

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ
ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ
ΤΗΣ ΣΚΟΝΗΣ ΤΗΣ ΣΑΧΑΡΑΣ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ: ΖΩΤΟΥ ΚΛΕΙΩ

Περιεχόμενα

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.1	Προκαρυωτικοί οργανισμοί και περιβάλλον	3
1.2	Ενδιατήματα.....	5
1.3	Μέθοδοι ταυτοποίησης μικροβιακού φορτίου σε διάφορα περιβάλλοντα.....	7
1.3.1	454-πυροαλληλούχιση.....	8
1.3.2	Illumina (Solexa) sequencing.....	11
1.3.3	Ion Torrent.....	15
1.3.4	SOLiD	16
1.4	Σκοπός.....	23
2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
2.1	Δειγματοληψία στην περιοχή της Κρήτης.....	23
2.2	Απομόνωση περιβαλλοντικού γενετικού υλικού (eDNA)	28
2.3	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA	29
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	31
3.1	Trajectories.....	31
3.2	Χαρακτηρισμός βακτηριακής ποικιλότητας.....	33
3.3	Ετήσιας διακύμανσης.....	35
3.3.1	Σε επίπεδο γένους:.....	38
3.4	Ποιοτική παρουσίαση της ετήσιας διακύμανσης (heatmap).....	39
3.5	Εποχιακή διακύμανση.....	41
3.6	Στατιστική ανάλυση.....	48
4	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	54
5	ΑΝΑΦΟΡΕΣ	57
6	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	64
6.1	Πρωτόκολλα.....	64
6.2	Ανάλυση των δεδομένων με το βιοπληροφορικό πακέτο QIIME.....	65
6.3	Ρετροπορείες.....	68

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Προκαρυωτικοί οργανισμοί και περιβάλλον

ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΟΜΗ και ΡΟΛΟΣ

Οι μικροοργανισμοί είναι ένα πολύπλοκο κομμάτι του πλανήτη. Ως κύτταρα έχουν δεδομένη δομή ίσως με μικρές διαφοροποιήσεις οι οποίες μπορεί να δημιουργηθούν λόγω των συνθηκών επιβίωσης. Μια από τις βασικές δομές των κυττάρων είναι η κυτταρική μεμβράνη η οποία είναι ο φραγμός που διαχωρίζει το εσωτερικό του κυττάρου από το εξωτερικό περιβάλλον. Στο εσωτερικό του κυττάρου υπάρχουν οι δομές και οι χημικές ουσίες που του επιτρέπουν να λειτουργεί. Δομή με καθοριστική σημασία είναι ο πυρήνας ή το πυρηνοειδές, όπου εκεί βρίσκεται αποθηκευμένη η γενετική πληροφορία υπό τη μορφή δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA). Εξίσου καθοριστικό είναι και το κυτταρόπλασμα, όπου βρίσκονται στοιχεία που απαιτούνται για την ανάπτυξη και λειτουργία των κυττάρων. Ο ρόλος των μικροβίων είναι ιδιαίτερα σημαντικός για το πλανήτη αλλά και για τον άνθρωπο. Αρχικά τα βακτήρια και μονοκύτταροι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί όπως είναι το φυτοπλακτό είναι υπεύθυνα για το ήμισυ περίπου της

φωτοσύνθεσης στη γη. Τα περισσότερα φωτοσυνθετικά *Η γνώση πάνω στα βακτήρια κολυμπούν ελεύθερα στους ωκεανούς, οι οποίοι μικρόβια που διατηρούν καλύπτουν το 70% της επιφάνειας της γης. Τα βακτήρια τη ζωή στο πλανήτη και αυτά επηρεάζουν βασικές χημικές ισορροπίες στην στο ανθρώπινο σώμα*

ατμόσφαιρα επηρεάζοντας σημαντικές βιογεωχημικές *ξεπερνούν τα όρια της φαντασίας.* διεργασίες όπως είναι ο κύκλος του άνθρακα. Ακόμα σε ζώνες χωρίς φως χημειοσυνθετικά βακτήρια παρέχουν την απαραίτητη ενέργεια καθώς και τον οργανικό άνθρακα που οι άλλοι οργανισμοί έχουν ανάγκη. Τέλος οι μικροοργανισμοί και κυρίως τα βακτήρια λόγω των συμβιωτικών σχέσεων που αναπτύσσουν έχουν σημαντικό ρόλο καθώς οι επιπτώσεις αυτών των αλληλεπιδράσεων επηρεάζουν όλο το οικοσύστημα (1).

ΠΙΘΑΝΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ

Η έρευνα και η κατανόηση της Μικροβιακής Βιολογίας είναι καταλυτική για την οικονομία και την κοινωνία καθώς οι εφαρμογές και τα οφέλη της επεκτείνονται σε όλους τους παρακάτω τομείς:

- *Παραγωγή Ενέργειας:* Κατανόηση και εμπορική εκμετάλλευση των μηχανισμών με τους οποίους διάφοροι μικροοργανισμοί προσλαμβάνουν, μετασχηματίζουν και αποθηκεύουν ενέργεια για πιθανή ανθρώπινη χρήση. Για παράδειγμα το μεγαλύτερο μέρος του φυσικού αερίου (μεθάνιο) παράγεται από μεθανογόνους προκαρυωτικούς οργανισμούς (αρχαία). Άλλοι μικροοργανισμοί έχουν τη δυνατότητα εκμετάλλευσης της φωτεινής ενέργειας

για την παραγωγή βιομάζας, ενώ κάποιoi άλλοι έχουν την ικανότητα παραγωγής υδρογόνου (H₂) (2).

- *Εξυγίανση και Διαχείριση του Περιβάλλοντος*: Κατανόηση και εμπορική εκμετάλλευση των μεταβολικών διεργασιών των μικροοργανισμών στον καθαρισμό των οργανικών και ανόργανων στοιχείων που αντιπροσωπεύουν εστίες ρύπανσης του περιβάλλοντος (π.χ. μόλυνση από βαρέα μέταλλα) και ανάπτυξη διαγνωστικής τεχνολογίας για τη μέτρηση των επιπέδων και επιδράσεων των παθογόνων μικροοργανισμών στην ισορροπία των οικοσυστημάτων. Κατανόηση και εμπορική εκμετάλλευση βακτηριακών βιομορίων που θα χρησιμοποιηθούν σε ολοκληρωμένες μορφές διαχείρισης καλλιεργειών. Για παράδειγμα η πρωτεΐνη HgrZ από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Erwinia amylovora* χρησιμοποιείται για φυτοπροστατευτικούς σκοπούς με την ονομασία «Messenger» (2).
- *Γεωργία, Τρόφιμα και Υδατοκαλλιέργειες*: Παραγωγή θρεπτικών και ασφαλών τροφίμων, με παράλληλη διατήρηση του περιβάλλοντος, της χλωρίδας και πανίδας αυτού (αειφορική διαχείριση). Γενετική βελτίωση των φυτών με νέα εργαλεία γονιδιωματικής ανάλυσης βασισμένα σε μικροβιακούς βιοδείχτες αντοχής σε ασθένειες (2).
- *Ανθρώπινη Υγεία*: Ανακάλυψη μικροβιακών γονιδίων που θα αποτελέσουν νέους στόχους για εμβόλια και αντιβιοτικά, νέα διαγνωστικά τεστ και νέους δείκτες για διάφορες ασθένειες. Ας σημειωθεί ότι πολλά μικροβιακά γονίδια και ένζυμα με αποπτωτική/αντιαποπτωτική δράση ελκύουν το ενδιαφέρον (και κατοχυρώνονται ευρεσιτεχνειακά στις ΗΠΑ και αλλού) ως εν δυνάμει εργαλείων «πρωτεϊνικής θεραπείας» για ασθένειες όπως ο καρκίνος (2).
- *Βιοτεχνολογία*: κατανόηση και εμπορική εκμετάλλευση της δημιουργικής ικανότητας των μικροοργανισμών στην παραγωγή νέων προϊόντων που μπορεί να κυμαίνονται από νέα πολυμερή, ή θερμό- και ψυχρό- ανθεκτικούς καταλύτες έως νέα αντιβιοτικά και εναντιοσυνθέσεις. Η ανάπτυξη μιας ολόκληρης τεχνολογίας (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) βασίζεται σε ένα προκαρυωτικό γονίδιο (*Taq* πολυμεράση) (2).
- *Εξέλιξη Οργανισμών και Οικοσυστημάτων*: Συμβολή στην κατανόηση της προέλευσης και εξέλιξης της ζωής στη Γη. Κατανόηση της έννοιας του είδους, της δομής και λειτουργίας της μικροβιακής ποικιλότητας, το ρόλο της στη λειτουργία των οικοσυστημάτων, την απόκρισή της σε τοπικές και πλανητικές αλλαγές, τη μελέτη της ενδοειδικής ποικιλότητας και των μηχανισμών προσαρμογής σε διαφορετικά ενδιαίτηματα, των συμβιωτικών σχέσεων, την ανακάλυψη νέων βιοχημικών μονοπατιών, λειτουργιών, τη συμβολή στη μελέτη της βιολογίας και της καλλιεργησιμότητας των ειδών (2).

Ως «Βιολογική ποικιλότητα» εννοείται η ποικιλομορφία που εμφανίζει η ζωή σε όλα τα επίπεδα οργάνωσης της. Ο ορισμός περιλαμβάνει την ποικιλότητα μέσα σε ένα είδος

όπως και εκείνη μεταξύ διαφορετικών ειδών και μεταξύ των οικοσυστημάτων (από τη Σύμβαση του Rio de Janeiro για την Βιολογική Ποικιλότητα, άρθρο 2). Η βιοποικιλότητα διακρίνεται σε 3 τύπους κυρίως, τους α, β και γ.

- ✓ α-ποικιλότητα: η ποικιλότητα των ειδών μέσα σε μία βιοκοινότητα ή ενδιαίτημα
- ✓ β-ποικιλότητα: η μέτρηση του ρυθμού και της έκτασης της αλλαγής των ειδών από το ένα ενδιαίτημα στο άλλο. Συγκεκριμένα, μπορεί να εξετάζει και το ρυθμό μεταβολής μέσα στο χρόνο ή λαμβάνοντας υπόψη κάποια άλλη μεταβλητή.
- ✓ γ-ποικιλότητα: η αφθονία των ειδών σε ένα σύνολο ενδιαιτημάτων μιας γεωγραφικής περιοχής

Η βιοποικιλότητα υπολογίζεται μέσω δεικτών βασισμένων στην ποικιλότητα και την αφθονία των ειδών. Οι δείκτες αυτοί είναι οι εξής:

- ✓ Δείκτης Chao 1 αναλύει τον αριθμό των ειδών που υπάρχουν σε μια μικροβιακή κοινότητα.
- ✓ Δείκτης ποικιλότητας του Shannon (H') μετρά το βαθμό της αβεβαιότητας στην πρόβλεψη του είδους, στο οποίο ανήκει ένα άτομο που συλλαμβάνεται τυχαία.
- ✓ Δείκτης Simpson δείχνει την πιθανότητα για κάθε δυο άτομα που επιλέγονται τυχαία από έναν απείρως μεγάλο πληθυσμό να ανήκουν στο ίδιο είδος.

1.2 Ενδιαίτηματα

1.2.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΕΛΔΑΦΟΣ

Η μικροβιακή βιομάζα στο έδαφος αποτελεί περίπου το 5% του συνολικού οργανικού άνθρακα ενώ έχει αναγνωρισθεί ο σημαντικός ρόλος της όσον αφορά την ανακύκλωση των θρεπτικών στοιχείων αλλά και ως πηγή θρεπτικών στοιχείων συμβάλλοντας έτσι στην διατήρηση της γονιμότητας των εδαφών (3). Τους μεγαλύτερους πληθυσμούς των μικροοργανισμών τους συναντάμε στα πρώτα 30-40 εκατοστά βάθους στο έδαφος (4). Ο Metting εκτίμησε ότι ένα γραμμάριο γόνιμου εδάφους περιέχει 10^5 - 10^8 βακτήρια, 10^6 - 10^7 Actinomycetes και 10^5 - 10^6 είδη μυκήτων ή μικροβιακές αποικίες. Η μικροβιακή δραστηριότητα στο έδαφος είναι συνάρτηση της διαθεσιμότητας του άνθρακα, με την ριζόσφαιρα να παρουσιάζει μια σταθερή παροχή άνθρακα. Έτσι στην περιοχή της ριζόσφαιρας είναι αναμενόμενο η μικροβιακή βιομάζα αλλά και η μικροβιακή δραστηριότητα να είναι μεγαλύτερη από ότι στο υπόλοιπο έδαφος (5). Το έδαφος είναι ο χώρος κατοικίας για βακτήρια, μύκητες, πρωτόζωα, νηματώδης, έντομα και άλλους οργανισμούς. Όλοι αυτοί οι οργανισμοί συμβάλουν στον σχηματισμό και διατήρηση των εδαφών (6).

Τα βακτήρια είναι οι περισσότερο άφθονοι μικροοργανισμοί του εδάφους με πληθυσμό που κυμαίνεται από 10^5 έως 10^8 και σε κάποιες περιπτώσεις 10^9 κύτταρα ανά κυβικό

εκατοστό εδάφους και βάρος κατά προσέγγιση 10 τόνους ανά εκτάριο, ενώ η μάζα τους αντιστοιχεί στο 5% της οργανικής ουσίας ξηρού βάρους του εδάφους. Ο αριθμός τους ποικίλει ανάλογα με την εποχή, την υγρασία, τη μηχανική σύσταση, την οργανική ουσία, το οξυγόνο, τη θερμοκρασία, το pH, την καλλιέργεια του εδάφους και την λίπανση. Το μικρό τους μέγεθος, τα υψηλά επίπεδα πληθυσμού και η υψηλή ταχύτητα πολλαπλασιασμού τους τα καθιστούν το πιο ενεργό τμήμα της μικροβιακής χλωρίδας του εδάφους. Κατά κύριο λόγο συμβάλουν στην ανακύκλωση των στοιχείων (4). Τα περισσότερα βακτήρια που συναντούμε στο έδαφος είναι μεσόφιλα με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 25 °C έως 35°C με κατώτατα και ανώτατα όρια τους 15°C και 45°C. Λιγότερα είναι τα ψυχρόφιλα με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 20°C ή και λιγότερο, ενώ πολλά ανήκουν στα θεμόφιλα με άριστη θερμοκρασία που κυμαίνεται ανάμεσα στους 45°C και 65°C (1). Το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού των βακτηρίων εντοπίζεται στα δέκα πρώτα εκατοστά του εδάφους ενώ σε βάθος 100-120 εκατοστών ουσιαστικά μηδενίζεται. *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Clostridium*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus* είναι μερικά από τα πιο κοινά γένη στο έδαφος. Αρκετά συχνά θα συναντήσουμε είδη του γένους *Corynebacterium* ενώ από το γένος *Bacillus* τα πιο συχνά είδη είναι το *megaterium*, *cereus* και *subtilis* (5).

1.2.2 ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΑΕΡΑΣ

Η σύσταση της ατμόσφαιρας έχει χαρακτηριστεί ως μια θεματική αιχμής της βιολογικής έρευνας στη Γη. Η σύνθεση των μικροβιακών κοινοτήτων στην ατμόσφαιρα εξακολουθεί να μην είναι σαφώς καθορισμένη και οι μελέτες για την κατάταξη της βακτηριδιακής ποικιλότητας στον εξωτερικό αέρα μόλις έχουν αρχίσει να αναδύονται. Η βασική εκτίμηση είναι πως οι γνώσεις για τη λειτουργική δυνατότητα της μικροχλωρίδας του αέρα είναι ελάχιστες (7). Στον αέρα οι μικροοργανισμοί μπορούν να συνδεθούν με σωματίδια ή και να ενσωματωθούν σε σταγονίδια νερού από τα σύννεφα, ή την ομίχλη καθώς και σε κατακρημνίσματα (βροχή, χιόνι, χαλάζι)(8-13). Επιπλέον μπορούν να επιστρέψουν στην επιφάνεια της Γης μέσω υγρής ή ξηρής εναπόθεσης και να προκαλέσουν ενδεχομένως προβλήματα στην βιοποικιλότητα καθώς και τη λειτουργία των υδάτινων και χερσαίων οικοσυστημάτων. Μια από τις επιπτώσεις είναι και η επιβάρυνση της ανθρώπινης υγείας λόγω της διασποράς παθογόνων μικροβίων. Λαμβάνοντας υπόψη τις επιπτώσεις των μικροοργανισμών στο οικοσύστημα όπως επίσης και στην ανθρώπινη υγεία, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι τα μικρόβια του αέρα είναι μεταβολικά δραστήρια και καλά προσαρμοσμένα στις σκληρές καιρικές συνθήκες (7). Τα τελευταία χρόνια η παγκόσμια μεταφορά σκόνης θεωρείται ότι παίζει έναν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο σε πολλές γεωχημικές, κλιματικές και περιβαλλοντικές διεργασίες (14-17). Η σκόνη μπορεί να μεταφέρει μέταλλα και θρεπτικά συστατικά (18), μπορεί όμως να μεταφέρει και παράγοντες μόλυνσης (19) καθώς και ποικίλους μικροοργανισμούς που έχουν την δυνατότητα να βλάψουν την υγεία του οικοσυστήματος (20-24). Λαμβάνοντας υπόψη τις περίπλοκες και εκτεταμένες διαδρομές της ατμοσφαιρικής κυκλοφορίας, η αερομεταφερόμενη σκόνη μπορεί να μεταφέρει μικροοργανισμούς για μεγάλες αποστάσεις. Πολλά είναι τα οφέλη από τη βαθύτερη γνώση των πιθανά αερομεταφερόμενων βακτηρίων, μυκήτων, και ιών για τους τομείς της ανθρώπινης υγείας, της κτηνιατρικής πρόληψης και της προστασίας

των γεωργικών καλλιεργειών (25). Η αερομεταφερόμενη σκόνη περιέχει βακτήρια, μύκητες, ιούς και τα σποριά τους. Παρόλα αυτά ο αριθμός των καλλιεργήσιμων οργανισμών είναι κάτω του 1% (26). Μελέτες που έχουν γίνει βασιζόμενες στις καλλιέργειες μικροοργανισμών υποστηρίζουν πώς η μικροβιακή πυκνότητα εξαρτάται από την εποχή και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (26-28). Αυξημένη παρουσιάζεται κατά τους καλοκαιρινούς μήνες όπως επίσης και το φθινόπωρο ενώ τους μήνες Δεκέμβριο με Φεβρουάριο είναι ιδιαίτερα χαμηλή (27). Καθώς οι τεχνικές που χρησιμοποιούν την καλλιέργεια ως μέσο αναγνώρισης της μικροβιακής ποικιλότητας κρίθηκαν αναποτελεσματικές, πλέον χρησιμοποιούνται πιο άμεσες μοριακές προσεγγίσεις στο πλαίσιο της μεταγονιδιωμικής ώστε να διευκρινιστεί η σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας (28). Η εμφάνιση νέων λοιμωδών νόσων σε πολλά μέρη του κόσμου (29) και η αναβίωση των παλαιών όπως η φυματίωση και η μηνιγγίτιδα υποστηρίζουν την άποψη πώς οι συνέπειες που σχετίζονται με την εναέρια μεταφορά των μικροβίων μεταξύ των εθνών και των ηπείρων αποτελούν απειλή (30,31). Η ατμόσφαιρα αποτελείται από ένα μίγμα σωματιδίων που περιέχουν μεταβλητά κλάσματα στερεών συστατικών και ρύπων, αποτελεί λοιπόν ένα φορέα παθητικής μεταφοράς διαφορετικών οργανισμών (32-34).

Μετά το 2000 το U.S. Geological Survey στο St. Petersburg, της Φλόριντα, ξεκίνησε το παγκόσμιο πρόγραμμα σκόνης που στηρίχθηκε οικονομικά από τη NASA με στόχο να διερευνηθεί κατά πόσο μεταφέρονται ζωντανοί μικροοργανισμοί στις μάζες σκόνης (ξεκίνησε με σκόνη από την περιοχή της Sahara) (35). Οι ερευνητές εξετάζοντας τις αλληλουχίες του ριβοσωμικού DNA, ήταν σε θέση να χαρακτηρίσουν 200 διαφορετικά είδη βακτηρίων και μυκήτων σε δείγματα που συλλέχτηκαν το 2000 κατά τη διάρκεια ενός φαινομένου μεταφοράς σκόνης (36).

Πολλοί από τους μικροοργανισμούς που χαρακτηρίστηκαν στη σκόνη της Σαχάρας είναι γνωστό, από κλινικά αρχεία, ότι προκαλούν αναπνευστικές ασθένειες (αλλεργικές αντιδράσεις, άσθμα, και πνευμονικές λοιμώξεις), των καρδιαγγειακών παθήσεων, ή λοιμώξεις του δέρματος (37). Άλλοι μικροοργανισμοί που βρίσκονται στην αερομεταφερόμενη σκόνη είναι γνωστό ότι προκαλούν παθήσεις όπως η πανούκλα, ο άνθρακας (36,39), ασθένειες των ποδιών και του στόματος (23), προβλήματα σε ζώα και φυτά (40-42). Επιπλέον η συσχέτιση μεταξύ των μικροοργανισμών και των ατμοσφαιρικών ρύπων όπως είναι τα σωματίδια διαμέτρου 2,5 και 10 (43) θα μπορούσε να υποδεικνύει ένα μηχανισμό μεταφοράς και διασποράς. Η Ευρώπη εκτίθεται σε μια μεγάλης κλίμακας μεταφορά σκόνης, με 80120Tg σκόνης ετησίως να μεταφέρονται σε όλη την Ευρώπη από την Αφρικανική ήπειρο (44,45). Ειδικότερα, η αερομεταφερόμενη σκόνη μπορεί να καταλήξει σε υψόμετρο έως και 8 χιλιόμετρα στην ατμόσφαιρα πάνω από τη λεκάνη της Μεσογείου (46).

1.3 Μέθοδοι ταυτοποίησης μικροβιακού φορτίου σε διάφορα περιβάλλοντα

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ

Όπως αναφέρθηκε η επιβίωση των μικροβίων σε ακραίες συνθήκες έχει επιτευχθεί αναπτύσσοντας πολλές και διάφορες στρατηγικές. Πιο συγκεκριμένα το γονιδίωμα

τους περιέχει ένα ευρύ φάσμα γενετικής πληροφορίας που επιτρέπει κατάλληλους βιοχημικούς μετασχηματισμούς προκειμένου να ανταπεξέλθουν επιτυχώς στο περιβάλλον που ζουν, ενώ συσσωρευμένες αλλαγές στο DN, που συνέβησαν σταδιακά και περιλαμβάνουν προσαρμογές σε περιβαλλοντικές αλλαγές τους, έχουν δώσει την ικανότητα της εξελικτικής επιβίωσης (47).

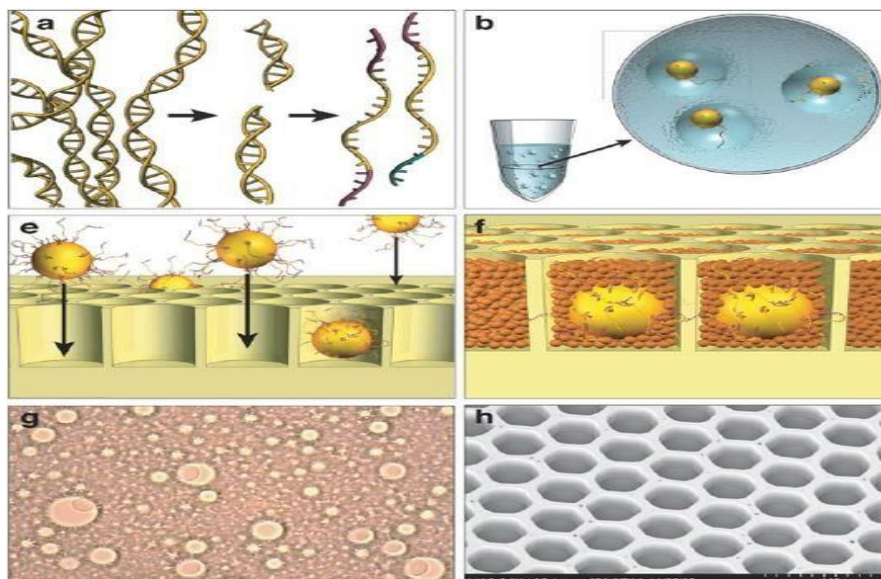
Τα μικρόβια είναι η πιο διαδεδομένη φυλογενετική ομάδα. Η πλειοψηφία των μικροοργανισμών αυτών χαρακτηρίζεται με μοριακές τεχνικές οι οποίες δεν στηρίζονται σε μεθόδους καλλιέργειας αλλά χρησιμοποιούν συντηρημένα γονίδια δείκτες, όπως το RNA της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας (48,49). Παρά το γεγονός ότι τα μικρόβια είναι μια τόσο σημαντική ομάδα, ο χαρακτηρισμός, η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση τους παραμένει πρόκληση παρά τα μοριακά εργαλεία που διατίθενται (50,51). Η πιο σημαντική επανάσταση στη μικροβιακή οικολογία ήταν η χρήση των αλληλουχιών DNA σε φυλογενετικές μελέτες. Αυτή η μεταμόρφωση της μικροβιολογίας αποκάλυψε πως η προκαρυωτική ποικιλότητα είναι ιδιαίτερα υποτιμημένη με τη χρήση κλασσικών μεθόδων καλλιέργειας (47,48,52,53). Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας η μεταγονιδιωματική συνδυάστηκε με τεχνολογίες νέας γενιάς, κάτι που έχει δώσει ιδιαίτερη ώθηση στη μικροβιακή οικολογία (54,55). Η χρήση της μεταγονιδιωματικής προσέγγισης οδήγησε στην ανακάλυψη νέων γονιδιωμάτων από πολλά μη καλλιεργήσιμα μικρόβια (56-58). Η χρήση της προσέγγισης αυτής λειτουργεί άψογα σε οικοσυστήματα χαμηλής έως μέτριας πολυπλοκότητας. Σε οικοσυστήματα μεγάλης ποικιλότητας η συγκεκριμένη προσέγγιση δεν είναι αποτελεσματική καθώς η μεγάλη ετερογένεια των δειγμάτων αυτών δεν ευνοεί την ανάλυση. Ένας τρόπος να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα είναι να χρησιμοποιηθεί η τεχνική της γονιδιωματικής του ενός κυττάρου (Single Cell Genomics) προσέγγιση που αναπτύχθηκε πρόσφατα και επιτρέπει την ανάλυση του γονιδιώματος του κάθε μέλους της κοινότητας (59,60). Η αρχή των σύγχρονων μεθόδων αλληλούχισης ξεκίνησε με την ολοκλήρωση του πρώτου χάρτη καταγραφής του ανθρώπινου γονιδιώματος (61,62,63). Αυτό ήταν το σημείο καμπής στην ανάπτυξη βελτιωμένων στρατηγικών αλληλούχισης οι οποίες ονομάστηκαν νέες τεχνολογίες αλληλούχισης. Η βασική αρχή λειτουργίας των τεχνολογιών αυτών είναι η παράλληλη αλληλούχιση μορίων DNA. Η αλληλούχιση γίνεται είτε σε πραγματικό χρόνο συνεχόμενα είτε σε βήματα με επαναληπτικό τρόπο (64). Αυτή τη στιγμή είναι διαθέσιμες 6 πλατφόρμες από τις τεχνολογίες δεύτερης και τρίτης γενιάς.

1.3.1 454-πυροαλληλούχιση

Η μέθοδος της πυροαλληλούχισης έχει εξελιχθεί ώστε να γίνει περισσότερο αποδοτική και λιγότερο δαπανηρή. Η νέα μέθοδος συνδυάζει τις ιδιότητες της χρήσης του πυροφωσφορικού πάνω σε στερεό υπόστρωμα οπτικών ινών με 1600000 μεμονωμένα φρεάτια (65). Έτσι είναι ικανή να προσφέρει αλληλούχιση 25 εκατομμυρίων βάσεων σε τέσσερις ώρες με σχετικά μεγάλη ακρίβεια. Για τη δημιουργία εκμαγείων αλληλούχισης τμήματα DNA ενισχύονται σε μικροσφαιρίδια μέσα σε σταγονίδια γαλακτώματος. Τα σφαιρίδια στα οποία έχουν ενσωματωθεί τα εκμαγεία τοποθετούνται στο εσωτερικό των φρεατίων, μετατρέποντάς τα σε αντιδραστήρες αλληλούχισης χρησιμοποιώντας την μέθοδο της πυροαλληλούχισης.

Διαδικασία

Αρχικά δημιουργούνται βιβλιοθήκες από θραύσματα του DNA. Το πλήρες γονιδίωμα τεμαχίζεται τυχαία και στα τμήματα αυτά προστίθενται κατάλληλοι προσαρμογείς ώστε να προσδεθούν στα μικροσφαιρίδια. Τα τμήματα του DNA που έχουν προσκολληθεί πάνω στα μικροσφαιρίδια πολλαπλασιάζονται με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε γαλάκτωμα (66).



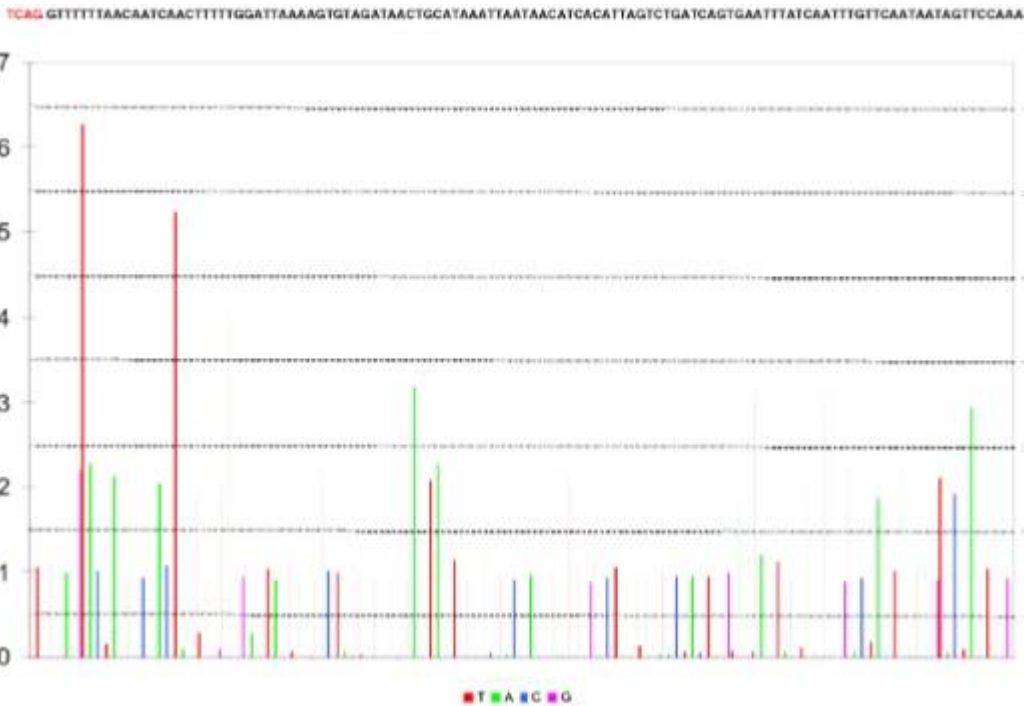
Εικόνα 1 : Προετοιμασία του δείγματος. a. Το γονιδιακό DNA απομονώνεται, τεμαχίζεται, συνδέεται σε προσαρμογείς και χωρίζεται σε μονές έλικες. b. Στη συνέχεια συνδέονται σε σφαιρίδια ένα κατά προτίμηση. Αυτά με την μέθοδο της PCR πολλαπλασιάζονται με αποτέλεσμα το κάθε μικροσφαιρίδιο να μεταφέρει δέκα εκατομμύρια αντίγραφα του αρχικού. c. Τα μικροσφαιρίδια τοποθετούνται στο εσωτερικό φρεατίων πάνω σε επιφάνεια οπτικών ινών. d. Τα σφαιρίδια που θα αλληλουχηθούν με πυροφωσφορικό θα τοποθετηθούν στο εσωτερικό φρεατίων που περιέχουν κατάλληλα ένζυμα. e. Φωτογραφία στην οποία φαίνονται σταγόνες που περιέχουν σφαιρίδια και κενές θέσεις. f. Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στην οποία φαίνονται τα φρεάτια πριν την τοποθέτηση των μικροσφαιριδίων (103).

