη ιζημάτων, συλλέχθηκαν δείγματα από τον θαλάσσιο πυθμένα του Νοτίου Ιονίου Πελάγους τον Μάιο του 2007. Όλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα φιαλίδια σε συνθήκες ψύξης (-20°C) μέχρι την περαιτέρω εργαστηριακή μελέτη τους. Ακόμη, η συγκέντρωση της χλωροφύλλης α και του ολικού άνθρακα και αζώτου των ιζημάτων υπολογίστηκαν με φθορόμετρο Turner TD-700 (Lorenzen and Jeffrey, 1980) και με τον αναλυτή Perkin Elmer CHN 2400 (Hedges and Stern, 1984) αντίστοιχα.

3.2 Κατασκευή βιβλιοθηκών κλώνων του γονιδίου 16S ριβοσωμικού RNA

Για την μελέτη των βενθικών βακτηριακών κοινωνιών των εν λόγω σταθμών δειγματοληψίας, κατασκευάστηκαν πέντε βιβλιοθήκες κλώνων του γονιδίου του 16S ριβοσωμικού RNA. Στην Εικόνα 7 παρουσιάζονται τα επιμέρους στάδια κατασκευής των βιβλιοθηκών και της συγκριτικής ανάλυσης των αλληλουχιών των βακτηριακών κλώνων του γονιδίου του 16S ριβοσωμικού RNA.



Εικόνα 7. Διαγραμματική απεικόνιση της κατασκευής των βιβλιοθηκών κλώνων του γονιδίου 16S ριβοσωμικό DNA και του χαρακτηρισμού των βενθικών ιζημάτων με συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών του ριβοσωμικού RNA (Τροποποιημένο σχήμα από Amann et al., 1995).

3.2.1 Εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων

Το πρώτο στάδιο κατασκευής των βιβλιοθηκών περιλαμβάνει την εκχύλιση του συνολικού DNA από τα δείγματα των ιζημάτων, η οποία και πραγματοποιήθηκε με την χρήση του FastDNA@SPIN Kit for soil της Q:BIOnce, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στην συνέχεια, η συγκέντρωση του DNA που επεριέχεται σε κάθε εκχύλισμα, μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά με το φασματοφωτόμετρο ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, DE, USA). Τελικά, η συγκέντρωση του για τα υπό μελέτη δείγματα ιζημάτων βρέθηκε να κυμαίνεται μεταξύ 14.4 έως 103.4 ng/μl.

3.2.2 Απομόνωση & Πολ/σμός του γονιδίου του 16S ριβοσωμικού RNA με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Το γονίδιο του 16S ριβοσωμικού RNA απομονώθηκε από τα προαναφερόμενα εκχυλίσματα με τους εκκινητές 27f (τροποποιημένο για την απομόνωση των γονιδίων των Planctomycetales; 5'-AGRGTTCGATCMTGGCTCAG-3') και 1492r (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') και πολλαπλασιάστηκε με την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR). Οι συνθήκες PCR σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να περιοριστούν οι πιθανότητες των εν δυνάμει σφαλμάτων (Polz and Cavanaugh, 1998; von Wintzingerode et al, 1997). Για κάθε δείγμα, πραγματοποιήθηκαν 8 αντιδράσεις πολλαπλασιασμού DNA όγκου 20μl στην συσκευή PCR

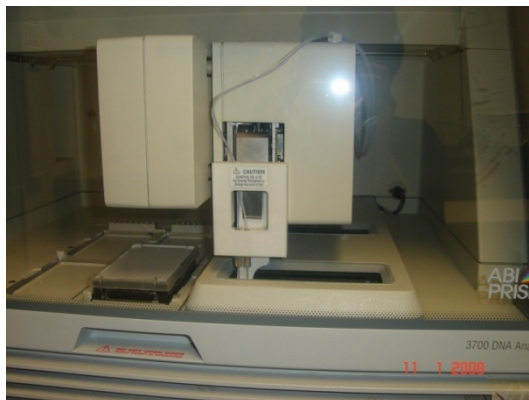
Perkin-Elmer Cycler, με αρχική θερμοκρασία αποδιάταξης στους 94°C διάρκειας 3min, την οποία και διαδέχονται 30 κύκλοι με τα εξής στάδια: 1min στους 94°C, 1min ενίσχυσης (annealing) στους 55 °C, 2min επιμήκυνσης εκκινητή στους 72 °C και τέλος, 7 min τελικής επιμήκυνσης στους 72 °C. Στην περίπτωση του δείγματος KM3, το στάδιο της ενίσχυσης πραγματοποιήθηκε στους 50°C. Επιπλέον, κάθε μία από τις παραπάνω αντιδράσεις περιέχει 1-4 ngr βακτηριακού γενωμικού υλικού, ρυθμιστικό διάλυμα PCR (10mM Tris-HCl, pH 9, 50mM KCl, 0.1% Triton X-100 και 2mM MgCl₂), 100nM από κάθε εκκινητή, 200μM από κάθε δεοξυριβονουκλεοτίδιο και 0.25 U Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Στην συνέχεια, οι αντιδράσεις PCR για κάθε δείγμα τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια των 1.5ml με σκοπό την προσυγκέντρωση του περιεχόμενου 16S ριβοσωμικού DNA με εξάχνωση σε συνθήκες κενού (SpeedVac; Heraeus Instruments, Hanau, Germany) και την απομόνωσή του με την μορφή ζώνωσης σε 1% πηκτή αγαρόζης ηλεκτροφόρησης με χρώση Βρωμιούχου Αιθιδίου. Η ανάκτησή του από την πηκτή αγαρόζης πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας το πρωτόκολλο Quiaquick PCR purification kit (Quiagen, Valencia, CA).

3.2.3 Κλωνοποίηση του γονιδίου 16S ριβοσωμικού DNA

Η κλωνοποίηση του 16S rDNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο TOPO TA Cloning kit (Version M, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Για κάθε δείγμα ιζήματος χρησιμοποιήθηκαν 5-10 ng προϊόντος της PCR προκειμένου να κλωνοποιηθούν μέσω πλασμιδίων pCR 4-TOPO, τα οποία τελευταία και χρησιμοποιούνται για να μετασχηματίσουν κύτταρα της *E.coli* One shot TOP10 cells σε χημικά ανταγωνιστικά κύτταρα. Οι βακτηριακοί κλώνοι που συλλέχθηκαν, μεταφέρθηκαν σε 96- deep well πιάτα και επωάσθηκαν για 24 ώρες στους 37°C με θρεπτικό υλικό Luria-Bertani (LB) με 25mg καναμυκίνης ml⁻¹. Τέλος, οι κλώνοι αυτοί είτε φυλάχθηκαν στους -80°C σε 7% διμέθυλο σουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide, DMSO) είτε χρησιμοποιήθηκαν για εκχύλιση πλασμιδίων με Unifilter microplates των 800 μl (Whatman Inc., NJ, USA). Τα εκχυλίσματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω στην διαδικασία της αλληλούχισης. Στην Εικόνα 8A, Β και Γ απεικονίζονται τα τρία σημαντικότερα στάδια της κλωνοποίησης των βακτηριακών κλώνων του 16S ριβοσωμικού DNA.

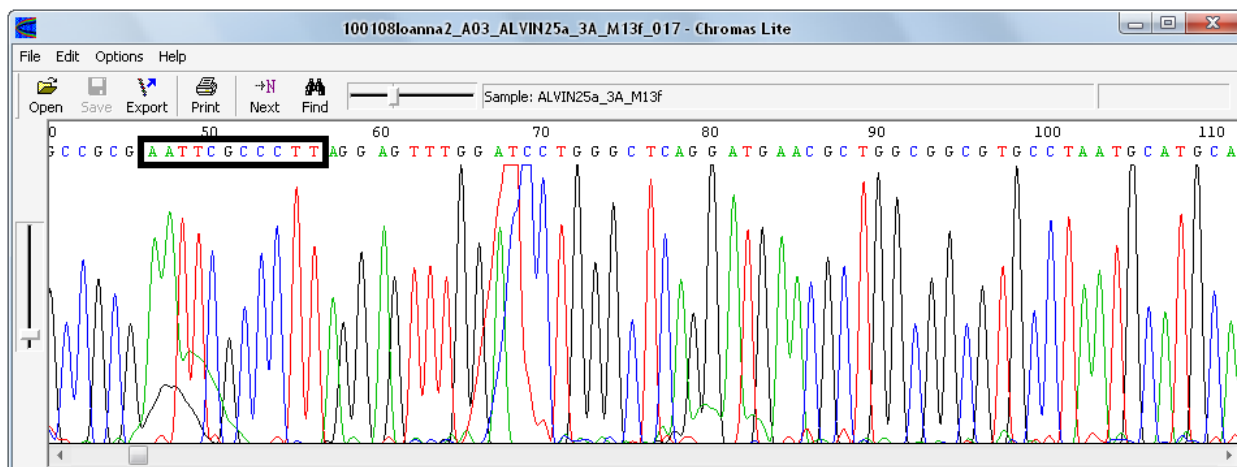




Εικόνα 8.Α) Μεταφορά βακτηριακών αποικιών από το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB με καναμυκίνη (τριβλία) σε περίπου 1.5 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB με καναμυκίνη (96 –well πιάτα) με την χρήση οδοντογλυφίδων. Β) Μεταφορά 75 µl βακτηριακών αποικιών από 96 –well πιάτα σε 96 – deep well πιάτα, μέσα στα οποία προστίθενται περίπου 1.5 ml υγρού θρεπτικού LB με καναμυκίνη. Στα 96 –well πιάτα προστίθενται 75 µl υγρού θρεπτικού LB με DMSO και κατόπιν φυλάσσονται σε συνθήκες ψύξης (-80°C). Γ) Εκχύλιση πλασμιδίων από τις βακτηριακές αποικίες με την χρήση Unifilter microplates των 800 µl. Δ) Ο αναλυτής ABI 3700 96-capillary sequencer, ο οποίος μόλις έχει ξεκινήσει την διαδικασία ‘ανάγνωσης’ των 16S rDNA βακτηριακών κλώνων που περιέχονται στο ABI plate.

3.2.4 Αλληλούχιση του γονιδίου του 16S ριβοσωμικού RNA

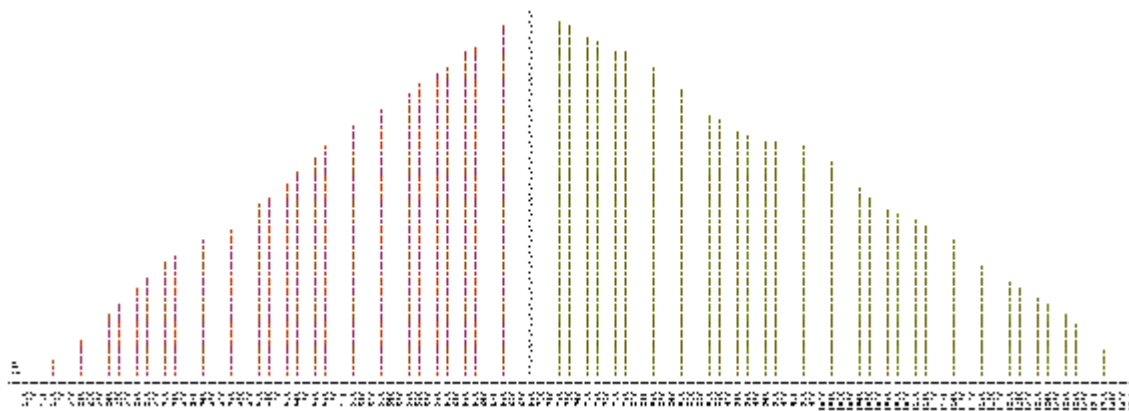
Οι πέντε βιβλιοθήκες κλώνων 16S rDNA που κατασκευάστηκαν, περιείχαν συνολικά 472 κλωνοποιημένες αλληλουχίες. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των κλώνων αυτών διαπιστώθηκε με την χρήση του πρωτοκόλλου BigDye terminator kit (v.3.1; Applied Biosystems) και του αναλυτή ABI 3700 96-capillary sequencer (Applied Biosystems, Εικόνα 8Δ), καθώς έτσι εξασφαλίζεται ‘ύψηλης ποιότητας ανάγνωση’ μεταξύ 450 και 780 βάσεων και ελέγχθηκε μία προς μία με το λογισμικό πρόγραμμα Chromas Lite 201. Στην Εικόνα 9 απεικονίζεται το χρωματογράφημα μίας 16S rDNA αλληλουχίας, όπως αυτή προκύπτει από την ‘ανάγνωση’ του αναλυτή ABI.



Εικόνα 9. Χρωματογράφημα μίας 16S rDNA αλληλουχίας όπως αυτή έχει προκύψει από την ‘ανάγνωση’ του αναλυτή ABI. Το μαύρο πλαίσιο περιλαμβάνει την αλληλουχία του εκκινητή, την οποία διαδέχονται οι νουκλεοτιδικές βάσεις του 16S rDNA κλώνου.

Πρώτο βήμα στον έλεγχο της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ενός βακτηριακού κλώνου είναι ο εντοπισμός της αλληλουχίας του εκκινήτη (AATTCGCCCTT) και συνεπώς την αρχή του 16S rDNA κλώνου. Στην συνέχεια προσπαθούμε να διαπιστώσουμε αν κάθε κορυφή του χρωματογραφήματος αντιστοιχεί στην νουκλεοτιδική βάση που αναγράφεται στην κορυφή κάθε γραφήματος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι κορυφές στις θέσεις 67 έως 70 όπου μετά από διόρθωση έχει προκύψει η αλληλουχία ATCC. Προφανώς, ο έλεγχος της αλληλουχίας των βακτηριακών κλώνων με το Chromas Lite 201 είναι απαραίτητος, καθώς έτσι διαπιστώνονται τυχόν λάθη κατά την 'ανάγνωση' του αναλυτή ABI.

Στην συνέχεια, οι βακτηριακοί κλώνοι εισάγονται ένας προς ένας στο λογισμικό πρόγραμμα Chimera Check του Ribosomal Database Project II (Michigan State University, East Lansing, MI, USA) όπου και εντοπίζονται, εφόσον υπάρχουν, οι χημικτικές αλληλουχίες που έχουν παραχθεί κατά την PCR. Στην παρούσα εργασία, διαπιστώθηκαν τρεις εν δυνάμει χημικτικές αλληλουχίες. Στην Εικόνα 10 παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό γράφημα χημικτικής 16S rDNA αλληλουχίας (Ribosomal Database Project II).



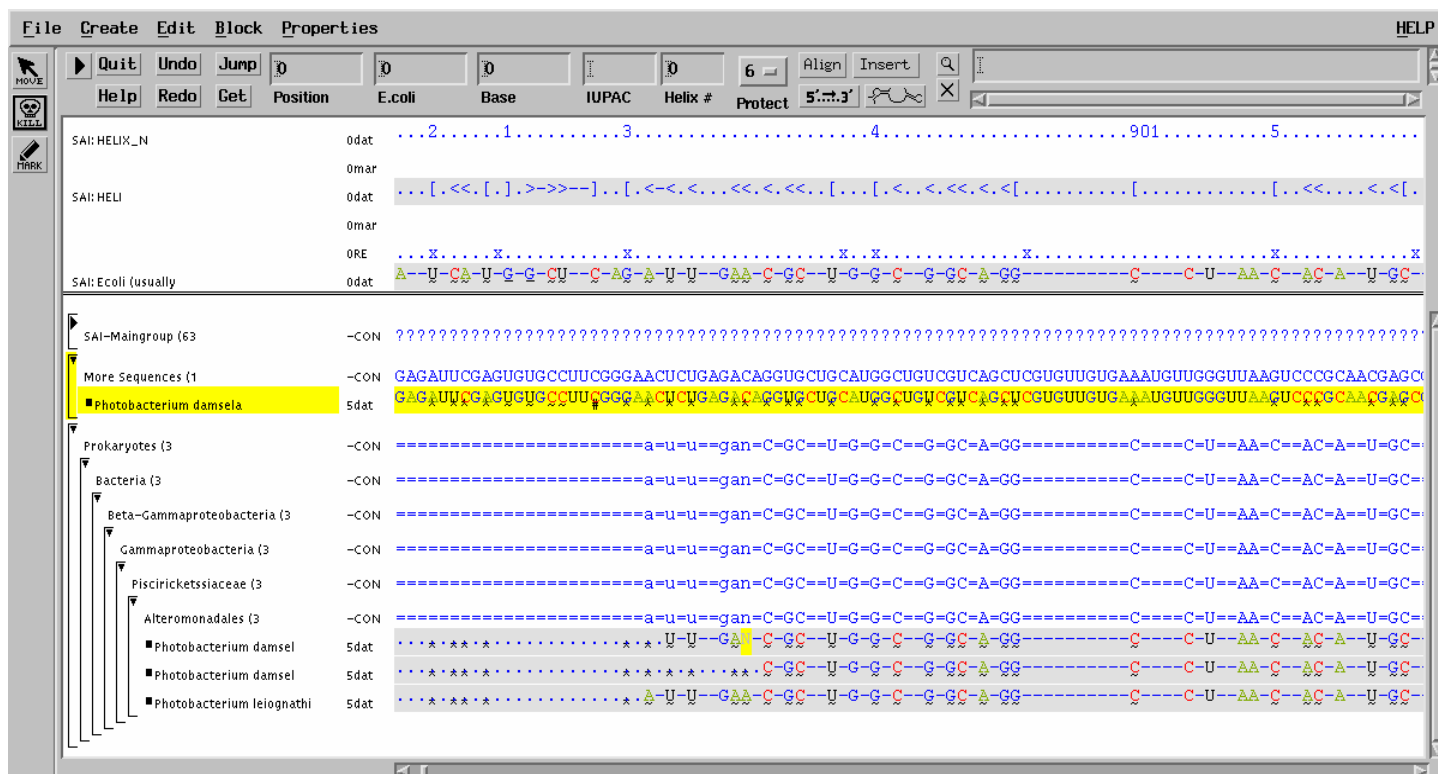
Εικόνα 10. Τυπικό γράφημα χημικτικής αλληλουχίας, όπως αυτό παρατίθεται στο Ribosomal Database Project II.

Τέλος, οι διορθωμένες πλέον βακτηριακές αλληλουχίες συγκρίνονται με αντίστοιχους κλώνους της βάσης δεδομένων GenBank με το λειτουργικό εργαλείο σύγκρισης BLAST (Basic Local Alignments Tool, National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA). Το BLAST συγκρίνει την νουκλεοτιδική αλληλουχία των 16S rDNA κλώνων με αυτή αντίστοιχων κλώνων που περιέχονται στην βάση δεδομένων και υπολογίζει την στατιστική σημαντικότητα των ζευγών που έχουν σχηματιστεί. Το BLAST μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διεξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τις λειτουργικές και εξελικτικές σχέσεις μεταξύ αλληλουχιών, καθώς και για την αναγνώριση μελών γονιδιακών οικογενειών (members of gene families). Στην παρούσα εργασία, εντοπίστηκαν συνολικά 55 αλληλουχίες κυτταρικών οργανιδίων και φορέα κλώνων (clone vector), καθώς και τρεις κλώνοι, οι οποίοι δεν εμφάνιζαν καμμία ομοιότητα με τις αλληλουχίες τόσο της GenBank, όσο και της βάσης του ARB. Προφανώς, οι αλληλουχίες των παραπάνω κατηγοριών δεν λήφθηκαν υπόψη στην περαιτέρω φυλογενετική

ανάλυση, με αποτέλεσμα 304 κλώνοι να κατατεθούν τελικά στην βάση δεδομένων GenBank με τους κωδικούς πρόσβασής τους να είναι FJ197343 – FJ197646.

3.2.5 Φυλογενετική ανάλυση

Η φυλογενετική ανάλυση των κλώνων 16S ριβοσωμικού DNA πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα ARB (Version 2.5b, Technische Universität München, München, Germany, Ludwig et al., 2004). Η ανάλυση αυτή περιλαμβάνει την ευθυγράμμιση των ριβονουκλεοτιδικών αλληλουχιών μία προς μία χρησιμοποιώντας τις ήδη ευθυγραμμισμένες αλληλουχίες της βάσης δεδομένων ARB, και την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων. Στην Εικόνα 11 παρουσιάζεται ο τρόπος με τον οποίο πραγματοποιείται η ευθυγράμμιση μίας αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA με βάση τους αντίστοιχους κλώνους του ARB (Warnecke et al., 2005).



Εικόνα 11. Ευθυγράμμιση μίας 16S rRNA αλληλουχίας με βάση αντίστοιχους 16S rRNA κλώνους που περιέχονται στην βάση δεδομένων του ARB (Warnecke et al., 2005).

Η ευθυγράμμιση της πρωτοταγούς δομής είναι αναμφισβήτητα το καθοριστικό πρώτο βήμα για την φυλογενετική ανάλυση που στηρίζεται στην νουκλεοτιδική αλληλουχία. Η ευθυγράμμιση είναι απαραίτητη καθώς μόνο οι σημειακές αλλαγές των αλληλουχιών που παρατηρούνται σε σύγκριση με μία πρότυπη αλληλουχία (πχ. αλληλουχία 16S rDNA του βακτηρίου *E.coli*) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την διεξαγωγή φυλογενετικών

συμπερασμάτων. Οι ομόλογες αυτές θέσεις αφού εντοπιστούν, πρέπει να διευθετηθούν σε στήλες προκειμένου οι αλληλουχίες να ευθυγραμμιστούν και η περαιτέρω ανάλυσή τους (εισαγωγή σε φυλογενετικό δέντρο) να είναι δυνατή (Ludwig and Klenk, 2001).

Εξαιτίας του μεγάλου πλήθους των κλώνων 16S rDNA, ήταν δυνατή μονάχα η κατασκευή δέντρων τύπου Maximum Parsimony. Η δημιουργία και η βελτιστοποίηση των δέντρων αυτών στηρίζεται σε ένα εξελικτικό μοντέλο, σύμφωνα με το οποίο η διατήρηση και όχι η αλλαγή φαίνεται να είναι πιθανότερη. Με βάση τους αλγόριθμους Parsimony, διερευνώνται εκείνες οι τοπολογίες δέντρου που ελαχιστοποιούν το συνολικό μήκος δέντρου. Έτσι, η πιο 'φειδωλή' τοπολογία δέντρου στηρίζεται στην υπόθεση του ελάχιστου πλήθους σημειακών μεταβολών, με βάση την οποία συσχετίζεται η τοπολογία του δέντρου με τις αρχικές αλληλουχίες-δεδομένα (Lundwig and Klenk, 2001).