Σε αντίθεση με τις άλλες μεθόδους στην παρούσα δεν απαιτείται υποκλωνοποίηση σε βακτήρια ή διαχείριση μεμονωμένων κλώνων, τα εκμαγεία διακινούνται ελεύθερα στο γαλάκτωμα (66). Χρησιμοποιώντας την μέθοδο της πυραλληλούχισης η αλληλούχιση επιτυγχάνεται άμεσα από τα ανοιχτά φρεάτια μικρού μεγέθους των οπτικών ινών. Κάθε πλακίδιο οπτικής ίνας περιέχει εξαγωνικά πηγάδια διαμέτρου 55μm που περιβάλλεται από επένδυση 2-3μm. Το κάθε φρεάτιο έχει όγκο 75pL και σε κάθε πλακίδιο περιέχονται 480 πηγάδια/mm². Το κάθε πλακίδιο περιέχει 1,6 εκατομμύρια πηγάδια τα οποία γεμίζουν με τα μικροσφαιρίδια τα οποία τοποθετούνται σε θάλαμο, ο οποίος έχει σχεδιαστεί να περιέχει κανάλια ύψους 300μm πάνω από το ύψος των πηγαδιών μέσω των οποίων γίνεται η ροή των αντιδραστηρίων αλληλουχίας. Η μη χαραγμένη βάση του πλακιδίου είναι σε οπτική επαφή με αισθητήρα CCD κάμερας. Έτσι τα εκπεμπόμενα φωτόνια από κάθε πηγάδι αποτυπώνονται (67). Στο θάλαμο ροής κυκλικά παραδίδονται αντιδραστήρια τα οποία επιτρέπουν την επέκταση των

προτύπων. Ο χρόνος διάχυσης προς και από τα πηγάδια είναι περίπου 10 sec αλλά μπορεί να διαφοροποιηθεί ανάλογα με τις διαστάσεις του πηγαδιού και το ύψος του καναλιού ροής. Το βάθος του κάθε πηγαδιού εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, αλλά θα πρέπει:

- i) Να καλύπτει τα μικροσφαιρίδια κατά την μεταφορά των αντιδραστηρίων. ii) Να παρέχει απομόνωση ώστε να αποτραπεί η διάχυση των υποπροϊόντων από το ένα πηγάδι στο άλλο
- iii) Να είναι αρκετά ρηχό ώστε να επιτρέπει την ταχεία διάδοση των νουκλεοτιδίων μέσα από τα πηγάδια και γρήγορη απομάκρυνση των νουκλεοτιδίων που δεν έχουν συνδεθεί στο τέλος του κάθε κύκλου (68).

Κάθε σύνδεση νουκλεοτιδίου γίνεται αντιληπτή από την απελευθέρωση του πυροφωσφορικού με την ταυτόχρονη παραγωγή φωτονίου. Κάθε πηγάδι που περιέχει μικροσφαιρίδιο προσδιορίζεται από την ανίχνευση μια σειράς τεσσάρων γνωστών νουκλεοτιδίων που ορίζονται ως «κλειδί» αλληλούχισης στην αρχή της ανάγνωσης. Ανάλογα με τον αριθμό των νουκλεοτιδίων που θα συνδεθούν θα εκπεμφθεί στη συνέχεια και το αντίστοιχο ποσό πυροφωσφορικού και φωτονίων (68).



Εικόνα 2: Διάγραμμα ροής 113 βάσεων. Τα νουκλεοτίδια τοποθετούνται με την σειρά T, A, C, G. Η αλληλουχία των βάσεων φαίνεται πάνω από το διάγραμμα. Το εύρος του σήματος φαίνεται στην δεξιά στήλη. Οι πρώτες τέσσερις βάσεις που υπάρχουν στην αλληλουχία τοποθετούνται για να ελεγχτεί αν το φρεάτιο περιέχει μικροσφαιρίδιο με κλάδο DNA (104).

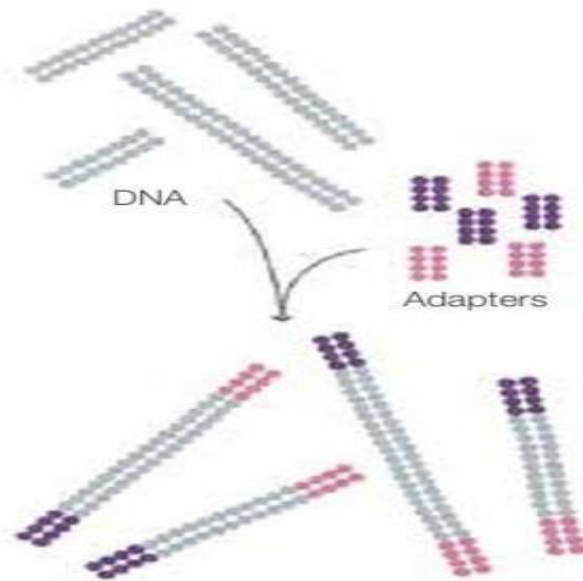
1.3.2 Illumina (Solexa) sequencing

Η βασική ιδέα, πάνω στην οποία στηρίχτηκε ο S. Balasubramanian και ο D. Klenerman από το Cambridge University το 1990, δεν έχει αλλάξει ριζικά από τις υπάρχουσες μεθόδους αλληλούχισης. Είναι παρόμοια μ' αυτή της αλληλούχισης με ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμίδης μέσα σε τριχοειδείς διαδρομές. Χρησιμοποιούν νουκλεοτίδια τα οποία έχουν σημανθεί με φθορίζουσα ουσία ώστε να γίνεται εφικτή η παρακολούθηση, με διαδοχικές επαναλήψεις, της δράσης της πολυμεράσης σε μονόκλωνο DNA το οποίο έχει ακινητοποιηθεί σε μια επιφάνεια (67). Η βασική διαφορά από τις παλαιότερες μεθόδους αλληλούχισης είναι ότι η προσθήκη των νουκλεοτιδίων δεν γίνεται μεμονωμένα αλλά ταυτόχρονα – παράλληλα σε πολλούς κλώνους του DNA. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται και ως reversible διότι ο τερματισμός της προσθήκης βάσεων δεν είναι μόνιμος, όπως γίνεται στην μέθοδο του Sanger, αλλά μπορεί να αναστραφεί και να συνεχιστεί μετά από μια διαδικασία “επιδιόρθωσης” του τμήματος που σταμάτησε την προσθήκη. Η παρουσία του H^+ στη θέση επέκτασης της αλληλούχισης κατά Sanger θα σταματούσε την διαδικασία μη αναστρέψιμα (μόνιμα). Η παρουσία όμως ομάδων που μπορούν να αντικατασταθούν από μια ομάδα υδροξυλίου μπορούν να συνεχίσουν την επέκταση της αλυσίδας ελεγχόμενα (69).

Διαδικασία

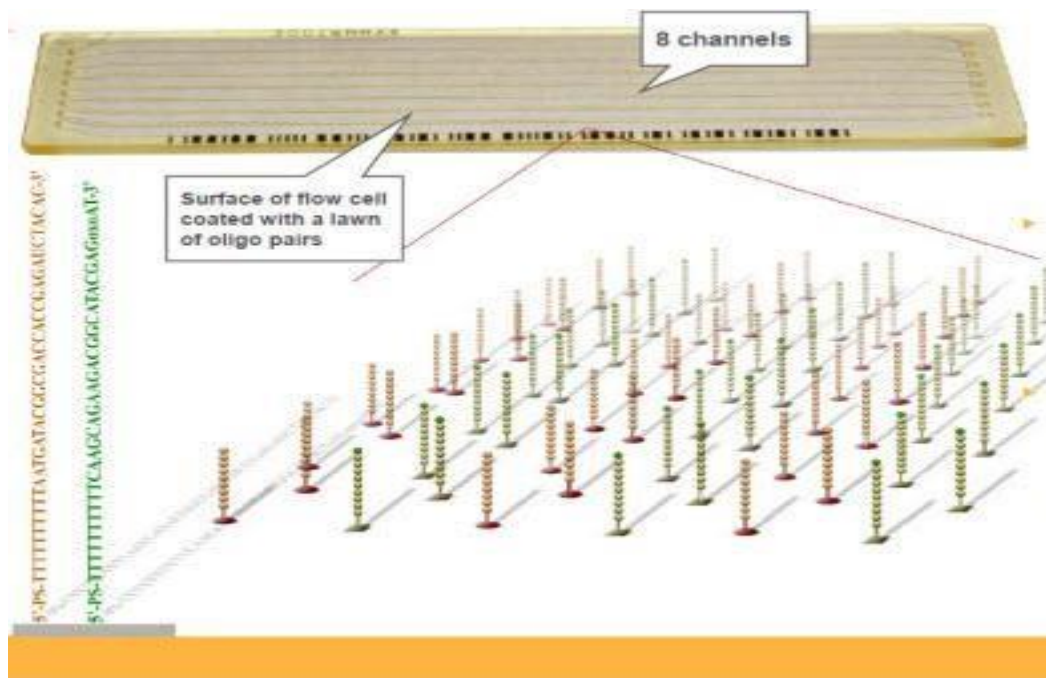
Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει τη δημιουργία συστάδων, δηλαδή τον πολλαπλασιασμό του δείγματος. Το δείγμα του DNA που έχει επιλεγεί τεμαχίζεται σε μικρότερα

τμήματα μήκους περίπου 400 bp. Τμήματα με μικρό αριθμό βάσεων – νουκλεοτιδίων (υποδοχείς) των οποίων την αλληλουχία την γνωρίζουμε, προσδένονται στα άκρα τους.



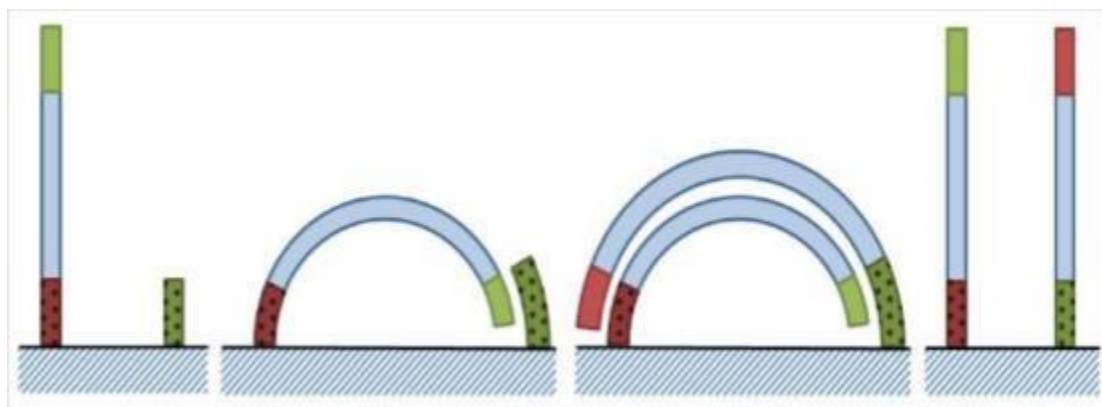
Εικόνα 3: Προετοιμασία του δείγματος. Τυχαία τμήματα συνδέονται με υποδοχείς στο άκρο τους (105) .

Τα μικρά αυτά τμήματα λειτουργούν σαν λαβές που σκοπό τους έχουν την ακινητοποίηση του DNA, επιτρέποντας όμως τις επαναλαμβανόμενες αντιδράσεις, στην κυψελίδα ροής (70). Επίσης οι υποδοχείς δημιουργούν περιοχές στις οποίες μπορούν να προσδεθούν οι εκκινητές για τις αντιδράσεις αλληλούχισης. Στην συνέχεια το δείγμα εγγέεται στην κυψελίδα ροής, η οποία περιέχει πυκνά προσδεμένα πάνω σ' αυτή τμήματα oligo-νουκλεοτιδίων, στα οποία με την σειρά τους θα προσδεθούν οι υποδοχείς που πριν ενσωματώθηκαν στα τμήματα του DNA. Η πυκνότητα ελέγχεται με προσοχή ώστε να υπάρχει μόνο ένας κλώνος σε μια συγκεκριμένη περιοχή του πλακιδίου ροής (71).



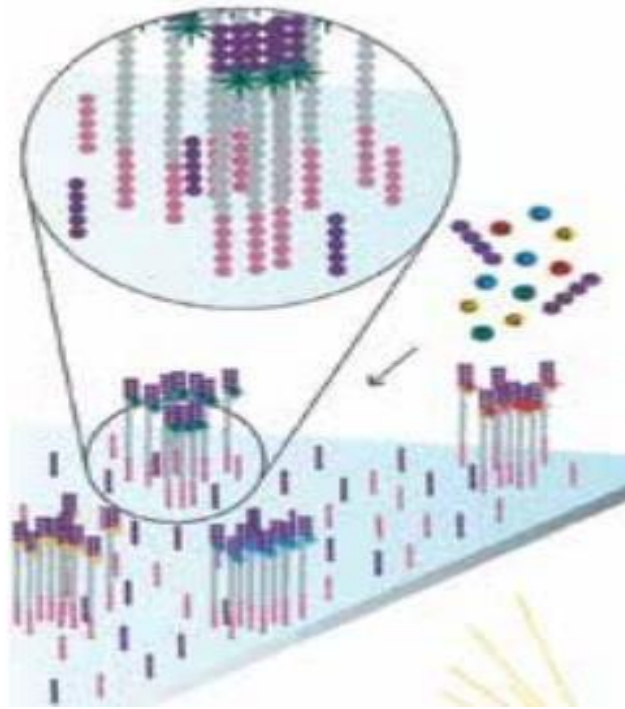
Εικόνα 4: Τμήματα DNA τοποθετημένα σε κυψέλες ροής (106)

Τα τμήματα πολλαπλασιάζονται με την μέθοδο της γεφύρωσης PCR. Με την διαδικασία αυτή, το προς αλληλούχιση τμήμα πολλαπλασιάζεται δημιουργώντας μια πυκνή συστοιχία μονών κλάδων του DNA της τάξης των χιλιάδων πανομοιότυπων αντιγράφων, σε μια συγκεκριμένη περιοχή της κυψέλης ροής (Εικ. 5).



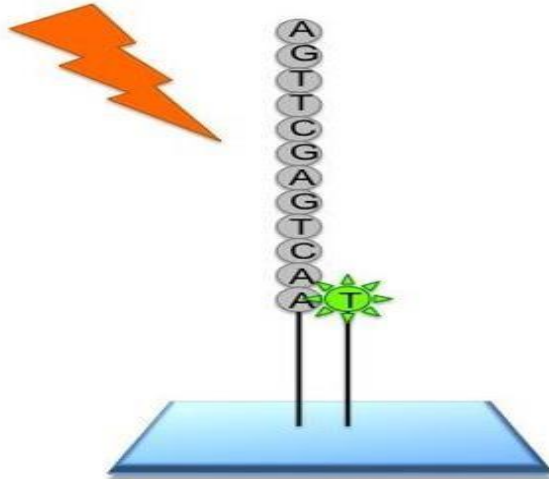
Εικόνα 5: Τρόπος πολλαπλασιασμού αλληλουχιών στην τεχνολογία Illumina. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι τον σχηματισμό πυκνών συστοιχιών. Τα κόκκινα και πράσινα τμήματα είναι οι εκκινητές που συνδέθηκαν με το τμήμα αλληλούχισης. Οι πούα περιοχές είναι αυτές που έχουν συνδεθεί με το πλακίδιο. Όταν ολοκληρωθεί η ενίσχυση τα τμήματα μπορούν να αλληλουχηθούν από κάθε πλευρά (107).

Κατά την διαδικασία του πολλαπλασιασμού με την μέθοδο της γεφύρωσης με PCR προκύπτουν δίκλωνα μόρια DNA τα οποία μετουσιώνονται και προκύπτουν στην συνέχεια τα μονόκλωνα που επιθυμούμε.



Εικόνα 6: Συστοιχίες τμημάτων DNA(105)

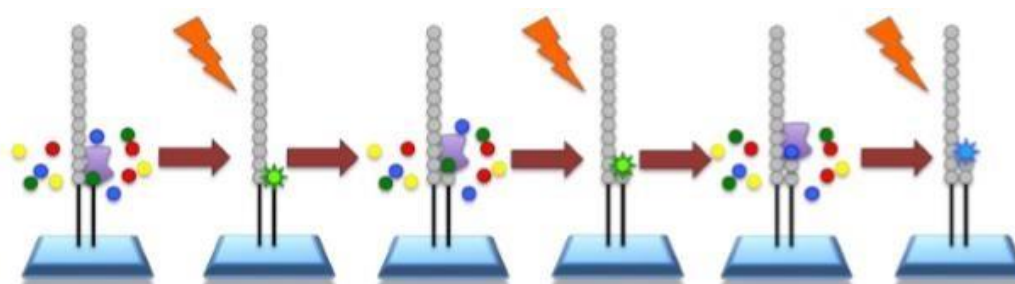
Αυτές οι συστοιχίες στη συνέχεια θα αλληλουχηθούν. Συνεχίζουν να είναι ακινητοποιημένες στην κυψελίδα ροής, η οποία μπορεί να περιέχει εκατομμύρια συστοιχιών, δέκα μονόκλωνες συστοιχίες ανά τετραγωνικό εκατοστό, οι οποίες είναι διαχωρισμένες μεταξύ τους ώστε να είμαστε σε θέση να διακρίνουμε την διαφορετική ακτινοβολία που θα εκπέμπεται κάθε φορά (72).



Εικόνα 7: Εκπομπή φωτός μετά την ενσωμάτωση του νουκλεοτιδίου (108).

Η αλληλούχιση πραγματοποιείται με την σύνθεση του μονού κλάδου του DNA σε δίκλωνο, προσθέτοντας ένα νουκλεοτίδιο κάθε φορά. Συγκεκριμένα στην κυψελίδα ροής προστίθενται εκκινητές που θα προσδεθούν στο μονόκλωνο DNA ώστε να είναι δυνατή η προσθήκη νουκλεοτιδίων. Στη συνέχεια θα προστεθούν και τα τέσσερα είδη

νουκλεοτιδίων, με την χαρακτηριστική ομάδα 3'-O-azidomethyl 2'-deoxynucleoside triphosphates (A, C, G και T) με διαφορετικό χρώμα ταυτόχρονα, με την ταυτόχρονη παρουσία της DNA πολυμεράσης η οποία θα καταλύσει την προσθήκη τους. Οι βάσεις που πρόκειται να προστεθούν και να συμπληρώσουν τον κλάδο εκμαγείο έχουν μια ιδιαιτερότητα. Δεν σταματούν την προσθήκη της επόμενης βάσης μόνιμα, αλλά παροδικά. Η κάθε συστοιχία όπως περιγράφηκε παραπάνω αποτελείται από μονόκλωνο DNA του ίδιου είδους, η διπλανή αλλά και οι επόμενες είναι διαφορετικές μεταξύ τους. Όταν προστεθεί ένα νουκλεοτίδιο το οποίο περιλαμβάνει την ουσία που εκπέμπει το φωτεινό σήμα από τον ένα κλάδο και το επόμενο στον διπλανό αλλά και σε όλους τους υπόλοιπους κλάδους θα εκπεμφθεί σήμα ισχυρό το οποίο είναι εύκολο να παρατηρηθεί. Τα νουκλεοτίδια τα οποία δεν έχουν ενσωματωθεί απομακρύνονται με έκπλυση. Το νουκλεοτίδιο το οποίο έχει τοποθετηθεί εξ αιτίας της παρουσίας κατάλληλης ομάδας O-R, όπου R ο αντιστρέψιμος όρος ο οποίος θα απομακρυνθεί, στην θέση 3' δεν επιτρέπει την προσθήκη της επόμενης βάσης (73).



Εικόνα 8: Η διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές μέχρι την πλήρη αλληλούχιση του τμήματος (108).

Οι τερματικοί όροι απομακρύνονται από την tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) μαζί με την φθορίζουσα ουσία, και την άμεση δημιουργία της 3' ύδροξυ ομάδας ώστε να είναι δυνατή η προσθήκη της επόμενης βάσης η οποία με την σειρά της θα εκπέμψει φωτεινό σήμα ίδιου χρώματος, αν είναι ίδια με την προηγούμενη ή διαφορετικού αν είναι διαφορετική. Το σήμα της κάθε προσθήκης αναγνωρίζεται άμεσα και η πιθανότητα σφάλματος στην αναγνώριση ελαχιστοποιείται (74). Τα δεδομένα αυτά θα οδηγηθούν σε ηλεκτρονική επεξεργασία. Σκοπός αυτής της επεξεργασίας είναι να ευθυγραμμιστούν τα δεδομένα που προέρχονται από διάφορα σημεία του DNA τα οποία με τυχαίο τρόπο τεμαχίστηκαν.

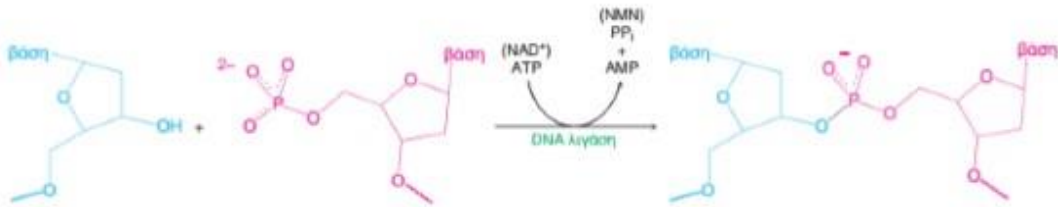
1.3.3 Ion Torrent

Η Τεχνολογία αλληλουχίας ημιαγωγών είναι παρόμοια με την 454 εκτός από το ότι ανιχνεύει πρωτόνια που ελευθερώνονται κατά τον πολυμερισμό του DNA και χρησιμοποιεί ένα μικροτσίπ ημιαγωγών για να διαβάσει τα βακτηριακά γονιδιώματα (75). Αυτή η χρήση κάνει την τεχνολογία Ion Torrent απλούστερη, ταχύτερη και πιο αποδοτική από άλλες τεχνολογίες αλληλούχισης νέας γενιάς. Σε αντίθεση με την Illumina και την 454, η Ion Torrent δεν κάνει χρήση οπτικών σημάτων. Αντίθετα

εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι η προσθήκη ενός διδεοξυνουκλεοτιδίου (dNTP) σε ένα κλώνο DNA απελευθερώνει ένα ιόν υδρογόνου. Η Ion Torrent αγοράστηκε από την Life Technologies το 2010. Οι πρώτες πλατφόρμες, Ion Personal Genome Machine (PGM), κυκλοφόρησαν στα τέλη του 2010, ενώ τον Σεπτέμβριο του 2012 ξεκίνησε ο Ion Proton με δυνατότητες μεγάλης παραγωγής. Αισθητήρες ιόντων χρησιμοποιούνται για να ανιχνεύουν αλλαγές στο pH από τα ιόντα που απελευθερώνονται κατά την προσθήκη των βάσεων κατά τη σύνθεση του DNA σε κάθε θέση αντίδρασης. Οι αλλαγές στο pH μας επιτρέπουν να προσδιορίσουμε εάν η βάση ή πόσες βάσεις προστέθηκαν στην αλληλουχία που είναι να διαβαστεί. Για να αυξηθεί η απόδοση, η Ion Torrent, χρησιμοποιεί μια εξαιρετικά πυκνή διάταξη μικροστών στις οποίες κάθε φρεάτιο δρα ως θάλαμος αντίδρασης πολυμερισμού DNA. Σε κάθε φρεάτιο υπάρχουν τμήματα DNA, ένα είδος dNTP, ρυθμιστικά και πολυμεράση. Κάτω από το στρώμα των φρεατίων υπάρχει μια παράλληλη συστοιχία αισθητήρων ημιαγωγών για να εκτελέσει απευθείας την μέτρηση των ιόντων υδρογόνου που παράγονται. Με επαναλήψεις, πολλαπλά μόρια dNTPs θα ενσωματωθούν σε έναν κύκλο. Αυτό οδηγεί στην απελευθέρωση περισσότερων πρωτονίων και υψηλότερο αναλογικά ηλεκτρονικό σήμα. Η σειρά των ηλεκτρικών παλμών που μεταδίδεται από το τσιπ σε έναν υπολογιστή μεταφράζεται σε μια αλληλουχία DNA. Ενώ αυτή η μέθοδος ανίχνευσης που βασίζεται στην αλληλούχιση ιόντων με σύνθεση προσφέρει μεγάλες δυνατότητες για τη μείωση του κόστους της αλληλούχισης, υπάρχουν αρκετοί περιορισμοί σε σχέση με την πλήρη αλληλούχιση γονιδιωμάτων. Ο Ion PGM στοχεύει κυρίως μικρά γονιδιώματα με απόδοση έως και 1 Gbp. Ο νεοσύστατος Ion Proton χρησιμοποιεί μεγαλύτερα τσιπ με υψηλότερες πυκνότητες και είναι σε θέση να παράγει 10 Gbp ανά αντίδραση. Αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν την τεχνολογία κατάλληλη για εξώμια και αλληλούχιση ολόκληρων γονιδιωμάτων. Τα μικρά μήκη ανάγνωσης και η αδυναμία απαρίθμησης υψηλού αριθμού επαναλήψεων του γονιδιώματος αποτελεί μειονέκτημα για τη διαδικασία αλληλούχισης και για *de novo* συναρμολόγηση του γονιδιώματος. Τέλος, σφάλμα μπορεί να προκύψει, εάν τα φρεάτια αντίδρασης δεν καθαρίζονται σωστά μεταξύ των βημάτων της αντίδρασης, με ένα ποσοστό σφάλματος που φτάνει το 1,78% (76,77) .

1.3.4 SOLiD

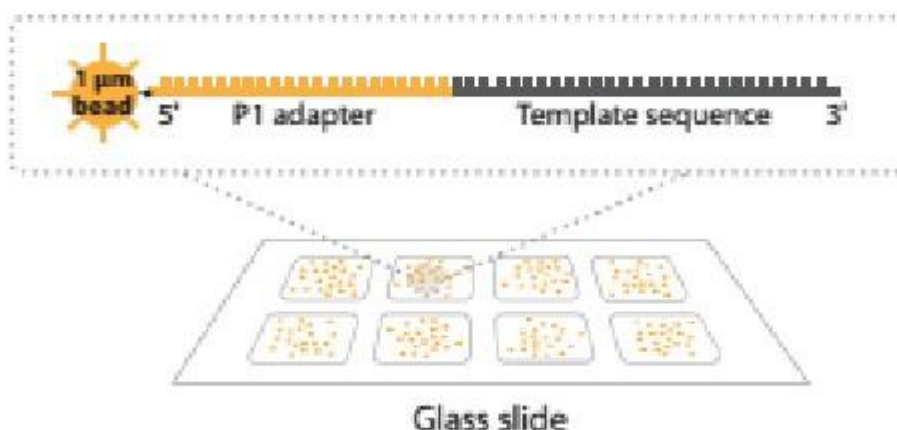
Η μέθοδος αυτή της οποίας η ονομασία προέρχεται από την αλληλούχιση με χρήση ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία συντίθενται με DNA λιγάση, τα οποία στη συνέχεια θα αναγνωριστούν (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection). Την μέθοδο αυτή δεν θα πρέπει να την συγχέουμε με τις άλλες μεθόδους αλληλούχισης, οι οποίες στηρίζονται στην αλληλούχιση με την μέθοδο της σύνθεσης των νουκλεοτιδίων. Αντ' αυτού χρησιμοποιεί την σύνδεση ολιγονουκλεοτιδίων με μήκος οκτώ ή εννέα βάσεων κάθε φορά, οι οποίες έχουν σημειωθεί με φθορίζουσα ουσία για τον προσδιορισμό δύο βάσεων του εκμαγείου κάθε φορά. Με αυτή την μέθοδο μειώθηκε το κόστος αλληλούχισης από 0,01\$/νουκλεοτίδιο το 2004 στο 0,0001\$/νουκλεοτίδιο αυξάνοντας τον αριθμό των νουκλεοτιδίων που αλληλουχήθηκαν από το 1000000 νουκλεοτίδια την ημέρα στα 5000000000 νουκλεοτίδια την ημέρα το 2009(78).



Εικόνα 9 Η αντίδραση της DNA λιγάσης. Η DNA λιγάση καταλύει τη σύνδεση ενός κλώνου DNA που έχει μια ελεύθερη 3'-υδροξυλική ομάδα με έναν άλλο που έχει μια ελεύθερη 5'- φωσφορική ομάδα. Στα ευκαρυωτικά και τα αρχαία, η ATP διασπάται προς AMP και PPi για να προωθήσει την αντίδραση αυτή. Στα βακτήρια, το NAD⁺ διασπάται προς AMP και νικοτιναμινομονονουκλεοτίδιο (NMM) (109).

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα που έχει η DNA λιγάση, συγκεκριμένα δεν μπορεί να συνδέσει δύο μόρια μονόκλωνου DNA ή να κυκλοποιήσει μονόκλωνο DNA, αντιθέτως έχει την ικανότητα να κλείνει ανοίγματα σε δίκλινα μόρια DNA (79). Το ένζυμο αυτό καταλύει τον σχηματισμό ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της 3'-υδροξυλικής ομάδας στο άκρο της μιας αλυσίδας του DNA και της 5'φωσφορικής ομάδας στο άκρο της άλλης. Αρχικά, και σ' αυτή την μέθοδο είναι η παραγωγή του δείγματος το οποίο πρόκειται να αλληλουχηθεί. Κατά την διαδικασία της αλληλούχησης η συσκευή επεξεργάζεται ταυτόχρονα δύο κυψελίδες ροής. Ο πολλαπλασιασμός του δείγματος γίνεται εφαρμόζοντας την μέθοδο emPCR κάνοντας χρήση μαγνητικών μικροσφαιριδίων επιφάνειας 1μm με σκοπό την παραγωγή ικανού σήματος κα την διάρκεια της διαδικασίας της αλληλούχησης (66). Αυτό το πολύ μικρό μέγεθος των σφαιριδίων προσφέρει στη SOLiD την απαιτούμενη χωρητικότητα ώστε να παράγει μεγαλύτερο αριθμό αποτελεσμάτων αλληλούχησης (80). Αυτά τα μαγνητικά μικροσφαιρίδια στη συνέχεια θα τοποθετηθούν μέσα σε κυψελίδες ροής.

SOLiD™ substrate



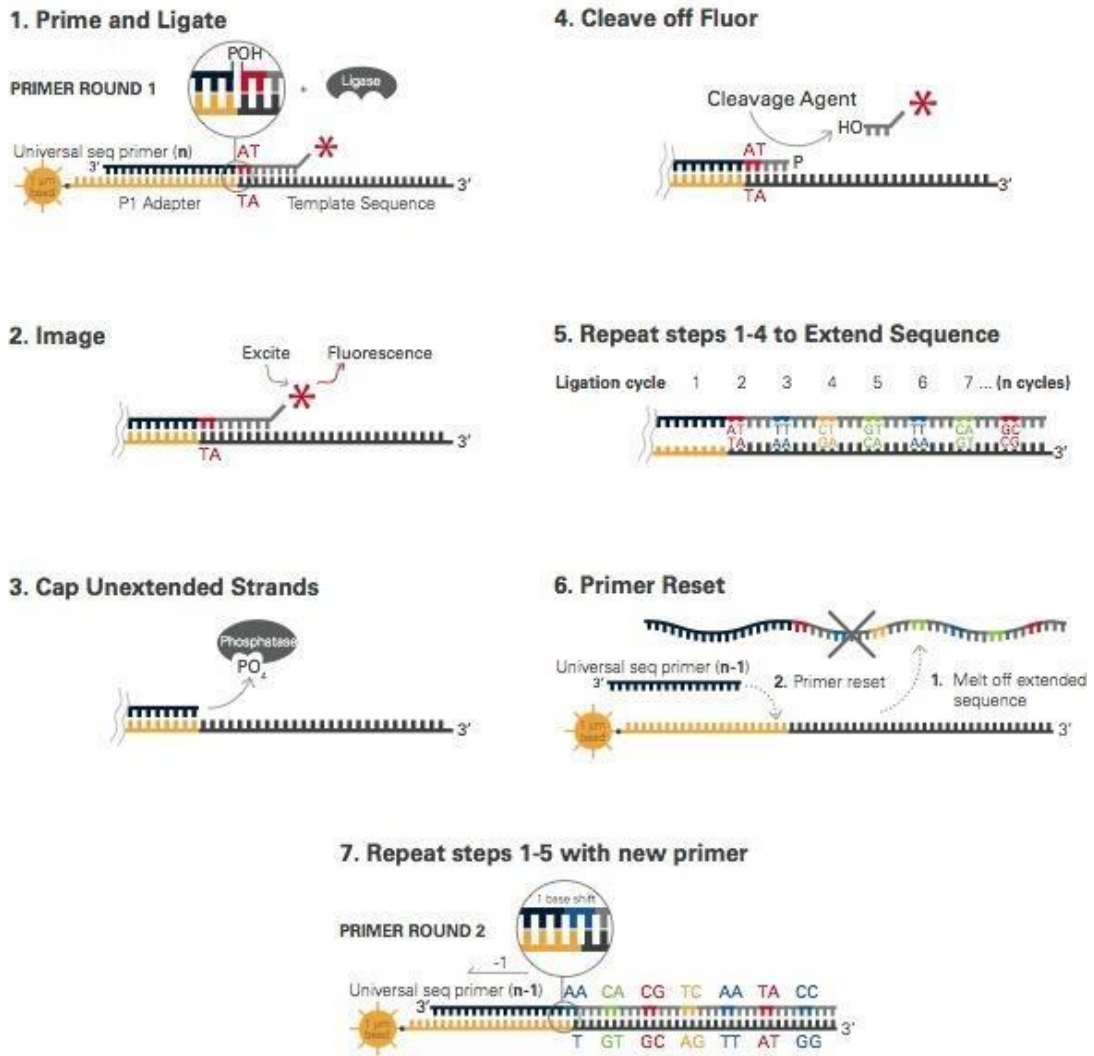
Εικόνα 10 Μαγνητικά μικροσφαιρίδια προσαρμοσμένα σε επιφάνεια γυάλινου πλακιδίου (109)

Σ' αυτά τα μικροσφαιρίδια έχουν προσδεθεί τα προς αλληλούχιση τμήματα του DNA το μήκος των οποίων είναι μεταξύ 25-35 bp. Στο στάδιο αυτό ο εκκινητής P1 θα δημιουργήσει την απαιτούμενη σύνδεση μεταξύ των μαγνητικών μικροσφαιριδίων και των τμημάτων του DNA. Σε κάθε κύκλο αλληλούχισης μπορεί να αλληλουχηθεί DNA του οποίου το μήκος μπορεί να φθάσει το 2-4 Gbp. Η μέθοδος περιλαμβάνει δύο βήματα (81). Στο πρώτο χρησιμοποιούνται οκταμερή ολιγονουκλεοτίδια με τα οποία πραγματοποιείται ο υβριδισμός τους στο σημείο στόχο του μονόκλωνου υπό αλληλούχιση εκμαγείου. Όταν το οκταμερές υβριδοποιηθεί θα αφήσει ένα κενό μεταξύ του 5' του εκκινητή και του 3' του οκταμερούς. Εκεί θα αναλάβει δράση, κλείνοντας αυτό το κενό η DNA λιγάση, όπως ακριβώς συμβαίνει και στην περίπτωση των κενών που υπάρχουν μεταξύ των τμημάτων Okazaki κατά την διαδικασία της αντιγραφής (81).



Εικόνα 11 Οκταμερές στο άκρο του οποίου υπάρχει φθορίζουσα η ουσία.(109).

Οι οκταμερείς εκκινητές αποτελούνται από οκτώ βάσεις συνδεδεμένες μεταξύ τους με τυχαίο τρόπο. Σε κάθε οκταμερές μας ενδιαφέρουν τα πρώτα δύο του μέλη. Αυτά είναι που θα καθορίσουν και την αλληλουχία στη συνέχεια. Οι βάσεις από την τρίτη έως και την όγδοη δεν θα μας απασχολήσουν. Στο άκρο του οκταμερούς έχει τοποθετηθεί δείκτης ο οποίος δηλώνει το είδος των δύο βάσεων που υπάρχουν στην αρχή. Έτσι έχουμε δεκαέξι συνδυασμούς βάσεων με τέσσερα διαφορετικά χρώματα δεικτών.

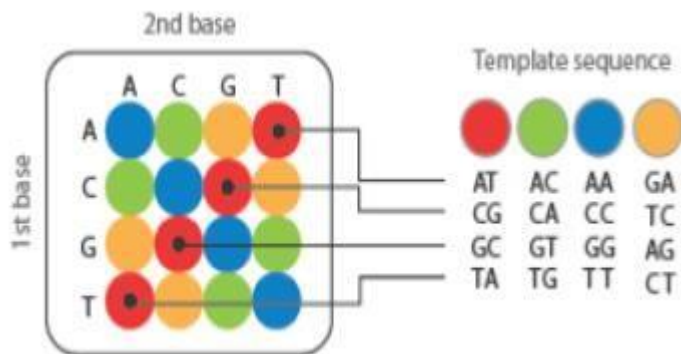


Εικόνα 12 Σύνδεση μεταξύ του οκταμερούς και του τέλους του εκκινητή. Εκπομπή φωτός από το φθορίζον τμήμα και στη συνέχεια αποκοπή του (109).

Το κάθε χρώμα αντιστοιχεί σε τέσσερα διαφορετικά ζευγάρια δεικτών. Αρχικά το κατάλληλο οκταμερές, το οποίο θα είναι συμπληρωματικό με το τμήμα του εκμαγείου, θα προσδεθεί στον αρχικό εκκινητή. Μετά την πρόσδεσή του και την απομάκρυνση των περιττών δεικτών το φωτεινό σήμα που εκπέμπεται θα καταγραφεί (78). Μετά την καταγραφή του σήματος οι τρεις τελευταίες βάσεις, στις οποίες είναι προσδεμένη η φθορίζουσα ουσία, αποκόπτονται και τα εναπομένοντα υλικά απομακρύνονται. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως “κύκλος της λιγάσης” (82). Στη συνέχεια θα πραγματοποιηθεί εκ νέου τοποθέτηση οκταμερών με την αποβολή του φθορίζοντος τμήματος αφού γίνει η καταγραφή του. Η διαδικασία θα συνεχιστεί μέχρι την πλήρη κάλυψη του αρχικού κλώνου με τις βάσεις που απέμειναν. Κατ’ αυτό τον τρόπο έχει αναδημιουργηθεί δίκλωνο DNA το οποίο στη συνέχεια θα μετουσιωθεί. Τα απομεινάρια των ολιγοεκκινητών αποβάλλονται. Όπως γίνεται αντιληπτό από τις παραπάνω φωτογραφίες υπάρχουν νουκλεοτίδια τα οποία δεν έχουν αναγνωριστεί προς το παρόν. Για το λόγο αυτό η διαδικασία επαναλαμβάνεται τέσσερις φορές. Αυτό συμβαίνει για να αναγνωριστούν όλα τα νουκλεοτίδια. Αυτό επιτυγχάνεται με τον εξής

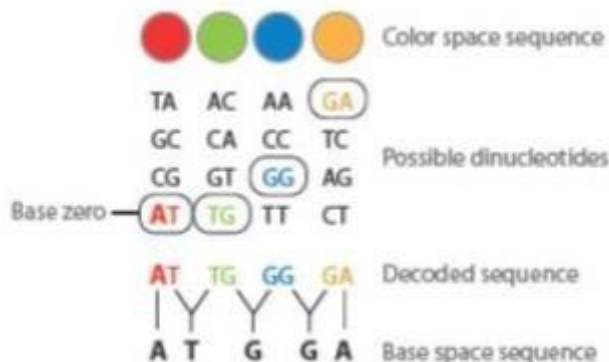
τρόπο, οι ολιγοεκκινητές την δεύτερη, τρίτη, τέταρτη και πέμπτη φορά θα είναι κατά μια βάση λιγότερη. Δηλαδή ο εκκινητής την δεύτερη φορά θα έχει $n-1$ νουκλεοτίδια, $n-2$, $n-3$ και $n-4$ την τρίτη, τέταρτη και πέμπτη φορά αντίστοιχα. Συνολικά θα πραγματοποιηθούν πέντε κύκλοι λιγάσης (82). Με αυτή την διαδικασία το κάθε νουκλεοτίδιο αναγνωρίζεται δύο φορές. Μια φορά με την εξ αριστερών βάση και μια φορά με την εκ δεξιών της βάση (72). Το αποτέλεσμα της αλληλούχησης αποδίδεται με την μορφή χρωμάτων τα οποία είναι δυνατόν να αναγνωριστούν-αντιστοιχιστούν με βάσεις άμεσα. Για να πραγματοποιηθεί η αλληλούχηση με ακρίβεια θα πρέπει να υπάρχει μια βάση η οποία να είναι εξ αρχής γνωστή πάνω στην οποία θα στηριχτεί η αναγνώριση των επόμενων, ως σημείο αναφοράς. Η βάση αυτή προϋπάρχει στον πρώτο εκκινητή που θα τοποθετηθεί στο μονόκλωνο DNA (83).

Το φωτεινό σήμα εκπέμπεται μετά την ενσωμάτωση του οκταμερούς (Εικόνα 11) αποκωδικοποιείται με μια διαδικασία που την ονομάζουν αποκωδικοποίηση των δύο βάσεων. Όπως και προηγουμένως αναφέρθηκε θα δυνατά χρώματα που μπορούν να παραχθούν είναι τέσσερα, κάθε ένα από τα οποία ανταποκρίνεται σε τέσσερα διαφορετικά ζεύγη νουκλεοτιδίων (71).



Εικόνα 13 Αποκωδικοποίηση χρωμάτων με βάση τα ζεύγη βάσεων (109).

Η αποκωδικοποίηση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων, δεν θα πρέπει να ξεχνάμε ότι γίνεται δύο φορές.



Εικόνα 14 Αποκωδικοποίηση των χρωμάτων (109)

Όλα ξεκινούν από γνώση του τελευταίου νουκλεοτιδίου του εκκινητή *n*. Το νουκλεοτίδιο αυτό το χαρακτηρίζουμε ως “βάση μηδέν”. Έτσι από τα διαδοχικά χρώματα που λαμβάνουμε μπορούμε να δημιουργήσουμε την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων (84). Είναι απόλυτα κατανοητό ότι για να γίνει σωστά η αλληλούχιση πρέπει να είμαστε απόλυτα βέβαιοι για το είδος του τελευταίου νουκλεοτιδίου “βάση μηδέν” του εκκινητή. Ένα από τα πλεονεκτήματα αυτής της σημαντικής διαφοροποίησης από τις πιο συμβατικές τεχνολογίες προσδιορισμού αλληλουχίας είναι ότι, είναι δυνατόν να αναγνωρίσουμε την διαφορά μεταξύ ενός πολυμορφισμού νουκλεοτιδίων και ενός σφάλματος αλληλούχισης στην αλληλουχία των χρωμάτων. Αυτή η ικανότητα προέρχεται εξαιτίας του ότι ένα και μόνο νουκλεοτίδιο επηρεάζει δύο από τα χρώματα στη χρωματική ακολουθία (λόγω του ότι αναγνωρίζεται δύο φορές), ενώ ένα σφάλμα αλληλούχισης αλλάζει μόνο ένα από τα χρώματα. Αυτό μπορεί να γίνει άμεσα εφαρμόσιμο στους πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) (84). Έτσι άμεσα μπορεί να εξεταστεί η ύπαρξη μεταλλάξεων στο υπό μελέτη δείγμα του DNA. Η μέθοδος είναι επίσης σε θέση να κάνει αλληλούχιση διπλού άκρου με μια ιδιαιτερότητα, η δεύτερη ανάγνωση του κάθε ζεύγους περιλαμβάνει πολύ μικρότερο αριθμό νουκλεοτιδίων από τη πρώτη ανάγνωση (35 bp αντί του 75 bp της πρώτης ανάγνωσης). Αυτό το μικρότερο μήκος ανάγνωσης κάνει τη SOLiD να έχει περιορισμούς στην αλληλούχιση *de novo*, για γονιδιώματα με μεγάλο αριθμό βάσεων (72).

Πίνακας : Συγκριτικός πίνακας των τεχνολογιών αλληλούχισης νέας γενειάς

<i>Μήκος</i>	<i>Gb</i>	<i>Μέθοδος</i>
--------------	-----------	----------------

Πλατφόρμα	αλληλουχία ς	χρόνος	/ run	αλληλούχισης	πλεονεκτήματα	μεονεκτήματα
454 GS FLX+ (Roche)	700bp	23hr	0.7	Σύνθεση	Δυνατότητα ανάγνωσης μεγάλου μήκους αλληλουχίες	Υψηλό ποσοστό λαθών σε επαναλήψεις ομοπολυμερών
Illumina (illumina)	200bp	27hr- 11days	2- 60 0	Σύνθεση	Χαμηλό κόστος	Δυνατότητα ανάγνωσης μικρού μήκους αλληλουχίες, μεγάλος χρόνος ανάγνωσης
Ion torrent (Life technologies)	200bp	2hr	10 0	Υβριδισμός	Μικρός χρόνος ανάλυσης	Δεν λειτουργεί καλά με τα ομοπολυμερή
SOLiD (Life technologies)	85bp	8 days	12 0	Σύνθεση (ανίχνευση H ⁺)	Χαμηλό ποσοστό λαθών	Μεγάλος χρόνος ανάλυσης

1.4 Σκοπός

Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε ως στόχο της τον χαρακτηρισμό της βακτηριακής ποικιλότητας στην αερομεταφερόμενη σκόνη από τη Σαχάρα με τη χρήση νέων τεχνολογιών αλληλούχισης. Ο προσδιορισμός της μικροβιακής ποικιλότητας της αφρικανικής σκόνης καθώς και ο χαρακτηρισμός των βακτηριακών κοινοτήτων που εν δυνάμει θα μπορούσαν να αποτελέσουν κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία ήταν ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής. Οι νέες τεχνολογίες επιλέχθηκαν διότι προσφέρουν μεγαλύτερη απόδοση, λεπτομέρεια, διακριτική ικανότητα και μεγαλύτερη ταχύτητα. Αυτή είναι η πρώτη μελέτη στην Ελλάδα όπου η βακτηριακή ποικιλότητα χαρακτηρίζεται με την χρησιμοποίηση ομικών τεχνολογιών.

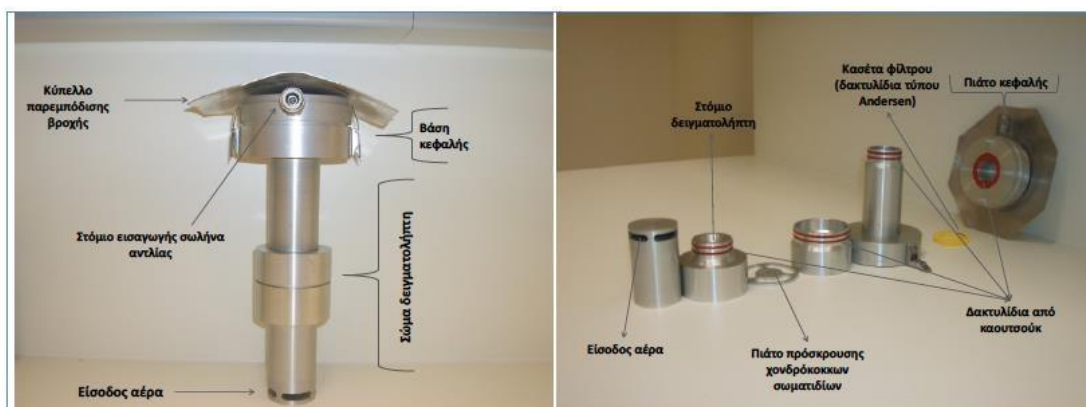
Η δειγματοληπτική διαδικασία ξεκίνησε το 2013 όπου λήφθηκαν τα πρώτα δείγματα και συνεχίστηκε έως το 2014. Ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων ήταν 22 και χωρίστηκαν σε δείγματα όπου το φαινόμενο ήταν στην ακμή του και σε δείγματα που το φαινόμενο δεν υπήρχε ώστε να έχουμε την δυνατότητα να συγκρίνουμε και να διαχωρίσουμε τη βακτηριακή ποικιλότητα μεταξύ των 2 περιόδων. Η δειγματοληψία έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Χημικών Περιβαλλοντικών Διεργασιών από το κ. Ιακωβίδη. Στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών όπου ξεκίνησε η διαδικασία για το χαρακτηρισμό των βακτηριακών κοινοτήτων. Το πρώτο βήμα στη διαδικασία ήταν η απομόνωση του γενετικού υλικού η οποία πραγματοποιήθηκε με το DNA Isolation kit της εταιρίας MOBIO. Εν συνεχεία αφού εκτιμήθηκε η ποσότητα και η καθαρότητα του γενετικού υλικού ξεκίνησε η ενίσχυση του. Η απαιτούμενη ποσότητα που χρειάζονταν ώστε να μελετηθεί το δείγμα είναι 300 ng γενετικού υλικού. Μετά το πέρας της διαδικασίας της ενίσχυσης του γενετικού υλικού ακλούθησε ο καθαρισμός και η τελική ποσοτικοποίηση. Το τελικό στάδιο της πειραματικής διαδικασίας έλαβε χώρα στην εταιρία IMG S.A όπου πραγματοποιήθηκε και η τελική αλληλούχιση. Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πακέτο Qiime. Τέλος για την στατιστική ανάλυση και την εικονική παρουσίαση των δεδομένων που αναλύθηκαν έγινε χρήση των προγραμμάτων Past 3, Primer 7 και Excel.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δειγματοληψία στην περιοχή της Κρήτης

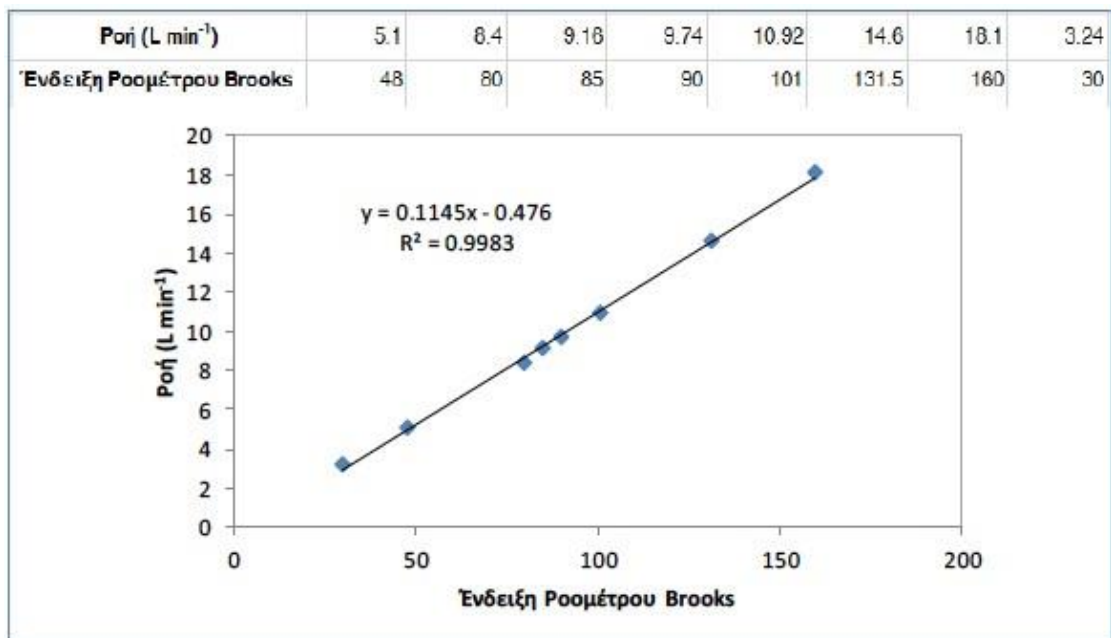
Στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος CHEMISAND (Hazardous Chemicals and Microorganisms transported by Saharan Dust into the Mediterranean), πραγματοποιήθηκε δειγματοληπτική εκστρατεία, η οποία χωρίστηκε σε δύο περιόδους, με διαφορετικά χαρακτηριστικά και χρονικό διάστημα εφαρμογής. Ακολουθώντας φθίνουσα χρονολογική σειρά, η πρώτη δειγματοληπτική περίοδος πραγματοποιήθηκε το χρονικό διάστημα από 05/2013 έως 06/2014 και έλαβε χώρα στις κτηριακές εγκαταστάσεις του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης (35°18' N, 25°4' E; 7 m AGL). Το σημείο αυτό βρίσκεται στο χώρο της Πανεπιστημιούπολης Βουτών, περίπου 8 Km μακριά από το κέντρο της πόλης του Ηρακλείου και 5 Km μακριά από τον κοντινότερο και περισσότερο πυκνοκατοικημένο (1,200 μόνιμοι κάτοικοι) οικισμό (κοινότητα Βουτών), ενώ ο κοντινότερος αστικός ιστός (Δήμος Γαζίου) βρίσκεται σε απόσταση περίπου 6 Km, στο βορειοδυτικό τμήμα του σημείου. Επιπλέον, η εγγύς περιοχή χαρακτηρίζεται από μικρής έντασης κατοικημένες περιοχές και σχετικά έντονη βλάστηση, ενώ περιστοιχίζεται από διαφόρων ειδών γεωργικές καλλιέργειες. Για το λόγο αυτό, το σημείο έχει χαρακτηριστεί ως ημιαγροτικό.

Στην πρώτη δειγματοληπτική περίοδο, χρησιμοποιήθηκε αντλία Milipore (Model XX5552223300), δυνατότητας άντλησης αέρα ροής 5-15 L min⁻¹, ενώ για τη συλλογή των αιωρούμενων σωματιδίων χρησιμοποιήθηκε δειγματολήπτης τύπου Harvard Honeycomb (Εικόνα 15). ο οποίος συνίσταται σε βάση, σώμα, ακροφύσιο που παρέχει το προκαθορισμένο μέγεθος των σωματιδίων που ανιχνεύονται (αεροδυναμικής διαμέτρου 2.5 μm ή μικρότερο), ένα πιάτο που προσφύεται στην κεφαλή του δειγματολήπτη και συλλέγει τα χονδρότερα σωματίδια και τέλος, την είσοδο του δειγματολήπτη.



Εικόνα 15 Δειγματολήπτης PM2.5 τύπου Harvard Honeycomb και τα εσωτερικά του μέρη.

Για την μέτρηση της ροής χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο ροόμετρο (Brooks Instruments, Inc.). Το γράφημα και οι προδιαγραφές βαθμονόμησης του ροόμετρου παρουσιάζονται στην Εικόνα 16.

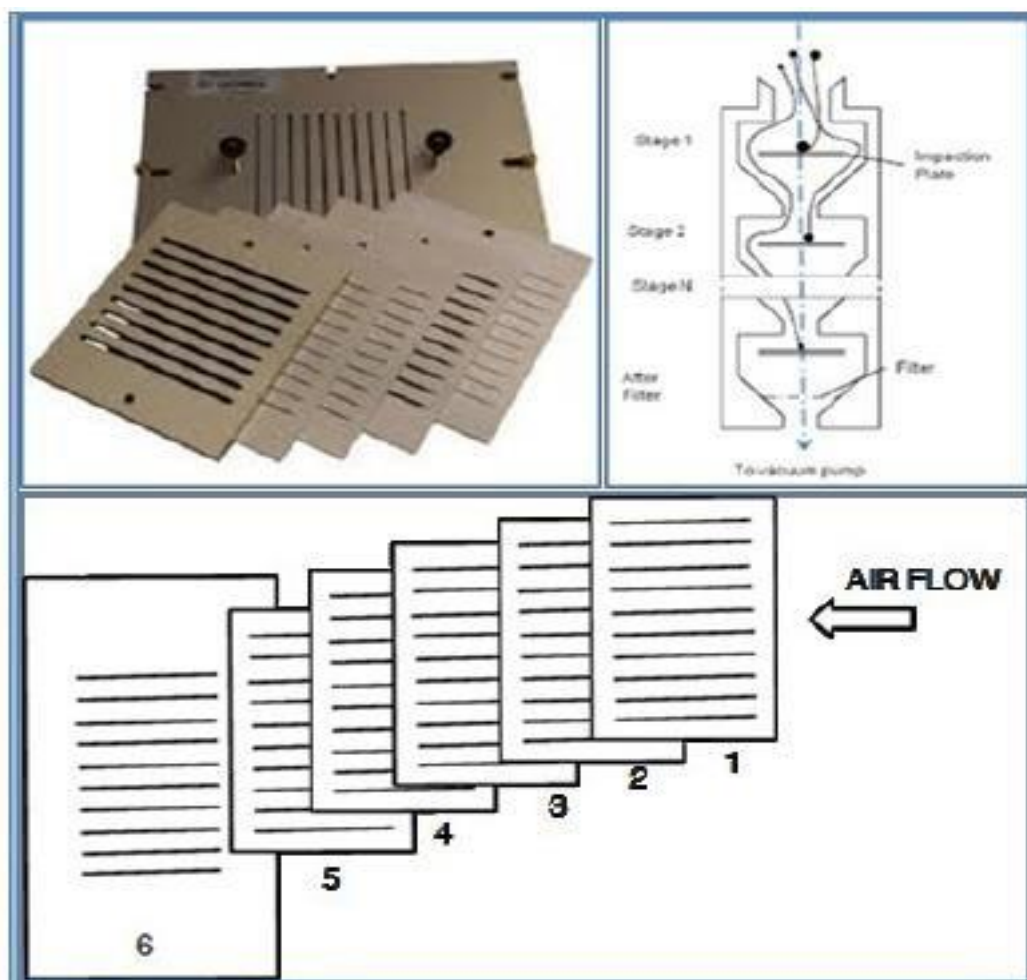


Εικόνα 16 Το γράφημα και οι προδιαγραφές βαθμονόμησης του ροόμετρου Brooks που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις ροής στις αντλίες τύπου Milipore.

Η ροή που εφαρμόστηκε ήταν σταθερή, περίπου 10 L min⁻¹, με τη βοήθεια κρίσιμων στομιών στην αντλία αέρα. Πριν τη χρησιμοποίηση των αντλιών, διαπιστωνόταν ότι η ροή του αέρα είναι η επιθυμητή (10±0.5 L min⁻¹) και συγκρίνονταν οι χρόνοι απόκρισης του μετρητή με τον πραγματικό. Η ροή κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας παρέμεινε σταθερή, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η πιθανή πτώση πίεσης πάνω στο φίλτρο, εξαιτίας των σωματιδίων που έχουν συλλεχθεί σ' αυτό και της υγρασίας στο περιβάλλον, δεν είναι τόσο μεγάλη (85).

Η δεύτερη δειγματοληπτική περίοδος έλαβε χώρα στο ίδιο σημείο δειγματοληψίας (ημι-αγροτικό) με την πρώτη (35°18' N, 25°4' E; 7 m AGL), κατά το χρονικό διάστημα από 01/2013 έως 05/2013. Για τη συλλογή των ατμοσφαιρικών δειγμάτων σωματιδιακής φάσης, χρησιμοποιήθηκε δειγματολήπτης Υψηλού Όγκου (High Volume sampler, HV) της εταιρίας General Metal Works (GMWL-2000H). Η ροή του ατμοσφαιρικού αέρα εξασφαλιζόταν με τη χρήση αντλίας Becker (Becker GmbH, USA) υψηλής απόδοσης και λειτουργικότητας, αφού δεν απαιτείται χρήση παλετών κάρβουνου ή λαδιού για την εύρυθμη λειτουργία του, διασφαλίζοντας ότι ο αέρας που εξέρχεται της αντλίας δεν είναι επιβαρυνμένος με οργανικές ή ανόργανες ενώσεις που θα μπορούσαν να επιμολύνουν τον περιβάλλοντα αέρα στο χώρο της δειγματοληψίας. Η ροή άντλησης του αέρα κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας μετρείτο με τη βοήθεια ειδικού ροόμετρου υψηλής ροής, βαθμονομημένο από την εταιρία Becker (ίδιας με αυτής των αντλιών), τοποθετώντας το ροόμετρο σε ειδική προσαρμογή σε ξεχωριστή εγκοπή της αντλίας, που βρίσκεται στην έξοδο της διαδρομής του αέρα που απορροφάται. Ο υπολογισμός της τελικής ροής αέρα που λήφθηκε σε κάθε δειγματοληψία πραγματοποιούνταν λαμβάνοντας τη μέση αριθμητική τιμή της ένδειξης του ροόμετρου σε τρία στάδια, μισή ώρα μετά την έναρξη, στο μέσο και πριν τη λήξη της κάθε δειγματοληψίας. Για τη συλλογή του αερολύματος, χρησιμοποιήθηκε δειγματοληπτική κεφαλή, αποτελούμενη από ένα

δικτυωτό μεταλλικό πλαίσιο, μεγέθους 20×25 cm, πάνω στο οποίο προσεφύετο συστάδα κρουστικού διαχωριστή σωματιδίων τριών (3) σταδίων (Sierra High Volume Cascade Impactor, Model 235, Andersen Instruments, Inc., USA). Συγκεκριμένα, κάθε στάδιο διαχωρισμού σωματιδίων επιτυγχάνετο με τη βοήθεια μιας πλάκας αλουμινίου που φέρει 9 έως 10 παράλληλες εγκοπές, με σταθερό πλάτος σε καθμία πλάκα, αλλά μειούμενο βαθμιαία (Εικόνα 17). Ανάμεσα στις πλάκες τοποθετούντο ειδικά φίλτρα συλλογής σωματιδίων. Το φίλτρο που βρισκόταν μεταξύ του τρίτου και του τελικού σταδίου της συστάδας ελάμβανε αιωρούμενα σωματίδια με μέγεθος 2.5 μm ή μικρότερο.