3.3 Βακτηριακή ποικιλότητα

Η βακτηριακή ποικιλότητα των βιβλιοθηκών υπολογίστηκε με την βοήθεια του προγράμματος Rarefaction calculator (<http://www2.biology.ualberta.ca/jbrzusto/rarefact.php>). Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε ο μη παραμετρικός (non parametric) δείκτης Chao (Chao, 1984), ο οποίος δίνεται από την εξίσωση:

$$S_1 = S_{obs} + \frac{a^2}{2b}$$

όπου, S_{obs} : το πλήθος των φυλογενετικών ομάδων OTUs και κατ'επέκταση των κλώνων 16S rDNA που εντοπίστηκαν

a: το πλήθος των OTUs που παρατηρήθηκαν μία φορά

b: το πλήθος των OTUs που παρατηρήθηκαν δύο φορές.

Οι τυπικές αποκλίσεις SD υπολογίστηκαν ως εξής:

$$SD = b \left[\left(\frac{a}{4b} \right)^4 + \left(\frac{a}{b} \right)^3 + \left(\frac{a}{2b} \right)^2 \right]$$

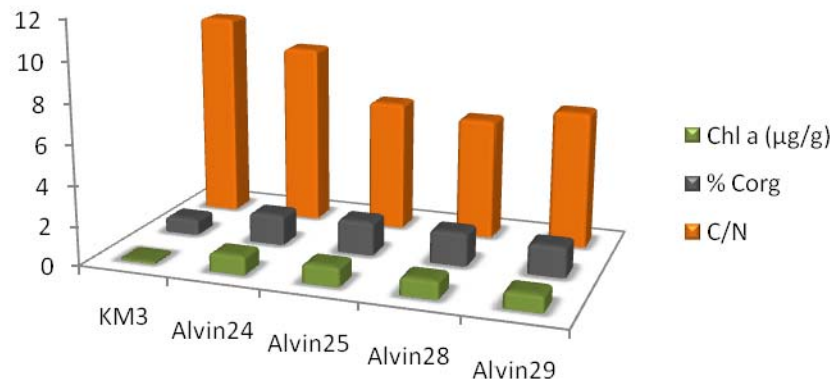
3.4 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του λογισμικού PRIMER (Plymouth Routines In Multivariate Ecological Research). Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε πολυμεταβλητή ανάλυση με την χρήση της Ευκλείδιας Απόστασης (Euclidean Distance), οπότε και οι βιβλιοθήκες των κλώνων ομαδοποιήθηκαν με βάση τις διαφορές τους ως προς τις επιμέρους αλληλουχίες του γονιδίου του 16S rRNA. Η ομαδοποίηση αυτά αναπαρίστανται γραφικά με την μορφή δενδρογράμματος.

4. Αποτελέσματα

4.1 Χημικά χαρακτηριστικά των ιζημάτων

Στην θαλάσσια βενθική οικολογία, η χλωροφύλλη α, ο οργανικός άνθρακας και ο λόγος C/N είναι ιδιαίτερα διαδεδομένοι δείκτες βιοδιαθέσιμης τροφής στα ιζήματα. Στον Πίνακα 2 (Παράρτημα) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν στα δείγματα των ιζημάτων Alvin και KM3. Στο Σχήμα 1 απεικονίζονται γραφικά τα αποτελέσματα αυτά.



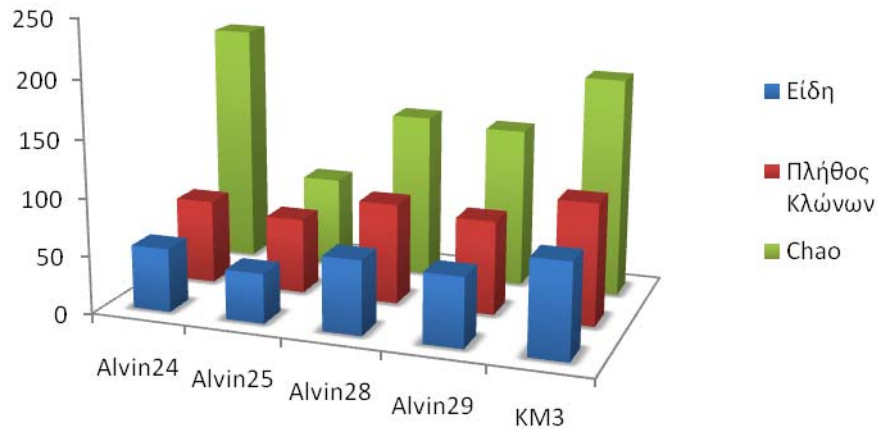
Σχήμα1. Συγκριτική γραφική απεικόνιση των χημικών παραμέτρων χλωροφύλλη α, % οργανικού άνθρακα, C/N για τα μικροπεριβάλλοντα Alvin και KM3.

Τα δείγματα του Ειρηνικού Ωκεανού περιείχαν την μεγαλύτερη ποσότητα τόσο χλωροφύλλης α (0.83-0.97 μg/g) όσο και οργανικού άνθρακα (1.53-1.69%), σε αντίθεση με το δείγμα ιζήματος από το Ιόνιο Πέλαγος, το οποίο διέθετε μόνο 0.12 μg/g χλωροφύλλης α και 0.82% οργανικού άνθρακα. Όσον αφορά στον λόγο C/N, το ιζήμα KM3 φαίνεται να έχει την μεγαλύτερη τιμή (10.45), η οποία όμως είναι συγκρίσιμη με την τιμή του Alvin24 (9.11). Τα υπόλοιπα τρία δείγματα του Ειρηνικού Ωκεανού έχουν τιμή C/N κυμαινόμενη μεταξύ 6.1 – 6.87.

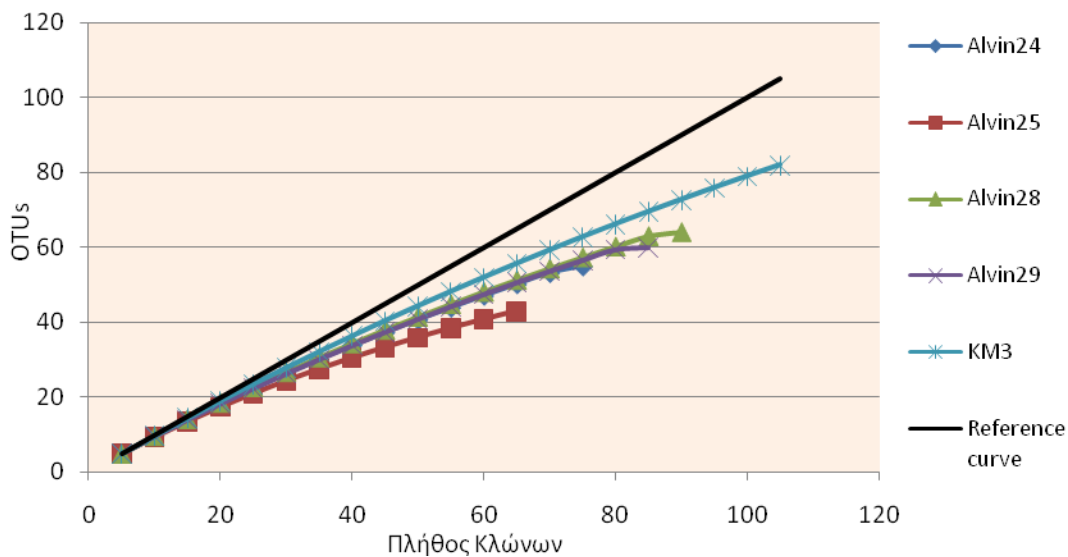
4.2 Βακτηριακή ποικιλότητα των μικροπεριβαλλόντων Alvin και KM3

Η αφθονία των ειδών στα υπό μελέτη μικροπεριβάλλοντα υπολογίστηκε με την τεχνική αραιώσης (rarefaction). Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε ο ιδιαίτερα διαδεδομένος για τα περιβαλλοντικά δείγματα μη παραμετρικός παράγοντας Chao ώστε να εκτιμηθεί η βακτηριακή ποικιλότητα. Στο Σχήμα 2 παρουσιάζονται γραφικά τα δεδομένα του Πίνακα 2 (Παράρτημα).

Στο Σχήμα 3 απεικονίζεται η Καμπύλη Αραίωσης για όλες τις βιβλιοθήκες των κλώνων του γονιδίου του 16S rRNA. Σε γενικές γραμμές, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές όσον αφορά στην βακτηριακή ποικιλότητα μεταξύ των βιβλιοθηκών 16S rRNA, αφού οι γραφικές παραστάσεις τους δεν αποκλίνουν σημαντικά από την καμπύλη αναφοράς. Το γεγονός αυτό είναι ενδεικτικό της υψηλής βακτηριακής ποικιλότητας σε όλα τα υπό μελέτη μικροπεριβάλλοντα.



Σχήμα2. Σύγκριση πλήθους κλώνων 16S rRNA, πλήθους ειδών και τιμών Chao για τις βιβλιοθήκες Alvin και KM3.

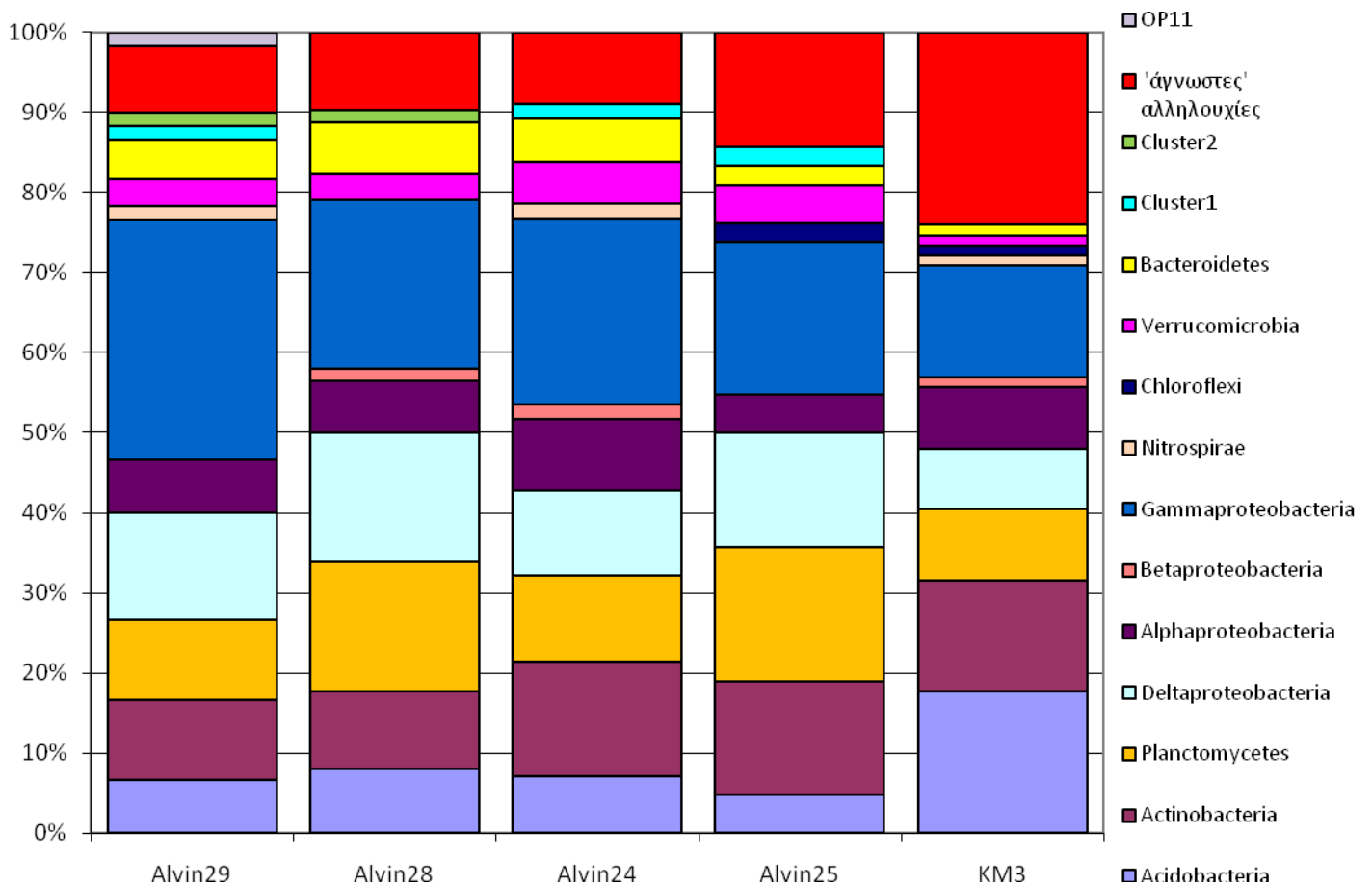


Σχήμα3. Καμπύλη αραιώσης για τις βιβλιοθήκες κλώνων του 16S ριβοσωμικού RNA του Ειρηνικού Ωκεανού και της Ανατολικής Μεσογείου.

4.3 Βακτηριακή σύσταση και σύγκριση των βιβλιοθηκών κλώνων του γονιδίου 16S ριβοσωμικού RNA

Στην φυλογενετική ανάλυση των βιβλιοθηκών χρησιμοποιήθηκαν 304 κλώνοι, από τους οποίους οι 252 ταξινομήθηκαν σε έντεκα γνωστά φύλα: Acidobacteria, Actinobacteria, Planctomycetes, Alpha Proteobacteria, Beta Proteobacteria, Gamma Proteobacteria, Delta

Proteobacteria, Nitrospirae, Chloroflexi, Verucomicrobia και Bacteroidetes. Από τους υπόλοιπους 52 κλώνους, οι πέντε αλληλουχίες ταξινομήθηκαν σε δύο επιμέρους ομάδες (Cluster 1 και Cluster 2), καθώς μία αλληλουχία συσχετίστηκε με το υποψήφιο φύλο OP11 (candidate division OP11), ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών δεν μπορούσε να ταξινομηθεί σε καμία από τις γνωστές ταξινομικές ομάδες (40 κλώνοι). Στον Πίνακα 4 (Παράρτημα) παρουσιάζονται όλες οι ταξινομικές ομάδες που προσδιορίστηκαν στα υπό μελέτη μικροπεριβάλλοντα και το ποσοστό των κλώνων κάθε βιβλιοθήκης που ταξινομείται σε κάθε μία από αυτές. Ακολούθως, στο Σχήμα 4, απεικονίζεται γραφικά η δομή της βακτηριακής βιοκοινωνίας για τις βιβλιοθήκες Alvin και KM3. Παρατηρείται ότι σε γενικές γραμμές, η δομή των μικροβιακών βιοκοινωνιών του Ειρηνικού Ωκεανού και της Ανατολικής Μεσογείου δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές.



Σχήμα 4. Συγκριτικό γράφημα της βακτηριακής σύστασης των μικροπεριβαλλόντων του Ειρηνικού Ωκεανού και της Ανατολικής Μεσογείου.

Με βάση τις τέσσερις βιβλιοθήκες Alvin (220 κλώνοι), στα αντίστοιχα μικροπεριβάλλοντα του Ειρηνικού Ωκεανού επικρατούν τα Gammaproteobacteria (23,31%)

ενώ τα Deltaproteobacteria (13,62%) και τα Actinobacteria (12,06%) συνιστούν τις δύο επόμενες πιο πολυπληθείς ταξινομικές ομάδες. Στην συγκεκριμένη βιβλιοθήκη βρέθηκαν κλώνοι που συσχετιζόνταν με τα φύλα Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Nitrospirae, Chloroflexi, την ομάδα Cluster2, το υποψήφιο φύλο OP11, ενώ ένα σημαντικό ποσοστό αλληλουχιών (10.31%) δεν ταξινομήθηκε σε καμία γνωστή φυλογενετική ομάδα (στο εξής 'άγνωστες αλληλουχίες'). Οι διαφοροποιήσεις μεταξύ των βιβλιοθηκών Alvin είναι περιορισμένες και είναι οι εξής:

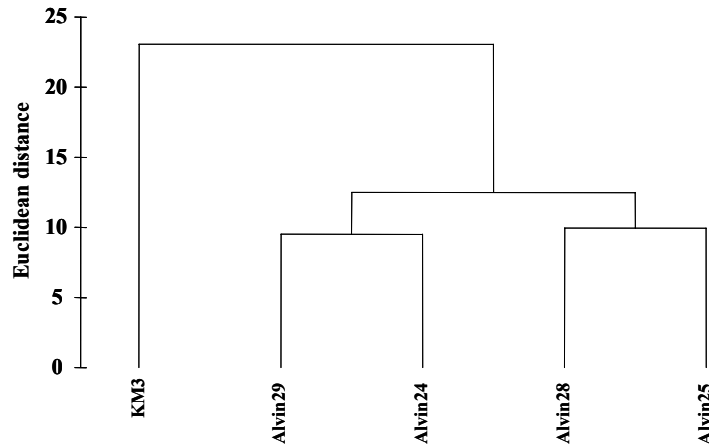
- ✱ η βιβλιοθήκη Alvin29 περιέχει κλώνους του γονιδίου του 16S rRNA της φυλογενετικής ομάδας OP11, ενώ δεν φαίνεται να διαθέτει κλώνους Betaproteobacteria,
- ✱ η βιβλιοθήκη Alvin28 διαθέτει κλώνους του γονιδίου του 16S rRNA της φυλογενετικής ομάδας Betaproteobacteria αλλά όχι και των ομάδων Nitrospirae και Cluster1,
- ✱ η βιβλιοθήκη Alvin25 είναι η μόνη που διαθέτει κλώνους του γονιδίου του 16S rRNA του φύλου Chloroflexi και το μεγαλύτερο ποσοστό 'άγνωστων αλληλουχιών' και δεν περιέχει αλληλουχίες 16S rDNA των φυλογενετικών ομάδων Nitrospirae και Betaproteobacteria,
- ✱ οι βιβλιοθήκες Alvin28 και Alvin25 διαθέτουν το μικρότερο πλήθος φυλογενετικών ομάδων (11),
- ✱ η φυλογενετική ομάδα Cluster2 αποτελείται από κλώνους μονάχα των βιβλιοθηκών Alvin29 και Alvin28,
- ✱ μεταξύ των 15 διαφορετικών φυλογενετικών ομάδων των βακτηρίων που φαίνεται να δραστηριοποιούνται στα τέσσερα μικροπεριβάλλοντα του Ειρηνικού Ωκεανού, μόνο δύο - Chloroflexi και OP11 - εντοπίστηκαν σε μία βιβλιοθήκη.

Όσον αφορά στην βιβλιοθήκη KM3, οι αλληλουχίες του γονιδίου του 16S rRNA που εντοπίστηκαν, ταξινομήθηκαν σε έντεκα γνωστά φύλα: Acidobacteria, Actinobacteria, Planctomycetes, Deltaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Nitrospirae, Chloroflexi, Verrucomicrobia, Bacteroidetes. Αξίζει να σημειωθεί ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των συνολικών κλώνων (24,05%) είναι αλληλουχίες 16S rDNA που δεν υπέπεσαν σε καμία γνωστή ταξινομική ομάδα. Από τις γνωστές φυλογενετικές ομάδες, τα Acidobacteria και κατόπιν τα Gammaproteobacteria και τα Actinobacteria είναι οι πιο πολυπληθείς με ποσοστά έναντι των συνολικών κλώνων με 17,72% και 13,92% αντίστοιχα.

Σε γενικές γραμμές δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στην βακτηριακή σύσταση των κοινωσιών από τα μικροπεριβάλλοντα του Ειρηνικού Ωκεανού και της Ανατολικής Μεσογείου Alvin και KM3. Συγκεκριμένα, η μία διαφορά αφορά στην κατανομή των αλληλουχιών του 16S rDNA, όπου στην βιβλιοθήκη KM3 το επικρατέστερο φύλο είναι τα Acidobacteria, σε αντίθεση με τα Gammaproteobacteria που κυριαρχούν και στις τέσσερις βιβλιοθήκες Alvin. Επίσης, η βιβλιοθήκη KM3 περιέχει το μεγαλύτερο ποσοστό κλώνων 16S rDNA που δεν μπορεί να ταξινομηθεί σε κανένα γνωστό φύλο/ταξινομική ομάδα (Σχήμα 4).