Εικόνα 17 Κρουστικός διαχωριστής σωματιδίων υψηλής ροής αέρα

Για τη συλλογή των αιωρούμενων σωματιδίων τύπου PM_{2.5} χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα ινών υάλου (Glass MicroFiber Filters, GFF, 37mm, 0 cycles, Cat No: 1820-037, Whatman και Pall Life Sciences, Type A/E, Glass Fiber Filter, 20.3 cm × 25.4 cm, P/N 61638, Qty 1). Συνολικά, τα δείγματα χαμηλού όγκου (LV) που συλλέχτηκαν την πρώτη περίοδο ήταν δεκαπέντε (15), από τα οποία τα πέντε (5) ήταν τυφλά, ενώ κατά τη διάρκεια της δεύτερης δειγματοληπτικής περιόδου ελήφθησαν συνολικά επτά (7) δείγματα υψηλού όγκου (HV), εκ των οποίων το ένα (1) ήταν τυφλό. Ο χειρισμός των φίλτρων που ελήφθησαν κατά την πρώτη περίοδο είχε ως εξής: Πριν τη χρησιμοποίησή του, κάθε φίλτρο, αφού τινάχθηκε αρκετές φορές (blow up) χρησιμοποιώντας καθαρή λαβίδα, είτε τοποθετήθηκε σε επαγωγό εστία τύπου

Laminar (λειτουργία UV) για 30 min, είτε θερμαίνονταν στους 440°C για 3 ώρες, με σκοπό την αποστείρωση και τον καθαρισμό τους από τυχόν επιμολύνσεις. Στη συνέχεια, όλα τα φίλτρα ζυγίζονταν σε ζυγό ακριβείας και τέλος, φυλάσσονταν με αλουμινόχαρτο σε αποστειρωμένο τρυβλίο Petri κλεισμένο ερμητικά, μέχρι τη χρησιμοποίησή τους στο πεδίο. Την ημέρα της προγραμματισμένης δειγματοληψίας, τοποθετούνταν στην κασέτα του δειγματολήπτη.

Μετά το πέρας της δειγματοληψίας, τα φίλτρα τοποθετούνταν σε επαγωγό εστία τύπου LAMINAR (λειτουργία flow fan) για περίπου 30 λεπτά με σκοπό την εξισορρόπηση σε κανονικές συνθήκες περιβάλλοντος, ενώ στη συνέχεια ζυγίζονταν χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη λαβίδα, τυλίγονταν στο ίδιο αλουμινόχαρτο και τοποθετούνταν στο ίδιο τρυβλίο Petri και στη συνέχεια στους -18°C, μέχρι την ανάλυσή τους.

Ο χειρισμός των φίλτρων (εκτεθειμένων και τυφλών) που ελήφθησαν κατά τη διάρκεια της δεύτερης δειγματοληπτικής περιόδου ήταν παρόμοιος με αυτόν που ακολουθήθηκε στα φίλτρα της πρώτης περιόδου, ο οποίος αναφέρθηκε παραπάνω.



Εικόνα 18 Το βέλος δείχνει την ακριβή τοποθεσία της δειγματοληψίας

Πίνακας 2.2. Δείγματα και συνθήκες δειγματοληψίας

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	PM2.5 mass concentration [ug/m3]	T (°C)	RH (%)	WS (Km/h)	AP (hPa)
1	17/1/2013	35,35	14,00	65,71	14,60	1012,01
2	3/2/2013	44,5	16,50	68,78	20,90	1014,54
4	7/2/2013	87,93	14,90	67,89	18,20	1008,27
5	22/2/2013	58,76	17,60	65,31	14,60	1001,92
6	11/3/2013	49,82	20,80	54,85	12,60	1004,00

7	19/5/2013	101,82	24,10	63,36	5,00	1013,80
8	20/5/2013	97,31	25,90	50,03	5,30	1012,77
9	21/5/2013	74,62	23,70	63,67	2,60	1012,29
10	22/5/2013	124,06	26,90	42,48	6,80	1010,18
11	28/5/2013	131,33	24,95	50,74	11,30	1007,79
12	30/5/2013	22,12	23,10	56,22	5,10	1007,45
13	21/1/2014	24,96	17,70	60,66	8,90	1014,89
14	17/2/2014	15,27	13,40	64,41	5,60	1023,17
16	22/4/2014	15,06	26,80	28,61	12,60	1013,85
15	27/3/2014	21,03	19,80	47,50	21,20	1013,27
17	23/4/2014	14,61	26,30	25,92	16,90	1012,65
19	5/6/2014	13,02	21,10	74,66	6,80	1011,11
18	3/6/2014	35,38	23,70	57,45	12,40	1007,84
20	26/6/2014	18,99	30,70	31,01	6,00	1012,67
21	27/6/2014	21,38	32,40	20,89	5,60	1012,62
22	16/1/2013	12,56	15,30	70,37	19,30	1013,97
23	18/2/2014	12,86	15,60	64,33	6,30	1024,79

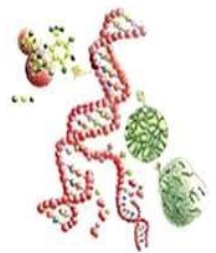
Στο πίνακα 2.2 φαίνονται όλα τα δείγματα (με κόκκινο είναι τα δείγματα ελέγχου) καθώς και I. Η ημερομηνία δειγματοληψίας

II. Περιβαλλοντικές συνθήκες
κατά τη
δειγματοληψία

III. Η ποσότητα μάζας στο κάθε
φίλτρο

2.2 Απομόνωση περιβαλλοντικού γενετικού υλικού (eDNA)

Η εξέταση του γονιδιώματος ενός οργανισμού προϋποθέτει την εξαγωγή και απομόνωση του DNA. Η εξαγωγή DNA πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το Powersoil DNA Isolation kit της εταιρίας MOBIO Laboratories. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε παρατίθεται στο παράρτημα. Για το κάθε δείγμα έχουν γίνει 3 επαναλήψεις ώστε να εξασφαλιστεί η μέγιστη ακρίβεια στην συγκέντρωση του γενετικού υλικού καθώς αυτό πιθανότατα να μην κατανέμεται ομοιόμορφα σε όλη την έκταση του φίλτρου. Επίσης, οι 3 επαναλήψεις μας δίνουν την δυνατότητα στατιστικού ελέγχου και εύρεσης των τυπικών σφαλμάτων που προκύπτουν από τις μετρήσεις. Ακόμα, για την κάθε επανάληψη πραγματοποιήθηκαν 2 εκχυλίσεις ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη ανάκτηση του γενετικού υλικού. Στη συνέχεια η ποσότητα DNA υπολογίστηκε με το φασματοφωτόμετρο Quawell UV-Vis 5000 (nanodrop) και εκτιμήθηκε σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης. Παράλληλα με την εκτίμηση της ποσότητας πραγματοποιήθηκε και εκτίμηση της καθαρότητας εξετάζοντας τους λόγους 260/280 και 260/230 στην κάθε μέτρηση.



Πίνακας 2.3 Συγκεντρώσεις Conc. (ng/ul)

δείγματα	ημερομηνία		1 ^η		2 ^η		3 ^η									
			1. elusion	2. elusion	1. elusion	2. elusion	1. elusion	2. elusion								
1	17/1/2013	HV	0,93	1,23	0,39	-0,84	5,7	-2,07								
2	3/2/2013	HV	-0,05	-0,47	-0,39	-0,57	0,38	32,58								
4	7/2/2013	HV	0,95	2,47	2,96	3,49	1,96	7,53								
5	22/2/2013	HV	2,35	2,69	2,16	1,7	1,44	3								
6	11/3/2013	HV	1,49	1,94	2,7	3,84	2,18	2,77								
7	19/5/2013	HV	3,57	2,62	3,63	4,29	2,36	1,73								
8	20/5/2013	LV	4,28	-1,6	-0,72	-0,16	-1,18	-1,21								
9	21/5/2013	LV	1,55	-0,42	-0,08	0,16	-0,11	-0,77								
10	22/5/2013	LV	-0,31	-0,61	-1,32	0,74	-0,2	-0,61								
11	28/5/2013	LV	-0,15	-0,38	4,91	1,9	-0,09	-0,33								
12	30/5/2013	LV	-8,19	-7,87	-8,43	7,86	-7,95	-8								
13	21/1/2014	LV	-0,38	-0,85	-0,31	0,09	-0,28	-0,32								
14	17/2/2014	LV	-7,25	-8,52	-8,78	-7,71	-7,65	-8,63								
15	27/3/2014	LV	1,22	0,85	0,56	0,09	1,04	0,6								
16	22/4/2014	LV	-6,8,24	-6,19	-6,48	-7,92	-8,75	17	23/4/2014	LV	0,09	0,62	0,02	0,81	-0,09	0,11
18	3/6/2014	LV	0,57	-0,39	0,28	0,43	0,42	-0,01								
19	5/6/2014	LV	-8,97	-8,12	-7,71	-8,44	-7,97	-8,43								
20	26/6/2014	LV	-0,53	0,2	0,27	-0,2	6,17	6,93								
21	27/6/2014	LV	-7,61	-8,56	-7,25	-8,25	-8,1	-5,93								
22	16/1/2013	HV	0,78	-0,26	0,52	-0,43	0,21	0,52								
23	18/2/2014	LV	0,74	9,94	-0,08	-0,3	-0,79	-0,16								

2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA

Για την ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA, στη συντηρημένη περιοχή V3 – V4 χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές U341F_MiSeqF1 (5' TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGR SGC AGC AG -3') και 805R_MiSeqR1 (5' GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C -3') οι οποίοι είναι κατάλληλοι για αλληλούχιση με την τεχνολογία Illumina.



Εικόνα 19 Η αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου αποτελείται από συντηρημένες και μεταβλητές περιοχές (V περιοχές). Οι συντηρημένες περιοχές χρησιμοποιούνται για την κατασκευή εκκινητικών μορίων με το προϊόν ενίσχυσης να περιλαμβάνει τις μεταβλητές περιοχές που περιέχουν τις πληροφορίες για τον φυλογενετικό χαρακτηρισμό των βακτηρίων (110)

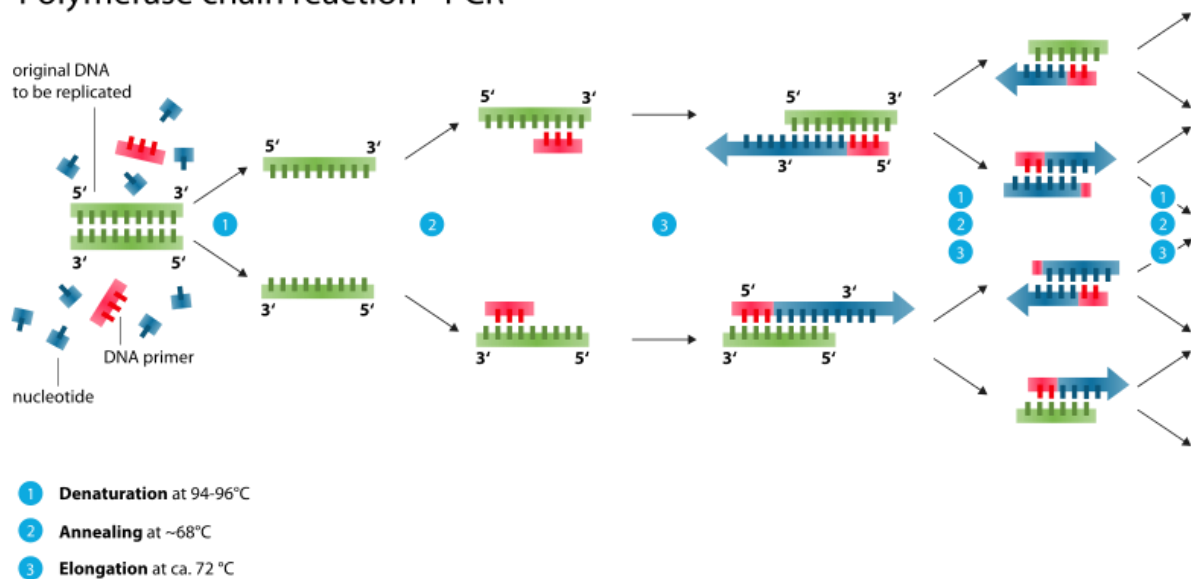
Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία για PCR αντιδράσεις με τελικό όγκο 25μl ήταν τα εξής:

- ✓ 5μl 5x Kapa HiFi
- ✓ 0,75μl dNTPs (25mM)
- ✓ 0,5μl Taq polymerase
- ✓ 0.3μl forward primer (25mM)
- ✓ 0.3μl reverse primer (25mM)
- ✓ 15μl SDW
- ✓ 3μl DNA

ακολουθώντας τις εξής συνθήκες:

1ο βήμα: 95°C για 5 min (αποδιάταξη)
2ο βήμα: 98°C για 20 s
3ο βήμα: 60°C για 30 s (υβριδοποίηση)
4ο βήμα: 72°C για 45 s (Επιμήκυνση)
5ο βήμα: Τα βήματα 2-4 για 30 κύκλους
6ο βήμα: 72°C για 5 min
7ο βήμα: 4°C

Polymerase chain reaction - PCR



Εικόνα 20 Διαδικασία αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (111)

Ακόμα για δείγματα που χαρακτηρίστηκαν ως control, λόγω της πολύ μικρής ποσότητας DNA που απομονώθηκε και της ύπαρξης αναστολέων, χρησιμοποιήθηκε η Taq Titanium με τα εξής αντιδραστήρια:

- ✓ 2.5μl 10x Buffer
- ✓ 0,5μl dNTPs 50x mix
- ✓ 0,5μl Taq polymerase
- ✓ 0.5μl forward primer (10mM)
- ✓ 0.5μl reverse primer (10mM)

✓ 16.5μl SDW ✓ 4μl DNA

ακολουθώντας τις εξής συνθήκες:

1ο βήμα: 95°C για 1 min
2ο βήμα: 95°C για 30 s
3ο βήμα: 68°C για 1min 30s
4ο βήμα: Τα βήματα 2-3 για 35 κύκλους
5ο βήμα: 68°C για 3 min
6ο βήμα: 4°C για πάντα

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση των εκκινητών με κατακρήμνιση με PEG. Αμέσως μετά πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση. Τα δείγματα αλληλουχήθηκαν χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια 2x 300 db στην εταιρία IMG M S.A. Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πακέτο Qiime.

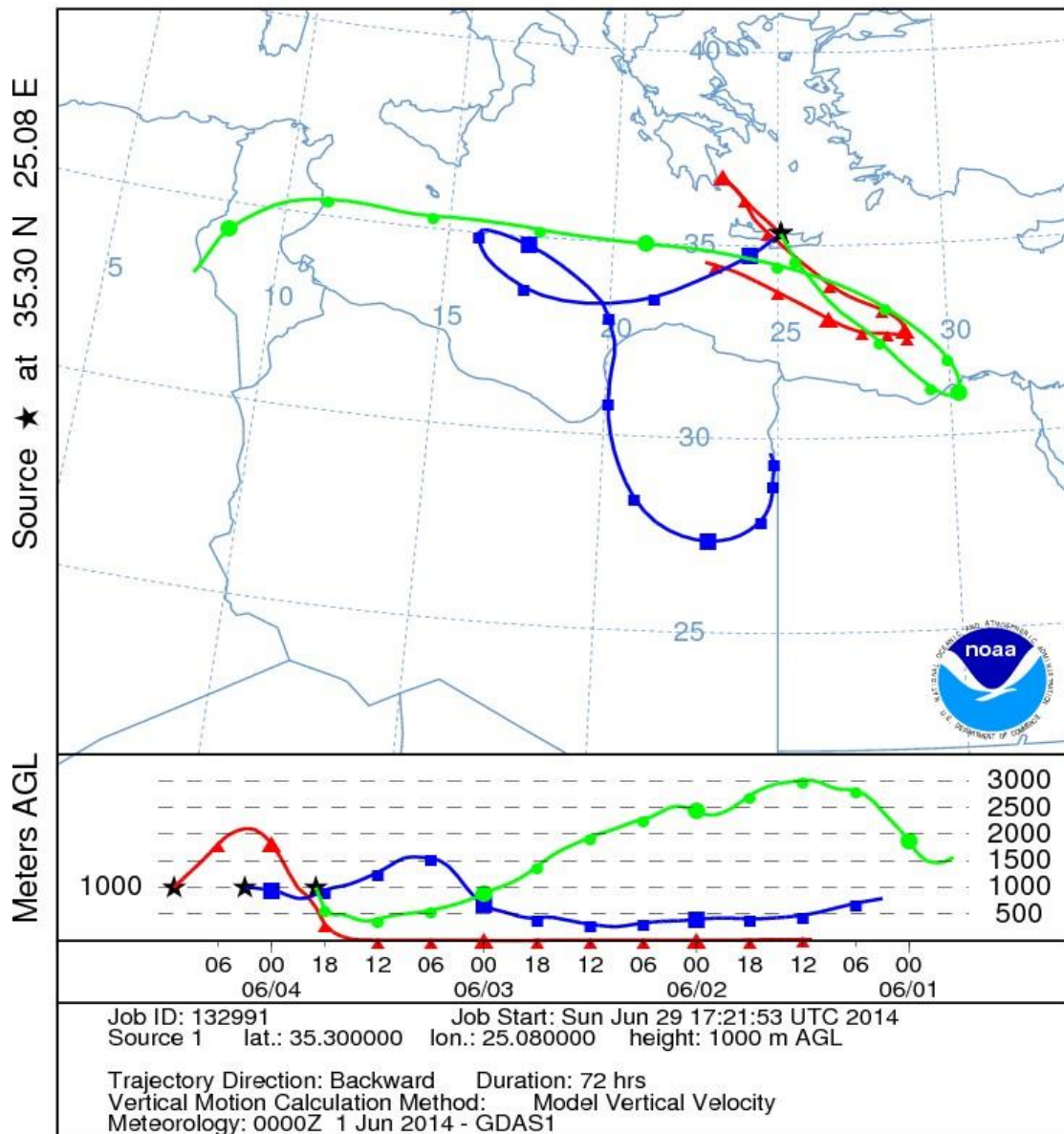
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Trajectories

Οι ρетроπορείες υπολογίζονται με τη χρήση του μοντέλου HYSPLIT 4, το οποίο δημιουργήθηκε από το Air Resources Laboratory (ARL), του National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) των ΗΠΑ. Το HYSPLIT MODEL (HYbrid Single – Particle Lagrangian Integrated Trajectory) έχει σχεδιαστεί για να υποστηρίζει έναν μεγάλο αριθμό προσομοιώσεων που σχετίζονται με μακράς διάρκειας μεταφορά, διάχυση και απόθεση ρύπων. Το συγκεκριμένο μοντέλο είναι Λαγκρανζιανό και προσομοιώνει απλά την πορεία μίας αέριας μάζας, λαμβάνοντας υπόψη τη διασπορά, την εναπόθεση που λαμβάνει χώρα και το πεδίο των ανέμων (86). Αυτό το μοντέλο όπως και άλλα παρόμοια υπολογίζουν τις τροχιές των αερίων μαζών με μεγάλη αβεβαιότητα. Τα λάθη στον υπολογισμό των τροχιών οφείλονται κυρίως στο ότι δεν είναι πάντα διαθέσιμα τα μετεωρολογικά δεδομένα (που συνεχώς μεταβάλλονται σε χώρο και χρόνο) για καθορισμένη τοποθεσία σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (87). Το τυπικό σφάλμα στον υπολογισμό της απόστασης που διανύει μια αέρια μάζα είναι της τάξης του 20-30%. Γι' αυτό τον λόγο οι τροχιές που υπολογίζονται πρέπει να θεωρούνται μια καλή εκτίμηση της μέσης κίνησης μιας αέριας μάζας. Στη παρούσα διπλωματική εργασία το μοντέλο αυτό χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση των ρетроπορειών των αερίων μαζών σε μέρες με αυξημένες συγκεντρώσεις αιωρούμενων σωματιδίων για να εξακριβωθεί αν ο λόγος που οι συγκεντρώσεις ήταν αυξημένες ήταν το ότι οι αέριες μάζες πριν φτάσουν στην περιοχή ενδιαφέροντος είχαν περάσει πάνω από την έρημο Σαχάρα. Για τον υπολογισμό της ρетроπορείας χρειάζονται ορισμένα δεδομένα εισόδου. Βάζοντας αυτά τα δεδομένα εισόδου προκύπτει κάθε φορά ένας χάρτης ρетроπορείας που απεικονίζει ένα εναέριο πλάνο της πορείας της αέριας μάζας μέχρι να φτάσει στην περιοχή ενδιαφέροντος καθώς και μία κατακόρυφη εικόνα της κίνησής του σε διαφορετικά ύψη. Συγκεκριμένα λάβαμε 3 ρетроπορείες ανά 24h δειγματοληψία, η 1^η ρетроπορεία λήφθηκε 4 ώρες μετά την έναρξη της κάθε δειγματοληψίας, η 2^η μετά από 8 ώρες από το πέρας της πρώτης και η 3^η ρетроπορεία,

ομοίως, μετά από 8 ώρες από το πέρας της δεύτερης (ή 4 ώρες πριν την λήξη της δειγματοληψίας) και 1000 m πάνω από την επιφάνεια της θάλασσας. Ο σκοπός που πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός των ρетроπορειών ήταν για εξεταστεί η πηγή των αιωρούμενων σωματιδίων καθώς και η πορεία της αέριας μάζας. Οι ρетроπορείες έδειξαν ότι δεν ήταν ίδια η πορεία της εκάστοτε αέριας μάζας καθώς πολλές από αυτές 72 ώρες πριν δεν βρίσκονταν κοντά στην περιοχή ενδιαφέροντος. Παρατηρήθηκε μια διαφοροποίηση μεταξύ των δυο ετών στη πορεία των αέριων μαζών και συγκεκριμένα το 2014 οι αέριες μάζες βρίσκονταν στη περιοχή ενδιαφέροντος στο διάστημα των 72 ωρών που τέθηκε ως δεδομένο (οι ρетроπορείες παρατίθενται στο παράρτημα).

NOAA HYSPLIT MODEL
 Backward trajectories ending at 1100 UTC 04 Jun 14
 GDAS Meteorological Data



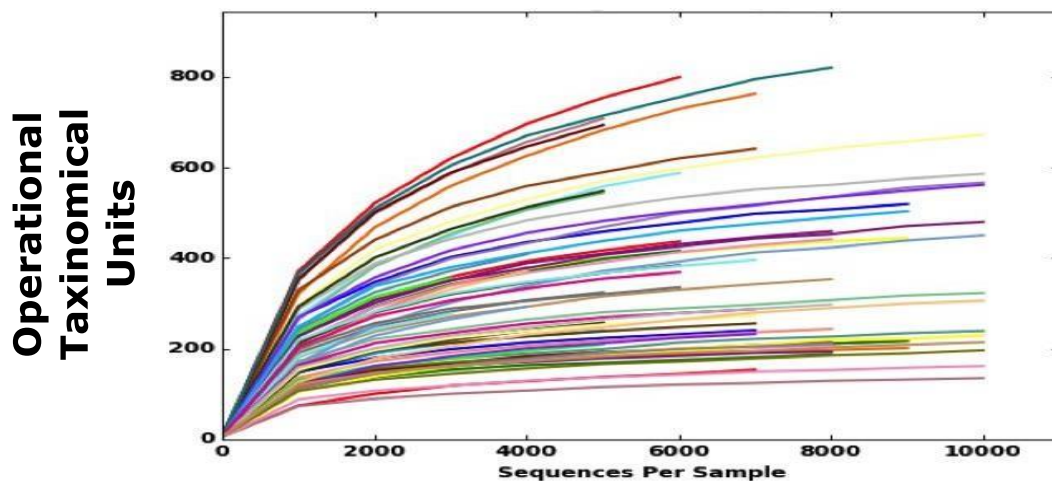
Εικόνα 21 Ρетроπορεία της δειγματοληψίας που πραγματοποιήθηκε 3/6/2014

3.2 Χαρακτηρισμός βακτηριακής ποικιλότητας

Στη παρούσα εργασία αναλύθηκαν συνολικά 1.329.769 αλληλουχίες και με τη χρήση του λογισμικού πακέτου Qiime υπολογίστηκαν οι δείκτες ποικιλότητας (88).

Ανάλυση του αριθμού των αλληλουχιών σε συνάρτηση με τον αριθμό των ειδών που έχουν χαρακτηριστεί με την μέθοδο των καμπυλών αραιώσης (rarefaction curves) επιβεβαίωσε ότι ο αριθμός των δειγμάτων που αναλύθηκε είναι ικανοποιητικός για την πλήρη περιγραφή της βακτηριακής ποικιλότητας καθώς οι καμπύλες δεν έχουν μόνο εκθετική φάση (Εικόνα 21).

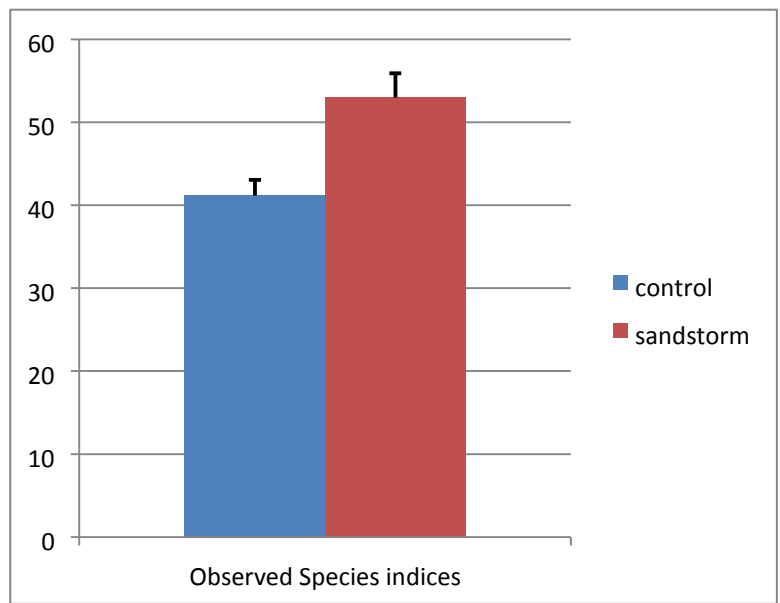
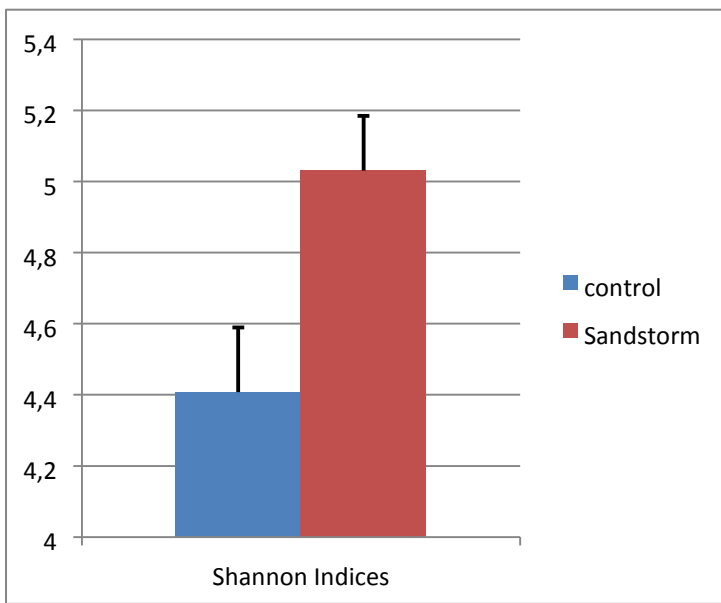
Η μέθοδος των καμπυλών αραιώσης είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της ποικιλότητας στα διαφορετικά δείγματα αλλά και για την κατανόηση της πολυμορφίας. Είναι μια γραφική παράσταση του αριθμού των ταξινομικών μονάδων συναρτήσει του αριθμού των δειγμάτων.