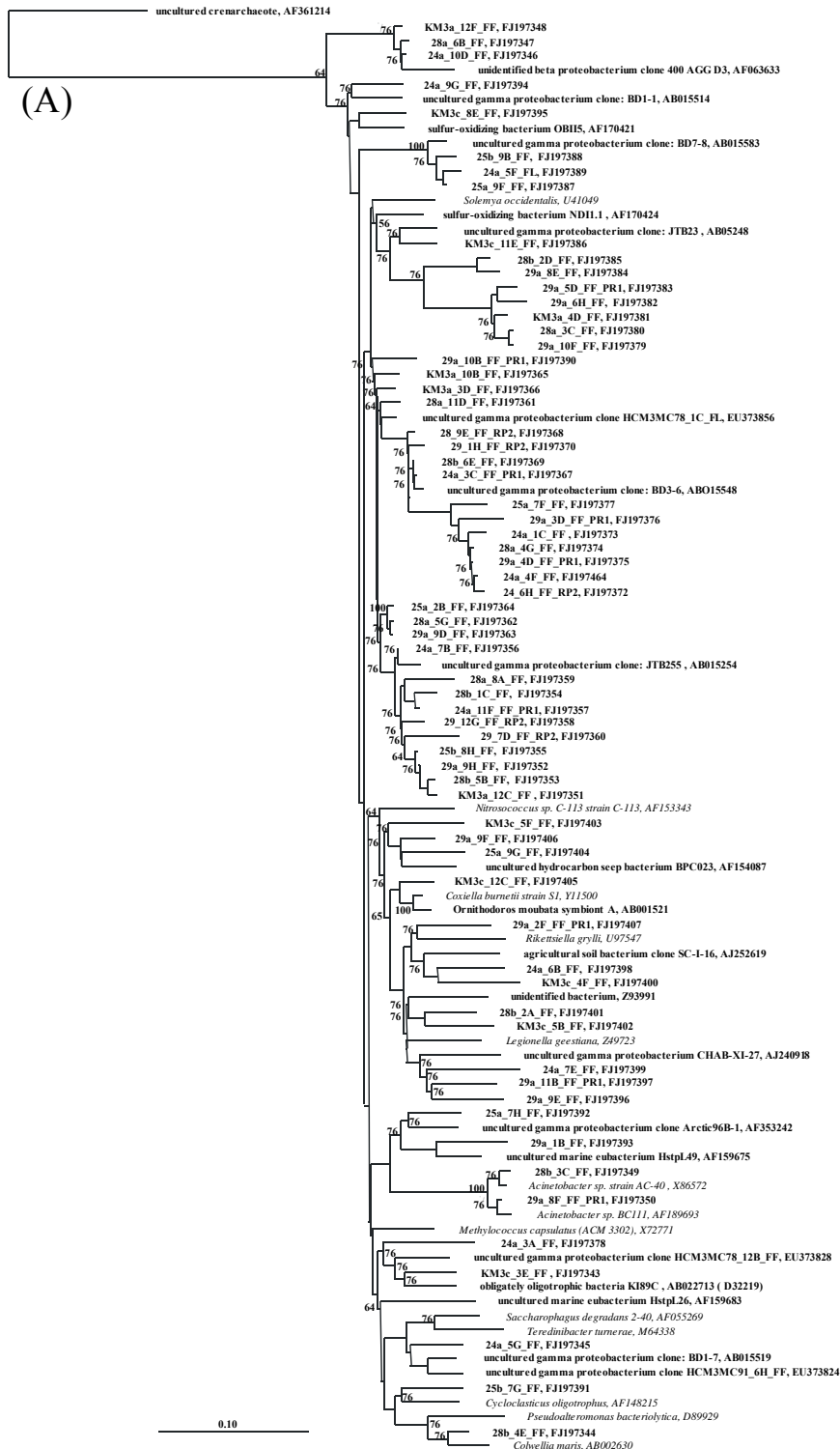
Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται από το διάγραμμα της Ευκλείδειας Απόστασης (Σχήμα 5), σύμφωνα με το οποίο οι βιβλιοθήκες Alvin έχουν ομαδοποιηθεί ανά

δύο: η Alvin29 με την Alvin24 και η Alvin28 με την Alvin25, με τις διαφοροποιήσεις ανά ζεύγος να αγγίζουν το 10% και περίπου 11% αντίστοιχα, ενώ αυτές μεταξύ των ζευγών να είναι λιγότερο από 15%. Η ομαδοποίηση αναμενόταν να περιλαμβάνει τα ζεύγη: Alvin29 - Alvin28 και Alvin24 - Alvin25, καθώς κάθε ζεύγος προέρχεται από τον ίδιο σταθμό δειγματοληψίας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η μικροκοινωνία KM3 διαφέρει μονάχα κατά 23% περίπου από αυτές του Ειρηνικού Ωκεανού.

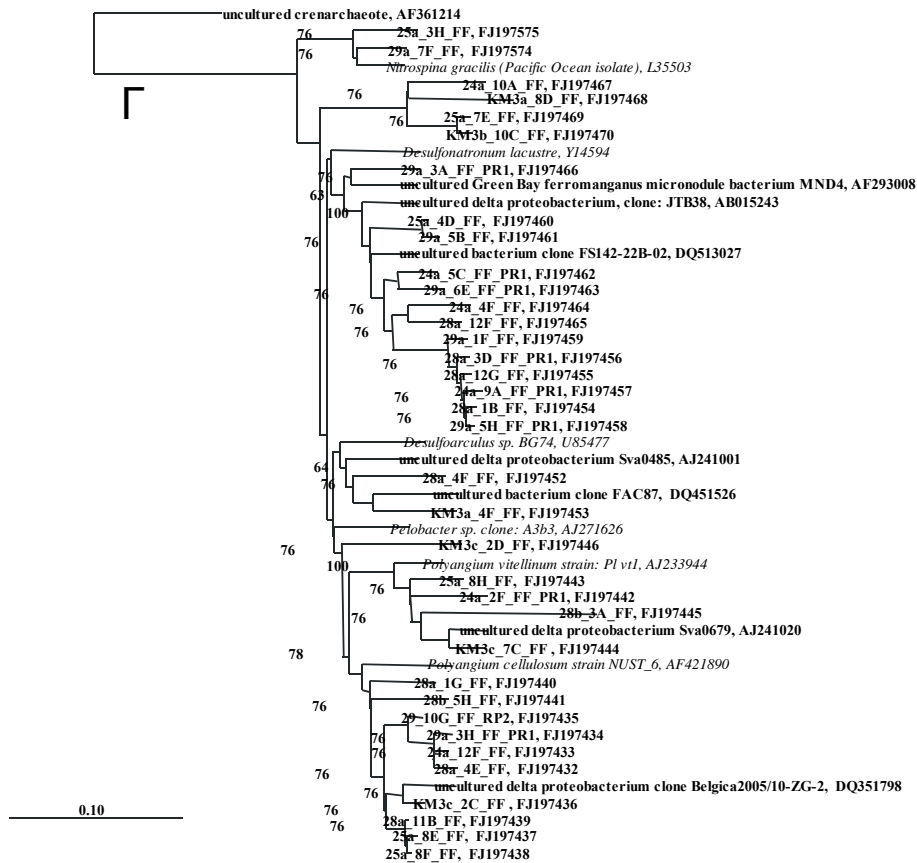
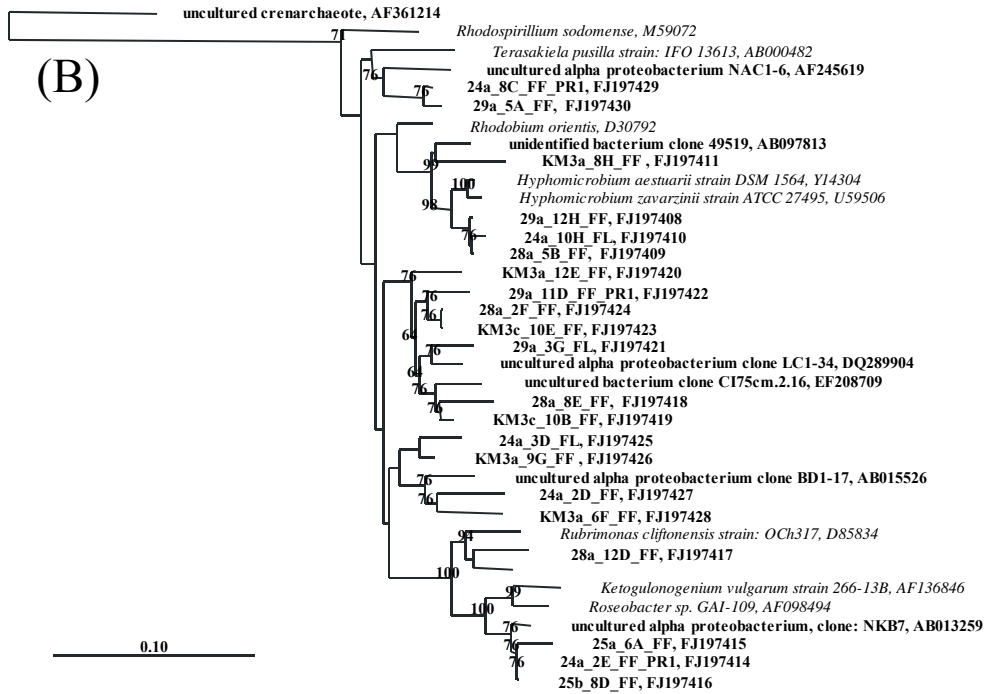


Σχήμα5. Ομαδοποίηση (Ευκλείδεια απόσταση) των βακτηριακών κοινωνιών του Ειρηνικού Ωκεανού και της Ανατολικής Μεσογείου.

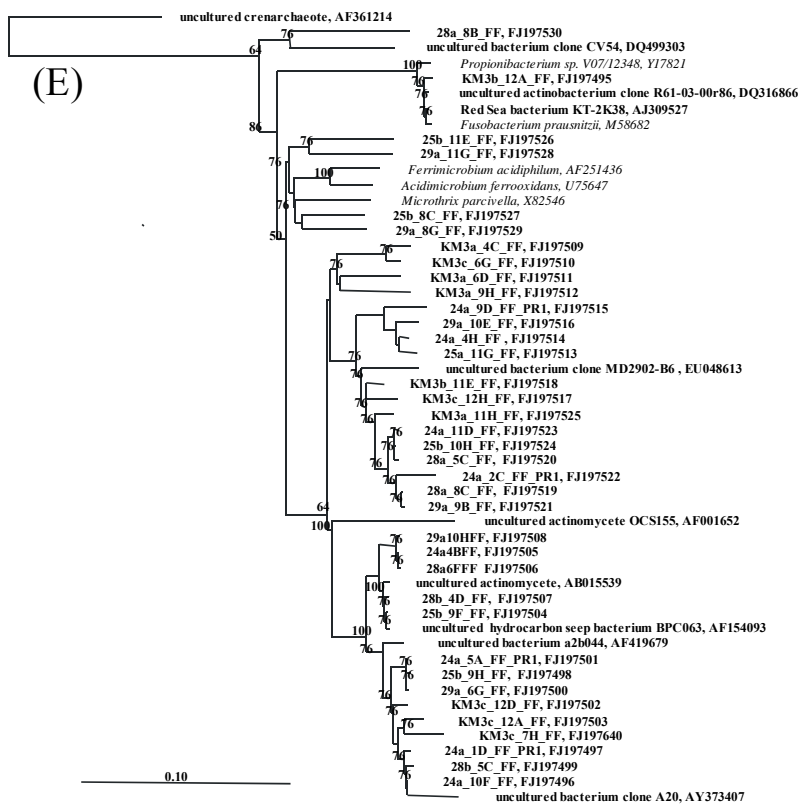
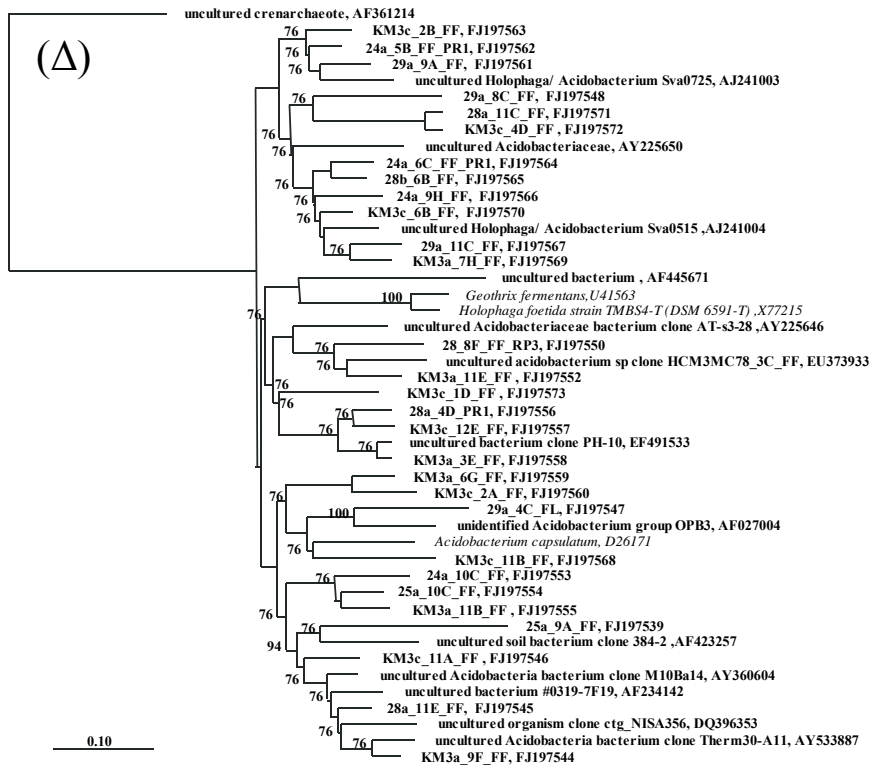
Στα πλαίσια της φυλογενετικής ανάλυσης κατασκευάστηκαν επτά φυλογενετικά δέντρα ‘Μέγιστης Φειδωλότητας’ (Maximum Parsimony), χρησιμοποιώντας σαν κλώνους αναφοράς αλληλουχίες 16S rDNA της βάσης δεδομένων του προγράμματος Arb. Κάθε ένα από τα δέντρα αντιπροσωπεύει μία φυλογενετική ομάδα, οπότε και κατασκευάστηκαν τα δέντρα των Betaproteobacteria & Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Actinobacteria, Planctomycetes και Acidobacteria (Σχήμα 6A, B, Γ, Δ, E και ΣΤ). Εξαίρεση αποτελεί το έβδομο δέντρο, στο οποίο έχουν ενσωματωθεί οι κλώνοι των OTUs περιορισμένης αφθονίας όπου περιλαμβάνονται τα Verrucomicrobia, Chloroflexi, OP11, Nitrospirae και οι ‘άγνωστες’ αλληλουχίες (Σχήμα 6Z). Στο δέντρο αυτό, πέντε συνολικά ‘άγνωστες’ αλληλουχίες των βιβλιοθηκών Alvin συμμετέχουν σε δύο επιμέρους φυλογενετικές ομάδες Cluster1 και Cluster2. Οι ομάδες αυτές αποτελούνται από αλληλουχίες δύο τουλάχιστον διαφορετικών βιβλιοθηκών, ενώ η ομοιότητά τους που πρέπει να είναι τουλάχιστον 98%, ελέγχθηκε με την επιλογή Neighbor Joining του προγράμματος Arb. Σε γενικές γραμμές, παρατηρήθηκε ότι σε όλα τα δέντρα οι αλληλουχίες 16S rDNA των βιβλιοθηκών του Ειρηνικού Ωκεανού συνδέονται στενά με αυτές της βιβλιοθήκης της Ανατολικής Μεσογείου.



Σχήμα 6. Φυλογενετικό δέντρο Μέγιστης Φειδωλότητας 16S rDNA όπου φαίνονται οι θέσεις των φυλοτύπων που συνδέονται με Α) Beta- και Gamma- Proteobacteria, Β) Alphaproteobacteria, Γ) Deltaproteobacteria, Δ) Acidobacteria, Ε) Actinobacteria, ΣΤ) Planctomycetales και Ζ) Nitrospirae, Unidentified, Chloroflexi, Verrucomicrobia, Cluster 1, Cluster 2, την υποψήφια ομάδα OP11, Chlorobi και Bacteroidetes των βιβλιοθηκών κλώνων (Alvin και KM3) που κατασκευάστηκαν από ιζήματα του Ειρηνικού Ωκεανού και της Ανατολικής Μεσογείου. Οι τιμές στις διακλαδώσεις δηλώνουν την αυτοδυναμία των ομάδων. Τιμές κάτω του 50% δεν παρουσιάζονται στο σχήμα. Η αναλογία 0,1 δηλώνει 10% διαφορά νουκλεοτιδίου ανά μία θέση 16S rRNA.



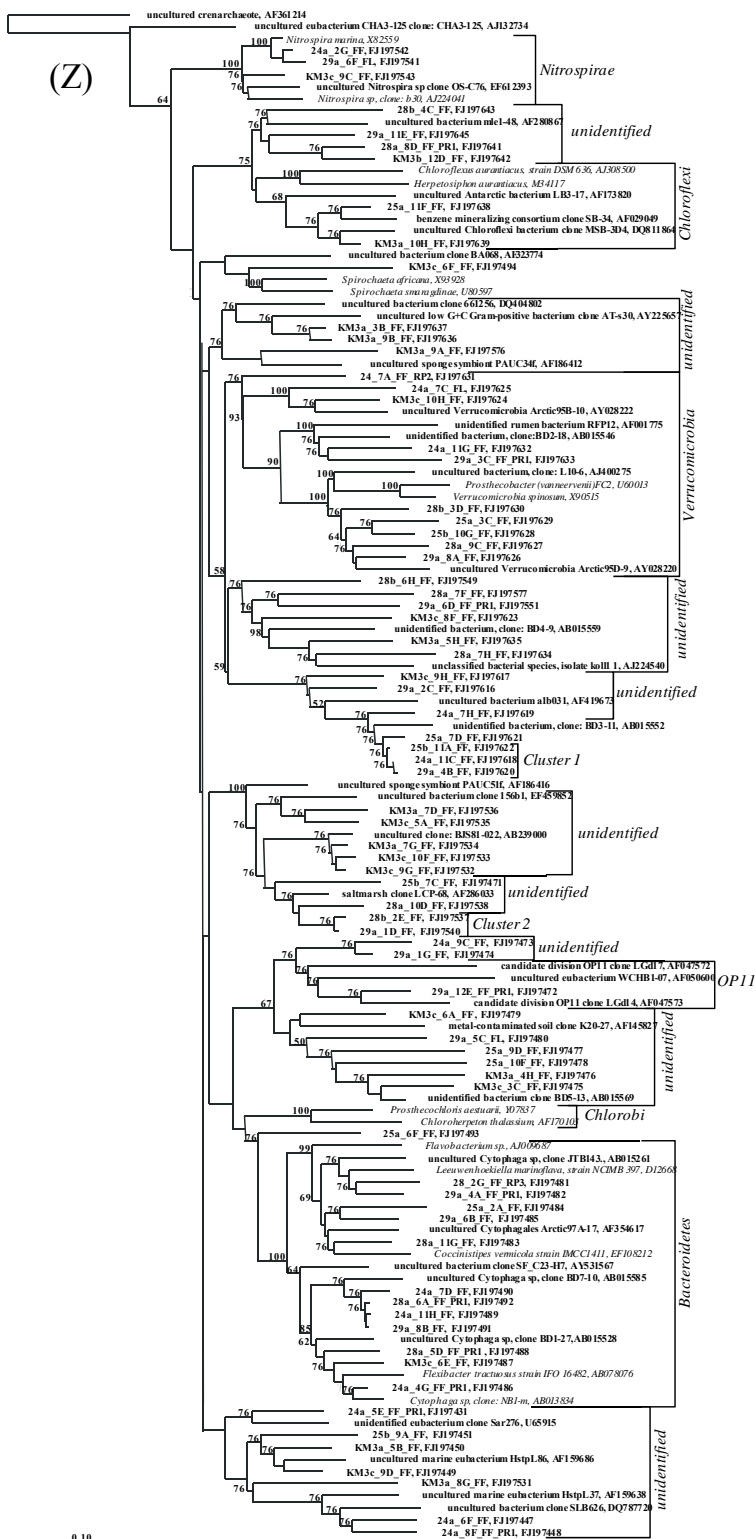
Σχήμα 6. Συνέχεια.



Σχήμα 6. Συνέχεια.



Σχήμα 6. Συνέχεια.



Σχήμα 6. Συνέχεια.

5. Συζήτηση

5.1 Χημικά χαρακτηριστικά ιζημάτων

Η περιεκτικότητα της χλωροφύλλης α στην στήλη του νερού αποτελεί τον πιο καθοριστικό παράγοντα της συγκέντρωσής της στα ιζήματα (Morata and Renaud, 2008, in press), ενώ έχει τονιστεί και η συσχέτιση μεταξύ της τελευταίας με το θαλάσσιο βάθος (Grahl et al., 1995). Ανάλογα με τα επίπεδα συγκέντρωσης χλωροφύλλης μπορεί να οριστούν περιοχές διαφορετικής τροφικής κατάστασης. Χαρακτηριστικό αποτελεί το παράδειγμα της Βαλτικής Θάλασσας, όπου ορίστηκαν τρεις ζώνες με βάση την συγκέντρωση της χλωροφύλλης: 1. το πρώτο εκατοστό του ιζήματος: η μόνιμα ευτροφική περιοχή, όπου η συγκέντρωσή της κυμαίνεται σε τιμές μεγαλύτερες των 35 $\mu\text{g/g}$, 2. την παράκτια περιοχή, όπου η τιμή αυτή ποικίλει μεταξύ 8 – 35 $\mu\text{g/g}$ και 3. την μεσοτροφική περιοχή με τιμές χλωροφύλλης μικρότερες των 8 $\mu\text{g/g}$ (Kowalewska, 2005). Ακόμη, στα βαθιά θαλάσσια ολιγοτροφικά οικοσυστήματα του Ισημερινού στον Ειρηνικό Ωκεανό οι τιμές της χλωροφύλλης είναι μικρότερες από 0.06 $\mu\text{g/g}$ (Smith et al., 1996) και κατά μέσο όρο 0.04 $\mu\text{g/g}$ στον Νότιο Ινδικό Ωκεανό με μέγιστη τιμή το 0.15 $\mu\text{g/g}$ στην μόνιμη ζώνη ανοιχτής θάλασσας (Riaux-Gobin et al., 1997). Στην παρούσα μελέτη, οι τιμές της χλωροφύλλης για τους σταθμούς του Ειρηνικού Ωκεανού είναι μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες τιμές που βρέθηκαν στα προαναφερθέντα βαθιά θαλάσσια περιβάλλοντα και έτσι μπορούν να χαρακτηριστούν ως μεσοτροφικά. Το μικροπεριβάλλον του Ιόνιου Πελάγους είναι ολιγοτροφικό, καθώς η συγκέντρωση της χλωροφύλλης είναι συγκρίσιμη με την αντίστοιχη μέγιστη τιμή στην μόνιμα ανοιχτή θάλασσα του Νότιου Ινδικού Ωκεανού. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται από προηγούμενη ανάλυση σε ιζημα του Ιονίου βάθους 2790 μέτρων (Polymenakou et al., 2005).

Κατά την καθίζησή του μέσα στην στήλη του νερού, μόνο ένα μικρό μέρος του οργανικού υλικού που έχει παραχθεί στην εύφωτη ζώνη, δεν υφίσταται στοιχειοποίηση, και μπορεί να καταλήξει στην επιφάνεια του ιζήματος (Hartman et al., 1976). Επιπλέον, επειδή οι αζωτούχες ενώσεις (που αποτελούν δείκτη παρουσίας των εύκολα αποδομήσιμων πρωτεϊνών) αποδομούνται γρηγορότερα σε σχέση με τις οργανικές, ο λόγος C/N του σωματιδιακού οργανικού υλικού αυξάνεται με την αύξηση του βάθους (Muller, 1977).

Συνήθως, για βάθη μεγαλύτερα από 1000 μέτρα από την επιφάνεια των ωκεανών, ο λόγος C/N είναι μεγαλύτερος από 10, ενώ προσεγγίζει την τιμή 15 σε ακόμα μεγαλύτερα ωκεάνια βάθη (Muller, 1977). Παρόλα αυτά στην παρούσα μελέτη, τα επίπεδα τιμών του λόγου C/N που προσδιορίστηκαν ήταν ιδιαίτερα χαμηλά. Συγκεκριμένα, για τους σταθμούς του Ειρηνικού Ωκεανού ο λόγος C/N κυμάνθηκε μεταξύ 6.1 και 9.11, ενώ για το Ιόνιο Πέλαγος η τιμή ήταν ίση προς 10.45, υποδηλώνοντας την άφθονη παρουσία αζωτούχων ενώσεων και κατ'επέκταση 'φρέσκιας και εύκολα αποδομήσιμης τροφής'. Η τιμή του λόγου C/N του σταθμού από το Ιόνιο Πέλαγος συμφωνεί με το εύρος τιμών C/N, όπως αυτό έχει διαπιστωθεί σε σταθμούς της Ανατολικής Μεσογείου κυμαινόμενου βάθους μεταξύ 2840 και 3532.5

μέτρων, το οποίο και είναι μεταξύ 10.50 και 18.14 (Polymenakou et al., 2005b). Τέλος, όσον αφορά στην περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, το ιζήμα του Ιονίου Πελάγους διαθέτει την μικρότερη τιμή (0.82%), η οποία όμως βρίσκεται στα ίδια επίπεδα με τιμές που έχουν καταγραφεί για την Ανατολική Μεσόγειο (0.37 – 1.63, Polymenakou et al., 2005c). Αντίθετα, τα ιζήματα από τον Ειρηνικό Ωκεανό περιείχαν μεγάλη συγκέντρωση οργανικού άνθρακα (1.53 – 1.69%), η οποία είναι συγκρίσιμη με αυτήν των σαπροπηλών της Ανατολικής Μεσογείου. Οι σαπροπηλοί είναι ζωνώσεις πάχους μεγαλύτερου από ένα εκατοστό στα ιζήματα, οι οποίες περιέχουν οργανικό άνθρακα σε τιμές που ξεπερνούν το 2% κατά βάρος ιζήματος (Kidd et al., 1978). Τα στρώματα των σαπροπηλών στα ιζήματα, ένα φαινόμενο ξεχωριστό που παρατηρείται στην Ανατολική Μεσόγειο, θεωρούνται ότι έχουν σχηματιστεί είτε λόγω συνθηκών παρατεταμένης ανοξίας σε μεγάλα βάθη (Passier et al., 1999), είτε λόγω αυξημένης πρωτογενούς παραγωγικότητας (Calvert et al., 1992).

5.2 Βακτηριακή ποικιλότητα των μικροπεριβαλλόντων *Alvin* και *KM3*

Κατά την μελέτη των βιβλιοθηκών κλώνων *Alvin* και *KM3* προέκυψε ότι τα υπό μελέτη μικροπεριβάλλοντα του Ειρηνικού Ωκεανού και ιδιαίτερα αυτό της Ανατολικής Μεσογείου χαρακτηρίζονται από υψηλές τιμές βακτηριακής ποικιλότητας. Υψηλές τιμές βακτηριακής ποικιλότητας έχουν προσδιοριστεί και σε άλλα βαθιά θαλάσσια οικοσυστήματα, όπως σε ιζήματα του Αρκτικού Ωκεανού (Ravenschlag et al., 1999) και Ανταρκτικής (Bowman and McGuaig, 2003) αντίστοιχα, όπου και διαπιστώθηκε η υψηλή βακτηριακή ποικιλότητα των κοινωνιών. Μάλιστα, οι Bowman και McGuaig (2003) αναφέρουν χαρακτηριστικά ότι η βιοποικιλότητα τόσο στην οξική όσο και στην ανοξική ζώνη των ιζημάτων που μελέτησαν, μπορεί να συγκριθεί με αυτή των χερσαίων οικοσυστημάτων. Οι τιμές της παρούσας εργασίας επιβεβαιώνουν προηγούμενες μετρήσεις για την ίδια περιοχή όπου η Polymenakou και συνεργάτες (2005) διαπίστωσαν ιδιαίτερα υψηλή βακτηριακή ποικιλότητα σε οξικά ιζήματα του Ιονίου Πελάγους βάθους 2750 μέτρων, με τιμή του παράγοντα Chao σχεδόν διπλάσια (1306 +/-187) από αυτήν της παρούσας εργασίας (761.35 +/-18.52). Η διαφορά αυτή οφείλεται στις διαφορετικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για την αποσαφήνιση της βακτηριακής βιοποικιλότητας, καθώς στην μελέτη της Polymenakou και συνεργατών (2005) χρησιμοποιήθηκε η τεχνική αποτύπωσης 'Ακραίος Πολυμορφισμός Περιορισμένων Τμηματικών Αποστάσεων' (T-RFLP). Το γεγονός της υψηλής βακτηριακής ποικιλότητας στα ιζήματα της Ανατολικής Μεσογείου ενισχύεται περαιτέρω με την εργασία του Luna και συνεργατών (2004), όπου επίσης, εφάρμοσαν την τεχνική T-RFLP για τον προσδιορισμό της βιοποικιλότητας σε θαλάσσια ιζήματα βάθους από 670 – 2570 μέτρων.

Λόγω της υψηλής βιοποικιλότητας και των πέντε μικροπεριβαλλόντων της παρούσας εργασίας, οι βιβλιοθήκες που κατασκευάστηκαν, όπως αναλύθηκαν με την τεχνική αραίωσης (Σχήμα 3), φαίνεται να μην συνιστούν μία ολοκληρωμένη εικόνα των επιμέρους βακτηριακών κοινωνιών, αλλά να αποτελούν ένα μικρό κομμάτι τους, καθώς σχεδόν κάθε κλώνος του

γονιδίου του 16S ριβοσωμικού RNA αντιπροσωπεύει και ένα είδος (Polymenakou et al., 2005). Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι η αλληλούχιση περισσότερων κλώνων από κάθε βιβλιοθήκη θα μπορούσε να εμπλουτίσει την αφθονία των φυλοτύπων (OTUs), όχι όμως και να αποκαλύψει φυλογενετικές ομάδες υψηλότερων ταξινομικών βαθμίδων (Ravenschlag et al., 1999), εφόσον το μεγαλύτερο ποσοστό των κλώνων του γονιδίου του 16S ριβοσωμικού γονιδίου RNA της παρούσας μελέτης, σε γενικές γραμμές, καλύπτει την παρουσία των διαφορετικών φύλων. Παρόλα ταύτα, οι φυλότυποι που είτε δεν έχουν εντοπιστεί είτε αντιπροσωπεύονται από έναν μόνο κλώνο, πιθανόν να διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στο ενδιαίτημά τους (Ravenschlag et al., 1999).

5.3 Βακτηριακή σύσταση και σύγκριση των βιβλιοθηκών κλώνων του γονιδίου του 16S ριβοσωμικού RNA

5.3.1 Βιβλιοθήκες *Alvin*

Οι αλληλουχίες του γονιδίου του 16S rRNA των βιβλιοθηκών *Alvin* ταξινομήθηκαν συνολικά σε 12 γνωστές φυλογενετικές ομάδες, οι οποίες σε σειρά μειούμενου μεγέθους έχουν ως εξής: Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Planctomycetes, Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Nitrospirae, Betaproteobacteria, Chloroflexi και OP11. Η δομή των βιοκοινωνιών *Alvin* φαίνεται να έχει σημαντικές ομοιότητες με αυτές των βιοκοινωνιών άλλων περιοχών του Ειρηνικού Ωκεανού. Συγκεκριμένα, ο Li και συνεργάτες (1999) σε αντίστοιχη μελέτη που πραγματοποίησαν σε ιζήματα του Ειρηνικού Ωκεανού κοντά στην Ιαπωνία βάθους 2339, 3671 και 4031 μέτρων, εντόπισαν τις ταξινομικές ομάδες Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria, Bacteroidetes και Actinobacteria. Η διαφορά στο πλήθος των ταξινομικών ομάδων μεταξύ των δύο μελετών πιθανόν να οφείλεται στη διαφορά μεγέθους των βιβλιοθηκών κλώνων που κατασκευάστηκαν, καθώς στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 220 αλληλουχίες 16S ριβοσωμικού DNA, σε αντίθεση με τον Li και συνεργάτες (1999) που χρησιμοποίησαν μόνο 55 συνολικά κλώνους. Επιπλέον, στην βιβλιοθήκη κοσμίδιου 37 κλώνων που κατασκευάστηκε από ιζημα βάθους 5274 μέτρων από την περιοχή Pacific Nodule Province επικρατεί η ταξινομική ομάδα των Gammaproteobacteria, ενώ επιπλέον εντοπίστηκαν οι ομάδες των Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Actinobacteria, και Firmicutes (Xu et al., 2007). Επιπλέον, σύμφωνα με τον Li και συνεργάτες (1999b), η παρουσία των Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria και Bacteroidetes φαίνεται να είναι συνήθης στα βαθιά θαλάσσια περιβάλλοντα. Μάλιστα τα Gammaproteobacteria, σε διάφορες μελέτες με αντικείμενο τα βαθιά θαλάσσια ιζήματα, συνιστούν την επικρατέστερη φυλογενετική ομάδα (Li et al., 1999, Kato et al., 1997, Bowman and McGuaig, 2003 και Polymenakou et al., 2005). Επιπλέον, ο Li και συνεργάτες (1999) διαπίστωσαν ότι το γένος *Pseudomonas* των Gammaproteobacteria

κυριαρχούν στα ιζήματα όλων των βαθμών, σε αντίθεση με την παρούσα εργασία όπου δεν εντοπίστηκε κανένας κλώνος συγγενικός με το γένος αυτό.

Τα Alphaproteobacteria είναι ευρέως διαδεδομένα στα βαθιά θαλάσσια περιβάλλοντα, αν και τόσο η φυσιολογία τους όσο και ο ρόλος τους στους βιογεωχημικούς κύκλους των θρεπτικών συστατικών δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα (Xu et al., 2007). Ένας κλώνος Alvin εμφανίζει ομοιότητα 97% με μία φυτοπλαγκτονική αλληλουχία της φυλογενετικής ομάδας Alphaproteobacteria, η οποία εντοπίστηκε στην κολώνα του νερού στην Ανατολική Τροπική Ζώνη του Βόρειου Ειρηνικού Ωκεανού (Eastern Tropical North Pacific Ocean; Ma et al., 2007). Η παρουσία τέτοιων φυτοπλαγκτονικών αλληλουχιών συνδέεται συνήθως με την καθίζηση του οργανικού υλικού από την στήλη του νερού (Ravenschlag et al., 1999). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι περισσότεροι κλώνοι που ταξινομήθηκαν ως Planctomycetales, φαίνεται να συνδέονται στενά με τα γένη *Isosphaera*, *Planctomyces* και *Pirellula*. Πρόκειται για τα τρία από τα τέσσερα γένη των Planctomycetales που αντιπροσωπεύονται από καλλιεργημένα βακτηριακά στελέχη και είναι αερόβια χημειοαυτότροφα βακτήρια (Yang et al., 2006). Ακόμη, αξίζει να σημειωθεί ότι αρκετοί κλώνοι σχετίζονταν με αλληλουχίες που έχουν απομονωθεί από την ευρύτερη περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου και συγκεκριμένα: α) δύο κλώνοι βρέθηκαν να έχουν ομοιότητα 95% και 90% με κλώνους του φύλου Planctomycetes που εντοπίστηκαν στον Θερμαϊκό Κόλπο και Νότιο Ιόνιο αντίστοιχα, β) στο δέντρο των Gammaproteobacteria, έξι αλληλουχίες ομαδοποιούνται με τρεις κλώνους από το Κρητικό Πέλαγος, γ) στο δέντρο των Acidobacteria δύο κλώνοι ομαδοποιούνται με δύο κλώνους ιζημάτων του Κρητικού Πελάγους (Polymenakou et al., 2005).

Τα Deltaproteobacteria ήταν μεταξύ των πολυπληθέστερων ταξινομικών ομάδων που προσδιορίστηκαν στα ιζήματα του Ειρηνικού Ωκεανού. Δύο κλώνοι των βιβλιοθηκών Alvin25 και Alvin29 συνδέονται στενά με το είδος *Nitrospina gracilis*, ένα αερόβιο, νιτροποιητικό χημειολιθότροφο βακτήριο (Fry, 2000), το οποίο παρόλο που βρίσκεται στο δέντρο των Deltaproteobacteria, τελικά φαίνεται να αποτελεί μέλος μίας ξεχωριστής ταξινομικής ομάδας γνωστής ως Nitrospina. Το φύλο αυτό έχει αντιπροσώπους που δραστηριοποιούνται σε μεγάλη ποικιλία θαλάσσιων, γλυκού νερού και χερσαίων ενδιαιτημάτων και μάλιστα θεωρείται ότι είναι τόσο ποικίλο όσο και τα Proteobacteria (Fry, 2000). Από την άλλη, η απουσία των Epsilonproteobacteria, αν και έχουν συνδεθεί με τα Deltaproteobacteria λόγω του κοινού ρόλου τους στην ρύθμιση του κύκλου του θείου, πιθανόν να συνδέεται με το γεγονός ότι η δραστηριοποίησή τους περιορίζεται είτε σε ρηγά παράκτια θαλάσσια ύδατα είτε σε βαθιές υδροθερμικές πηγές (Longnecker and Reysenbach, 2001).

Ένας κλώνος της βιβλιοθήκης Alvin29 συνδέεται στενά με κλώνους του υποψήφιου φύλου OP11, το οποίο χαρακτηρίζεται από μεγάλη φυλογενετική ποικιλότητα (Fry, 2000). Αντιπρόσωποι του OP11 εντοπίστηκαν για πρώτη φορά σε μία θερμοπηγή στο Εθνικό πάρκο Yellowstone των Η.Π.Α. (Hugenholtz et al., 1998), ενώ κανένα στέλεχος του δεν έχει καλλιεργηθεί ακόμα (Fry, 2000). Ακόμη, ένα σημαντικό κλάσμα του πληθυσμού των

βακτηριδίων των βιβλιοθηκών Alvin αποτελούν τα Verrucomicrobia. Πρόκειται για μικροοργανισμούς, η παρουσία των οποίων είναι πολύ σημαντική σε διάφορους τύπους εδαφών. Όμως, έχουν βρεθεί σε υδάτινα συστήματα, όπως πόσιμο νερό, μεσοκόσμους λιμνών, λίμνες, θαλάσσια ιζήματα, θερμοπηγές αλλά και σε περιβάλλοντα με ιδιαίτερα έντονη την ανθρώπινη παρέμβαση, όπως σε μεταλλορυχεία (Wagner and Horn, 2006). Στο φυλογενετικό δέντρο, πέντε κλώνοι Alvin φαίνεται να συνδέονται με το βακτηριακό είδος *Verrucomicrobia spinosum*, το οποίο διαθέτει ένα γονίδιο ελέγχου του τύπου III συστήματος εκκρίσεων χωρίς μαστίγιο, ένα εργαλείο πρωτεϊνικών εκκρίσεων που μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση μεταξύ βακτηρίων και ευκαρυωτικών κυττάρων (Wagner and Horn, 2007). Τέλος, ένας κλώνος Alvin εμφάνισε ομοιότητα 96% με αλληλουχία 16S rRNA γονιδίου που έχει ανιχνευτεί σε έδαφος δασικού οικοσυστήματος (Roesch et al., unpublished όπως αναφέρεται στην βάση δεδομένων BLAST), ενώ τρεις επιπλέον κλώνοι ομαδοποιήθηκαν με χερσαίες βακτηριακές αλληλουχίες.

5.3.2 Βιβλιοθήκη KM3

Παρά το γεγονός ότι κατασκευάστηκε μία μόνο βιβλιοθήκη κλώνων του γονιδίου του 16S ριβοσωμικού RNA για την μελέτη της βακτηριακής βιοποικιλότητας των ιζημάτων βάθους 4000 μέτρων στο Ιόνιο Πέλαγος (Ανατολική Μεσόγειο) εξαιτίας τεχνικών δυσκολιών, με την χρήση του λογισμικού BLAST διαπιστώθηκε ένας σημαντικός συσχετισμός των κλώνων KM3 με αλληλουχίες 16S rRNA που εντοπίστηκαν στην Ανατολική Μεσόγειο σε προηγούμενες μελέτες (βλ. Polymenakou et al., 2005 και Heijs et al., 2007).

Σύμφωνα με την παρούσα φυλογενετική ανάλυση των κλώνων του γονιδίου του 16S rRNA της βιβλιοθήκης KM3 της Ανατολικής Μεσογείου, στο υπό μελέτη μικροπεριβάλλον φαίνεται να επικρατούν τα Acidobacteria και ακολούθως τα Actinobacteria και τα Gammaproteobacteria. Επιπλέον, ένας σημαντικός αριθμός κλώνων ταξινομήθηκε με τις φυλογενετικές ομάδες Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chloroflexi, Nitrospirae και Bacteroidetes. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενη μελέτη των Polymenakou και συνεργατών (2005) που πραγματοποιήθηκε σε ιζήματα μεγάλου βάθους του Ιονίου Πελάγους με τις διαφορές που εντοπίζονται, να είναι ελάχιστες και να αφορούν κυρίως στα ποσοστά των κλώνων των επιμέρους φυλοτύπων και ελάχιστα στην σύνθεση της βακτηριακής βιοκοινωνίας. Αξίζει να σημειωθεί ότι 27 κλώνοι της βιβλιοθήκης KM3 εμφάνισαν ομοιότητα μεγαλύτερη από 90% με κλώνους του γονιδίου του 16S rRNA, που εντοπίστηκαν σε διάφορες περιοχές της Ανατολικής Μεσογείου, με 17 από αυτούς να έχουν ομοιότητα 98-99% (Polymenakou et al., 2005).

Στην βιβλιοθήκη KM3, τα Acidobacteria συνιστούν την επικρατούσα φυλογενετική ομάδα, επιβεβαιώνοντας προηγούμενες εργασίες που έχουν πραγματοποιηθεί σε άλλες περιοχές της Ανατολικής Μεσογείου. Συγκεκριμένα, το συγκεκριμένο φύλο έχει βρεθεί να επικρατεί σε ιζήματα του Νοτίου Ιονίου Πελάγους (Polymenakou et al., 2005), καθώς και σε

ιζήματα μεγάλου βάθους στο υποθαλάσσιο φαράγγι της Σαμαριάς και του Παξιμαδά νότια της Κρήτης (Polymenakou et al., 2009). Τα Acidobacteria γενικά διαθέτουν αντιπροσώπους που κυριαρχούν σε διάφορους τύπους εδαφών, θερμοπηγών και ιζημάτων (Fry, 2000). Η βιοποικιλότητα του φύλου αυτού έχει αυξηθεί με τον εντοπισμό νέων φυλοτύπων του φύλου Acidobacteria που δραστηριοποιούνται σε ιζήματα μολυσμένα από το ραδιενεργό ουράνιο (Barns et al, 2007). Ο Selenska-Pobell και συνεργάτες (2002) επίσης εντόπισαν αλληλουχίες 16S rDNA του φύλου Acidobacteria σε υλικά μολυσμένα με ουράνιο στην Γερμανία και στο Κολοράντο με το ποσοστό αφθονίας τους να είναι 26% και 9% των συνολικών βακτηριακών κλώνων του 16S rRNA γονιδίου αντίστοιχα. Τέλος, ένας από τους καλλιεργημένους αντιπροσώπους του φύλου αυτού, το είδος *Acidobacterium capsulatum* - αερόβιο, μεσοφιλικό, χημειο-οργανότροφο βακτήριο, το οποίο μπορεί να αξιοποιήσει ποικιλία πηγών άνθρακα (Fry, 2000) - βρέθηκε να συνδέεται στενά με ένα κλώνο της βιβλιοθήκης KM3.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα Actinobacteria είναι εξίσου άφθονα με τα Gammaproteobacteria, σε αντίθεση με την Polymenakou και συνεργατών (2005), οι οποίοι εντόπισαν ένα πολύ μικρό ποσοστό των πρώτων για την ίδια περιοχή. Γενικά, έχουν γίνει πολλές αναφορές σχετικά με το ότι τα Actinobacteria αποτελούν ένα μεγάλο ή ακόμη και επικρατές κλάσμα των βακτηριακών πληθυσμών μεγάλου βάθους (Bull et al., 2005). Μέχρι πρόσφατα επικρατούσε η άποψη ότι τα Actinobacteria είναι χερσαία και μεταφέρονται στην θάλασσα, όπου και επιβιώνουν στα ιζήματα με την μορφή σπορίων ή σωματιδίων λανθάνουσας κατάστασης (Bull et al., 2005). Από ότι φαίνεται, υπάρχουν στελέχη τους που δραστηριοποιούνται στα ιζήματα, γεγονός βέβαια που απαιτεί περαιτέρω έρευνα (Bull et al., 2005). Ένας κλώνος από την βιβλιοθήκη KM3 του φύλου Actinobacteria βρέθηκε να έχει ομοιότητα 99% με κλώνο του ίδιου φύλου που εντοπίστηκε στα έξι πρώτα εκατοστά ιζήματος από το ενεργό ηφαίστειο ιλύος Kazan της Ανατολικής Μεσογείου που βρίσκεται σε βάθος 1673 μέτρων από την επιφάνεια της θάλασσας (Heijs et al., 2007).