Εικόνα 21 Καμπύλες αραιώσης για όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν

Δείγμα	O.S.	PD_Whole_tree	Chao 1	Shannon	Simpson	
	(Observed Species)					
16/1/13(control)	64,7	8,1	201,5	5,7	0,9	
17/1/13(sandstorm)	56,7	7,5	143,9	5,3	0,9	170,8
5/4 0,9						
7/2/13(sandstorm)	55,8	7,8	160,2	5,2	0,9	126,2
4,2 0,8						
11/3/13(sandstorm)	59,9	7,6	191,4	5,5	0,9	
19/5/13(sandstorm)	59,9	7,6	188,2	5,4	0,9	
20/5/13(sandstorm)	46,5	6,4	127,3	4,6	0,9	
21/5/13(sandstorm)	75,3	9,7	241,4	6,1	0,9	
22/5/13(sandstorm)	72,9	9,6	230,3	5,9	0,9	
28/5/13(sandstorm)	48,5	6,9	88,1	5,1	0,9	
30/5/13(control)	45,7	6,5	121,9	4,6	0,9	
21/1/14(sandstorm)	45,1	6,4	91,8	4,7	0,9	
17/2/14 (control)	45,5	6,5	99,9	4,7	0,9	
18/2/14 (control)	36,1	5,5	119,2	3,9	0,8	
27/3/14(sandstorm)	38,5	5,4	93,3	4,4	0,9	
22/4/14 (control)	47,6	6,5	129,4	4,7	0,9	
23/4/14(sandstorm)	39,1	5,7	78,6	4,3	0,9	
3/6/14(sandstorm)	38,6	5,6	90,6	4,3	0,9	
5/6/14 (control)	39,6	5,7	104,7	4,3	0,9	
26/6/14(sandstorm)	39,9	6,4	74,9	4,3	0,9	
27/6/14(sandstorm)	38,2	5,9	96,8	4,0	0,8	

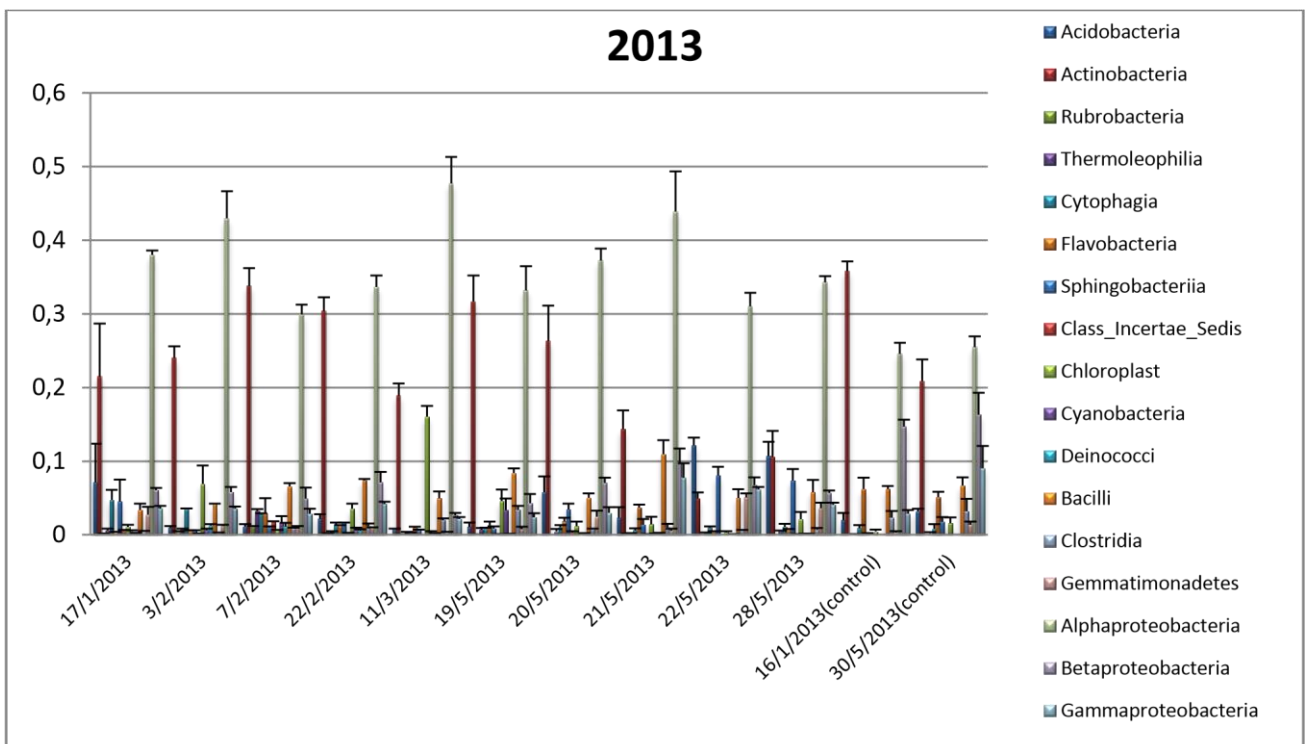
Η στατιστική ανάλυση των δεικτών ποικιλότητας υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων. Ο δείκτης Shannon εμφανίζεται στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος κατά την περίοδο αμμοθύελλας σε σχέση με τα δείγματα που συλλέχθηκαν την περίοδο ηρεμίας ($p < 0.001$) (Πίνακας 3.1). Η ίδια τάση παρατηρείται τόσο με τον αριθμό των λειτουργικών ταξινομικών ομάδων που χαρακτηρίστηκαν αλλά και με τον δείκτη chao1 ($p < 0.001$) (Πίνακας 3.1, Εικόνα 22).



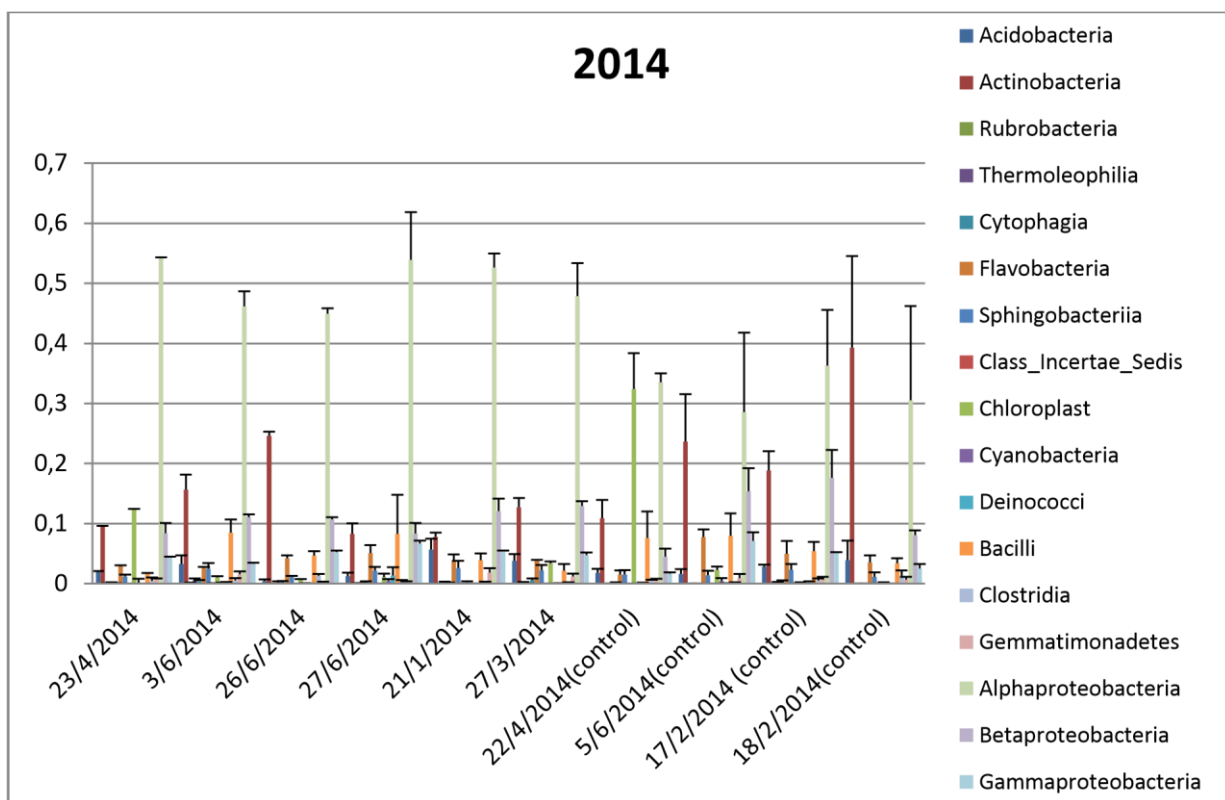
Εικόνα 22 Δείκτες ποικιλότητας (A) Shannon και (B) αριθμός ειδών για τα δείγματα αμμοθύελλας και κοντρολ.

3.3 Ετήσιας διακύμανσης

Για τον έλεγχο της ετήσιας διακύμανσης η ομαδοποίηση των δειγμάτων έγινε διαχωρίζοντας τα δείγματα μας ανάλογα με το έτος δειγματοληψίας. Στην ετήσια διακύμανση σε επίπεδο κλάσης εμφανίζονται στο Διάγραμμα 2 όλες οι ημερομηνίες που πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία κατά τη διάρκεια του εκάστοτε έτους και οι κλάσεις των βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν.



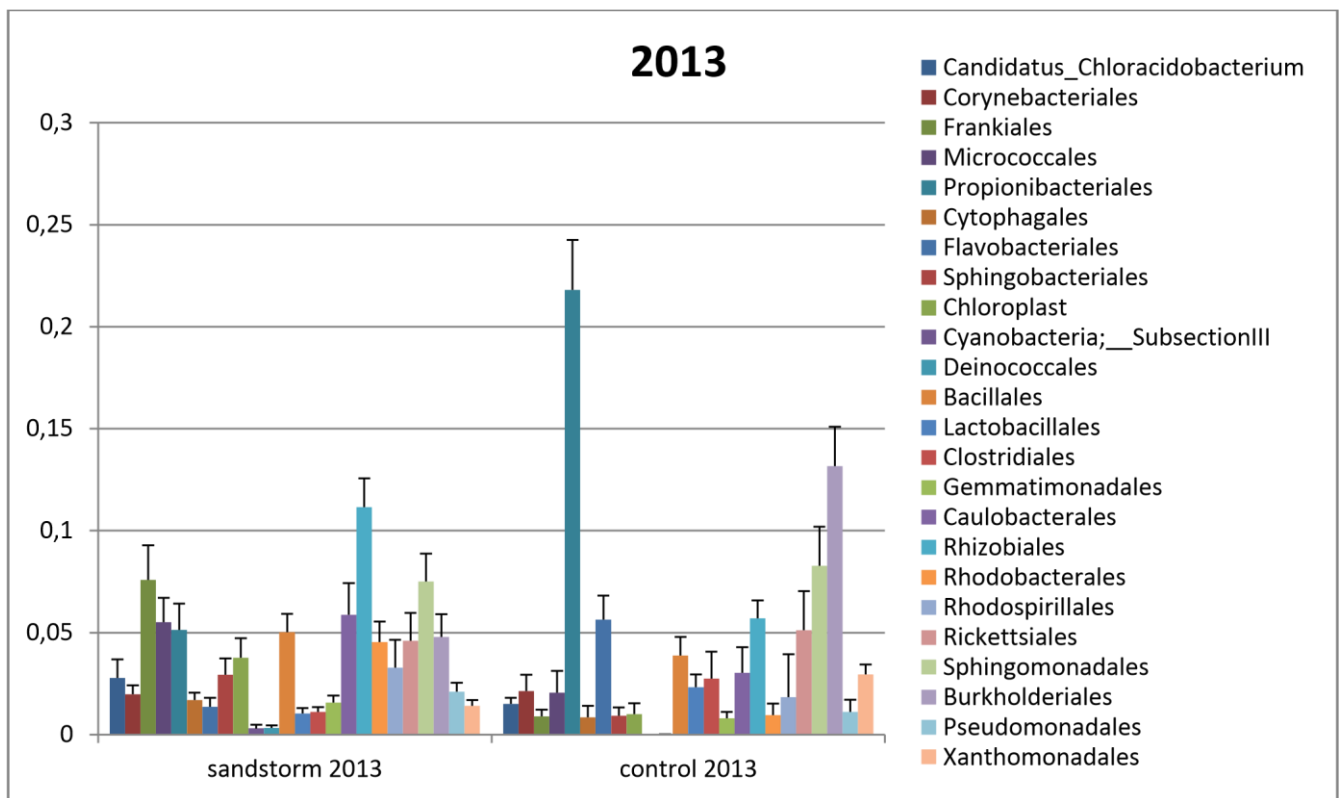
Διάγραμμα 1 Σχετική αφθονία βακτηρίων σε επίπεδο κλάσης για το έτος 2013



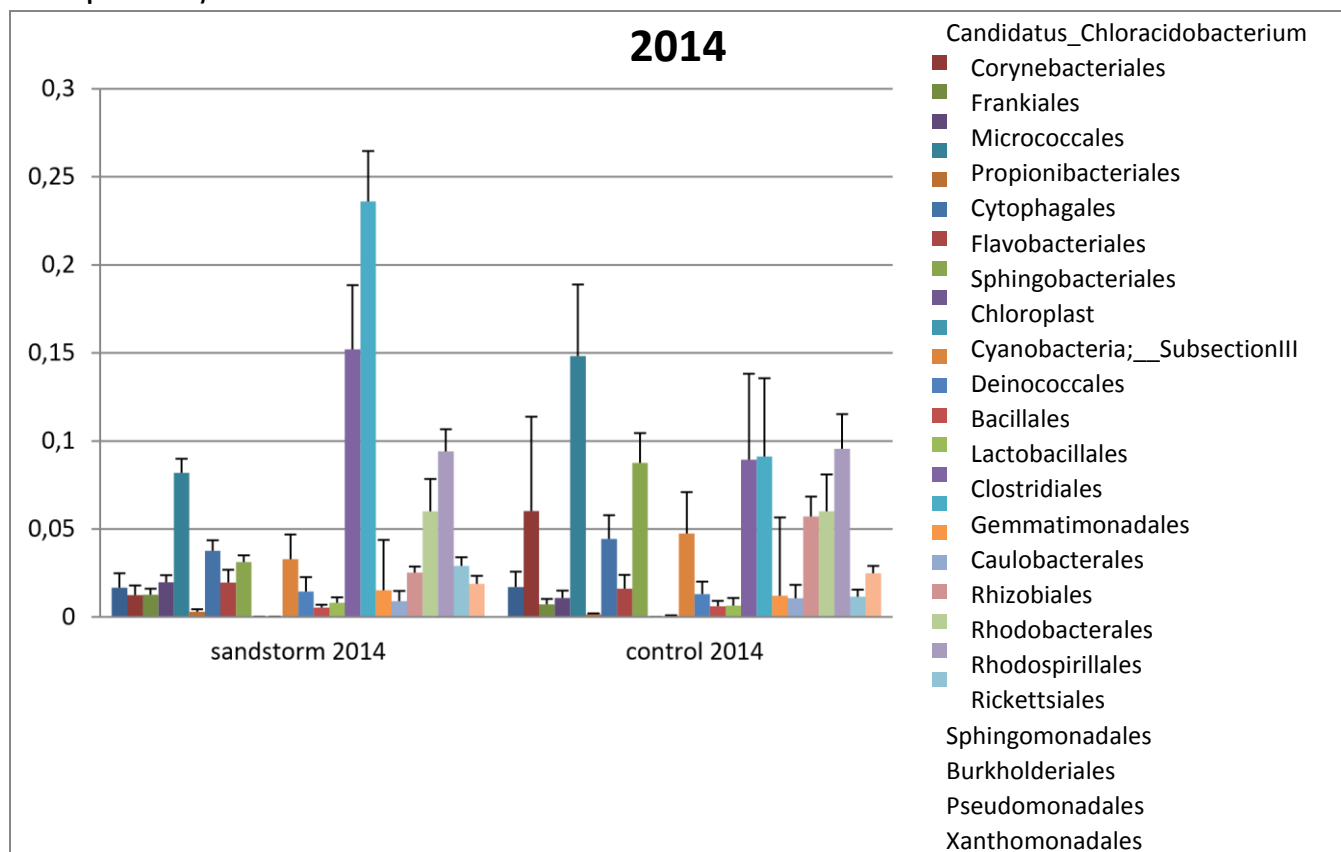
Διάγραμμα 2 Σχετική αφθονία βακτηρίων σε επίπεδο κλάσης για το έτος 2014

Παρατηρούνται μεγάλες διακυμάνσεις στα δυο έτη σε συγκεκριμένες κλάσεις βακτηρίων όπως τα α-πρωτεοβακτήρια, β-πρωτεοβακτήρια, γ-πρωτεοβακτήρια και ακτινοβακτήρια. Παρατηρείται ότι τόσο για το 2013 όσο και για το 2014 όσο αυξάνονται τα Alphaproteobacteria μειώνονται τα Actinobacteria και τα Betaproteobacteria. Παρόλα αυτά η βακτηριακή ποικιλότητα δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο ετών.

Στη συνέχεια για να είναι πιο εύκολη η κατανόηση έγινε μια περαιτέρω ομαδοποίηση σε σχέση με τη παρουσία (sandstorm) ή απουσία(control) αμμοθύελλας.



Διάγραμμα 3 Σχετική αφθονία βακτηρίων συγκρίνοντας τις περιπτώσεις αμμοθύελλας και κεντρικό για το έτος 2013



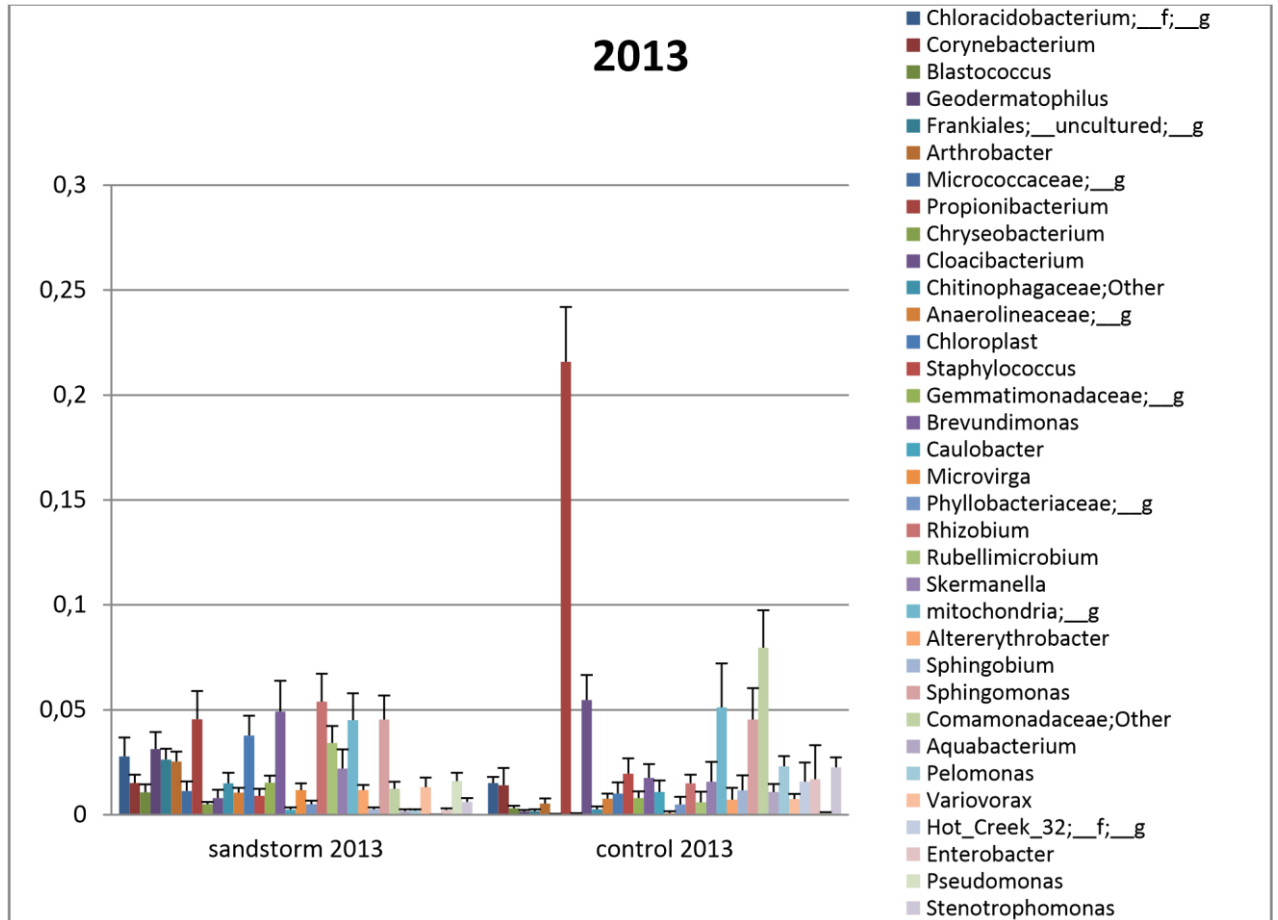
Διάγραμμα 4 Σχετική αφθονία βακτηρίων συγκρίνοντας τις περιπτώσεις αμμοθύελλας και κεντρικό για το έτος 2014

Η ανάλυση των δεδομένων υποδεικνύει ότι κατά την διάρκεια των ανεμοθύελλών παρατηρείται αύξηση των *Rhizobiales*, συνοδευόμενη από μια μικρότερη αύξηση σε αντιπροσώπους των *Caulobacteriales* (Διάγραμμα 3 & 4). Ακόμα για τις τάξεις των

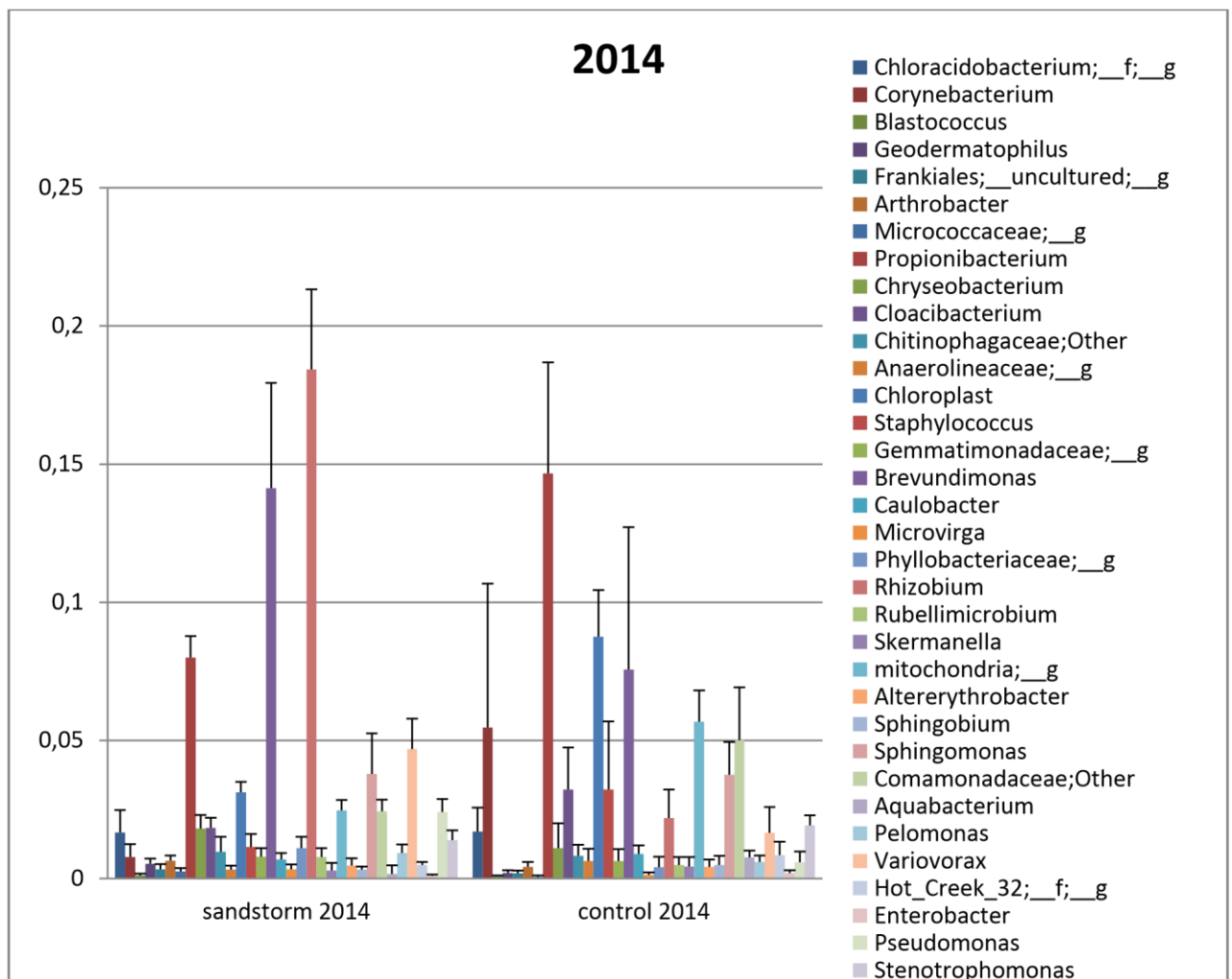
Propionibacteriales και *Rickettsiales* παρατηρείται μια σχετική μείωση της σχετικής αφθονίας (Διάγραμμα 3 & 4).

3.3.1 Σε επίπεδο γένους:

Σε αυτό το στάδιο εξετάσαμε τα γένη που παρουσίασαν αφθονία μεγαλύτερη του 1% καθώς είναι και αυτά που σημειώνουν τις διαφορές που παρατηρήσαμε παραπάνω.



Διάγραμμα 5 Σχετική αφθονία βακτηρίων με ποσοστό μεγαλύτερο του 1% συγκρίνοντας τις περιπτώσεις αμμοθύελλας και κοντρόλ για το έτος 2013

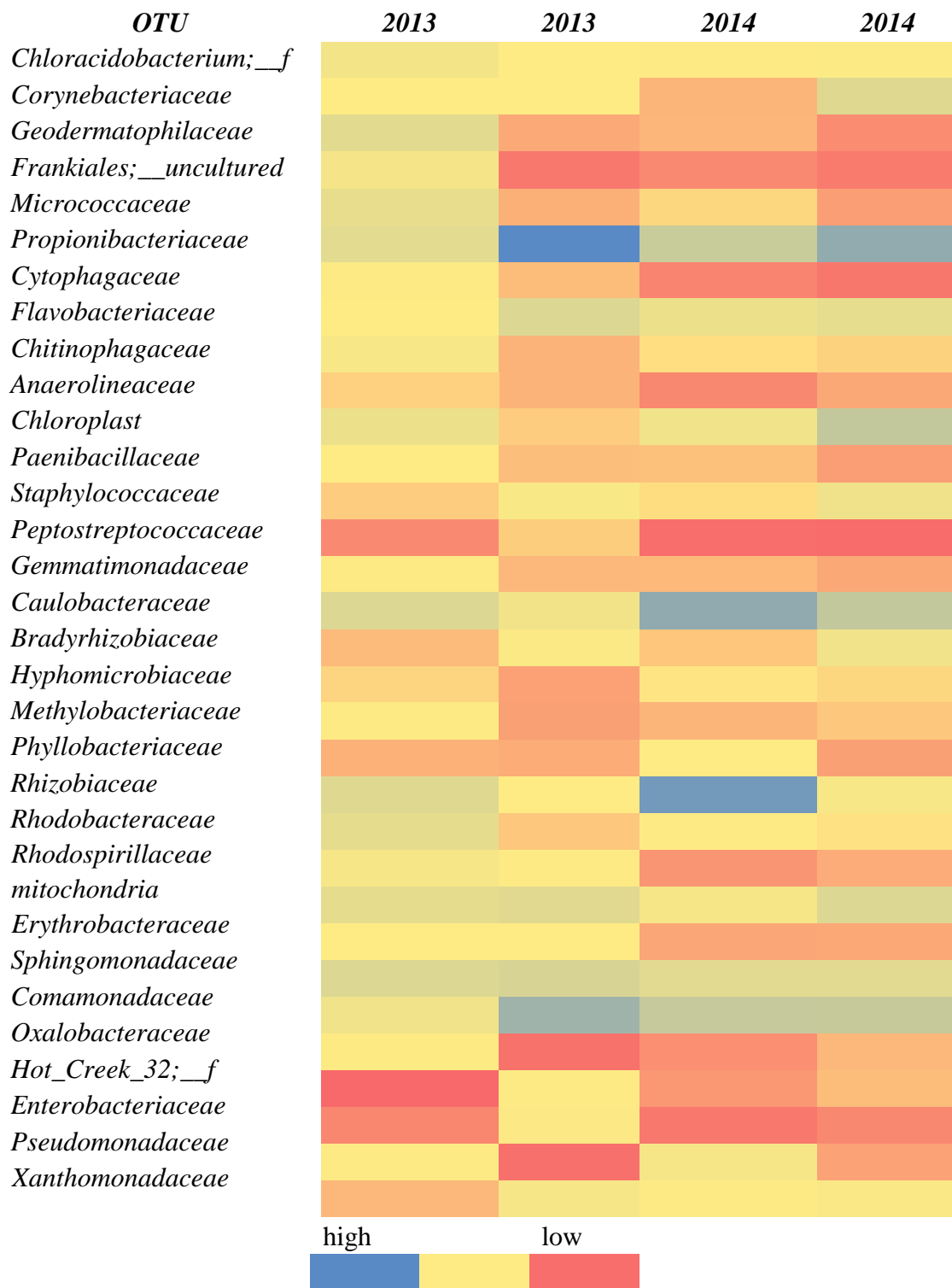


Διάγραμμα 6 Σχετική αφθονία βακτηρίων με ποσοστό μεγαλύτερο του 1% συγκρίνοντας τις περιπτώσεις αμμοθύελλας και κοντρόλ για το έτος 2014

Συγκεκριμένα παρατηρούμε ότι ο αριθμός των αλληλουχιών που σχετίζονται με τα γένη των *Rhizobium* και *Pseudomonas* αυξάνονται κατά τη διάρκεια ανεμοθυελλών ενώ αντίθετα μειώνονται οι αντιπρόσωποι των *Propionibacterium*. Επίσης τα *Comamonadaceae* μειώνονται σε περιόδους μεταφοράς σκόνης (Διάγραμμα 5 & 6).

3.4 Ποιοτική παρουσίαση της ετήσιας διακύμανσης (heatmap)

sandstorm control sandstorm control



Στο διάγραμμα αυτό μπορούμε να παρατηρήσουμε ποιοτικά τις διαφορές που παρουσιάζονται στα δείγματα μας ανάλογα με το έτος και την παρουσία η όχι αμμοθύελλας. Η χρωματική απεικόνιση των τιμών ευνοεί την κατανόηση των διαφορών. Αρχικά παρατηρείται το γεγονός ότι υπάρχουν οικογένειες που μένουν ανεπηρέαστες από το αν υπάρχει αμμοθύελλα η όχι. Οι οικογένειες αυτές είναι : *Chloracidobacterium;f*, *Flavobacteriaceae*, *Paenibacillaceae*, *Gemmatimonadaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Erythrobacteraceae*, *Sphingomonadaceae*, *Comamonadaceae*, *Rhodospirillaceae*. Οι μικρές διαφορές που δύναται να υπάρχουν στις τιμές δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Παρατηρείται, ότι κάποιες από τις οικογένειες αυτές παρότι

δεν τις επηρεάζει η παρουσία η απουσία σκόνης έχουν αυξομειώσεις σε ότι αφορά τον πληθυσμό τους ανάμεσα στα δυο έτη, όπως είναι η *Comamonadaceae* και η *Rhodospirillaceae*. Η διαφορά αυτή πιθανώς οφείλεται στις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν στα 2 έτη ή στις διαφορετικές ρετροπορείες. Επίσης, οι αντιπρόσωποι της οικογένειας *Enterobacteriaceae* έχουν πτωτικές τάσεις κατά τη διάρκεια της αμμοθύελλας και αυτό συμβαίνει και στα δυο έτη δειγματοληψίας.

Με ακριβώς αντίθετο τρόπο κινούνται οι αντιπρόσωποι της οικογένειας *Pseudomonadaceae*, παρουσιάζουν αύξηση κατά τη διάρκεια της αμμοθύελλας.