Γενικά, οι κλώνοι KM3 βρέθηκαν να συνδέονται στενά με έξι καλλιεργημένα στελέχη των φύλων Acidobacteria, Actinobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Nitrospirae και Cytophaga σε αντίθεση με την Polymenakou και συνεργάτες (2005), οι οποίοι δεν εντόπισαν κανένα κλώνο που να έχει σημαντική ομοιότητα με κάποιο γνωστό καλλιεργημένο στέλεχος. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ένας κλώνος KM3 φαίνεται να συνδέεται στενά με το στέλεχος *Coxiella burnetii* του φύλου Gammaproteobacteria, του οποίου μία ομάδα κλώνων *Coxiella* εντοπίστηκαν σε οξικά και ανοξικά ιζήματα της Ανταρκτικής υφαλοκρηπίδας σε βάθος 761 μέτρων (Bowman and McCuaig, 2003). Παρόλα αυτά, το ποσοστό των άγνωστων αλληλουχιών αγγίζει το 24.05%, το οποίο είναι υψηλότερο ακόμη και από την αφθονία του επικρατούς φύλου Acidobacteria. Μία από τις 'άγνωστες' αλληλουχίες KM3 παρουσιάζει ομοιότητα 92% με μία επίσης 'άγνωστη' αλληλουχία 16S rDNA, η οποία εντοπίστηκε σε ανοξικό έδαφος (Derakshani et al., 2001). Η άγνωστη αυτή αλληλουχία αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς δεν παρουσιάζει ομοιότητα

με κάποια γνωστή φυλογενετική ομάδα, ενώ σε δέντρα που κατασκευάστηκαν με διαφορετικούς φυλογενετικούς αλγορίθμους φαινόταν να ομαδοποιείται με αλληλουχίες του υποψήφιου φύλου OP3 (Derakshani et al., 2001), που εντοπίστηκαν για πρώτη φορά σε μία θερμότητα στο Εθνικό πάρκο Yellowstone των Η.Π.Α. (Hugenholtz et al., 1998).

Η απουσία του φύλου Firmicutes γεννά πολλά ερωτηματικά, καθώς κλώνοι 16S rDNA του φύλου αυτού έχουν ευρέως εντοπιστεί σε προηγούμενες μελέτες στην Ανατολική Μεσόγειο (Polymenakou et al., 2005 και Polymenakou et al., 2009). Οι Firmicutes είναι ένα φύλο με πολλά καλλιεργημένα στελέχη και μεγάλη μεταβολική ποικιλότητα, τα οποία κατηγοριοποιούνται σε βακτήρια που σχηματίζουν ενδοσπόρια, βακτήρια λακτικού οξέος και σε Gram-θετικούς βακτηριοκόκκους (Ahmad et al., 2000). Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι η Polymenakou και συνεργάτες (2008) εντόπισαν ένα σημαντικό αριθμό βακτηρίων που ανήκουν στο συγκεκριμένο φύλο σε δείγματα ατμόσφαιρας από την περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου που συλλέχθηκαν κατά την περίοδο έντονης μεταφοράς σκόνης από την Σαχάρα. Η μελέτη αυτή ήταν ιδιαίτερα σημαντική λόγω σύνδεσής της με τις κλιματικές αλλαγές, καθώς σύμφωνα με τους Prospero and Lamb (2003) η ποσότητα της μεταφερόμενης σκόνης από τη Βόρεια Αφρική έχει αυξηθεί ιδιαίτερα τις τελευταίες δεκαετίες, εξαιτίας της επικρατούσας ξηρασίας. Για τον λόγο αυτό η μεταφορά μελών του φύλου Firmicutes στην περιοχή του Νοτίου Ιονίου μέσω ξηρής και υγρής εναπόθεσης είναι αναμενόμενη και η παρουσία τους στην βιβλιοθήκη KM3 θα ήταν δικαιολογημένη.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι εκτός από αντιπροσώπους γνωστών φύλων, η βιβλιοθήκη KM3 περιλαμβάνει συν τοις άλλοις βακτηριακούς κλώνους, οι οποίοι φαίνεται να δραστηριοποιούνται σε χερσαία οικοσυστήματα. Συγκεκριμένα, στην βιβλιοθήκη του Νοτίου Ιονίου εντοπίστηκαν δύο κλώνοι ομαδοποιημένοι με μη καλλιεργημένα χερσαία βακτήρια, ενώ τρεις κλώνοι KM3 βρέθηκαν να διαθέτουν ομοιότητα ίση και μεγαλύτερη από 92% με βακτήρια του εδάφους. Μάλιστα, η μία από αυτές εμφανίζει 100% ομοιότητα με μη καλλιεργημένο χερσαίο βακτήριο που ανιχνεύτηκε σε ίζημα εδάφους από οικοσύστημα δασικού τύπου *Pinyon - Juniper* στην περιοχή της Αριζόνα (Dunbar et al., 2002).

5.4 Σύγκριση των βενθικών μικροκοινωνιών του Ειρηνικού Ωκεανού και της Ανατολικής Μεσογείου.

Οι βιβλιοθήκες 16S ριβοσωμικού DNA που κατασκευάστηκαν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, είναι ενδεικτικές της υψηλής βακτηριακής βιοποικιλότητας των μικροκοινωνιών που δραστηριοποιούνται σε ιζήματα μεγάλου βάθους. Το γεγονός ότι εντοπίστηκαν κλώνοι συγγενικοί με βακτηριακές αλληλουχίες που εντοπίζονται σε διαφορετικού τύπου ενδιαίτηματα, όπως χερσαία, ανοξικά, ηφαίστεια ιλύος, πιθανόν να οφείλεται σε παράγοντες, όπως ρεύματα και άνεμοι, καθώς παραμένει άγνωστο το γεγονός αν αυτά μπορούν να επιβιώσουν σε συνθήκες υψηλής πίεσης και περιορισμένης βιοδιαθεσιμότητας θρεπτικών (Li et al., 1999).

Η σύνθεση των βακτηριακών βιοκοινωνιών Alvin και KM3 δεν εμφανίζει σημαντικές διαφορές παρά το ότι δεν πραγματοποιείται καμία ανταλλαγή υδάτινων μαζών μεταξύ των δύο υπό μελέτη θαλάσσιων οικοσυστημάτων και διαφέρουν ως προς την τροφική κατάσταση και τη θερμοκρασία τους. Οι μοναδικές διαφοροποιήσεις που εντοπίστηκαν, είναι η απουσία αντιπροσώπων κάποιων μικρών φύλων από το ένα από τα δύο θαλάσσια οικοσυστήματα και η διαφορά στα ποσοστά των κλώνων που ταξινομήθηκαν στις επιμέρους φυλογενετικές ομάδες. Μάλιστα, στα φυλογενετικά δέντρα που κατασκευάστηκαν, παρατηρείται ότι πολλοί κλώνοι των KM3 και Alvin εμφανίζονται να συνδέονται στενά μεταξύ τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το φύλο Betaproteobacteria. Ως τέτοια έχουν ταξινομηθεί τρεις αλληλουχίες 16S rRNA γονιδίου με την ομοιότητα της αλληλουχίας από την βιβλιοθήκη κλώνων KM3 με τις δύο αλληλουχίες από τις βιβλιοθήκες κλώνων Alvin να αγγίζει το 76%. Ομοίως, στην περίπτωση του φύλου Planctomycetes, βρέθηκαν τέσσερις κλώνοι από τις βιβλιοθήκες κλώνων Alvin με υψηλή ομοιότητα με δύο κλώνους που είχαν εντοπιστεί στην Ανατολική Μεσόγειο.

Έτσι, φαίνεται ότι τόσο η υψηλή πίεση που επικρατεί στο βάθος των 4000 μέτρων, όσο και η ποιότητα της τροφικής ύλης, καθορίζουν τη δομή των βακτηριακών βιοκοινωνιών. Πράγματι, η πίεση θεωρείται ότι έχει σημαντική επίδραση στην στρωματοποίηση μεγάλου βάθους, εφόσον έχουν απομονωθεί βαροφιλικά βακτήρια και έχουν εντοπιστεί συγκεκριμένες προσαρμογές, όπως τα οπερόνια βακτηρίων μεγάλου βάθους ρυθμιζόμενα από την πίεση (Martin-Cuadrado et al., 2007). Όμως, σύμφωνα με τον Luna και συνεργάτες (2004), ο τύπος των ιζημάτων, και όχι η πίεση, φαίνεται να διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην δομή της βακτηριακής βιοκοινωνίας, καθώς παρατήρησαν ότι η κατανομή της βακτηριακής ποικιλότητας είναι ανεξάρτητη από το βάθος.

Στα μεγάλα θαλάσσια βάθη όπου οι φωτοσυνθετικοί ρυθμοί είναι μηδενικοί, η διαθεσιμότητα του οργανικού υλικού είναι αυτή που καθορίζει την βενθική παραγωγικότητα και βιομάζα (Jorgensen and Boetius, 2007). Η Polymenakou και συνεργάτες (2005c) διαπίστωσαν ότι η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα και σε χλωροφύλλη α ήταν οι παράγοντες που συνδέονται με την δομή βακτηριακών κοινωνιών σε ιζήματα ποικίλου βάθους (30 – 2860 μέτρα) από την Ανατολική Μεσόγειο. Αντίθετα, από την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης προέκυψε ότι μονάχα η συγκέντρωση του οργανικού άνθρακα συσχετίζεται με τη δομή των μικροκοινωνιών και στα δύο θαλάσσια οικοσυστήματα. Παρόλα αυτά, μία πιθανή ερμηνεία της ομοιότητας που παρατηρήθηκε μεταξύ των μικροβιακών κοινωνιών των δύο διαφορετικών οικοσυστημάτων μπορεί να βασιστεί στην διαθεσιμότητα της τροφής. Τόσο στην περίπτωση του Ειρηνικού Ωκεανού όσο και στην περίπτωση της Ανατολικής Μεσογείου, το οργανικό υλικό βρέθηκε να είναι υψηλής ποιότητας καθώς ο λόγος οργανικού άνθρακα και αζώτου βρέθηκε να είναι ιδιαίτερα χαμηλός. Αυτό υποδεικνύει ότι τα βακτήρια στα συγκεκριμένα οικοσυστήματα διαθέτουν ένα μεγάλο εύρος διαφορετικών οργανικών ουσιών που φαίνεται να καθορίζει την υψηλή ποικιλότητά τους.

5.5 Μελλοντικοί στόχοι

Η παρούσα μελέτη αποκάλυψε ένα πολύ μικρό κομμάτι της γνώσης που μπορεί να αντληθεί από τα συγκεκριμένα μικροπεριβάλλοντα. Το μεγάλο ποσοστό των αλληλουχιών 16S rDNA που δεν ταξινομήθηκε σε καμία γνωστή ταξινομική ομάδα σε συνδυασμό με την υψηλή βιοποικιλότητα όλων των βιβλιοθηκών, είναι ενδεικτικά μικροπεριβαλλόντων υψίστης σημασίας καθιστώντας αναγκαία την περαιτέρω διερεύνησή τους. Ερωτήματα, τα οποία έχουν ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον να απαντηθούν μελλοντικά, είναι:

- ✓ Ποιος είναι ο καθοριστικός παράγοντας της σύνθεσης των μικροβιακών κοινωνιών, πχ τύπος ιζήματος, πίεση, διαθεσιμότητα τροφής;
- ✓ Ποιο είναι το ενεργό πληθυσμιακό κλάσμα των βακτηρίων που εντοπίζονται σε βάθος 4000 μέτρων; Με το ερώτημα αυτό πρόκειται να αποσαφηνισθεί η επιρροή των φυσικών παραγόντων, όπως άνεμοι, θαλάσσια ρεύματα, στην ποικιλότητα και δομή των βενθικών κοινωνιών.
- ✓ Ποιο είναι, εφόσον υπάρχει, το ποσοστό λάθους όσον αφορά στην κατανομή των φυλοτύπων σε σχέση με την κατανομή τους στο περιβάλλον σαν αποτέλεσμα των μεθοδολογικών περιορισμών της PCR; Μήπως η απουσία των φύλων Epsilonbacteria και Firmicutes οφείλεται σε αυτό;
- ✓ Γενικά, υπάρχει η εμπειρική και θεωρητική αντίληψη ότι στα ακραία περιβάλλοντα τα αρχαία είναι αυτά που έχουν πετυχημένες προσαρμογές, σε αντίθεση με τα βακτήρια που φαίνεται να προσαρμόζονται αποτελεσματικά σε δυναμικά περιβάλλοντα (Lipp et al., 2008). Θα είχε πολύ μεγάλο ενδιαφέρον να διερευνηθεί η βιοποικιλότητα των αρχαίων στα μικροπεριβάλλοντα αυτά προκειμένου να διαπιστωθεί εάν στην παρούσα περίπτωση η παραπάνω θεωρία επιβεβαιώνεται ή όχι.

6. Παράρτημα

Πίνακας 2. Χημικά χαρακτηριστικά των μικροπεριβαλλόντων Alvin και KM3 του Ειρηνικού Ωκεανού και της Ανατολικής Μεσογείου αντίστοιχα.

| | Βάθος | Chl a ($\mu\text{g/g}$) | % Corg | C/N |
|---------|--------|------------------------------|--------|-------|
| KM3 | 4015 m | 0,12 | 0,82 | 10,45 |
| Alvin24 | 4100 m | 0,94 | 1,53 | 9,11 |
| Alvin25 | 4100 m | 0,97 | 1,69 | 6,6 |
| Alvin28 | 4100 m | 0,9 | 1,66 | 6,1 |
| Alvin29 | 4100 m | 0,83 | 1,53 | 6,87 |

Πίνακας 3. Βακτηριακή βιοποικιλότητα των μικροπεριβαλλόντων Alvin και KM3.

| | Πλήθος κλώνων 16S rRNA | Πλήθος Ειδών | Παράγοντας Chao | Coverage |
|---------|------------------------------|-----------------|--------------------|----------|
| KM3 | 105 | 82 | 188,78 | 43,44 |
| Alvin24 | 73 | 55 | 209,08 | 26,30 |
| Alvin25 | 65 | 43 | 78,64 | 54,68 |
| Alvin28 | 87 | 64 | 142,89 | 44,79 |
| Alvin29 | 81 | 60 | 137,88 | 43,51 |

Πίνακας 4. Ταξινομικές ομάδες και κατανομή των κλώνων του γονιδίου 16s rRNA των βιβλιοθηκών του Ειρηνικού Ωκεανού και της Ανατολικής Μεσογείου.

| Ταξινομική Ομάδα | % ποσοστό κλώνων 16S rDNA επιμέρους ταξινομικών ομάδων | | | | | |
|------------------------|--|---------|---------|---------|-------------------|-------|
| | Alvin24 | Alvin25 | Alvin28 | Alvin29 | Alvin (Σύνολο) | KM3 |
| Acidobacteria | 7,14 | 4,76 | 8,06 | 6,67 | 6,66 | 17,72 |
| Actinobacteria | 14,29 | 14,29 | 9,68 | 10,00 | 12,07 | 13,92 |
| Planctomycetes | 10,71 | 16,67 | 16,13 | 10,00 | 13,38 | 8,86 |
| Delta Proteobacteria | 10,71 | 14,29 | 16,13 | 13,33 | 13,62 | 7,59 |
| Alpha Proteobacteria | 8,93 | 4,76 | 6,45 | 6,67 | 6,7 | 7,59 |
| Beta Proteobacteria | 1,79 | - | 1,61 | - | 0,85 | 1,27 |
| Gamma Proteobacteria | 23,21 | 19,05 | 20,98 | 30,00 | 23,31 | 13,92 |
| Nitrospirae | 1,79 | - | - | 1,67 | 0,87 | 1,27 |
| Chloroflexi | - | 2,38 | - | - | 0,6 | 1,27 |
| Verrucomicrobia | 5,36 | 4,76 | 3,23 | 3,33 | 4,17 | 1,27 |
| Bacteroidetes | 5,36 | 2,38 | 6,45 | 5,00 | 4,8 | 1,27 |
| Cluster1 | 1,79 | 2,38 | - | 1,67 | 4,59 | - |
| Cluster2 | - | - | 1,61 | 1,67 | 0,65 | - |
| ‘άγνωστες’ αλληλουχίες | 8,93 | 14,29 | 9,68 | 8,33 | 10,31 | 24,05 |
| OP11 | - | - | - | 1,67 | 0,42 | - |

7. Βιβλιογραφία

- ✻ Ahmad, S., Selvapandiyar, A., Bhatnagar, R., K. (2000). 'Phylogenetic analysis of Gram-positive bacteria based on *grpE*, encoded by the *dnaK* operon'. *Int. J. of Syst. Evol. Microbiol.*, **50**: 1761-1766.
- ✻ Amann, R. I., Stromley, J., Devereux, R., Key, R., Stahl, D. A. (1992). 'Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms'. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 614-623.
- ✻ Amann, R., I., Ludwig, W., Schleifer, K., H. (1995). 'Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation'. *Microbiol. Rev.*, **59(1)**: 143-169.
- ✻ Ashkin, A., Dziedzic, J. M., Yamane, T. (1987). 'Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams'. *Nature (London)* 330: 769-771.
- ✻ Baker, B., Banfield, J. (2003). 'Microbial communities in acid mine drainage'. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **44**: 139-152.
- ✻ Bar Zeev, E., Yogev, T., Man-Aharonovich, D., Kress, N., Herut, B., Beja, O., Berman-Frank, Ilana (2008). 'Seasonal dynamics of the endosymbiotic, nitrogen-fixing cyanobacterium *Richella intracellularis* in the eastern Mediterranean Sea'. *ISME Journal*.
- ✻ Barkley, Richard A. (1968). *Oceanographic Atlas of the Pacific Ocean*. Honolulu: University of Hawaii Press.
- ✻ Barnett, P.R.P., Watson, J., Connelly, D. (1984). 'A multiple corer for taking virtually undisturbed sediment samples from shelf, bathyal and abyssal sediments'. *Oceanol. Acta*, **7**: 399-408.
- ✻ Barns, S., M., Cain, E., C., Sommerville, L., Kuske, C., R. (2007). '*Acidobacteria* phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum'. *Appl Environ Microbiol*, **73(9)**: 3113-3116.
- ✻ Boetius, A., Damm, E. (1998). 'Benthic oxygen uptake, hydrolytic potentials and microbial biomass at the Arctic continental slope'. *Deep-Sea Res. I*, **45**: 239-275.
- ✻ Boetius, A., Suess, E. (2004). 'Hydrate Ridge: a natural laboratory for the study of microbial life fueled by methane from near-surface gas hydrates'. *Chem. Geol.*, **205**: 291-310.
- ✻ Bordowskiy, O., K. (1965a). 'Sources of organic matter in marine basins. *Mar. Geol.*, **3**: 5-31
- ✻ Bowman, J.P., McGuaig, R.,D. (2003). 'Biodiversity, community structural shifts and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment'. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69(5)**: 2463-2483.
- ✻ Brock, T., D. (1978). 'Thermophilic microorganisms and life at high temperatures. *New York: Springer*.
- ✻ Brock, T., D., Freeze, H. (1969). '*Thermus aquaticus* Gen N and Sp N a nonsporulating extreme thermophile.' *F. Bacteriol.*, **98**: 289-297.
- ✻ Buchholz-Cleven, B.E.E., Rattunde, B., Straub, K.L. (1997). 'Screening for genetic diversity of isolates of anaerobic Fe(II) oxidizing bacteria using DGGE and whole cell hybridization'. *Syst. Appl. Microbiol.* **20**: 301-309.
- ✻ Bull, A., Stach, J., E., M., Ward, A., C., Goodfellow, M. (2005). 'Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions'. *Antonie van Leeuwenhoek*, **87**: 65-79.
- ✻ Calvert, S.E., Nielsen, B., Fontugne, M.R. (1992). 'The role of mat-forming diatoms in the formation of Mediterranean sapropels'. *Nature* **359**: 223-225.
- ✻ Chao, A. (1984). 'Non-parametric estimation of the number of classes in a population'. *Scand. J Stat*, **11**: 265-270.
- ✻ Christner, B., Mosley-Thomson, E., Thomson, L., Reeve, J. (2001). 'Isolation of bacteria nad 16S rDNAs from Lake Vostok accretion ice'. *Environ. Microbiol.*, **3**: 570-577
- ✻ Cohan, F., M. (2006). 'Towards a conceptual and operational union of bacterial systematic, ecology, and evolution'. *Phil. Trans. R. Soc. B*.
- ✻ Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. (2008). 'The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis'. *Nucleic Acids Res.* Advance Access November 2008. Oxford University Press.
- ✻ Danovaro, R., Marral, D., Della Croce, N., Parodi, P., Fabiano, M. (1999). 'Biochemical composition of sedimentary organic matter and bacterial distribution in the Aegean Sea: trophic state and pelagic-benthic coupling'. *J Sea Res*, **42**: 117-129.

- Danovaro, R., Gambi, C., Dell'Anno, A., Corinaldesi, C., Frascchetti, S., Vanreusel, A., Vincx, M., Gooday, A.J. (2008). 'Exponential decline of deep-sea ecosystem functioning linked to benthic biodiversity loss'. *Curr. Biol.* 18: 1-8.
- Degens, E.T. (1969). 'Molecular nature of nitrogenous compounds in sea water and recent marine sediments'. In *Organic Matter in Natural Waters* (editor D.W. Hood), 77-106.
- Delong EF, Preston CM, Mincer T, Rich V, Hallam SJ, Frigaard NU, et al. (2006). 'Community genomics among stratified microbial assemblages in the Ocean's interior'. *Science* 311: 496-503
- Deming, J.,W., Yager, P., L. in *Deep-Sea Food Chains and the Global Carin Cycle* (eds Rowe, G.T. and Pariente, V.) 11-28 (Kluwer Academic, Dordrecht, 1992).
- Deming, J.W. , Baross, J.A. in *Organic Geochemistry* (eds Engel, M.H. & Macko, S.A.) 119-144 (Plenum, New York, 1993).
- De Corte, D., Yokokaa, T., Varela, M., M., Agogue, H., Herndi, G., J.(2008). 'Spatial distribution of bacteria and archaea and *amoA* gene copy numbers throughout the water column of the Eastern Mediterranean Sea'. *ISME J.*
- De Lange, G., J., Thomson, J., Reitz, A., Slomp, C., P., Principato, M., S., Erba, E., Corselli, C. (2008). 'Synchronous basin-wide formation and redox-controlled preservation of a Mediterranean sapropel'. *Nature Geosci.*, 1: 606-610.
- Derakshani, M., Lukow, T., Liesack, W. (2001). 'Novel bacterial lineages at the (sub)division level as detected by signature nucleotide-targeted recovery of 16s rRNA genes from bulk soil and rice roots of flooded rice microcosms'. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67(2)**: 623-631.
- D' Hont, S. et al. 'Distributions of microbial activities in deep seafloor sediments'. *Science*, **306**: 2216-2221
- Downing, A., L., Leibold, M., A. (2002). 'Ecosystem consequences or species richness and composition in pond food webs'. *Nature*, **25**: 837-841.
- Dunbar, J., Barns, S., M., Ticknor, L., O., Kuske, C., R. (2002). 'Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils'. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68(6)**: 3035-3045.
- Dupre, S., J. M. Woodside, J.-P. Foucher, G. de Lange, J. Mascle, A. Boetius, V. Mastalerz, A. Stadnitskaia, H. Ondreas, C. Huguen, F. Harmegnies, S. Gontharet, L. Loncke, E. Deville, H. Niemann, E. Omoregie, K. Olu-Le Roy, A. Fiala-Me'dioni, A. Dahlmann, J.-C. Caprais, A. Prinzhofer, M. Sibuet, C. Pierre, J. Sinninghe Damste, N. S. Party, (2007). 'Seafloor geological studies above active gas chimneys off Egypt (Central Nile Deep Sea Fan)'. *Deep-Sea Res.*, 54: 1146-1172.
- Fitch, W.M., Margoliash, E. (1967). 'Construction of phylogenetic trees'. *Science*, **20 (3760)**: 279-284
- Fox, G.E., Pechman, D.R., Woese, C.R. (1977). 'Comparative cataloging of the 16S ribosomal ribonucleic acid: a molecular approach to prokaryotic systematics'. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **27**: 44-57
- Fry, J. (2000). 'Bacterial diversity and "unculturables"'. *Microbiol. Today*, **27**: 186-188.
- Gallagher JM, Carton MW, Eardly DF, Patching JW. (2004). 'Spatiotemporal variability and diversity of water column prokaryotic communities in the eastern North Atlantic'. *FEMS Microbiol Ecol*, **47**: 249-62.
- Garcia-Martinez J, Acinas SG, Massana R, Rodriguez- Valera F. (2002). 'Prevalence and microdiversity of *Alteromonas macleodii*-like microorganisms in different oceanic regions'. *Environ Microbiol*, **4**: 42-50.
- Grahl, C., Boetius, A., Nothig, E.-M. (1995). 'Pelagic-benthic coupling in the Laptev Sea affected by ice cover. Land-Ocean Systems in the Siberian Arctic: Dynamics and History', 143-152.
- Green, C. T. and Scow, K. M. (2000). *Hydrogeol. J.* **8**: 126.
- Gustafsson, O, Haghseta, F., Chan, C., Macfarlane, J., Gschwend, P., M. (1997). 'Quantification of the dilute sedimentary soot-phase: implications for PAH speciation and bioavailability'. *Environ. Sci. Technol.*, **31** : 203-209.
- Hartman M., Muller P.J., Sues E., Van Der Weijden C. H. (1976). Chemistry of Late Quaternary sediments and their interstitial waters from the NW African continental margin. "*Meteor*" *Forsch.-Ergebn. C*, **24** : 1-67, Berlin, Stuttgart.
- Hedges, J., I., Stern, J., H. (1984). 'Carbon and nitrogen determinations of carbonate-containing solids. *Limnology and Oceanography*, **29**: 657-663.
- Heijs, S., K., Haese, R., R., Van Der Wielen, W.,J.,J., Forney, L., J., van Elsas, J., D. (2007). 'Use of 16s rRNA gene based clone libraries to assess microbial communities potentially involved in anaerobic methane oxidation in a Mediterranean Cold Seep'. *Microb. Ecol.*, **53** : 384-398.

- Horner-Devine, M.C., Leibold, M.A., Smith, V.H., Bohannon, B., J., M. (2003). 'Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity'. *Ecology Letters*, **6**: 613-622.
- Horner-Devine, M., C., Carney, K., M., Bohannon, B., J., M. (2003b). 'An ecological perspective on bacterial biodiversity'. *The Royal Society*, 113-122.
- Hu M., Wang, F., Meng, J., Xiao, X. (2007). 'Construction and preliminary analysis of a metagenomic library from a deep-sea seiment of east Pacific Nodule Province'. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **62** : 233-241.
- Hugenholtz, P., Goebel, B., M., Pace, N., R. (1998). 'Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity'. *J. Bacteriol.*, **180**: 4765-4774.
- Ignatiades, L. (1969). 'Annual cycles, species diversity and succession of phytoplankton in lower Saronikos Bay, Aegean Sea'. *Mar. Biol.*, **3**: 196-200.
- Inagaki, F., Sakihama, Y., Inoue, A., Kato, C., Horikoshi, K. (2002). 'Molecular phylogenetic analyses of reverse-transcribed bacterial rRNA obtained from deep-sea cold seep sediments'. *Env. Microb.*, **4(5)**: 277-286.
- Jannasch, H., W., Taylor, C., D. (1984). 'Deep sea microbiology'. *Ann. Rev. Microbiol.*, **38**: 487-514.
- Jones, M., L. (1985). 'Hydrothermal vents of the eastern Pacific: an overview'. *Bull. Biol. Soc. Wash.*, **6**: 545.
- Jorgensen, B. B., Boetius, A. (2007). 'Feast and famine – microbial life in the deep-sea bed'. *Nature*, **5**: 770 – 781.
- Kato, C., Li, L., Tamaoka, J., Horishoki, K. (1997). 'Molecular analyses of the sediment of the 11000-m deep Mariana Trench'. *Extremophiles*, **1**: 117-123.
- Kidd, R.B., Cita, M.B., Ryan, W.B.F. (1978). 'Stratigraphy of eastern Mediterranean sapropel sequences recovered during DSDP Leg 42A and their paleoenvironmental significance'. *Init Rep DSDP*, **42**: 421–443.
- Knoblauch, C., Sahm, K., Jorgensen, B., B. (1999). 'Psychrophilic sulfate-reducing bacteria isolated from permanently cold Arctic marine sediments: description of *Desulfofrigus oceanense* gen. nov., sp. Nov., *Desulfotalea psychrophila* gen. nov., sp. Nov., and *Desulfotalea artica* sp. Nov. *Int J Syst Bacteriol*, **49** : 1631-1643.
- Kowalewska, G. (2005). 'Algal pigments in sediments as a measure of eutrophication in the Baltic environment'. *Quaternary International*, **130**: 141–151.
- Kumar, Y., Westram, R., Kipfer, P., Meier, H., Ludwig, W. (2006). 'Evaluation of sequence alignments and oligonucleotide probes with respect to three-dimensional structure of ribosomal RNA using ARB software package'. *BMC Bioinformatics*, **7**: 240.
- Krom, M.D., Brenner, S., Kress, N., Gordon, L.I. (1991). 'Phosphorus limitation of primary productivity in the Eastern Mediterranean Sea'. *Limnol. Oceanogr.*, **36**: 424-432.
- Lambou, V., W., Hern, S., C., Taylor, W., D., Williams, L., R. (1982). Chlorophyll, phosphorus, secchi disk and trophic state. *Wat. Resour. Bull*, 807-813.
- Larsen, N., Olsen, G. J., Maidak, B. L., McCaughey, M. J., Overbeek, R., Macke, T. J., Marsh, T. L., Woese, C. R. (1993). 'The ribosomal database project'. *Nucleic Acids Res*, **21** : 3021–3023.
- Li, L., Kato, C., Horikoshi, K. (1999). 'Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths'. *Biod. Conserv.*, **8**: 659-677.
- Li, L., Kato, C., Horikoshi, K. (1999b). 'Microbial diversity in sediments collected from the deepest cold-seep area, the Japan Trench'. *Mar. Biotechnol.*, **1** : 391-400.
- Liesack, W., Weyland, H., Stackebrandt, E. (1991). 'Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed culture of strict barophilic bacteria'. *Microb. Ecol.*, **21**:191–198.
- Lipp, S., J., Morono, Y., Inagaki, F., Hinrichs, K. (2008). 'Significant contribution of Archaea to extant biomass in marine subsurface sediments'. *Nature*, **454**: 991-994.
- Liu, W.-T., Marsh, T. L., Cheng, H. & Forney, L. J. (1997). 'Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA'. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4516–4522.
- Lochte, K. in *Deep-Sea Food Chains and the Global Carbon Cycle* (eds Rowe, G.T. and Pariente, V.) 1-10 (Kluwer Academic, Dordrecht, 1992).
- Longnecker, K., Reysenbach, A. (2001). 'Expansion of the geographic distribution of a novel lineage of ϵ -Proteobacteria to a hydrothermal vent site on the Southern East Pacific Rise'. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **35** : 287-293.

- ✿ Lonsdale, P. (1977). 'Clustering of suspension-feeding macrobenthos near abyssal hydrothermal vents at oceanic spreading centers'. *Deep-Sea Res.*, **24**, : 857-863.
- ✿ Lopez-Garcia P, Lopez-Lopez A, Moreira D, Rodriguez- Valera F. (2001). 'Diversity of free-living prokaryotes from a deep-sea site at the Antarctic Polar Front'. *FEMS Microbiol Ecol*, **33** : 219–32.
- ✿ Lorenzen, C and Jeffrey, J. (1980). 'Determination of chlorophyll in sea water.' *UNESCO Tec Pap Mar Sci*, **35** : 1-20.
- ✿ Luna, G. M., Dell'Anno, A., Giuliano, L., Danovaro, R. (2004). 'Bacterial diversity in deep Mediterranean sediments: relationship with the active bacterial fraction and substrate availability'. *Environ. Microbiol.*, **6(7)**:745-753.
- ✿ Ludwig, W., Klenk, H., P. (2001). 'Overview: A phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics'. In: Boon DR, Castenholz RW, Garrity GM (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 49-66, Springer, New York.
- ✿ Ludwig, W., Strunk O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Buchner, Y. A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Forster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A., W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., Koniq, A., Liss, T., Lußmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbq, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., Schleifer, K. (2004). 'ARB: a software environment for sequence data'. *Nucleic Acids Res.*, **32(4)**: 1363-1371.
- ✿ Ma, Y., Zeng, Y., Jiao, N., Shi, Y., Hong, N. (in press). 'Vertical distribution and phylogenetic composition of bacteria in the Eastern Tropical North Pacific Ocean'. *Microb. Res.*
- ✿ Malanotte-Rizzoli, P., Hecht, A. (1988). 'Large-scale properties of the Eastern Mediterranean: a review'. *Oceanol. Acta*, **11**:323-335.
- ✿ Martin-Cuadrado, A., Lopez-Garcia, P., Alba, J., Moreira, D., Monticelli, L., Strittmatter, A., Gottschalk, G., Rodriguez-Valera, F. (2007). 'Metagenomic of the deep Mediterranean, a warm bathypelagic habitat'. *PlosOne*, **(9)** (www.plosone.org)
- ✿ McInerney, J., O., Mullarkey, M., Wernecke, M., E., Powell, R. (2002). 'Bacteria and Archaea: Molecular techniques reveal astonishing diversity'. *Biodiversity*, **3(2)**: 3-10.
- ✿ Moeseneder, M.M., Arrieta, J.M., Muyzer, G., Winter, C., Herndl, G.J. (1999). 'Optimization of terminal restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis'. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3518-3525.
- ✿ Morata N., Renaud, P.E. (2008). 'Sedimentary pigments in the western Barents Sea: A reflection og pelagic-benthic coupling?'. *Deep-Sea Res. II*. In press
- ✿ Morasch, B., Richnow, H., H., Schink, B., Meckenstock, R., U. (2001). 'Stable hydrogen and carbon isotope fractionation during microbial toluene degradation: mechanistic and environmental aspects'. *Appl Environ Microbiol*, **67**: 4842-4849.
- ✿ Muller P.J. (1977). 'C/N ratios in Pacific deep-sea sediments: Effect of inorganic ammonium and organic nitrogen compounds sorbed by clays'. *Geochim Cosmochim. Acta* **41** : 765-776. Pergamon Press.
- ✿ Muyzer, G., de Waal, E. C., Uitterlinden, A. G. (1993). 'Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA'. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 695–700.
- ✿ Muyzer, G. (1998). 'Structure, function and dynamics of microbial communities: the molecular biological approach'. In 'Advances in molecular ecology' (eds G.R. Carvalho).
- ✿ Nelson, D., C., Wirsén, C.O., Jannasch, H.W. (1989). 'Characterization of large autotrophic Beggiatoa abundant at hydrothermal vents of the Guaymas Basin'. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 2909-2917.
- ✿ Niemann, H. *et al.* (2006). 'Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink'. *Nature*, **443**: 854-858.
- ✿ Nubel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Wolfgang, L., Backhaus, H. (1996). 'Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis'. *J. Bacteriol.* **178**: 5636-5643.
- ✿ Omoregie, E.O., Mastalerz, V., de Lange, G., Straub, K.L., Kappler, A., Roy, H., Stadnitskaia, A., Foucher, J., Boetius, A. (2008). 'Biogeochemistry and community composition of iron- and sulfur- precipitating microbial mats at the Chefrén Mud Volcano (Nile deep sea fan, Eastern Mediterranean)'. *Appl. Environ. Microb*, **74(10)** : 3198-3215.

- ✿ Pancost, R.D., Sinninghe Damste, J.S., De Lint, S., Van Der Maarel, M.J.E.C., Gottschal, J.C. and the Medinaut Shipboard Scientific Party (2000). 'Biomarker evidence for widespread anaerobic oxidation in Mediterranean sediments by a consortium of methanogenic archaea and bacteria'. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66(3)**: 1126-1132.
- ✿ Passier, H., F., Bosch, H., J., Nijenhuis, I., A., Lourens, L., J., Bottcher, M., E., Leenders, A., Sinninghe Damste, J., S., de Lange, G., J., Leeuw, J., W. (1998). 'Sulphidic Mediterranean surface waters during Pliocene sapropel formation'. *Nature*, **397**: 146-149.
- ✿ Passier, H.F., Bosch, H.J., Nijenhuis, I.A., Lourens, L.J., Böttcher, M.E., Leenders, A., *et al.* (1999). 'Sulphidic Mediterranean surface waters during Pliocene sapropel formation'. *Nature*, **397**: 46-149
- ✿ Polz, M.F., Cavanaugh, C.M.(1998). 'Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR'. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 3724-3730.
- ✿ Polymenakou, P., Bertilsson, S., Tselepidis, A., Stephanou, E., G. (2005). 'Bacterial community composition in different sediments from the Eastern Mediterranean Sea: A comparison of four 16S rDNA clone libraries'. *Microbial Ecol.*, **50**: 447-462
- ✿ Polymenakou, P., Stephanou, E., G., Tselepidis, A., Bertilsson, S. (2005b). 'Organic matter preservation and microbial community accumulations in deep-hypersaline anoxic basins'. *Geomicrob.*, **24**: 19-29.
- ✿ Polymenakou, P., Bertilsson, S., Tselepidis, A., Stephanou, E., G. (2005c). 'Links between geographic location, environmental factors and microbial community in sediments of Eastern Mediterranean Sea'. *Microb. Ecol.*, **49(3)**: 367-378.
- ✿ Polymenakou, P., N., Lampadariou, N., Mandalakis, M. and Tselepidis, A. (2009). 'Phylogenetic diversity of sediment bacteria from the southern Cretan margin, Eastern Mediterranean Sea'. *Syst. Appl. Microbiol.*, **32**: 17-26.
- ✿ Polymenakou, P., N., Mandalakis, M., Stephanou, E., G., Tselepidis, A. (2008). 'Particle size distribution of airborne microorganisms and pathogens during an intense African dust in the Eastern Mediterranean'. *Environm. Health Persp.*, **116(3)**: 292-296.
- ✿ Powell, S.M., Bowman, J.P., Snape, I., Stark, J.S. (2003). 'Microbial community variation in pristine and polluted nearshore Antarctic sediments'. *FEMS Microb. Ecol.* **45**: 135-145.
- ✿ Prospero, J., M., Lamb, P., J. (2003). 'African droughts and dust transport to the Caribbean: climate change implications'. *Science*, **302** : 1024-1027.
- ✿ Radjasa, O., K., Hidetoshi, U., Kita-Tsukamoto, K., Ohwada K. (2001). 'Characterization of psychrotrophic bacteria in the surface and deep-sea waters from Northwestern Pacific Ocean based on 16S ribosomal DNA analysis'. *Mar. Biotechnol.*, **3** : 454-462.
- ✿ Rajendran, N., Suwa, Y., Urushigawa, Y. (1993). 'Distribution of phospholipids ester-linked fatty acid biomarkers for bacteria in the sediment of Ise Bay, Japan'. *Mar. Chem.* **42**: 39-56.
- ✿ Ravensschlag, K., Sahm, K., Penthaler, J., Amann, R. (1999). 'High bacterial diversity in permanently cold marine sediments'. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65(9)**: 3982-3989.
- ✿ Redfield, A., C., Ketchum, B., H., Richards, F., A. (1963). 'The influence of organisms on the composition of sea-water'. In *The Sea* (Editor M.N. Hill), **2**: 26-77.
- ✿ Riaux-Gobin, C., Hargraves, P.E., Neveux, J., Oriol, L., Vétion, G. (1997). 'Microphyte pigments and resting spores at the water-sediment interface in the Subantarctic deep sea (Indian sector of the Southern Ocean)'. *Deep-Sea Res. II*, **44 (5)**: 1033-1051.
- ✿ Ringelberg, D. G., Sutton, S., White, D., C. (1997). 'Biomass, bioactivity and biodiversity: microbial ecology of the deep subsurface: analysis of ester-linked phospholipid fatty acid'. *FEMS Microbiol. Rev.*, **20**: 371-377.
- ✿ Roesch, C., Bruns, J., Mounier, E., Backhausen, S., Bothe, H. (unpublished). 'Bacterial diversity of a German forest soil, as assessed by nifH, nosZ, and SSU clone libraries and tRFLP' University of Cologne, Germany.
- ✿ Roling, W.F.M., van Breukelen, B.M., Braster, M., Goeltom, M.T., Groen, J., van Verseveld, H.W. (2000). 'Analysis of microbial communities in a landfill leachate polluted aquifer using a new method for anaerobic physiological profiling and 16S rDNA based fingerprinting'. *Microb. Ecol.* **40**: 177-188.
- ✿ Rütters, H., Sass, H., Cypionka, H., Rullkötter, J.(2002). *J. Microbiol. Meth.* **48**: 149.
- ✿ Sakamoto, M., Takeuchi, Y., Umeda, M., Ishikawa, I., Benno, Y. (2003). 'Application of terminal RFLP analysis to characterize oral bacterial flora in saliva of healthy subjects and patients with periodontitis'. *J. Med. Microb.* **52**: 79-89.

- Salomonova, S., Lamacova, J., Rulik, M., Rolcik, J., Cap, L., Bednar, P., Bartak, P. (2003). 'Determination of phospholipid fatty acids in sediments'. *Chemica* **42**: 39-49.
- Sass, A.M., Sass H., Coolen, M.J.L., Cyrionka, H., Overmann, J. (2001). 'Microbial communities in the chemocline of a hypersaline deep-sea basin (Urania Basin, Mediterranean Sea'. *Appl. and Environ. Micro.*, **67(12)**: 5392-5402.
- Schauer, M., Massana, R., Pedros-Alio, C. (2000). 'Spatial differences in bacterioplankton composition along the Catalan coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting'. *FEMS Microbiol. Ecol.* **33**: 51-59.
- Schlintzer, R (2004). 'Export production in the equatorial and north Pacific derived from dissolved oxygen, nutrient and carbon data'. *J Oceanogr*, **60** : 53-62.
- Selenska-Pobell, S., Flemming, K., Tzvetkova, T., Raff, J., Schnorpfeil, M., Geibler, A. (2002). 'Bacterial communities in uranium mining waste piles and their interaction with heavy metals'. 455-464. *In* Merkel, B.J., Planer-Friedrich, B. and Wolkersdorfer (ed.). *Uranium in the aquatic environment*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Smith, C.R., Hoover, D.J., Doan, S.E., Pope, R.H., DeMaster, D.J., Dobbs, F.C., Altabet, M.A., (1996). 'Phytodetritus at the abyssal seafloor across 101 of latitude in the central equatorial Pacific'. *Deep-Sea Res II*, **43**: 1309-1338.
- Smith, C.R. *et al* (1997). 'Latitudinal variations in benthic processes in the abyssal equatorial Pacific: control by biogenic particle flux'. *Deep-Sea Res II*, **44**: 2295-2317.
- Snape, I., Riddle, M.J., Stark, J.S., Cole, C.M., King, C.K., Duquesne, S., Gore, D.B. (2001). 'Management and remediation of contaminated sites at Casey Station, Antarctica'. *Polar Rec.* **37**: 119 -214.
- Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DM, Huse SM, Neal PR, et al. (2006). 'Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere" '. *PNAS*, **103** : 12115-20.
- Takai, K., Nakagawa, S., Reysenbach, A.L., Hoek, J. in *Back Arc Spreading Systems: Geological, Biological, Chemical and Physical Interactions* (eds Christie, D. M. et al) 185-214 (AGU Books, Washington DC, 2006).
- Theocharis, A., Klein, B., Nittis, K., Roether, W. (2002). 'Evolution and status of the Eastern Mediterranean Transiet (1997-1999)'. *Jour. Mar. Syst.*, **33-34** : 91-116.
- Tivey, M. (2007). 'Generation of seafloor hydrothermal vent fluids and associated mineral deposits'. *Oceanography*, **20**: 50-65.
- Tryon, M.D. *et al* (1999). 'Measurements of transience and downward fluid flow near episodic methane gas vents, Hydrate Ridge, Cascadia'. *Geology*, **27**: 1075-1078.
- Tselepidis, A., Zervakis, V., Polychronaki, T., Danovaro, R., Chronis, G. (2000). 'Distribution of nutrients and particulate organic matter in relation to the prevailing hydrographic features of the Cretan Sea (NE Mediterranean)'. *Progr. Oceanogr.*, **46**: 113-142.
- Tselepidis, A., Polychronaki, T., Marralle, D., Akoumianaki, I., Dell'Anno, A., Puscheddu, A., Danovaro, R. (2000a). 'Organic matter composition of the continental shelf and bathyal sediments of the Cretan Sea'. *Prog Oceanogr*, **46**: 311-344.
- van Hannen, E.J., Mooij, W., van Agterveld, M.P., Gons, H.J., Laanbroek, H.J. (1999). 'Detritus dependent development of the microbial community in an experimental system: qualitative analysis by denaturing gradient gel electrophoresis'. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2478-2484.
- Ventriani, C., Jannasch, H. W., MacGregor, B. J., Stahl, D.A., Reysenbach, A.L. (1999). 'Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments'. *Appl. Environm. Microbiol.*, **65**: 4375-4384.
- von Wintzingerode, F., Gobel, U., B., Stackerbrandt, E. (1997). 'Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rDNA analysis'. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **21**: 213-229.
- Wagner, M., Horn, M. (2006). 'The Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chlamydiae and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance'. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **17**: 241-249.
- Wang, P., Xiao, X, Wang, F. 2005. 'Phylogenetic analysis of Archaea in the deep-sea sediments of west Pacific Warm Pool'. *Extremophiles*, **9**: 209-217
- Warnecke, F., Peplies, J., Glocker, F.O. (2005). 'Quick reference guide for ARB'. www.arb-home.de.