Αντιπρόσωποι της οικογένειας αυτής έχουν απομονωθεί από δείγματα εδάφους, από ιστούς φυτών και ζώων συνεπώς η αυξημένη παρουσία τους κατά την αμμοθύελλα είναι αναμενόμενη (89). Κατά τη διάρκεια της αμμοθύελλας παρατηρείται μια αύξηση των βακτηρίων που ανήκουν στην οικογένεια των *Geodermatophilaceae*.

Μέλη της οικογένειας αυτής έχουν βρεθεί σε ποικίλα δείγματα εδάφους και πολλά από αυτά σε δείγματα από ερήμους. Συγκεκριμένα τα είδη *Geodermatophilus* και *Blastococcus* θεωρούνται ιδιαίτερα ανθεκτικά σε ακραία περιβάλλοντα. Η κυτταρική δομή τους καθώς και το υψηλό περιεχόμενο G+C αυξάνουν την προστασία τους απέναντι στην υψηλή ακτινοβολία που παρατηρείται στις ερήμους (90). Τέλος, έχουν τη δυνατότητα να δημιουργούν σπόρια, γεγονός που τους επιτρέπει την ανάπτυξη σε ακραία περιβάλλοντα.

Τα μέλη της οικογένειας *Propionibacteriaceae* τείνουν να μειώνονται κατά τη διάρκεια της αμμοθύελλας και αυτό συμβαίνει κατά τη διάρκεια και των 2 ετών. Το *Propionibacterium* είναι ένα είδος το οποίο αναπτύσσεται σε γαλακτοκομικά προϊόντα, σε φυτά αλλά και στην επιδερμίδα του ανθρώπου. Δεν διαθέτει ιδιαίτερους μηχανισμούς ώστε να μπορεί να προστατευτεί από ακραίες συνθήκες, γεγονός που επιβεβαιώνεται με την μείωση της σχετικής αφθονίας του *Propionibacterium* κατά τη διάρκεια των αμμοθυελλών.

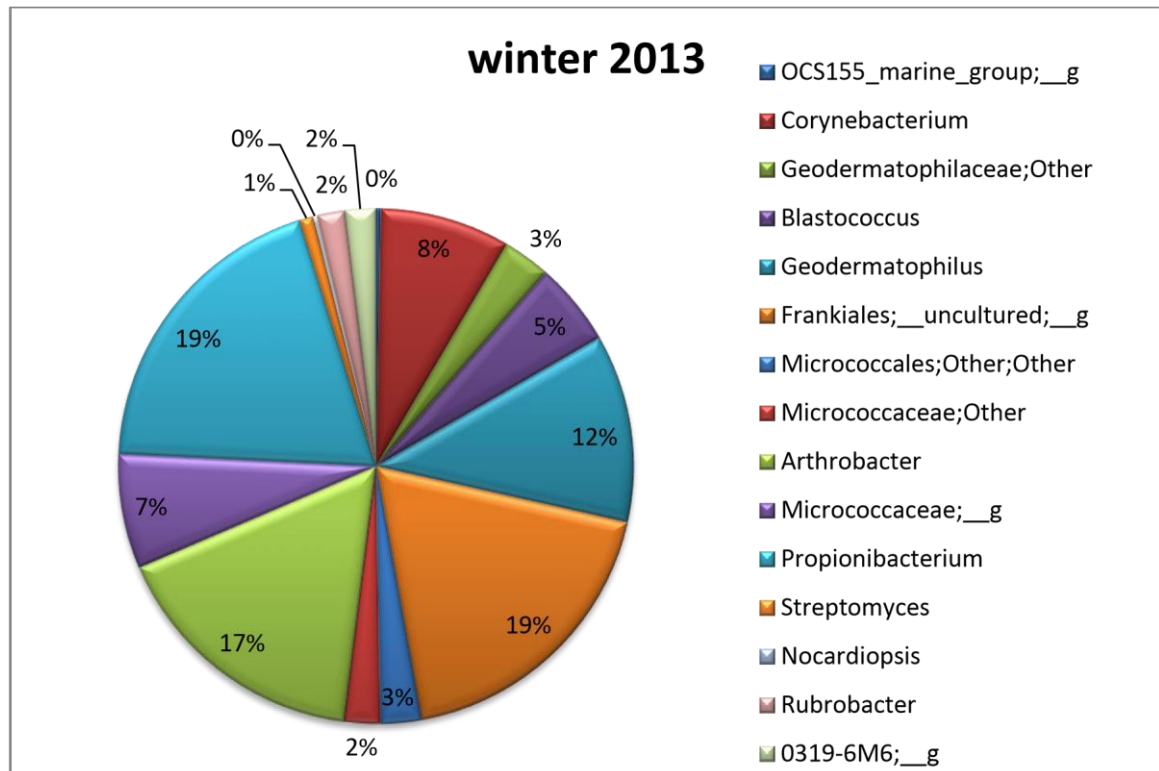
Η οικογένεια *Caulobacteraceae* παρουσιάζει άνοδο κατά τη διάρκεια της αμμοθύελλας. Αυτό συμβαίνει λόγω του γένους *Brevundimonas* του οποίου τα στελέχη διαβιούν σε ιδιαίτερα ακραίες συνθήκες. Στελέχη του γένους αυτού έχουν απομονωθεί στην ανταρκτική και επίσης έχουν πραγματοποιηθεί πειράματα από τα οποία ανακαλύφθηκε η αντοχή τους απέναντι στην ακτινοβολία. Επομένως η άνοδος που παρατηρείται τις περιόδους που υπάρχει αμμοθύελλα είναι φυσιολογική καθώς οι ακραίες συνθήκες δεν τα επηρεάζουν (91). Τέλος στελέχη που ανήκουν στην οικογένεια *Rhizobiaceae* παρατηρείται να έχουν ανοδική τάση κατά τη διάρκεια της αμμοθύελλας. Τα βακτήρια της οικογένειας αυτής είναι συμβιωτικά, έχουν απομονωθεί από διάφορα περιβάλλοντα και χαρακτηρίζονται από σχετική αντοχή σε δύσκολες συνθήκες. Διαθέτουν υψηλό περιεχόμενο σε G + C βάσεις και λειτουργούν εξαιρετικά σε συνθήκες στρες (92).

3.5 Εποχιακή διακύμανση

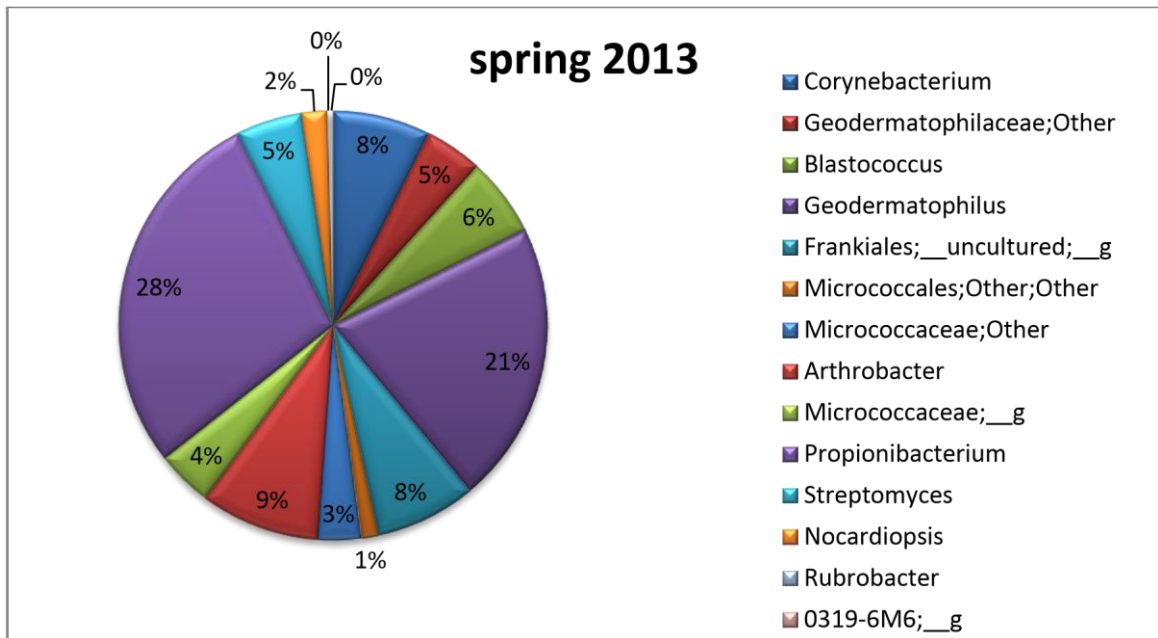
Παρατηρώντας διαφορές στην ετήσια διακύμανση της ποικιλότητας επιλέξαμε να εξετάσουμε και την εποχιακή διακύμανση ώστε να εντοπίσουμε τις διαφορές μεταξύ

των εποχών. Για να διεξάγουμε τον έλεγχο της εποχιακής διακύμανσης πραγματοποιήθηκε η εξής ομαδοποίηση των δειγμάτων μας. Αρχικά διαχωρίστηκαν σε παρουσία (sandstorm) και απουσία (control) αμμοθύελλας. Στη συνέχεια σύμφωνα με την ημερομηνία δειγματοληψίας τα διαχωρίσαμε σε χειμώνα και άνοιξη. Υπήρξε και χρονικός διαχωρισμός για τα 2 έτη που έγινε η δειγματοληψία. Εξετάζοντας την εποχιακή διακύμανση δεν παρατηρούνται ιδιαίτερες διακυμάνσεις μεταξύ των εποχών στα περισσότερα φύλα εξαιρώντας τις ομάδες των πρωτεοβακτηρίων και των ακτινοβακτηρίων (Διάγραμμα 1,2). Στα φύλα αυτά παρατηρείται μια διαφοροποίηση της τάξης του 10% μεταξύ των εποχών, παρόλα αυτά μεγάλη διακύμανση παρατηρείται μεταξύ των ετών που είναι της τάξης του 20% στα συγκεκριμένα φύλα.

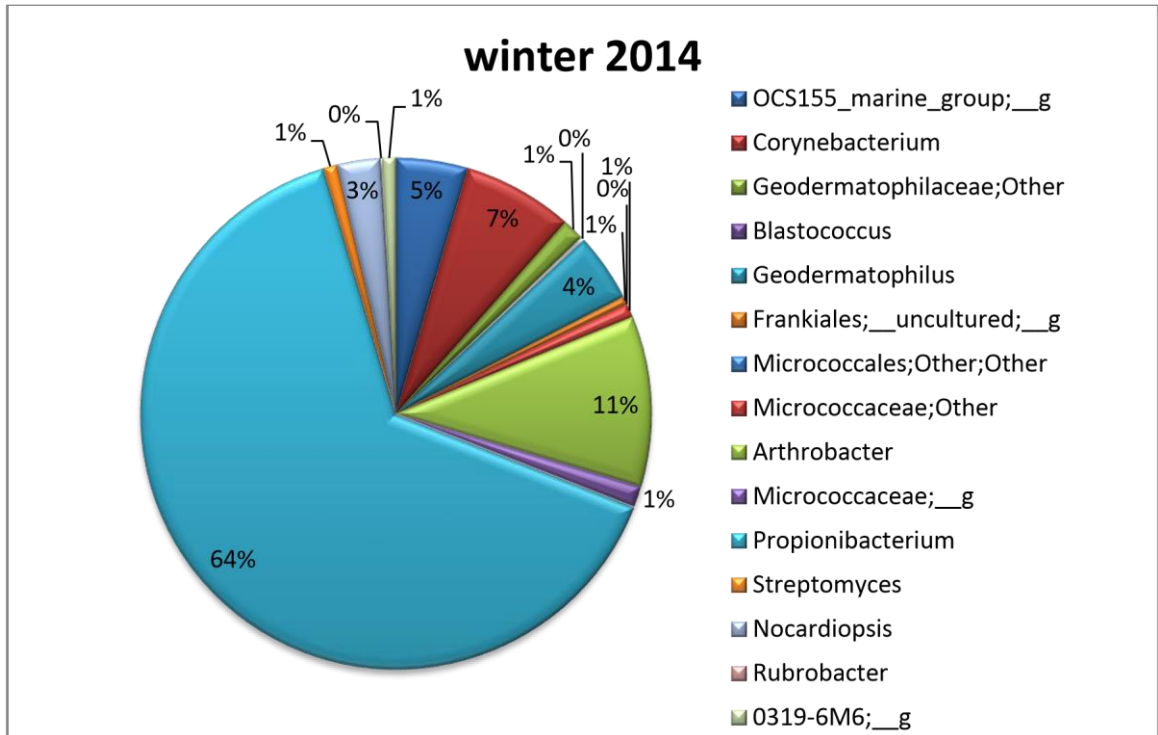
➤ *Ακτινοβακτήρια*



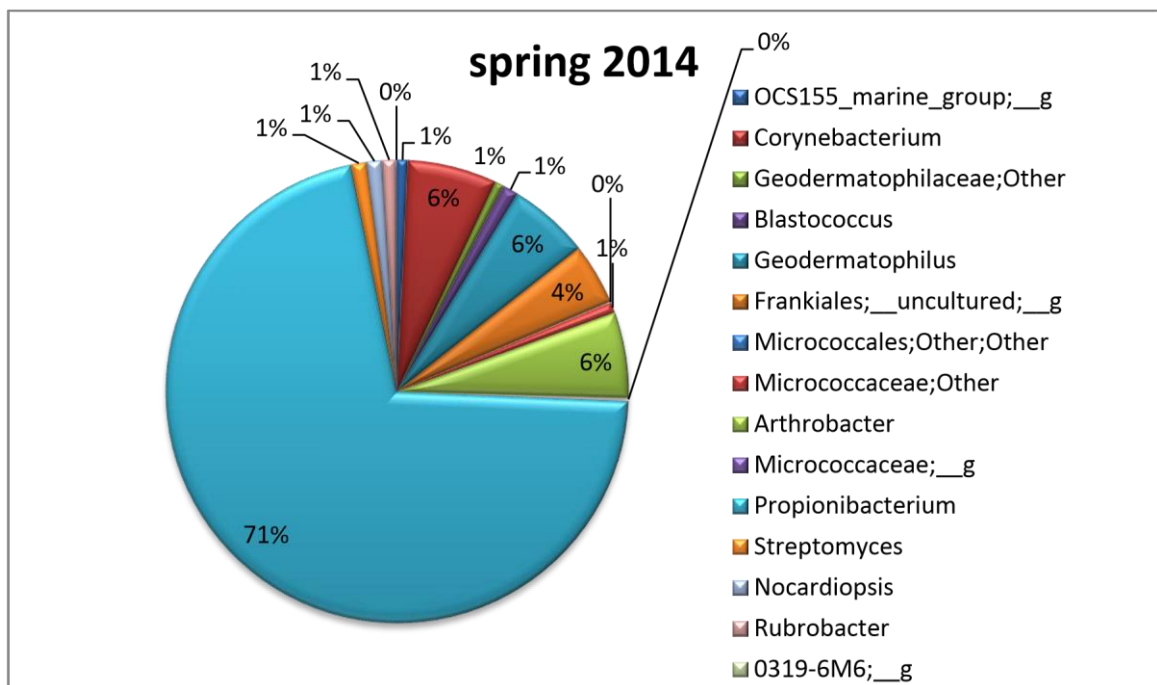
Διάγραμμα 7 Διακύμανση αντιπροσώπων ακτινοβακτηρίων κατά τη διάρκεια του χειμώνα του 2013



Διάγραμμα 8 Διακύμανση αντιπροσώπων ακτινοβακτηρίων κατά τη διάρκεια της άνοιξης του 2013



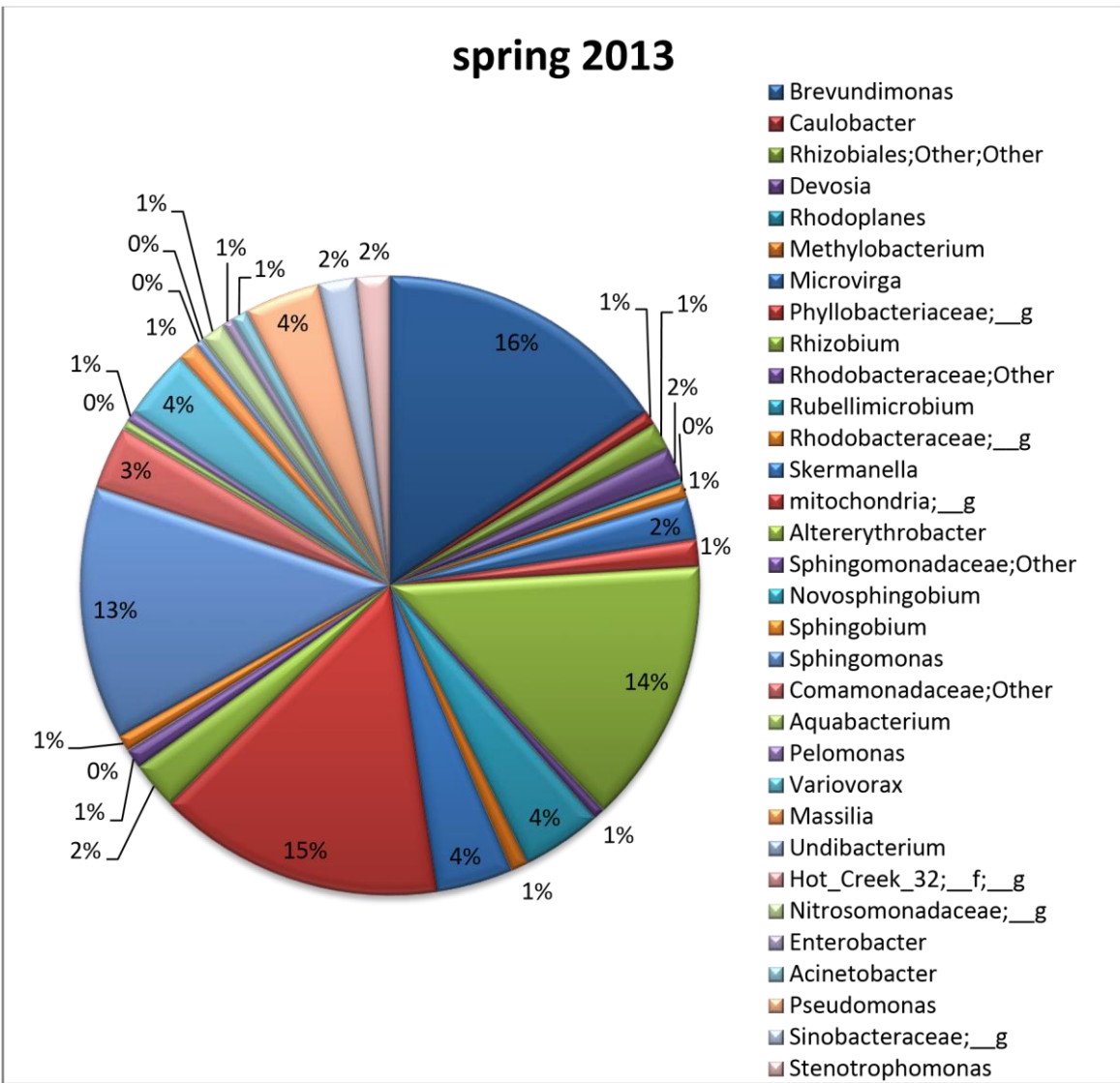
Διάγραμμα 9 Διακύμανση αντιπροσώπων ακτινοβακτηρίων κατά τη διάρκεια του χειμώνα του 2014



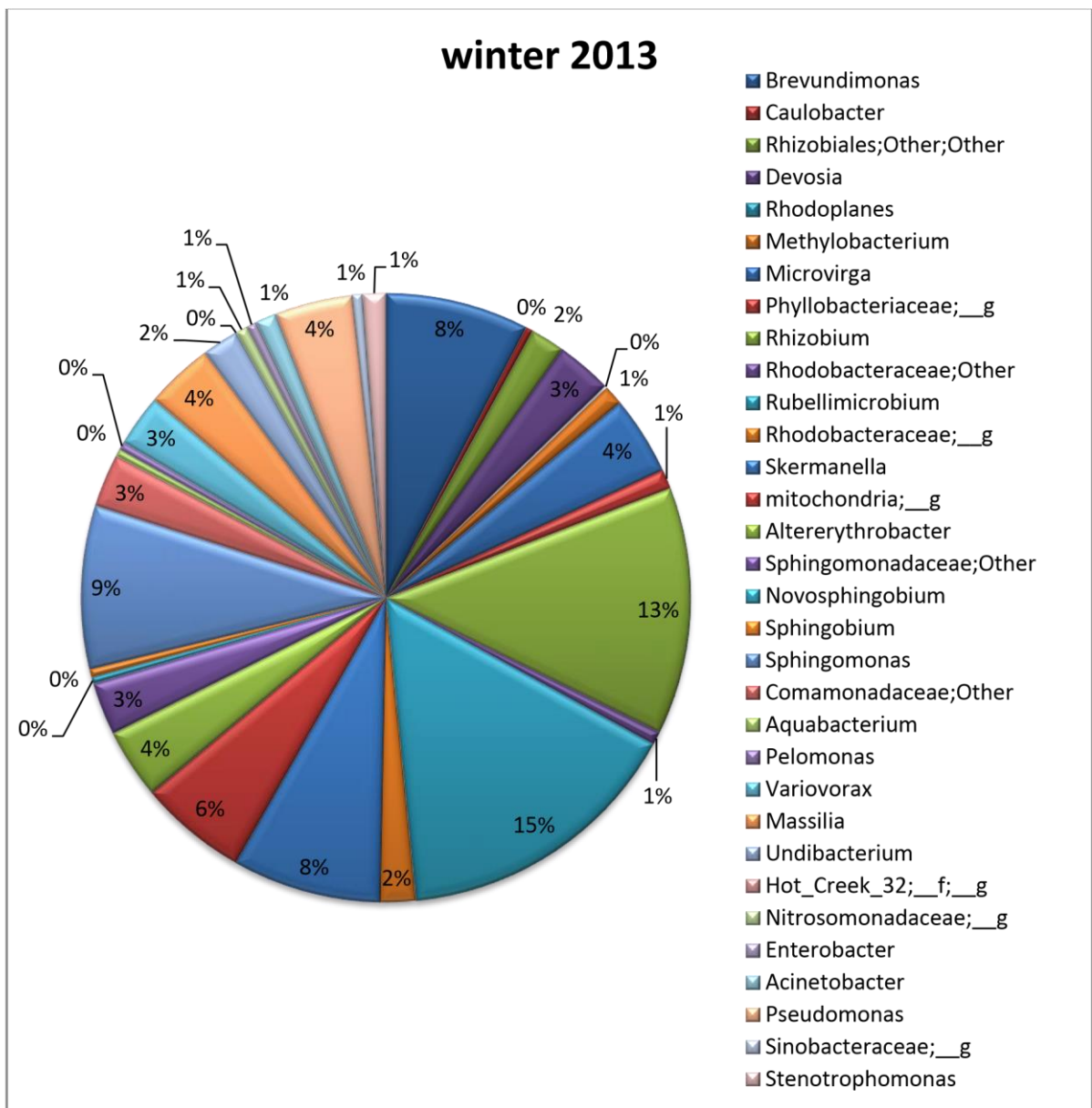
Διάγραμμα 10 Διακύμανση αντιπροσώπων ακτινοβακτηρίων κατά τη διάρκεια της άνοιξης του 2014

Σε ότι αφορά τα *ακτινοβακτήρια* εποχικά δεν παρατηρούνται πολύ μεγάλες διακυμάνσεις. Συγκεκριμένα ισχυρή παρουσία έχουν τα γένη *Propionibacterium*, *Arthrobacter*, *Geodermatophilus*. Μεταξύ των εποχών (χειμώνας- άνοιξη) η διακύμανση είναι της τάξης του 8-10%. Παρόλα αυτά η πολύ μεγάλη διαφορά εμφανίζεται μεταξύ των ετών, που στη περίπτωση του *Propionibacterium* είναι περίπου 50% (Διάγραμμα 7,8,9,10). Υπάρχουν διάφοροι λόγοι που υφίσταται αυτό το γεγονός. Αρχικά σημαντικό ρόλο παίζει η προέλευση της σκόνης εξετάζοντας τις ρετροπορείες παρατηρείται μια διαφοροποίηση μεταξύ των 2 ετών. Επίσης οι περιβαλλοντικές συνθήκες ενδέχεται στο ένα έτος να ήταν ευνοϊκότερες σε σχέση με το άλλο για κάποιες ομάδες βακτηρίων. Τέλος το γένος του *Propionibacterium* πολλές φορές λόγω συγγένειας συγγέεται με το γένος του *Corynebacterium* καθώς κάποια είδη είναι πολύ όμοια συνεπώς επειδή η ανάλυση έγινε μέχρι το επίπεδο γένους υπάρχει και αυτό το ενδεχόμενο (93).

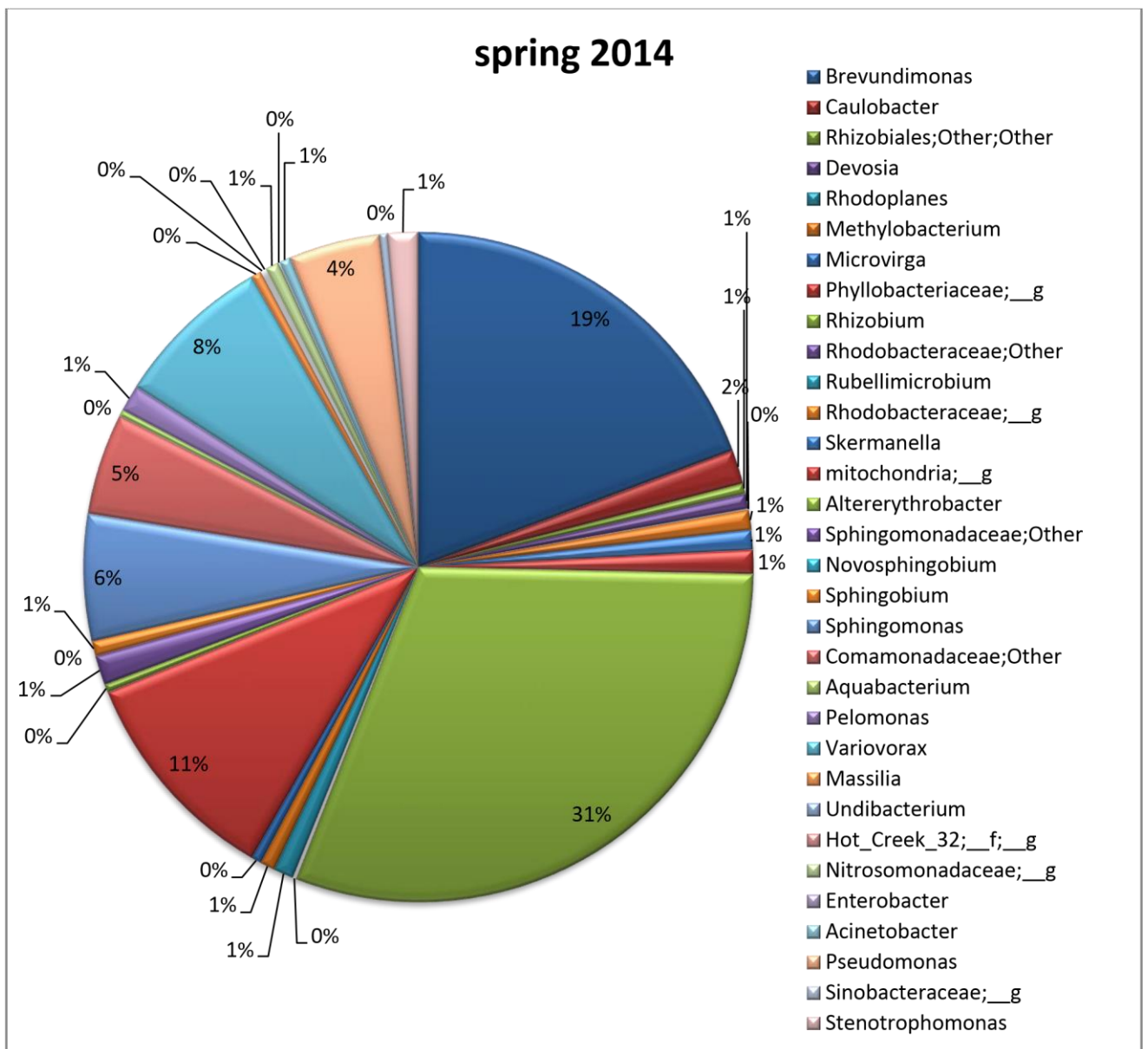
➤ *Πρωτεοβακτήρια*



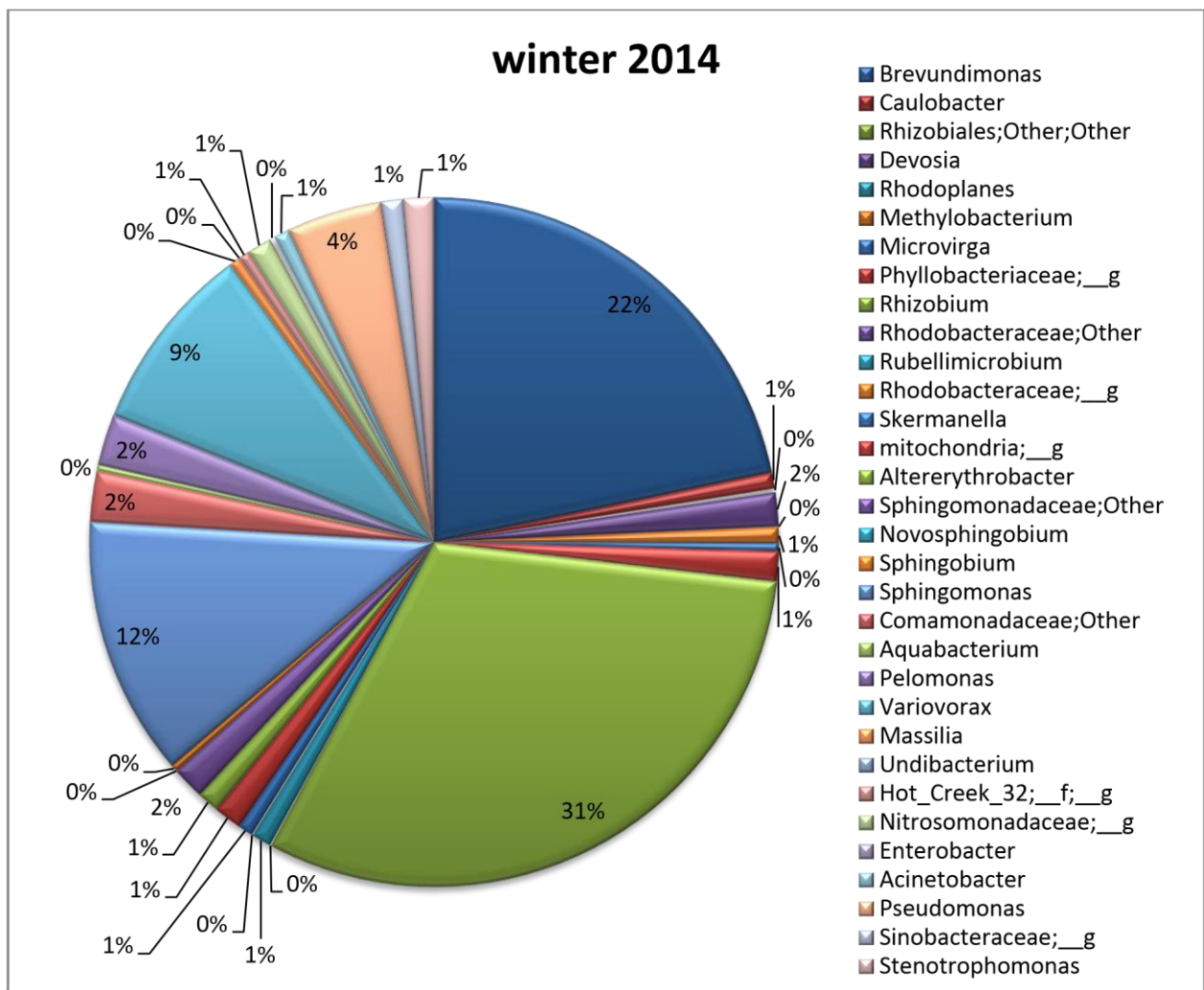
Διάγραμμα 11 Διακύμανση αντιπροσώπων πρωτεοβακτηρίων κατά τη διάρκεια της άνοιξης του 2013



Διάγραμμα 12 Διακύμανση αντιπροσώπων πρωτεοβακτηρίων κατά τη διάρκεια το χειμώνα του 2013



Διάγραμμα 13 Διακύμανση αντιπροσώπων πρωτεοβακτηρίων κατά τη διάρκεια της άνοιξης του 2014



Διάγραμμα 14 Διακύμανση αντιπροσώπων πρωτεοβακτηρίων κατά τη διάρκεια του χειμώνα του 2014

Αναφορικά με τα πρωτεοβακτήρια παρατηρούνται κάποιες διαφορές μεταξύ των εποχών, στα γένη *Rubellimicrobium*, *Sphingomonas*, *Brevundimonas*, *Skermanella*, *Rhizobium*, *Variovorax* της τάξεως του 4-10%. Οι διαφορές αυτές που προκύπτουν μεταξύ των εποχών είναι λογικές καθώς οι περιβαλλοντικές συνθήκες μεταβάλλονται. Στα αναφερόμενα γένη παρατηρείται πολύ μεγάλη διαφορά μεταξύ των ετών. Πιο συγκεκριμένα τα μέλη του γένους *Rhizobium* παρουσιάζουν μια διαφορά της τάξεως του 18% ενώ στο γένος *Brevundimonas* είναι στο 14%. Τα στελέχη που ανήκουν στο γένος *Rubellimicrobium* παρουσιάζουν μια αύξηση περίπου 12% κατά τη διάρκεια του χειμώνα του 2013 ενώ την άνοιξη του 2013 και 2014 είναι στο 1-3%. Όπως αναφέραμε και παραπάνω οι διαφορές αυτές μπορεί να προκύπτουν είτε από τις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούσαν κατά τη διάρκεια των 2 ετών, είτε λόγω της πορείας της σκόνης όπως αυτή εξετάστηκε από τις ρετροπορείες.