- Wenzhofer, F., Glud, R., N. (2002). 'Benthic carbon mineralization in the Atlantic: a synthesis based on *in situ* data from the last decade'. *Deep-Sea Res. I*, **49**: 1255 – 1279.
- Whitman, W., B., Coleman, D., C., Wiebe, W., J. (1998). 'Prokaryotes: the unseen majority'. *PNAs U.S.A.*, **95**: 6578-6583.
- White, D. C., Bobbie, R. J., Herron, J. S., King, J. D., Morrison, S. J. (1979). 'Biochemical measurements of microbial mass and activity from environmental samples'. *In*: Costerton, J. W. and Colwell, R. R. (eds.): Native aquatic bacteria: Enumeration, activity and ecology. ASTM STP 695, American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- Whittaker, R., H. (1959). 'On the broad classification of organisms'. *Quart Rev Biol.*, **34**: 210-226.
- Woese, C., R. (1987). 'Bacterial evolution'. *Microbiological Reviews*, **51**: 221-271.
- Woese, C., R., Kandler, O., Wheelis, M., L. (1990). 'Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria* and *Eucarya*.' *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **74**: 5088-5090.
- Xu, M., Wang, F., Meng, J., Xiao, X. (2007). 'Construction and preliminary analysis of a metagenomic library from a deep-sea sediment of east Pacific Nodule Province'. *FEMS Microb. Ecol.*, **62**:233-241.
- Yakimov, M., M., La Cono, V., Denaro, R., D'Auria, G., Decembrini, F., Timmis, K., N., Golyshin, P., N., Guiliano, L. (2007). 'Primary producing prokaryotic communities of brine, interface and seawater above the halocline of deep anoxic lake L'Atalante, Eastern Mediterranean Sea'. *ISME J*.
- Yang, Q., Jia, Z., Liu, R., Chen, J. (2006). 'Molecular diversity and anammox activity of novel planctomycete-like bacteria in the wastewater treatment of a full-scale alcohol manufacturing plant'. *Process Biochem.*, **42**:180-187.
- Zuckerkindl, E., Pauling, L. (1965). 'Molecules as documents of evolutionary history'. *J Theor Biol*, **8(2)**: 357-366.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ (ΥΠΟ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ)

Will be submitted to: Research in Microbiology

Comparative phylogenetic diversity of sediment bacteria from the deep Pacific Ocean and the Eastern Mediterranean Sea (km³ station)

Ioanna Kouridaki^{1,2}, Paraskevi N. Polymenakou^{2,*}, Anastasios Tselepides^{2,3}, Kenneth L. Smith, Jr.⁴

¹*University of Crete, Department of Chemistry, P.O.Box 2208, GR-71003, Heraklion, Greece*

²*Hellenic Centre for Marine Research, Institute of Marine Biology and Genetics, Gournes Pediadou, P.O.Box 2214, GR-71003, Heraklion, Crete, Greece*

³*University of Piraeus, Department of Maritime Studies, 40 Karaoli & Dimitriou St., GR-18532, Piraeus, Greece*

⁴*Monterey Bay Aquarium Research Institute, 7700 Sandholdt Road, Moss Landing, CA 95039, USA*

* Corresponding author. Tel.: +30 2810 337855, fax.: +30 2810 337822

E-mail address: polymen@her.hcmr.gr (P.N. Polymenakou)

Abstract

The variability of bacterial community composition and diversity was studied by comparative analysis of five large 16S ribosomal-DNA clone libraries from deep-sea sediments (water column depth: 4000 m) of the Eastern Mediterranean Sea and the Pacific Ocean. This is the first attempt having ever been documented, to compare the bacterial communities living in these deep-sea ecosystems. The estimated chlorophyll-a, organic carbon and C/N ratios demonstrated significant differences on the trophic state between the Pacific Ocean and the Eastern Mediterranean sediments. A diverse range of prokaryotes was found in the sediments which were represented by 11 different taxonomic groups at the phylum level. The phylogenetic analysis of a total of 304 clones revealed that these sequences grouped with the phyla Acidobacteria, Actinobacteria, Planctomycetes, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Nitrospirae, Chloroflexi, Verucomicrobia, Bacteroidetes and OP11 (candidate division). Gammaproteobacteria was the prevalent bacterial group in the Pacific Ocean sediments, in contrast to Acidobacteria which dominated the Eastern Mediterranean microcommunity. In addition, it is worth mentioning that the clones, not affiliated with any known taxon, represent a sensible fraction of the total sequences retrieved not only from the Pacific Ocean microenvironments (10.31%), but also from the one located in the Eastern Mediterranean (24.05%). A large number of clones from both sampling regions appeared to be affiliated to each other in the phylogenetic trees. Both the high biodiversity and the significant percentage of the ‘non-affiliated’ 16s rRNA gene clones reveal these microenvironments being hot spots, urging that further research is indispensable.

Keywords: *Biodiversity; Deep-sea sediments; 16S rRNA genes*

Introduction

Deep-sea sediments (water depth ≥ 1000 m) cover about the 95% of the total oceanic bottom and the 67% of the total earth’s surface representing one of the largest ecosystems on earth [Wenzhöfer and Glud, 2002 and references therein]. For years, the deep-sea floor was considered

as a very stable and biologically inert environment due to its high hydrostatic pressure and the absence of sunlight. However, recent technological developments and monitoring methods have shown that the deep sea ecosystems constitute a dynamic environment linked to the upper water column processes through the influx of organic matter [Sarda et al., 2004; Jørgensen and Boetius, 2007]. The microbial processes occurring there have shown to be essential to sustain the oceanic primary and secondary production [Gage and Tyler, 1991]. In addition, the accommodated microbial cells account for the most of the benthic biomass while an enormous amount of about $0.3 - 8.3 \times 10^6$ undiscovered species has been estimated to harbor the deep-sea floor [Grassle and Maciolek, 1992; Gage and Tyler, 1991].

Despite the vast contribution of microbial biomass on the deep ocean floor and their indispensable role in the biogeochemical cycles, the cultivated strains constitute just a scant piece of the total biodiversity [Amann et al, 1995; Bull et al., 1992; Torsvik et al., 2002; DeLong and Karl, 2005]. Molecular methods targeting 16S rRNA genes have revealed that we know only a very small part of the diversity of the microbial world which most of this seems to be hiding in the large amount of yet uncultured bacteria [Amann et al, 1995; Hugenholtz et al., 1998]. However, the number of the constructed large clone libraries in deep-sea sediments is very limited since most of them are small in size with only few exceptions such as the clone libraries constructed from the Antarctic sediment [Bowman and McCuaig, 2003] and the deep Eastern Mediterranean Sea [Polymenakou et al., 2005a; 2009]. In general, with the exception of some functionally defined bacterial groups (methanogens, methanotrophs, sulfate reducing bacteria), our knowledge about the ecology and physiology of sediment bacteria is fragmentary due to the lack of extensive biogeographical studies of sediment bacterial populations [Bowman and McCuaig, 2003].

In the present study, we used molecular-based methods to analyze the microbial components in the deep-sea sediments (water-column depth: 4000m) of two contrasting environments, the Eastern Mediterranean Sea and the Pacific Ocean. The deep eastern basin of the Mediterranean Sea is one of the most oligotrophic regions in the world [Ignatiades, 1969; Krom, 1991; Tselepides et al., 2000] and it represents a complex hydrographic and geomorphologic system [Malanotte-Rizzoli and Hecht, 1988; Theocharis et al, 2002]. Despite being deep (average depth: 2000 m), its deep water mass temperature is at least 13.5°C. Hence, the Eastern Mediterranean Sea constitutes a model for a deep relatively warm and highly oligotrophic bathypelagic habitat [Robinson et al., 2001; Martin-Cuadrado et al, 2007]. On the other hand, the Eastern Pacific Ocean exhibits high surface nutrient level, chlorophyll concentrations and high biological productivity [Schlitzer, 2004] representing an eutrophic and relatively cold environment compared to the Eastern Mediterranean Sea. The main objective of the present study is the comparative phylogenetic analysis of the microbial community composition and biodiversity dwelling in the aforementioned environments by means of 16S ribosomal DNA clone libraries. If the trophic state plays a key role on microbial community composition then it is expected that the eutrophic environment of the Pacific Ocean will support a different microbial assemblage compared to the oligotrophic Mediterranean Sea. To our knowledge, this is the first attempt having ever been documented, to compare the bacterial communities living in these deep-sea ecosystems.

Materials and Methods

Sampling sites and environmental parameters analyses

Four sampling sites at the Pacific Ocean (Alvin samples) and one at the Eastern Mediterranean Sea (KM3 station; South Ionian Sea; Fig. 1; Table 1) were selected at water column depth approximately 4000 m. Undisturbed Pacific sediment samples were collected by means of the submersible Alvin (Woods Hole O.I.) in August 2006 (Fig. 1a). Piston cores manipulated by the arms of the submersible Alvin were used for collecting undisturbed sediment samples from four microenvironments in the Pacific Ocean (Fig. 2). In particular, the sediment core Alvin24 was collected on a bioturbation mound whereas the core Alvin 25 was used as a control since it was collected away from the observed mound. Similarly, core Alvin28 was collected near a Kelp holdfast baitfall on the seafloor whereas core Alvin29 was used as a control. A Bowers and Conelly Multiple-corer (8 cores, i.d. 9.0 cm; [Barnett et al, 1984]) was used to collect cores with an undisturbed sediment-water interface and with overlying bottom water from the South Ionian Sea in May 2007 on board the R/V Aegaeo of the Hellenic Centre for Marine Research (Fig. 1b). Due to technical difficulties on board, only three independent deployments were made possible in the South Ionian sampling site (KM3 station). Mixed surface sediment samples (0-1 cm) from each of the sampling sites (one Ionian and four Pacific oxic sediments) were stored frozen in sterile vials for subsequent analysis in the laboratory. Chloroplastic pigments (chlorophyll a and phaeopigments) and total organic carbon and nitrogen concentrations were estimated using a Turner TD-700 fluorometer [Lorenzen and Jeffrey, 1980] and a Perkin Elmer CHN 2400 analyzer [Hedges and Stern, 1984], respectively. Chloroplastic pigment equivalents (CPE) are considered as the sum of chlorophyll a and phaeopigments.

16S ribosomal RNA gene clone library construction

Five large 16S rRNA gene clone libraries were constructed from the surface sediments in order to study benthic bacterial diversity and community composition. Total sedimentary DNA was extracted directly from the deep-sea samples using the FastDNA-SPIN Kit for Soil (Q-Biogene, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. DNA concentration contained in the extracts was measured using the spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, DE, USA). Bacterial 16S ribosomal RNA genes were amplified by using the polymerase chain reaction (PCR) with the universal bacterial primers 27f (modified to match also Planctomycetales; 5'-AGRGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492r (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3'). For each sample, eight replicate PCR reactions of 20µl were amplified in a Perkin-Elmer Cycler with initial denaturation at 94°C for 3 min followed by 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min annealing at 55°C, 2 min primer extension at 72°C and a final extension at 72°C for 7 min. In the case of KM3 sample, the PCR annealing took place at 50°C. Each PCR tube contained 1-4 ng of target DNA, PCR buffer (10mM Tris-HCl, pH 9, 50mM KCl, 0.1% Triton X-100 και 2mM MgCl₂), 100nM of each primer, 200µM of each dNTP and 0.25 U Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA). Then, all PCR reactions were pooled and precipitated in centrifugal vacuum evaporator (SpeedVac; Heraeus Instruments, Hanau, Germany) followed by gel purification using the Quiaquick PCR purification kit (Quiagen, Valencia, CA, USA). For each sample, 5-10 ng of PCR product was cloned into the pCR 4-TOPO vector and transformed into chemically competent cells of *E.coli* One shot TOP10 cells using the TOPO TA Cloning kit (Version M) as recommended by the manufacturer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The bacterial clones collected were transferred in 96-deep well plates and incubated for 24 hours at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium containing 25 mg kanamycin ml⁻¹.

Aliquots of the individual clones were either archived at -80°C in 7% dimethyl sulfoxide or processed for plasmid DNA extraction using the 800 μl Unifilter microplates (Whatman Inc., NJ, USA). The extracts were further used for sequencing.

Phylogenetic analysis, species richness and statistical analysis

A total of 472 clones were successfully sequenced on an ABI 3700 96-capillary sequencer (Applied Biosystems) using the BigDye terminator kit (v.3.1; Applied Biosystems), as it provides high-quality reads of between 450-780 bases. Three sequences were identified as likely chimeric products using the Chimera Check included in Ribosomal Database Project II (Michigan State University, East Lansing, MI, USA) and were excluded from the phylogenetic analysis. The remaining sequences were compared to Genbank entries using BLAST (Basic Local Alignment Tool; National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) in order to obtain a preliminary phylogenetic affiliation of the clones. Sequences that were also excluded from further analysis included 55 clones related to eukaryotic organelles and clone vector sequences, and three clones not having any relation to the reference clones of the GenBank. Eventually, the remaining 411 clones were imported to the ARB software (Version 2.5b; Technische Universität München, München, Germany; Ludwig et al, 2004) and aligned using the integrated aligner tool and the fast aligner option followed by manual alignment of the sequences to closely related sequences in the ARB database. Similarity matrices among the sequences of the clones were calculated in order to identify the operational taxonomic units (OTUs) which were further used to estimate species richness (Chao-1) using the web based Rarefaction calculator software (<http://www2.biology.ualberta.ca./jbrzusto/rarefact.php>; [Chao, 1984]). A total of 304 OTUs were finally identified and used for the calculation of the phylogenetic trees by applying the maximum parsimony method. The robustness of tree topologies was confirmed by maximum parsimony analysis [Ludwig et al., 2004] with 100 bootstrap replications. Values <50 were removed. All 304 partial 16S rDNA sequences generated in the present study have been deposited in Genbank under accession numbers FJ197343–FJ197646. Novel clusters of uncultured sediment bacteria were defined as monophyletic groups of 16S rDNA sequences with a minimum sequence similarity of 98%. Additional criteria were that the cluster should contain sequences from a minimum of two libraries. Multivariable analysis using Euclidean Distance that is integrated in the PRIMER 6.1.5 software (Plymouth Marine Laboratory) was carried out in order to compare bacterial community composition among the environmental samples, at the level of large taxonomic groups.

Results

Geochemical sediment characteristics

Chloroplastic pigments, organic carbon and carbon-to-nitrogen ratio (C/N) are useful indicators depicting the amount of the food being available to the sediment dwellers. According to the chemical analysis results (Table 1), the Alvin samples contain greater quantity of chlorophyll a ($0.83\text{-}0.97\ \mu\text{g g}^{-1}$), chloroplastic pigment equivalents ($7.04\text{-}7.75\ \mu\text{g g}^{-1}$) and organic carbon content (1.53-1.69%) compared to the Eastern Mediterranean sediment having only $0.12\ \mu\text{g g}^{-1}$, $1.07\ \mu\text{g g}^{-1}$, and 0.82% respectively. Amongst the Alvin samples, slightly lower concentrations of organic carbon were observed at the control sampling sites. As for the ratio C/N, its highest value was found in the KM3 sediment (10.45), which can only be paralleled with the Alvin24 sample (9.11). The rest of the Alvin samples were characterized by a lower C/N ratio fluctuating between 6.1 and 6.87.

Bacterial biodiversity

The species richness was estimated by means of rarefaction analysis and the rarefaction curve was constructed (Fig. 3), so that the bacterial biodiversity of the KM3 and Alvin deep-sea microenvironments would be illustrated. We compared a total of 411 clones, so that 82 different OTUs among the 105 screened clones from the KM3 clone library were identified, whereas 55 of 73, 43 of 65, 64 of 87, 60 of 81 from the Alvin24, Alvin25, Alvin28, Alvin29 clone libraries, respectively, were further identified. Apparently, all of the 16S rRNA gene libraries were highly diverse, while their curves diverge minimally from the reference curve.

Taxonomic groups and phylogenetic analysis

A total of 304 16S rRNA gene clones was used so that a comparative phylogenetic analysis among the five clone libraries would be enabled. Phylogenetic analysis (Fig. 4; Fig. 5) classified the majority of sequences (252 clones) in eleven widespread phyla that are Acidobacteria, Actinobacteria, Planctomycetes, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Nitrospirae, Chloroflexi, Verrucomicrobia and Bacteroidetes. Among the rest 52 clones, five were classified as Cluster1 and Cluster2, one clone was found to be affiliated with the candidate division OP11, whereas the majority of them (40 clones) could not fall into any known taxonomic group.

As far as the Pacific Ocean microenvironments were concerned (a total of 220 16S rRNA clones), there were found trivial differences among them. In general, Gammaproteobacteria constituted the dominant subphylum (23.31%), while Deltaproteobacteria (13.62%) and Actinobacteria (12.06%) were the following more multitudinous taxonomic groups. There were also retrieved bacterial clones affiliated with the Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Nitrospirae, Chloroflexi, Cluster2, the candidate division OP11 and a significant percentage of clones non-affiliated with any known taxonomic group (10.31%).

On the other hand, the KM3 clone library (84 clones) included bacterial sequences sorted in eleven phylogenetic groups that are Acidobacteria, Actinobacteria, Planctomycetes, Deltaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Nitrospirae, Chloroflexi, Verrucomicrobia and Bacteroidetes. It is worth mentioning the fact that the 16S rRNA gene sequences non-affiliated with any known taxonomic group were the most multitudinous group (24.05%). At the same time, Acidobacteria was the prevalent known phylum (17.72%) followed by Gammaproteobacteria and Actinobacteria (17.72% and 13.92% respectively).

Surprisingly enough, there were not any noticeable discrepancies regarding the bacterial community composition in the Pacific Ocean and Eastern Mediterranean Sea sediments. Hierarchical cluster analysis based on the similarity matrices for bacterial community composition revealed the following differences between the Alvin and KM3 clone libraries: Acidobacteria and Gammaproteobacteria were the prevalent phylogenetic groups in the sediments of the Eastern Mediterranean Sea and the Pacific Ocean, respectively, whereas the KM3 clone library had the highest percentage of the 16S rRNA gene sequences not clustered into any known taxonomic group (Fig. 4; Fig. 5).

Discussion

Deep-sea sediments have been characterized as the final depository for the accumulation of autochthonous and allochthonous organic matter (e.g. [Hedges and Keil, 1995; Fabiano and Danovaro, 1994]) whereas the levels of chlorophyll a and CPE have been widely used for assessing the contribution of phytodetritus to the sediments. Based on these levels various trophic state regions can be defined. For example, deep-sea oligotrophic ecosystems exhibited values of chlorophyll a less than $0.06 \mu\text{g g}^{-1}$ in the central equatorial Pacific [Smith et al, 1996] and an average of $0.15 \mu\text{g g}^{-1}$ in the Indian sector of the Southern Ocean with a maximum of $0.15 \mu\text{g g}^{-1}$ at the permanently open-ocean zone [Riaux-Gobin et al, 1997]. Our data regarding the Pacific Ocean sampling sites (Chl a: $0.83\text{-}0.94 \mu\text{g g}^{-1}$; Table 1) were higher than the aforementioned deep-sea ecosystem values and were found to be comparable to mesotrophic environments. As for the Eastern Mediterranean sediment, its chlorophyll a value ($0.12 \mu\text{g g}^{-1}$; Table 1) is in accordance with previous measurements in South Ionian Sea sediment ($0.05 \mu\text{g g}^{-1}$; water depth: 2790m; [Polymenakou et al., 2005a; c]), typical for oligotrophic environments.

As far as organic matter was concerned, just a minor part of it being produced in the euphotic zone escapes mineralization during settling within the water column and reaches the sediment surface (e.g. [Hartman et al., 1976]). Due to a preferential decomposition of nitrogen compounds, the organic matter shows increasing C/N ratios with increasing water depth [Muller, 1977]. As a matter of fact, below 1000 m water depth the C/N ratios were found to be higher than 10 and increasing to values around 15 in the deeper parts of the oceans [Muller, 1977]. Nevertheless, our data were lower enough, as the C/N ratio ranged between 6.1 and 9.11 for the Pacific sediments and equal to 10.45 for the Eastern Mediterranean one. The C/N value of the KM3 station is concordant to the value range (>10.00) previously estimated for other sites in the Eastern Mediterranean (water depth: 30 - 3532.5m; [Pusceddu et al., 2005; Polymenakou et al, 2007]). The organic carbon content was found to be lower in the KM3 sediment (0.82%) comparing to the Pacific sediments which contain approximately 1.53 – 1.69%. Our data confirm the organic carbon values previously documented for the Eastern Mediterranean Sea sediments that range between 0.37% and 1.63% [Polymenakou et al., 2005c]. On the other hand, the Alvin organic carbon content was considered to be as high as the sapropel content. The sapropels, found only at the Eastern Mediterranean Sea, are organic carbon-rich layers ($>1\text{-}2\%$ for the recent sapropel S1; [Rossignol-Strick, 1985]) and are considered to have been formatted due to either protracted anoxic conditions in the deep sea [Passier et al., 1999] or increased primary production [Calvert et al, 1992].

Overall, because of the trifling photosynthetic rates, the deep-sea organic matter availability regulates the benthic productivity and biomass [Jorgensen and Boetius, 2007]. Polymenakou et al [2005c] found out that both organic carbon and chlorophyll a is linked with the bacterial community composition in Eastern Mediterranean Sea sediments from various depths (30-2860m). In the present study, all the 16S rRNA gene clone libraries were proved to be highly diverse. There were detected several 16S rRNA gene clones affiliated with bacterial sequences from various inhabitants, such as terrestrial, anoxic inhabitants and mud volcanoes. Such high biodiversity in deep sea sediments has already been appointed, namely in Arctic Ocean [Ravenschlag et al, 1999], in Antarctica [Bowman and McGuaig, 2003] and in Eastern Mediterranean Sea [Polymenakou et al., 2005]. In fact, Bowman and McGuaig [2003] reported that sedimentary biodiversity of both oxic and anoxic layers can be compared with the diversity of the terrestrial ecosystems.

The Alvin bacterial community composition appears to resemble enough with sedimentary bacterial communities spotted in other regions of the Pacific Ocean. In a similar research conducted in Pacific Ocean deep-sea sediments near Japan (water column depths: 2339 - 4031 m), Li et al [1999] retrieved 16S rRNA gene clones that clustered into the Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria, Bacteroidetes, and Actinobacteria. The fact that just 55 clones were analyzed, is reflected in the smaller number of the phylogenetic groups identified compared to the present study. Furthermore, Gammaproteobacteria were proved to be the dominant taxonomic group in the 37 clone cosmid library constructed from a deep-sea sediment (depth: 5274m) in the Pacific Nodule Province [Xu et al, 2007]. Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Actinobacteria and Firmicutes were the rest groups retrieved. According to Li et al [1999b], the presence of the Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria and Bacteroidetes appears to be common in the deep-sea sediments. In fact, the Gammaproteobacteria are proved to be the most popular phylogenetic group, as they prevail over the rest taxa in several deep-sea researches (e.g. [Li et al, 1999; Kato et al, 1997; Bowman and McGuaig, 2003; Polymenakou et al, 2005]).

Deltaproteobacteria are one of the multitudinous taxonomic groups defined in the Pacific sediments. A couple of clones included in the Alvin25 and Alvin29 libraries are clustered with the species *Nitrospina gracilis*. This species being an aerobic, nitrifying, chemolithotrophic bacteria [Fry, 2000], seems to belong to a distinct taxonomic group named Nitrospina, although it has been embodied at the Deltaproteobacteria phylogenetic tree. Nitrospina is considered to be so much diverse as Proteobacteria do, as its representatives have inhabited a wide variety of marine, freshwater and terrestrial environments [Fry, 2000]. On the other hand, due to their common role in the sulfur cycle regulation, the presence of the subphylum Deltaproteobacteria is linked with the Epsilonproteobacteria one. Nevertheless, clones affiliated with the Epsilonproteobacteria were not spotted. It is pretty possible their absence to be connected with their inhabiting limited in either shallow coastal marine water or deep hydrothermal vents [Longnecker and Reysenbach, 2001]. It is very intriguing the fact that several clones from the Pacific sampling sites were closely related to 16S rRNA gene clones previously found in the Eastern Mediterranean Sea (i.e. clones from the Thermaikos Gulf, South Ionian Sea, Cretan Sea; [Polymenakou et al., 2005]).

Based on the phylogenetic analysis of the KM3 16S rRNA gene clone library, this bacterial community appeared to be dominated by Acidobacteria, Actinobacteria and Gammaproteobacteria in succession. A noticeable number of 16S rRNA genes were affiliated with Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chloroflexi, Nitrospirae and Bacteroidetes. Phylogenetic analysis results were in accordance with a former study being conducted at deep-sea sediment from the Ionian Sea [Polymenakou et al, 2005], despite some trivial discrepancies concerning the number of the clones included in the OTUs and the absence of certain phylogenetic groups. In particular, a total of 17 16S rRNA gene clones from the KM3 library exhibited high sequence similarity (98-99%) to clones obtained from various sampling sites all over the Mediterranean Sea [Polymenakou et al, 2005].

The fact that Acidobacteria was dominated the KM3 clone library is verified by previous researches in the Eastern Mediterranean Sea. Particularly, this phylum is proved to be the prevalent one in the sedimentary bacterial communities in South Ionian Sea [Polymenakou et al, 2005] and in deep-sea sediments from both the submarine Samaria gorge and the Paximades

channel in the southern Cretan margin [Polymenakou et al, 2009]. Overall, Acidobacteria representatives predominate in a variety of soils, hot springs and sediments [Fry, 2000].

Actinobacteria and Gammaproteobacteria constituted the next more abundant phylogenetic taxa included in the KM3 clone library. However, a quite limited number of Actinobacteria clones were found in Eastern Mediterranean sediments [Polymenakou et al, 2005]. Overall, Actinobacteria are reported to form a major or dominant component of the bacterial populations both at bathyal and abyssal depths [Bull et al, 2005]. Until recently, Actinobacteria were regarded to be terrestrial. Thus, having been transferred at the sea, they can be detected in the sediments, where they survive as either spores or resting propagules [Bull et al, 2005]. Recent evidence suggests that certain actinobacterial clades identified in freshwaters and estuaries are indigenous and not inoculated from terrestrial sources [Warnecke et al, 2004]. The 16S rRNA gene sequences not affiliated with any known bacterial clone formed the most multitudinous KM3 group, as their abundance (24.05%) was higher than the Acidobacteria one. Despite being quite widespread in the Eastern Mediterranean Sea [Polymenakou et al, 2005; 2009] and especially in the air [Polymenakou et al., 2008], 16S rRNA gene clones affiliated with the phylum Firmicutes were not detected in the KM3 sediment at all.

The Pacific and Eastern Mediterranean ecosystems scrutinized, have different trophic state and temperature conditions but the same water column depth. Nevertheless, their bacterial community composition did not have sensible discrepancies. The only differences spotted concern the clone presence or absence of certain minor phyla and the clone percentage classified in each phylogenetic group. In fact, several KM3 and Alvin clones appeared to be affiliated to each other in the phylogenetic trees. It is worth mentioning the fact that all sampling sites are located at the same latitude. Generally, most organisms show latitudinal gradients in species diversity while their species richness generally increases from the poles towards the equator [Hillebrand, 2004; Maguran, 2004]. Such a pattern lacks a general explanation but the few suggested mechanisms are based on the species-area relationships, the productivity levels, and the evolutionary history of the ecosystem [Hillebrand, 2004]. Finlay [2002] suggested that the free-living microbial species (e.g. protists) do not show biogeographies and their ubiquity-biogeography transition is believed to be located in the species size range between 1 and 10 μm . He also suggested that as prokaryotes are much smaller and several orders of magnitude more abundant compared to microbial eukaryotes, they are even less likely to be restricted by geographical barriers [Finlay, 2002]. However, Pommier et al. [2007] by analyzing the bacterioplankton communities from coastal waters at nine world-wide distributed locations demonstrated that these tiny communities share many of the biogeographical and macroecological features of macroscopic organisms. In particular, the investigated marine bacterioplankton community showed a high degree of endemism and followed a latitudinal gradient of their species richness. Although several arguments and debates have been made regarding the biogeographical patterns and the ubiquitous distribution of microbial taxa as well as the occurrence of endemic bacterial communities, most studies are restricted to free-living bacterioplankton communities and microbial eukaryotes (e.g. [Finlay, 2002; Pommier et al., 2007; Gray et al., 2007]). This restriction is due to the capability of planktonic communities to be well mixed as there are few barriers to microbial dispersal [Falkowski and de Vargas, 2004]. On the other hand, sediments may seem unlikely to support ubiquitous dispersal of microorganisms relative to the water column. However, although there is little evidence to support the idea of ubiquitous dispersal in the sediments, there have been several studies suggesting habitat specificity of different types of bacteria. Recent studies have shown that the water column depth

is one of the factors controlling the microbial community composition in the sediments [Polymenakou et al., 2005c; Hewson et al., 2007] despite the trophic state of the ecosystem. The results of the present study confirm this statement since similar bacterial communities were observed between widely dispersed habitats of different trophic state and temperature conditions. The present study has unveiled just a scant piece of information that can be obtained by scrutinizing benthic communities. Both the high biodiversity and the significant percentage of the ‘non-affiliated’ 16s rRNA clones denote these microenvironments being hot spots, urging that further research is indispensable. Extensive biogeographical studies will further scrutinized the factors determining bacterial distribution and dispersal in the deep-sea sediments.

References

- [1] Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143–169.
- [2] Barnett, P.R.P., Watson, J., Conelly, D. (1984) A multiple corer for taking virtually undisturbed sediment samples from shelf, bathyal and abyssal sediments. *Oceanol. Acta* 7, 399–40.
- [3] Bowman, J.P., McGuaig, R.,D. (2003) Biodiversity, community structural shifts and biogeography of prokaryotes within Antartict continental shelf sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2463–2483.
- [4] Bull, A.T., Goodfellow, M., Slater, J.H. (1992) Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 219–252.
- [5] Bull, A., Stach, J.E., Ward, A.C., Goodfellow, M. (2005) Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Anton. Leeuw.* 87, 65–79.
- [6] Calvert, S.E., Nielsen, B., Fontugne, M.R. (1992) The role of mat-forming diatoms in the formation of Mediterranean sapropels. *Nature* 359, 223–225.
- [7] Chao, A. (1984) Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scand. J. Stat.* 11, 265–270.
- [8] DeLong, E.F., Karl, D.M. (2005) Genomic perspectives in microbial oceanography, *Nature* 437, 336–342.
- [9] Fabiano, M., Danovaro, R. (1994) Composition of organic matter in sediments facing a river estuary (Tyrrhenian Sea): relationships with bacteria and microphytobenthic biomass. *Hydrobiologia* 277, 71–84.
- [10] Falkowski, P.G., de Vargas, C. (2004) Shotgun sequencing in the sea: a blast from the past? *Science* 304, 58–60.
- [11] Finlay, B.J. (2002) Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* 296, 1061-1063.
- [12] Fry, J. (2000) Bacterial diversity and ‘unculturables’. *Microbiol. Today*, 27, 186–188.
- [13] Grassle, J.F., Maciolek, N.J. (1992) Deep-sea species richness: Regional and local diversity estimates from quantitative bottom samples. *Am. Nat.* 139, 313–341.
- [14] Gage, J.D., Tyler, P.A. (1991) *Deep-Sea Biology: A Natural History of Organisms at the Deep Sea Floor*. Cambridge: Cambridge University Press.
- [15] Gray, N.D., Brown, A., Nelson, D.R., Pickup, R.W., Rowan, A.K., Head, I.M. (2007) The biogeographical distribution of closely related freshwater sediment bacteria is determined by environmental selection. *ISME J.* 1, 596-605.

- [16] Hartman M., Muller P.J., Sues E., Van Der Weijden C.H. (1976) Chemistry of Late Quaternary sediments and their interstitial waters from the NW African continental margin. "Meteor" Forsch.-Ergebn. C (24), (pp. 1–67). Berlin: Stuttgart.
- [17] Hedges, J.I., Keil, R.G. (1995) Sedimentary organic matter preservation: an assessment and speculative synthesis. *Mar. Chem.* 49, 137–139.
- [18] Hedges, J.I., Stern, J.H. (1984) Carbon and nitrogen determinations of carbonate-containing solids. *Limnol. Oceanogr.* 29, 657–663.
- [19] Hewson, I., Jacobson/Meyers, M.E., Fuhrman, J.A. (2007) Diversity and biogeography of bacterial assemblages in surface sediments across the San Pedro Basin, Southern California Borderlands. *Environ. Microbiol.* 9, 923–933.
- [20] Hillebrand, H. (2004) On the generality of the latitudinal diversity gradient. *Am. Nat.* 163, 192–211.
- [21] Hugenholtz, P., Goebel, B.M., Pace, N.R. (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180, 4765–4774.
- [22] Ignatiades, L. (1969) Annual cycles, species diversity and succession of phytoplankton in lower Saronikos Bay, Aegean Sea. *Mar. Biol.* 3, 196–200.
- [23] Jørgensen, B.B., Boetius, A. (2007) Feast and famine – microbial life in the deep-sea bed. *Nature* 5, 770–781.
- [24] Kato, C., Li, L., Tamaoka, J., Horishoki, K. (1997) Molecular analyses of the sediment of the 11000-m deep Mariana Trench. *Extremophiles* 1, 117–123.
- [25] Krom, M.D., Brenner, S., Kress, N., Gordon, L.I. (1991) Phosphorus limitation of primary productivity in the Eastern Mediterranean Sea. *Limnol. Oceanogr.* 36, 424–432.
- [26] Li, L., Kato, C., Horikoshi, K. (1999) Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths. *Biodivers. Conserv.* 8, 659–677.
- [27] Li, L., Kato, C., Horikoshi, K. (1999b) Microbial diversity in sediments collected from the deepest cold-seep area, the Japan Trench. *Mar. Biotechnol.* 1, 391–400.
- [28] Longnecker, K., and Reysenbach, A. (2001) Expansion of the geographic distribution of a novel lineage of ϵ -Proteobacteria to a hydrothermal vent site on the Southern East Pacific Rise. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35, 287–293.
- [29] Lorenzen, C., Jeffrey, J. (1980) Determination of chlorophyll in sea water. *UNESCO Tech. Pap. Mar. Sci.* 35, 1–20.
- [30] Ludwig, W., Strunk O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, Y.A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A.W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lüßmann, May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., Schleifer, K.-H. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32, 1363–1371.
- [31] Maguran, A.E., Henderson, P.A. (2003) Explaining the excess of rare species abundance distributions. *Nature*, 422, 714–716.
- [32] Malanotte-Rizzoli, P., Hecht, A. (1988) Large-scale properties of the Eastern Mediterranean: a review. *Oceanol. Acta* 11, 323–335.
- [33] Martin-Cuadrado, A.-B., López-García, P., Alba, J.-C., Moreira, D., Monticelli, L., Strittmatter, A., Gottschalk, G., Rodríguez-Valera, F. (2007) Metagenomic of the deep Mediterranean, a warm bathypelagic habitat. *PloS One* 2(9), e914.
- [34] Muller P.J. (1977) C/N ratios in Pacific deep-sea sediments: Effect of inorganic ammonium and organic nitrogen compounds sorbed by clays. *Geochim. Cosmochim. Ac.* 41, 765–776.

- [35] Passier, H.F., Bosch, H.J., Nijenhuis, I.A., Lourens, L.J., Böttcher, M.E., Leenders, A., Sinninghe Damsté, J.S., de Lange, G.J., Leeuw, J.W. (1999) Sulphidic Mediterranean surface waters during Pliocene sapropel formation. *Nature* 397, 146–149.
- [36] Polymenakou, P.N., Bertilsson, S., Tselepides, A., Stephanou, E.G. (2005a) Bacterial community composition in different sediments from the Eastern Mediterranean Sea: A comparison of four 16S rDNA clone libraries. *Microb. Ecol.* 50, 447–462.
- [37] Polymenakou, P., Bertilsson, S., Tselepides, A., Stephanou, E., G. (2005c) Links between geographic location, environmental factors and microbial community in sediments of Eastern Mediterranean Sea. *Microb. Ecol.* 49, 367–378.
- [38] Polymenakou, P., N., Lampadariou, N., Mandalakis, M., Tselepides, A. (2009) Phylogenetic diversity of sediment bacteria from the southern Cretan margin, Eastern Mediterranean Sea. *Syst. Appl. Microbiol.* 32, 17–26.
- [39] Polymenakou, P.N., Stephanou, E.G., Tselepides, A., Bertilsson, S. (2007) Organic matter preservation and microbial community accumulations in deep-hypersaline anoxic basins. *Geomicrobiol. J.* 24, 19–29.
- [40] Polymenakou, P.N., Mandalakis, M., Stephanou, E.G., Tselepides, A. (2008) Particle size distribution of airborne microorganisms and pathogens during an intense African dust in the Eastern Mediterranean. *Environ. Health Persp.* 116, 292–296.
- [41] Pommier, T., Canbäck, B., Riemann, L., Boström, K.H., Simu, K., Lundberg, P., Tunlid, A., Hagström, Å. Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. *Mol. Ecol.* 16, 867–880.
- [42] Pusceddu, A., Fiordelmondo, Polymenakou, P., Polychronaki, T., Tselepides, A., Danovaro, R. (2005) Effects of bottom trawling on the quantity and biochemical composition of organic matter in coastal marine sediments (Thermaikos Gulf, northwestern Aegean Sea). *Cont. Shelf Res.* 25, 2491–2505.
- [43] Ravenschlag, K., Sahn, K., Penthaler, J., Amann, R. (1999) High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3982–3989.
- [44] Riaux-Gobin, C., Hargraves, P.E., Neveux, J., Oriol, L., Vétion, G. (1997) Microphyte pigments and resting spores at the water-sediment interface in the Subantarctic deep sea (Indian sector of the Southern Ocean). *Deep-Sea Res. Pt II* 44, 1033–1051.
- [45] Robinson, A.R., Theocaris, A., Lascaratos, A., Leslie, W.G. (2001) Mediterranean Sea circulation. *Encyclopedia of Ocean Sciences.* (pp. 1789–1706). London: Academic Press.
- [46] Rossignol-Strick, M. (1985) Mediterranean quaternary sapropels, an immediate response to orbital insolation. *Nature* 304, 46–49.
- [47] Sardá, F., Calafat, A., Flexas, M.M., Tselepides, A., Canals, M., Espino, M., et al. (2004) An introduction to Mediterranean deep-sea biology. *Sci. Mar.* 68, 7–38.
- [48] Schlitzer, R. 2004. Export production in the equatorial and north Pacific derived from dissolved oxygen, nutrient and carbon data. *J. Oceanogr.* 60, 53–62.
- [49] Smith, C.R., Hoover, D.J., Doan, S.E., Pope, R.H., Demaster, D.J., Dobbs, F.C., Altabet, M.A. (1996) Phytodetritus at the abyssal seafloor across 10° of latitude in the central equatorial Pacific. *Deep-Sea Res. Pt II* 43, 1309–1338.
- [50] Theocharis, A., Klein, B., Nittis, K., Roether, W. (2002) Evolution and status of the Eastern Mediterranean Transient (1997–1999). *J. Marine Syst.* 33–34, 91–116.
- [51] Torsvik, V., Øvreås, L., Thingstad, T.F. (2002) Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* 296, 1064–1066.

- [52] Tselepidis, A., Zervakis, V., Polychronaki, T., Danovaro, R., Chronis, G. (2000) Distribution of nutrients and particulate organic matter in relation to the prevailing hydrographic features of the Cretan Sea (NE Mediterranean). *Prog. Oceanogr.* 46, 113–142.
- [53] Warnecke F., Amann R., Pernthaler J. (2004) Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages. *Environ. Microbiol.* 6, 242–253.
- [54] Wenzhöfer, F., Glud, R.N. (2002) Benthic carbon mineralization in the Atlantic: a synthesis based on in situ data from the last decade. *Deep-Sea Res. Pt I* 49, 1255–1279.
- [55] Xu, M., Wang, F., Meng, J., Xiao, X. (2007) Construction and preliminary analysis of a metagenomic library from a deep-sea sediment of east Pacific Nodule Province. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62, 233–241.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Map showing the positions of the sampling sites in A) the Pacific Ocean and B) the Eastern Mediterranean Sea

Fig. 2. Photos showing the sampling procedure followed with the submersible Alvin.

Fig. 3. Rarefaction analysis of 16S rDNA sequence heterogeneity in clone libraries from the sediment samples. Total numbers of screened clones are plotted against unique operational taxonomic units (OTUs).

Fig. 4. A) Column chart denoting the bacterial community composition of the Pacific Ocean and Eastern Mediterranean sediments. B) Cluster analysis of bacterial community composition from the different surface sediment samples. Scale indicates Euclidean distance.

Fig. 5. Maximum parsimony (MP) 16S rDNA trees showing positions of phylotypes affiliated with (A) Betagammaproteobacteria, (B) Alphaproteobacteria, (C) Deltaproteobacteria, (D) Acidobacteria, (E) Actinobacteria, (F) Planctomycetes, (G) Nitrospirae, Chloroflexi, Verrucomicrobia, Bacteroidetes, Clusters 1, and 2, candidate division OP11, and unidentified clones from the sediment samples. The closest matching entries in GenBank were also included in the tree. The trees are a summary of 100 multiple bootstrapped replicates with MP method and the bootstrap values, determined as percentages of the 100 trees inferred by MP method, are given for branches with greater than 50% support. The scale bar indicates 10% nucleotide change per 16S rDNA positions. Sequences from cultured representatives are indicated in italics.

Table 1. Geochemical characteristics of the deep-sea sediments collected from the Pacific Ocean and the Eastern Mediterranean Sea (Chl a: chlorophyll a; CPE: chloroplast pigment equivalents; OC (%): organic carbon content; C/N: organic carbon to nitrogen ratio).

| | KM3 | Alvin24 | Alvin25 | Alvin28 | Alvin29 |
|----------------------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|
| Station character | Deep-sea basin | away from bioturbation mound | on bioturbation mound | near a Kelp holdfast | away from Kelp holdfast |
| Depth (m) | 4015 | 4100 | 4100 | 4100 | 4100 |
| Temperature (°C) | 14.00 | 1.48 | 1.48 | 1.48 | 1.48 |
| Chl a (µg g⁻¹) | 0.12 | 0.94 | 0.97 | 0.90 | 0.83 |
| CPE (µg g⁻¹) | 1.07 | 7.75 | 7.38 | 7.46 | 7.04 |
| OC (%) | 0.82 | 1.53 | 1.69 | 1.66 | 1.53 |
| C/N | 10.45 | 9.11 | 6.60 | 6.10 | 6.87 |
| Sequenced clones | 105 | 73 | 65 | 87 | 81 |
| OTUs | 82 | 55 | 43 | 64 | 60 |
| Coverage (%) | 43.44 | 26.31 | 54.68 | 44.79 | 43.51 |
| Chao-1 | 188.78 | 209.08 | 78.64 | 142.89 | 137.88 |