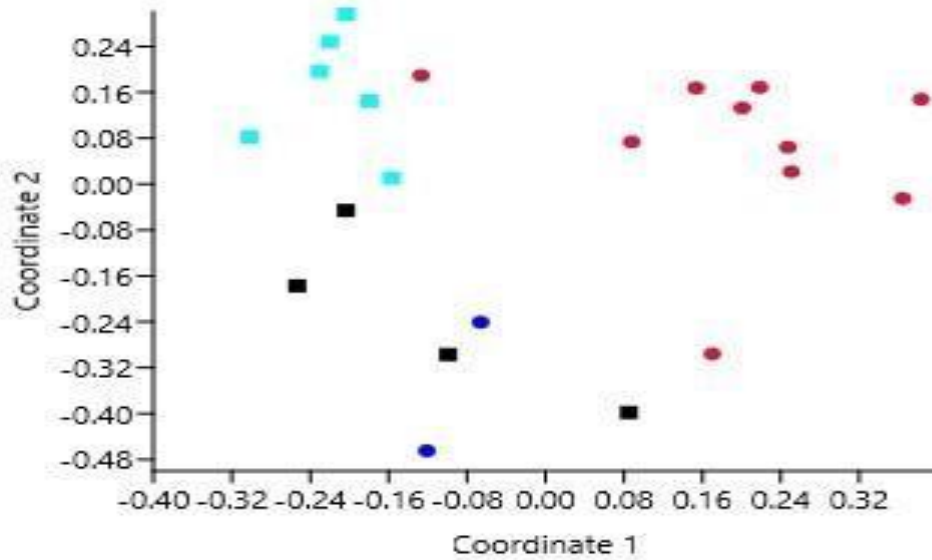
3.6 Στατιστική ανάλυση

- ✓ Principal Coordinate Analysis

Η μέθοδος των Κυρίων Συνιστωσών είναι μία τεχνική ανάλυσης δεδομένων με σκοπό τη δημιουργία καινούργιων μεταβλητών, οι οποίες είναι γραμμικοί συνδυασμοί των αρχικών μεταβλητών, έτσι ώστε να είναι ασυσχέτιστες μεταξύ τους και να περιέχουν όσο το δυνατόν μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης των αρχικών μεταβλητών. Οι νέες μεταβλητές που παράγονται ονομάζονται Κύριες Συνιστώσες. Αυτό που επιτυγχάνεται από τη μέθοδο αυτή είναι ότι από ένα σύνολο συσχετισμένων μεταβλητών καταλήγουμε σε ένα σύνολο ασυσχέτιστων μεταβλητών, το οποίο είναι χρήσιμο για αρκετές στατιστικές μεθόδους. Επίσης, οι κύριες συνιστώσες που προκύπτουν μπορούν να ερμηνεύσουν το μεγαλύτερο ποσοστό της διακύμανσης, που σημαίνει πως καταλήγουμε σε ένα πιο μικρό αριθμό μεταβλητών από ότι είχαμε αρχικά, με κόστος ότι χάνουμε ένα μικρό ποσοστό της συνολικής μεταβλητότητας. Τέλος, ένα χρήσιμο γράφημα που χρησιμοποιείται στην ανάλυση σε κύριες συνιστώσες είναι το biplot. Είναι η γραφική παράσταση των τιμών των κυρίων συνιστωσών (principal components scores) και των συντελεστών (principal components loadings) ταυτόχρονα στο ίδιο γράφημα.

Η κανονική ανάλυση κύριων συντεταγμένων (CAP) συσχετίζει τα δεδομένα του συνόλου των ειδών με κάποιες άλλες ποσοτικές μεταβλητές (π.χ. περιβαλλοντικές μεταβλητές) για να δείξει την αλληλεπίδραση ενός εξωτερικού και ανεξάρτητου παράγοντα στα βιολογικά δεδομένα μας. Ωστόσο αυτές οι μέθοδοι είναι "μόνο" τεχνικές οπτικοποίησης ομάδων και πρέπει να συνοδεύονται από στατιστικές αναλύσεις για την εύρεση σημαντικών διαφορών μεταξύ των ομάδων (π.χ. ANOSIM, PERMANOVA, κλπ). Τα σημεία βρίσκονται πλησιέστερα στο χώρο m διαστάσεων ομαδοποιούνται με βάση το δείκτη ομοιότητας Bray-Curtis σε ομογενείς κατά σύσταση ομάδες. Με βάση αυτόν τον αλγόριθμο, είδη εντός της ίδιας ομάδας βρίσκονται κοντά μεταξύ τους ενώ είδη που είναι μακριά μεταξύ τους διαχωρίζονται σε διαφορετικές ομάδες. Τα αποτελέσματα της PCoA και της CAP δείχνουν ότι υπάρχει απόσταση μεταξύ των δειγμάτων κοντρόλ και ανεμοθύελλας καθώς και μεταξύ των ετών κατά τη διάρκεια των οποίων πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες. Η ανάλυση PCoA δείχνει ευδιάκριτα τις ανομοιότητες μεταξύ των δειγμάτων πράγμα που υποστηρίζεται διακριτά και από την CAP

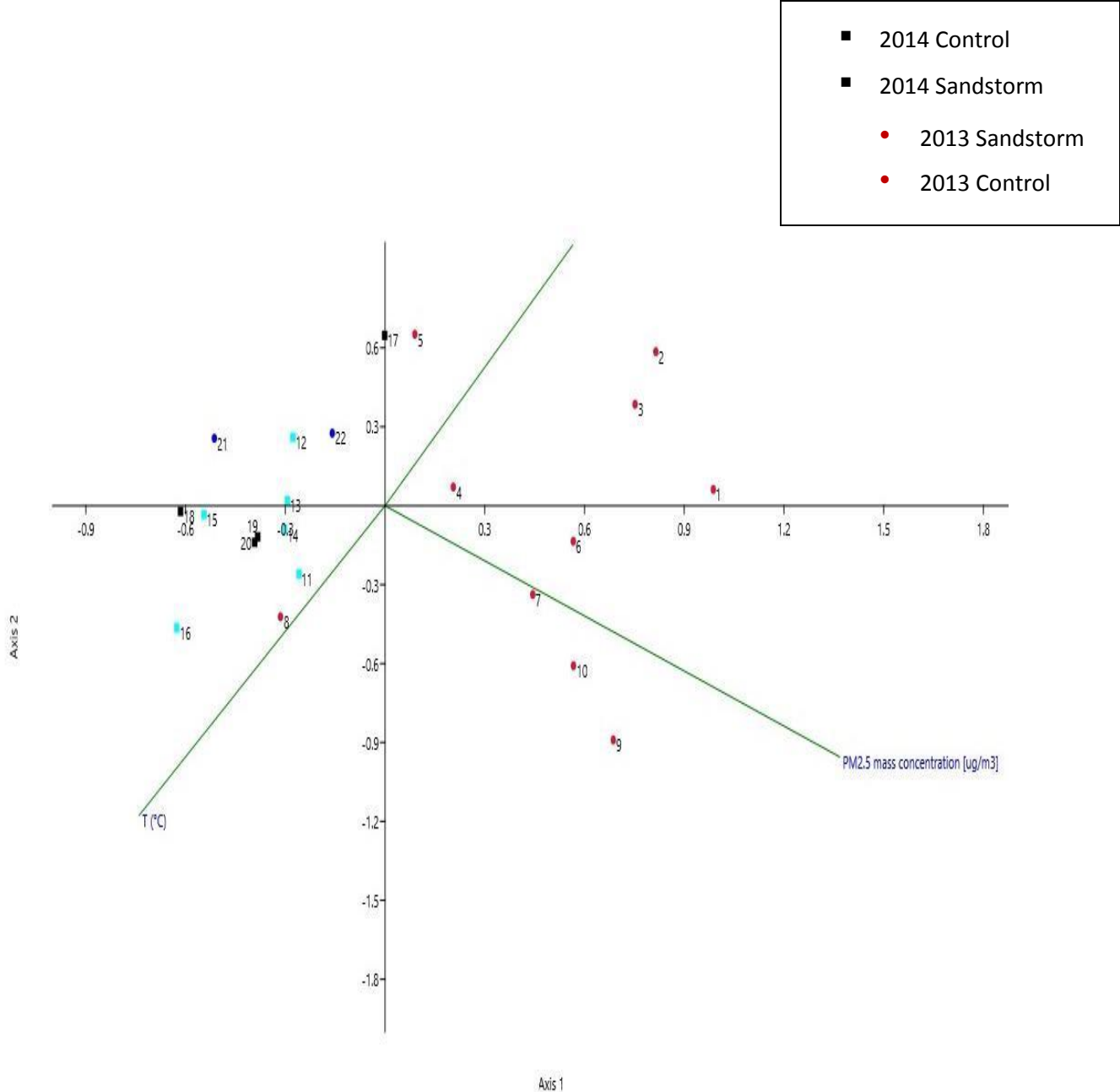
- 2014 Control
- 2014 Sandstorm
- 2013 Sandstorm
- 2013 Control



Διάγραμμα 15 Ανάλυση κύριων συντεταγμένων (PCoA)

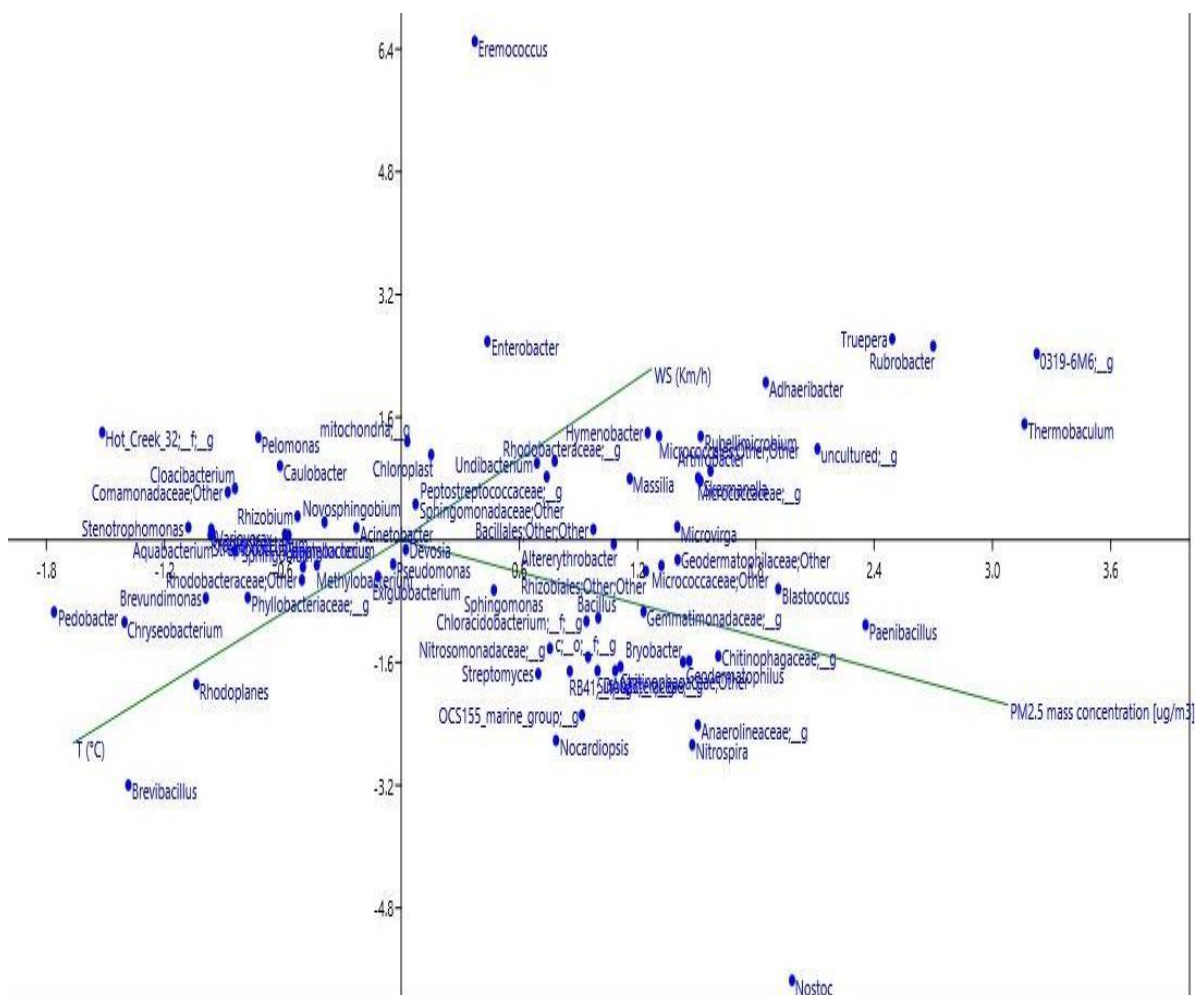
Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται πως τα δείγματα αμμοθύελλας του 2013 με αυτά του 2014 σχηματίζουν 2 διακριτές ομάδες. Το σχηματισμό διαφορετικών διακριτών ομάδων παρατηρούμε και μεταξύ των δειγμάτων αμμοθύελλας και κοντρόλ. Γεγονός που δεν παρατηρείται μεταξύ των δειγμάτων κοντρόλ στα 2 έτη αφού αυτά επικαλύπτονται.

✓ Canonical Correspondence Analysis



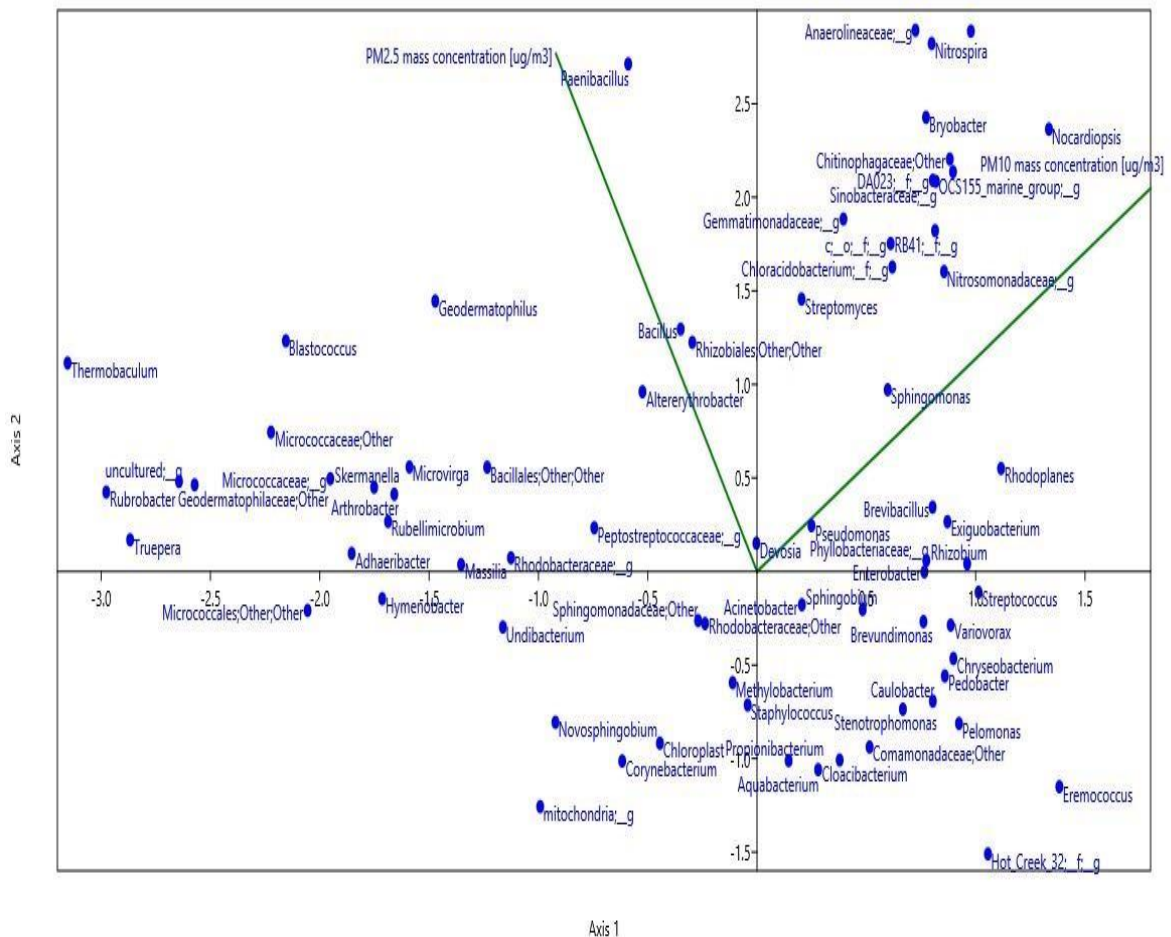
Διάγραμμα 16 Συσχέτιση μεταξύ των δειγμάτων και των μεγεθών θερμοκρασίας και μάζας.

Στο διάγραμμα 16 εξετάζεται η συσχέτιση των δειγμάτων με τους παράγοντες της θερμοκρασίας και της μάζας. Παρατηρείται λοιπόν ότι τα δείγματα 8 και 11 σχετίζονται περισσότερο με τη θερμοκρασία, μια πιθανή αύξηση της θερμοκρασίας επηρεάζει περισσότερο τα δείγματα αυτά καθώς υπάρχει μια θετική συσχέτιση. Αναλόγως τα δείγματα 7 και 10 επηρεάζονται περισσότερο από την συγκέντρωση της μάζας. Με τα υπόλοιπα δείγματα υπάρχει μια αρνητική συσχέτιση, η θερμοκρασία και η συγκέντρωση της μάζας δεν τα επηρεάζουν.



Διάγραμμα 17 Συσχέτιση μεταξύ των βακτηριακών ομάδων και των μεγεθών θερμοκρασίας, μάζας και ταχύτητας του αέρα.

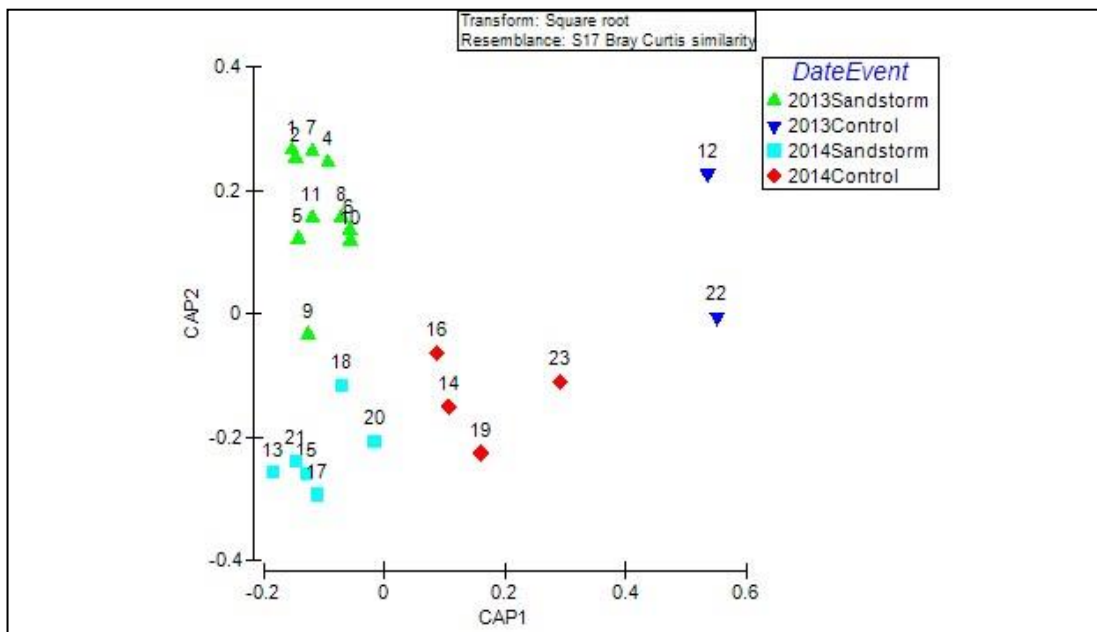
Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται η συσχέτιση κάποιων ομάδων με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες της θερμοκρασίας, της μάζας και της ταχύτητας του αέρα. Παρατηρείται μια θετική συσχέτιση μεταξύ της θερμοκρασίας και των αντιπροσώπων που ανήκουν στα γένη *Rhodoplanes*, *Phyllobacteriaceae_g*, *Pseudomonas* και *Exiguobacterium*. Ομοίως θετική συσχέτιση παρατηρείται μεταξύ των γενών *Bacillus* και *Gemmatimonadaceae_g* και τη συγκέντρωση της μάζας. Ενώ τα γένη *Undibacterium*, *Sphingomonadaceae;other*, *Peptostreptococcaceae_g* και *Rhodobacteraceae_g* παρουσιάζουν θετική συσχέτιση με την ταχύτητα του αέρα. Όσο αυξάνεται ο καθένας από αυτούς περιβαλλοντικούς παράγοντες τόσο επηρεάζονται οι βακτηριακές αυτές ομάδες.



Διάγραμμα 18 Συσχέτιση μεταξύ των βακτηριακών ομάδων και των PM_{2,5} και PM₁₀.

Στόχος μας στο παραπάνω διάγραμμα ήταν να εξετάσουμε πόσο επηρεάζουν τις χαρακτηρισμένα γένη των βακτηρίων οι συγκεντρώσεις των διαφόρων σωματιδίων σκόνης. Εξετάσαμε πως αντιδρούν τα μέλη των βακτηρίων παρουσία PM_{2,5} και PM₁₀ μόνο για τα δείγματα στα οποία υπήρχαν δειγματοληπτικά δεδομένα, δηλαδή για 15 από τα 22 δείγματα. Παρατηρήθηκε ότι τα γένη των βακτηρίων (*Bacillus*, *Altererythrobacter* και *Rhizobiales;other;other*) που είδαμε και παραπάνω να επηρεάζονται από την παρουσία των PM_{2,5} συνεχίζουν να συσχετίζονται με αυτά εκτός από το γένος *Gemmatimonadaceae_g* που τείνει προς τα PM₁₀. Τέλος παρατηρήθηκε μια θετική συσχέτιση μεταξύ των PM₁₀ και των γενών *Pseudomonas* και *Sphingomonas*.

✓ Canonical Principal coordinates Analysis



Διάγραμμα 19 Κανονική ανάλυση συντεταγμένων (CAP)

Στο διάγραμμα 18 παρατηρείται ότι η κάθε χρονιά καθώς και η κάθε συνθήκη (αμμοθύελλα ή κοντρόλ) συνιστά διαφορετική δομή μικροβιακής κοινότητας.

Συμπερασματικά από την στατιστική ανάλυση προκύπτουν τα εξής :

- Υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων sandstorm και control
- Η ομοιότητα Bray-Curtis υποδεικνύει διακριτές συστάδες στο χώρο μεταξύ των δειγμάτων sandstorm και control που ποσοτικά υποστηρίζεται από τα ποσοστά της ανάλυσης CAP
- Τα αποτελέσματα της CAP δείχνουν ότι υπάρχει απόσταση μεταξύ των δειγμάτων sandstorm και control καθώς και μεταξύ των ετών κατά τη διάρκεια των οποίων πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες

4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών η αύξηση του ποσού της αφρικανικής σκόνης έχει αποδοθεί στη συνεχιζόμενη ξηρασία στη Βόρεια Αφρική, που ξεκίνησε τη δεκαετία του 1970 (94). Δορυφορικές εικόνες δείχνουν ότι η αφρικανική σκόνη μεταφέρεται σε όλη την Μεσόγειο Θάλασσα προς την Ευρώπη και προς δυσμάς διασχίζει τον Ατλαντικό Ωκεανό, επηρεάζοντας απομακρυσμένες περιοχές. Μεταφορές της σκόνης από τη Σαχάρα πάνω από την περιοχή της ανατολικής Μεσογείου είναι πολύ συχνές το χειμώνα, το φθινόπωρο και την άνοιξη και ελάχιστες κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού (95). Έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες μελέτες με

στόχο την ταυτοποίηση των μικροβίων στην ατμόσφαιρα με μεθόδους καλλιέργειας (26,28). Αυτά τα καλλιεργήσιμα μικρόβια αντιπροσωπεύουν μόνο ένα μικρό κλάσμα του τι υπάρχει στην ατμόσφαιρα (27,96,97). Σε αντίθεση με τεχνικές καλλιέργειας, η χρήση νέων τεχνολογιών για την μικροβιακή ταυτοποίηση δεν εξαρτάται από τη βιωσιμότητα κάτω από εργαστηριακές συνθήκες (29).

Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε η σύνθεση των αερομεταφερόμενων βακτηρίων στην ατμόσφαιρα της ανατολικής Μεσογείου κατά τη διάρκεια αμμοθύελλας από τη Σαχάρα, με τη χρήση νέων τεχνολογιών αλληλούχισης. Παρά την υψηλή συγκέντρωση μάζας αερολύματος κατά τη διάρκεια της εκδήλωσης του φαινομένου, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα ότι ορισμένοι από τους μικροοργανισμούς που ανιχνεύθηκαν μπορεί να έχουν προέλθει από άλλες πηγές πλην της Σαχάρας. Στην περίπτωση μας, το μικροβιακό περιεχόμενο της σκόνης θα μπορούσε να έχει αναμιχθεί με τα σωματίδια του εδάφους από τις επιφάνειες της Βόρειας Αφρικής και της Κρήτης κατά μήκος της οριζόντιας μεταφοράς των μαζών αέρα στο χώρο δειγματοληψίας. Για να εξεταστεί και το μικροβιακό περιεχόμενο του αέρα ανεξαρτήτως του φαινομένου συλλέχθηκαν δείγματα πριν και μετά από τα επεισόδια σκόνης. Η πλειοψηφία των στελεχών που ανιχνεύθηκαν στη παρούσα εργασία συνήθως ανιχνεύονται στο έδαφος, σε θαλάσσια περιβάλλοντα, στο δέρμα αλλά και σε περιβάλλοντα που επικρατούν ακραίες συνθήκες (θερμοκρασίας, πίεσης, ακτινοβολίας, κλπ.). Επίσης πολλά από τα στελέχη σχηματίζουν σπόρια και θεωρούνται παθογόνα καθώς μπορεί να προκαλέσουν από αλλεργίες μέχρι σοβαρές πνευμονικές παθήσεις. Η δειγματοληπτική περίοδος διήρκησε 2 χρόνια και παρατηρήθηκε ότι η προέλευση των αερίων μαζών δεν ήταν πάντα η ίδια, για αυτό παρατηρήθηκαν και αρκετές διαφορές στο μικροβιακό φορτίο. Παρομοίως, η μελέτη των Prospero et al. 2005 (20) έδειξαν ότι οι συγκεντρώσεις των βιώσιμων βακτηρίων και μυκήτων στην ατμόσφαιρα της Καραϊβικής ήταν ουσιαστικά ασυσχέτιστες με τα επίπεδα της μεταφερόμενης σκόνης από την Αφρική, υπονοώντας ότι η σκόνη από τη Σαχάρα δεν ήταν η μόνη πηγή των αερομεταφερόμενων μικροβίων.

Αναφορικά με την τεχνολογία αλληλούχισης που χρησιμοποιήθηκε, πρέπει να αναφέρουμε ότι οι περισσότερες μελέτες πλέον χρησιμοποιούν τεχνολογίες νέας γενιάς καθώς μας προσφέρουν μεγαλύτερη απόδοση, λεπτομέρεια, διακριτική ικανότητα και πολύ μεγάλη ταχύτητα. Δεδομένου του δείγματος (τα δείγματα αέρα χαρακτηρίζονται από χαμηλή περιεκτικότητα γενετικού υλικού και παρουσία αναστολέων) οι νέες τεχνολογίες κρίθηκαν ως οι καταλληλότερες για την χαρτογράφηση του μικροβιακού φορτίου γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τους Rosselli et al., An S et al., Meola et al.(98,99,100)

Στην συνέχεια εξετάσαμε την α-ποικιλότητα στα δείγματα μας, δηλαδή την ποικιλότητα ειδών που παρουσιάζει το δείγμα μας. Η μελέτη αυτή έγινε χρησιμοποιώντας τους δείκτες Shannon και Simpson που μας δείχνουν την σχετική αφθονία και τους δείκτες Chao1 και O.S που αφορούν την εκτίμηση του αριθμού των διαφορετικών ειδών που παρατηρήθηκαν στο δείγμα μας. Η στατιστική ανάλυση των δεικτών ποικιλότητας υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων. Ο δείκτης Shannon εμφανίζεται στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος κατά

την περίοδο αμμοθύελλας σε σχέση με τα δείγματα που συλλέχθηκαν την περίοδο ηρεμίας ($p < 0.001$). Η ίδια τάση παρατηρείται τόσο με τον αριθμό των λειτουργικών ταξινομικών ομάδων (O.S) που χαρακτηρίστηκαν αλλά και με τον δείκτη Chao1 ($p < 0.001$). Αντίθετα με τα αποτελέσματά μας, κατά την ανάλογη μελέτη που πραγματοποίησαν οι An S et al. (99) στη περιοχή της Κίνας δεν παρατήρησαν μεγάλη διαφορά μεταξύ της παρουσίας ή όχι του φαινομένου αλλά και ούτε μεταξύ των χρόνων δειγματοληψίας. Η επόμενη παρατήρηση που πραγματοποιήσαμε αφορούσε την κατανομή των βακτηρίων κατά τη διάρκεια του φαινομένου αλλά και κατά την απουσία αυτού. Οι Meola et al. (100) παρατήρησαν ότι μέλη της οικογένειας

Comamonadaceae και Gemmatimonaceae υπάρχουν σε αφθονία μόνο στα δείγματα που υπάρχει η παρουσία σκόνης, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με την παρούσα μελέτη στην οποία παρατηρήσαμε σταθερή παρουσία των οικογενειών αυτών. Επίσης η μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Κίνα από τους S An et al. (99) υπέδειξε μείωση των μελών του *Propionibacterium* και του *Corynebacterium* παρουσία του φαινομένου γεγονός που παρατηρήθηκε και από εμάς. Τέλος οι Rosselli et al. (98) παρατήρησαν ότι τα γένη αυτά ήταν τα πιο άφθονα κατά την διάρκεια της αμμοθύελλας γεγονός που παρατηρήσαμε και στην παρούσα εργασία ιδιαίτερα το 2014. Ακόμα παρατήρησαν την παρουσία taxa όπως *Sphingomonas*, *Methylobacterium*, *Caulobacter* και *Brevundimonas* σε δείγματα που περιείχαν σκόνη όπως συνέβη και στη παρούσα εργασία.

Η μελέτη της β-ποικιλότητας μέσω της οποίας εξετάζουμε τον ρυθμό μεταβολής μέσα στο χρόνο μας υπέδειξε ένα παρόμοιο βακτηριακό προφίλ μεταξύ των δειγμάτων μας. Τα δείγματα μας ομαδοποιούνται ξεκάθαρα αναφορικά με την παρουσία ή όχι σκόνης αλλά και μεταξύ των ετών. Παρόμοια προσπάθεια ομαδοποίησης έγινε από τους S An et al. (99) η οποία όμως δεν υπέδειξε την παρουσία κάποιου κοινού μοτίβου στα δείγματα που είχαν συλλέξει.

Σκεπτόμενοι τον άνθρωπο ως τελικού αποδέκτη του μικροβιακού αυτού φορτίου, αναρωτηθήκαμε ποιο είναι το μέγεθος της επιβάρυνσης της ανθρώπινης υγείας. Η ανθρώπινη υγεία και η ισορροπία του περιβάλλοντος έχουν άμεσες αλλά και έμμεσες επιπτώσεις από τη μεταφορά σκόνης. Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές και ποικίλες μελέτες που εξετάζουν την παθογένεια μικροοργανισμών που υπάρχουν και μεταφέρονται με τον αέρα (36,101,102). Ο χαρακτηρισμός της βακτηριακής ποικιλότητας που μεταφέρεται με τη σκόνη από τη Σαχάρα και είναι υπεύθυνη για την επιβάρυνση της ανθρώπινης υγείας αλλά κυρίως οι τρόποι που επιδρά σε αυτήν είναι στα επόμενα σχέδια μας.

5 ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Madigan M.T., Martinko J.M. and Jack Parker. Βιολογία των μικροοργανισμών. Τόμος 1. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης 2005
2. Κυρπίδης Ν. Βιοποικιλότητα και Τεχνολογική ανάπτυξη. Επιστημονικό Συμπόσιο, Θεσσαλονίκη 2014
3. Jagadish C.T., Subhash C.M. and Kathgu S. (2001). Influence of straw size on activity and biomass of soil microorganisms during decomposition. *European Journal of Soil Biology*. Vol:37, no:3, pp.157–160
4. Flemming E., Regin R. and Griffiths. (B.S 2001). Quantitative Estimation of Flagellate Community Structure and Diversity in Soil Samples. *Protist*. Vol:152, no:4, pp.301–314
5. Metting F.B.Jr. *Soil Microbial ecology*. Ed Marcel Dekker. New York 1993
6. Prescott M.L., Harley J., Donald P. and Klein A. In ‘Antimicrobial chemotherapy.’ *Microbiology* 2nd edition. Brown C. Publishers. U.S.A. 1999
7. Polymenakou P.N. (2012). Atmosphere: A source of pathogenic or beneficial microbes? *Atmosphere*, Vol:3, pp.87-102

8. Bauer H., Kasper-Giebl A., Löflund M., Giebl H., Hitzemberger R., Zibuschka F. and Puxbaum H. (2002). The contribution of bacteria and fungal spores to the organic carbon content of cloud water, precipitation and aerosols. *Atmospheric Research*. Vol:64, pp:109–119
9. Christner B.C., Cai R., Morris C.E., McCarter K.S., Foreman C.M., Skidmore M.L., Montross S.N. and Sands D.C. (2008). Geographic, seasonal, and precipitation chemistry influence on the abundance and activity of biological ice nucleators in rain and snow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. Vol:105, pp.18854–18859
10. Christner B.C., Morris C.E., Foreman C.M., Cai R., Sands D.C. (2008) Ubiquity of biological ice nucleators in snowfall. *Science*. 319, doi:10.1126/science.1149757
11. Fuzzi S., Mandrioli P. and Perfetto A. (1997). Fog droplets—An atmospheric source of secondary biological aerosol particles. *Atmospheric Environment*. Vol:31, pp.287–290
12. Möhler O., DeMott P.J., Vali G. and Levin Z. (2007). Microbiology and atmospheric processes: The role of biological particles in cloud physics. *Biogeosciences*. Vol:4, pp.2559–2591
13. Sattler B., Puxbaum H. and Psenner R. (2001). Bacterial growth in supercooled cloud droplets. *Geophysical Research Letters*. Vol:28, pp.239–242
14. Foltz, G. R. & McPhaden, M. J. Impact of Saharan dust on tropical North Atlantic SST. *J. Clim.* 21, 5048–5060 (2008)
15. Booth B.B.B., Dunstone N.J., Halloran P.R., Andrews T. and Bellouin N. (2012). Aerosols implicated as a prime driver of twentieth century North Atlantic climate variability. *Nature*. Vol:484, pp. 228–232
16. Bangert M. et al. (2012). Saharan dust event impacts on cloud formation and radiation over Western Europe. *Atmospheric Chemistry and Physics*. Vol:12, pp.4045–4063
17. Gallisai R., Peters F., Volpe G., Basart S. and Baldasano J.M. (2014). Saharan Dust Deposition May Affect Phytoplankton Growth in the Mediterranean Sea at Ecological Time Scales. *PLoS One*. Vol:9, e:110762
18. Yu H. et al. (2015). The Fertilizing Role of African Dust in the Amazon Rainforest: A First Multiyear Assessment Based on CALIPSO Lidar Observations. *Geophysical Research Letters*. Vol:42, doi:10.1002/2015GL063040
19. Bonasoni P. et al. (1996). Effect of Saharan Dust Transport on Ozone and Carbon Dioxide Concentration. *Environmental Science and Technology*. Vol:11, pp.313–322
20. Prospero J.M., Blades E., Mathison G. and Naidu R. (2005). Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust. *Aerobiologia*. Vol:21, pp.1–19
21. Whon T.W. et al. (2012). Metagenomic Characterization of Airborne Viral DNA Diversity in the Near-Surface Atmosphere. *Journal of Virology*. Vol:86, pp.8221–8231

22. Shinn E.A., Grifn D.W. and Seba D.B. (2003). Atmospheric transport of mold spores in clouds of desert dust. *Archives of Environmental and Occupational Health*. Vol:58, pp.498–504
23. Grifn, D.W. (2007). Atmospheric movement of microorganisms in clouds of desert dust and implications for human health. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol:20, pp.459–477
24. Reche I. et al. (2009). Effect of Saharan dust inputs on bacterial activity and community composition in Mediterranean lakes and reservoirs. *Limnology and Oceanography*. Vol:54, pp.869–879
25. Giongo A. et al. (2012). Microbial hitchhikers on intercontinental dust: highthroughput sequencing to catalogue microbes in small sand samples. *Aerobiologia*. Vol:29, pp.71–84
26. Foord N. and Lidwell O.M. (1975). Airborne infection in a fully airconditioned hospital. II. Transfer of airborne particles between rooms resulting from the movement of air from one room to another. *The Journal of Hygiene*. Vol:75, pp.31–44
27. Bovallius A., Bucht B., Rofey R. and Anas P. (1978). Tree year investigation of the natural airborne bacterial fora at four localities in Sweden. *Applied Environmental Microbiology*. Vol:35, pp.847–852
28. Peccia J. and Hernandez M. (2006). Incorporating polymerase chain reactionbased identification, population characterization, and quantification of microorganisms into aerosol science: A review. *Atmospheric Environment*. Vol:40, pp.3941–3961
29. Gyan, K. et al. African dust clouds are associated with increased paediatric asthma accident and emergency admissions on the Caribbean island of Trinidad. *Int. J. Biometeorol.* 49, 371–376 (2005).
30. Cheesbrough J.S., Morse A.P. and Green S.D. (1995). Meningococcal meningitis and carriage in western Zaire: a hypoendemic zone related to climate? *Epidemiology and Infection*. Vol:114, pp.75–92
31. Pérez García-Pando C. et al. (2014). Soil dust aerosols and wind as predictors of seasonal meningitis incidence in niger. *Environmental Health Perspectives*. Vol:122, pp.679–686
32. Jeong G. Y. (2008). Bulk and single-particle mineralogy of Asian dust and a comparison with its source soils. *Journal of Geophysical Research*. Vol:113, no:D02208, doi:10.1029/2007JD008606
33. Ginoux P., Prospero J.M., Gill T.E., Hsu N.C. and Zhao M. (2012). Globalscale attribution of anthropogenic and natural dust sources and their emission rates based on MODIS Deep Blue aerosol products. *Reviews of Geophysics*. Vol:50, no:RG3005, doi:10.1029/2012RG000388
34. Nickovic S., Vukovic A., Vujadinovic M., Djurdjevic V. and Pejanovic G. (2012). Technical Note: High-resolution mineralogical database of dustproductive soils for atmospheric dust modeling. *Atmospheric Chemistry and Physics*. Vol:12, pp.845–855

35. Shinn E.A. et al. (2000). African dust and the demise of Caribbean Coral Reefs. *Geophysical Research Letters*. Vol:27, p.3029
36. Griffin D.W., Garrison V.H., Herman J.R. and Shin E.A. (2001). African desert dust in the Caribbean atmosphere: Microbiology and public health. *Aerobiologia*. Vol:17, pp.203–213
37. Katra I. et al. (2014). Richness and diversity in dust stormborne biomes at the southeast mediterranean. *Scientific Report*. Vol:4 p.5265, doi:10.1038/srep05265.
38. Wiggs G.F.S. et al. (2003). The dynamics and characteristics of aeolian dust in dryland Central Asia: possible impacts on human exposure and respiratory health in the Aral Sea basin. *The Geographical Journal*. Vol:169, pp.142–157
39. Weinhold B. (2004). Infectious disease: The human costs of our environmental errors. *Environmental Health Perspectives*. Vol:112, pp.A32–9
40. Purdy L.H. (1985). Introduction of Sugarcane Rust into the Americas and Its Spread to Florida. *Plant Disease*. Vol:69, pp.689–693
41. Taylor D.A. (2002). Dust in the wind. *Environ. Health Perspectives*. Vol:110, pp.A80–7
42. Kellogg C.A. et al. (2004). Characterization of aerosolized bacteria and fungi from desert dust events in Mali, West Africa. *Aerobiologia*. Vol:20, pp.99–110
43. Cao C. et al. (2014). Inhalable Microorganisms in Beijing's PM 2.5 and PM 10 Pollutants during a Severe Smog Event. *Environmental Science and Technology*. Vol:48, pp.1499–1507
44. d'Almeida G.A.A (1986). Model for Saharan Dust Transport. *Journal of Applied Climatology and Meteorology*. Vol.25, pp.903–916
45. Dulac F. et al. (1996). Quantitative remote sensing of African dust transport in the Mediterranean. In *The Impact of Desert Dust Across the Mediterranean*. (eds Guerzoni S. et al.), Kluwer Academic Publishers pp.25–49
46. Alpert P., Kishcha P., Shtivelman A., Krichak S.O. and Joseph J.H. (2004). Vertical distribution of Saharan dust based on 2.5-year model predictions. *Atmospheric Research*. Vol:70, pp.109–130
47. Handelsman J. (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol:68, no:4, pp.669–685
48. Rajendhran J. and Gunasekaran P. (2011). Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiological Research*. Vol:166, no:2, pp.99–110
49. Gilbert J.A. and Dupont C.L. (2011). Microbial metagenomics: beyond the genome. *Annual Review of Marine Science*. Vol:3, pp.347–371
50. Wu D., Hugenholtz P., K. Mavromatis et al. (2009). A phylogeny driven genomic encyclopaedia of Bacteria and Archaea. *Nature*. Vol:462, no:7276, pp.1056–1060

51. Kyrpides N. C. (2009). Fifteen years of microbial genomics: meeting the challenges and fulfilling the dream. *Nature Biotechnology*. Vol:27, no:7, pp.627–632
52. Lane D.J., Pace B. and Olsen G.J. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. Vol:82, no:20, pp.6955–6959
53. Stein J.L., Marsh T.L., Wu K.Y., Shizuya H. and Delong E.F. (1996). Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. *Journal of Bacteriology*. Vol:178, no:3, pp.591–599
54. Tringe S.G. and Hugenholtz P. (2008). A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Current Opinion in Microbiology*. Vol:11, no:5, pp.442–446
55. Rusch D.B., Halpern A.L., Sutton G. et al. (2007). The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: north west Atlantic through eastern tropical Pacific. *PLoS Biology*. Vol:5, no:3, e:77
56. Tyson G. W., Chapman J., Hugenholtz P. et al. (2004). Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*. Vol:428, no:6978, pp.37–43
57. Chivian D., Brodie E.L., Alm E.J. et al. (2008). Environmental genomics reveals a single-species ecosystem deep within earth. *Science*. Vol:322, no:5899, pp.275–278
58. Woyke T., Teeling H., Ivanova N.N. et al. (2006). Symbiosis in sights through metagenomic analysis of a microbial consortium. *Nature*. Vol:443, no:7114, pp.950–955
59. Dean F.B., Nelson J.R., Giesler T.L. and Lasken R.S. (2001). Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Research*. Vol:11, no:6, pp.1095–1099
60. Lasken R.S. (2007). Single-cell genomic sequencing using multiple displacement amplification. *Current Opinion in Microbiology*. Vol:10, no:5, pp.510–516
61. Yamey G. (2000). Scientists unveil first draft of human genome. *British Medical Journal*. Vol:321, no:7252, p.7
62. Craig Venter J., Adams M.D., Myers E.W. et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science*. Vol:291, no:5507, pp.1304–1351
63. Lander E.S., Linton L.M., Birren B. et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. Vol:409, no:6822, pp.860–921
64. Pareek C.S., Smoczynski R. and Tretyn A. (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. *Journal of Applied Genetics*. Vol:52, no:4, pp.413–435
65. Torres T.T, Metta M., Ottenwalder B. and Schlotttere C. (2008). Gene expression profiling by massively parallel sequencing, *Genome Research*. Vol: 18, no:1, pp.172-177
66. Margulies M. et al. (2005). Genome sequencing in microfabricated highdensity picolitre reactors. *Nature*. Vol:437, pp.376-380

67. Tawfik D. and Griffiths A. (1998). Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nature Biotechnology*. Vol:16, pp.652-656
68. Ronaghi M. et al. (1996). Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Analytical Biochemistry*. Vol:242, pp.84-89
69. Kircher M., Stenzel U. and Kelso J.(2009). Improved base calling for the Illumina Genome Analyzer using machine learning strategies. *Genome Biology*. Vol:10, no:8, R:83
70. Ronaghi M. and Fisher J. (2010). The Current Status and Future Outlook for Genomic Technologies, *Frontiers of Engineering: Reports on Leading-Edge Engineering from the 2010 Symposium*. National Academy of Sciences pp.129-138
71. Chen F. et al. (2013). The History and Advances of Reversible Terminators Used in New Generations of Sequencing Technology. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. Vol:11, no:1, pp.34–40
72. S. Schlebusch, N. Illing, Next generation shotgun sequencing and the challenges of de novo genome assembly, *Pharmacogenomics*, Vol. 13, No. 8, pp. 901–915, 2012
73. Fedurco M. et al. (2006). BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solidphase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Research*. Vol:34, no:3, e:22
74. Mardis E. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics*. Vol:24, no:3, pp.142-149
75. Rothberg J.M., Hinz W., Rearick T.M. et al. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. Vol:475, no:7356, pp.348–352
76. Morozova O., Hirst M. and Marra M.A. (2009). Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. Vol:10, pp.135–151
77. Quail M.A., Smith M., Coupland P., D. Otto T., Harris S.R., Connor T.R., Bertoni A., Swerdlow H.P. and Gu Y. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*. Vol:13, e:341
78. Moorthie S. et al. (2011). Review of massively parallel DNA sequencing technologies. *Hugo Journal*. Vol:5 no:1-4, pp.1–12
79. Berg M.J., Tymoczko L.J and Stryer L. (2010). Βιοχημεία, Τόμος ΙΙ, ΠΕΚ. σελ. 857
80. Ulucan K. (2013). Applications of Molecular genetics in Personalized Medicine. eBooks. OMICS Group
81. Okazaki R. and Sakabe K. (1966). A unique property of the replicating region of chromosomal DNA. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol:129, no:3, pp.651–654
82. Moorthie S. et al. (2011). Review of massively parallel DNA sequencing technologies. *The HUGO Journal*. Vol:5, no:1, pp1-12

83. Shendure J. (2005). Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science*. Vol:309, pp.1728–1732
84. Peckham H.E. et al. SOLiD Sequencing and 2-Base Encoding, *Applied Biosystems P.N.* 2624.
85. Eeftens M. et al.(2012). Spatial variation of PM_{2.5}, PM₁₀, PM_{2.5} absorbance and PM_{coarse} concentrations between and within 20 European study areas and the relationship with NO₂ – Results of the ESCAPE project. *Atmospheric Environment*. Vol: 62,pp.303-317
86. Draxler Roland R. (1992). Hybrid single-particle lagrangian integrated trajectories' (HY-SPLIT): Version 3.0. User's guide and model description. Air Resources Laboratory
87. Rolph, G.D. and Draxler R.R. (1990). Sensitivity of three-dimensional trajectories to the spatial and temporal densities of the wind field' *Journal of Applied Meteorology and Climatology*. Vol:29, pp.1043-1054
88. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K. et al. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*. Vol:7, no:5, pp.335–336
89. Querol X.J. et al. (2009). African dust contributions to mean ambient PM₁₀ mass-levels across the Mediterranean Basin. *Atmospheric Environment*. Vol:43, pp.4266–4277
90. Qin S., Li W.J., Dastager S.G, Wael N.H. Actinobacteria in Special and Extreme Habitats: Diversity. Function Roles and Environmental adaptations. *Frontiers Media SA* 2016
91. Dartnell L.R., Hunter S.J., Lovell K.V., Coates A.J., Ward J.M. (2010). LowTemperature Ionizing Radiation Resistance of *Deinococcus radiodurans* and Antarctic Dry Valley Bacteria. *Astrobiology* Vol:10, pp.717-732
92. Sakrouhi I., Belfquih M., Sbabou L., Moulin P., Bena G., Filali-Maltouf A. and Le Quéré A. (2016). Recovery of symbiotic nitrogen fixing acacia rhizobia from Merzouga Desert sand dunes in South East Morocco – Identification of a probable new species of *Ensifer* adapted to stressed environments. *Systematic and Applied Microbiology*. Vol:39, pp.122-141
93. Holt J.G. et al. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Williams & Wilkins. Baltimore MD 1994
94. Prospero J.M. and Lamb P.J. (2003). African droughts and dust transport to the Caribbean: Climate change implications. *Science*. Vol:302, pp.1024–1027.
95. Polymenakou P.N., Mandalakis M., Tselepides A. and Stephanou E.G. (2008). Particle size distribution of airborne microorganisms and pathogens during an intense African dust event in the Eastern Mediterranean. *Environmental Health Perspectives*. Vol:116, pp.292–296
96. Goudie A.S. and Middleton N.J. (2001). Saharan dust storms: Nature and consequences. *Earth Science Reviews*. Vol.56, pp.179–204
97. Yeo H.G. and Kim J.H. (2002). SPM and fungal spores in the ambient air of west Korea during the Asian dust (Yellow sand) period. *Atmospheric Environment*. Vol:36, pp.5437–5442

98. Rosselli R et al. (2015). Microbial immigration across the Mediterranean via airborne dust. *Scientific Reports*. Vol: 5, no: 16306, doi:10.1038/srep16306
99. An S., Sin H.H. and Dubow M.S. (2015). Modification of atmospheric sand-associated bacterial communities during Asian sandstorms in China and South Korea. *Heredity*. Vol: 114, pp. 460-467, doi:10.1038/hdy.2014.102
100. Moela M., Lazzaro A. and Zeyer J. (2015). Bacterial Composition and Survival on Sahara Dust Particles Transported to the European Alps. *Frontiers in Microbiology*. Vol: 6, no: 1454, doi: 10.3389/fmicb.2015.01454
101. Kellogg C.A. and Griffin D.W. (2006). Aerobiology and the global transport of desert dust. *Trends in Ecology and Evolution*. Vol:21, pp.638 – 644
102. Weir-Brush J.R., Garisson V.H., Smith G.W. and Shinn E.A. (2004). The relationship between gorgonian coral (Cnidaria: Gorgonacea) diseases and African dust storms. *Aerobiologia*. Vol:20, pp.119–126
103. https://www.researchgate.net/figure/6354583_fig6_Fig-8-Picotiter-plate-pyrosequencing-a-Genomic-DNA-is-fragmented-ligated-to-adapter (30/12/2016)
104. <http://www.slideshare.net/PaoloDametto/new-generation-sequencing-technologies> (30/12/2016)
105. https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf (30/12/2016)
106. <https://www.nap.edu/read/13043/chapter/22#131> (30/12/2016)
107. http://www.scielo.org.za/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0038-23532012000600016 (30/12/2016)
108. [http://wiki.nmbu.org/index.php/Illumina_\(Solexa\)_sequencing](http://wiki.nmbu.org/index.php/Illumina_(Solexa)_sequencing) (30/12/2016)
109. <http://seqanswers.com/forums/showthread.php?t=10> (30/12/2016)
110. <http://www.slideshare.net/RickNolte1/clipboards/microbiome-slides> (30/12/2016)
111. https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction (30/12/2016)

6 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

6.1 Πρωτόκολλα

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΟΜΙΚΟΥ DNA / ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΤΗΣ ΜΟΒΙΟ

- ✓ Ζυγίστηκε 0.25 gr δείγμα
- ✓ Χρησιμοποιούμε σωληνάρια Power Beat Tubes
- ✓ Ελαφριά μείξη με το vortex για 5-10 sec

- ✓ Παίρνουμε το διάλυμα C1 και προσθέτουμε 60 μlt C1(διάλυμα SDS για λύση των κυττάρων) στο κάθε δείγμα και καλή μίξη
- ✓ Τα δείγματα ασφαρίζονται πάνω στο vortex και αναδεύονται στη μέγιστη ταχύτητα για 10 min
- ✓ Ακολουθεί φυγοκέντριση στα 10000g σε θερμοκρασία δωματίου για 30 sec και απομόνωση του υπερκείμενου διαλύματος σε νέα tubes
- ✓ Προσθήκη 250 μlt διάλυμα C2(διάλυμα που ιζηματοποιεί οργανικό και ανόργανο υλικό). Vortex για 5 sec. Επώαση στους 40C για 5 min
- ✓ Φυγοκέντριση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min στα 10000g και απομόνωση του υπερκείμενου σε νέα tubes
- ✓ Προσθήκη 200 μlt από το διάλυμα C3(διάλυμα που επίσης ιζηματοποιεί πρωτεΐνες, χουμικά οξέα και υπολείμματα του κυττάρου). Vortex για 5 sec. Επώαση στους 40C για 5 min.
- ✓ Φυγοκέντριση σε θερμοκρασία δωματίου στα 10.000g για 1 min και απομόνωση του υπερκείμενου σε νέα tubes
- ✓ Προσθέτουμε 1200 μlt διάλυμα C4(διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης αλάτων). Κάνουμε vortex για 5 sec.
- ✓ Χρήση Spin Filters και τους προσθέτουμε 675 μlt. Φυγοκέντριση στα 10.000g για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. πετάμε και βάζουμε ξανά άλλα 675 μlt. Φυγοκέντριση και επαναλαμβάνουμε εως τέλους
- ✓ Προσθήκη στην κολώνα 500 μlt από το C5(διάλυμα αιθανόλης). Φυγοκέντριση την κολώνα στα 10.000g για 30 sec.
- ✓ Προσθήκη της κολώνας σε νέο σωληνάριο 2.0 ml Tubes.
- ✓ Προσθήκη 100 μlt από το διάλυμα C6(διάλυμα 10mM Tris).
- ✓ Φυγοκέντριση στα 10.000g για 30 sec.
- ✓ Επανάληψη ώστε να έχουμε και δεύτερο elusion

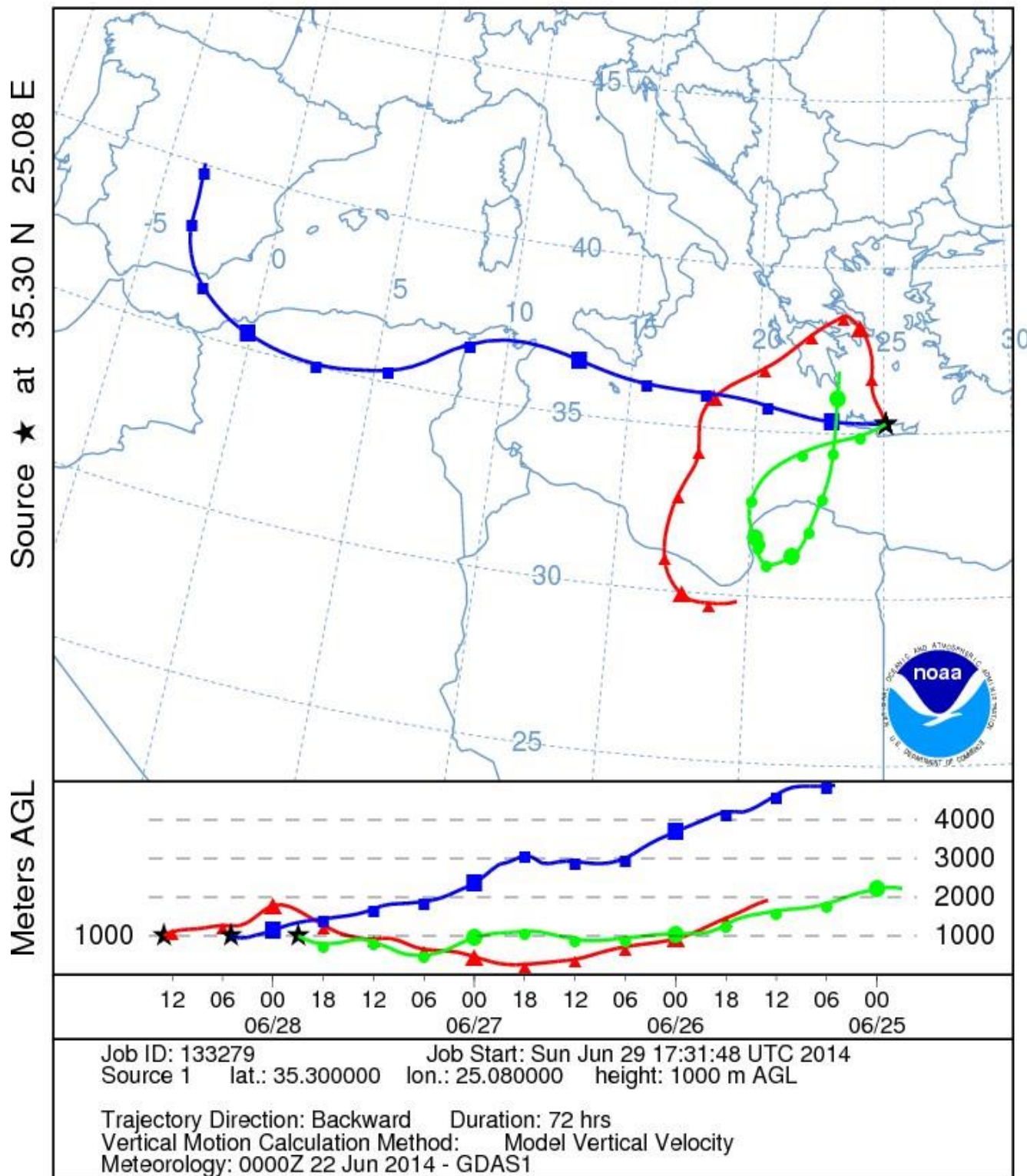
6.2 Ανάλυση των δεδομένων με το βιοπληροφορικό πακέτο QIIME

- ✓ Πραγματοποιείται είσοδος στο putty.exe
- ✓ Είσοδος στο φάκελο με τα δεδομένα στα οποία θα πραγματοποιηθεί η ανάλυση
- ✓ Πληκτρολογούμε `mac qiime` για να εισέλθουμε στο πρόγραμμα και να ξεκινήσουμε την ανάλυση
- ✓ `identify_chimeric_seqs.py -i seqs.fna -m usearch61 -o usearch_checked_chimeras/ -r gold.fa` : γίνεται εντοπισμός των χιμερικών αλληλουχιών στο αρχείο μας

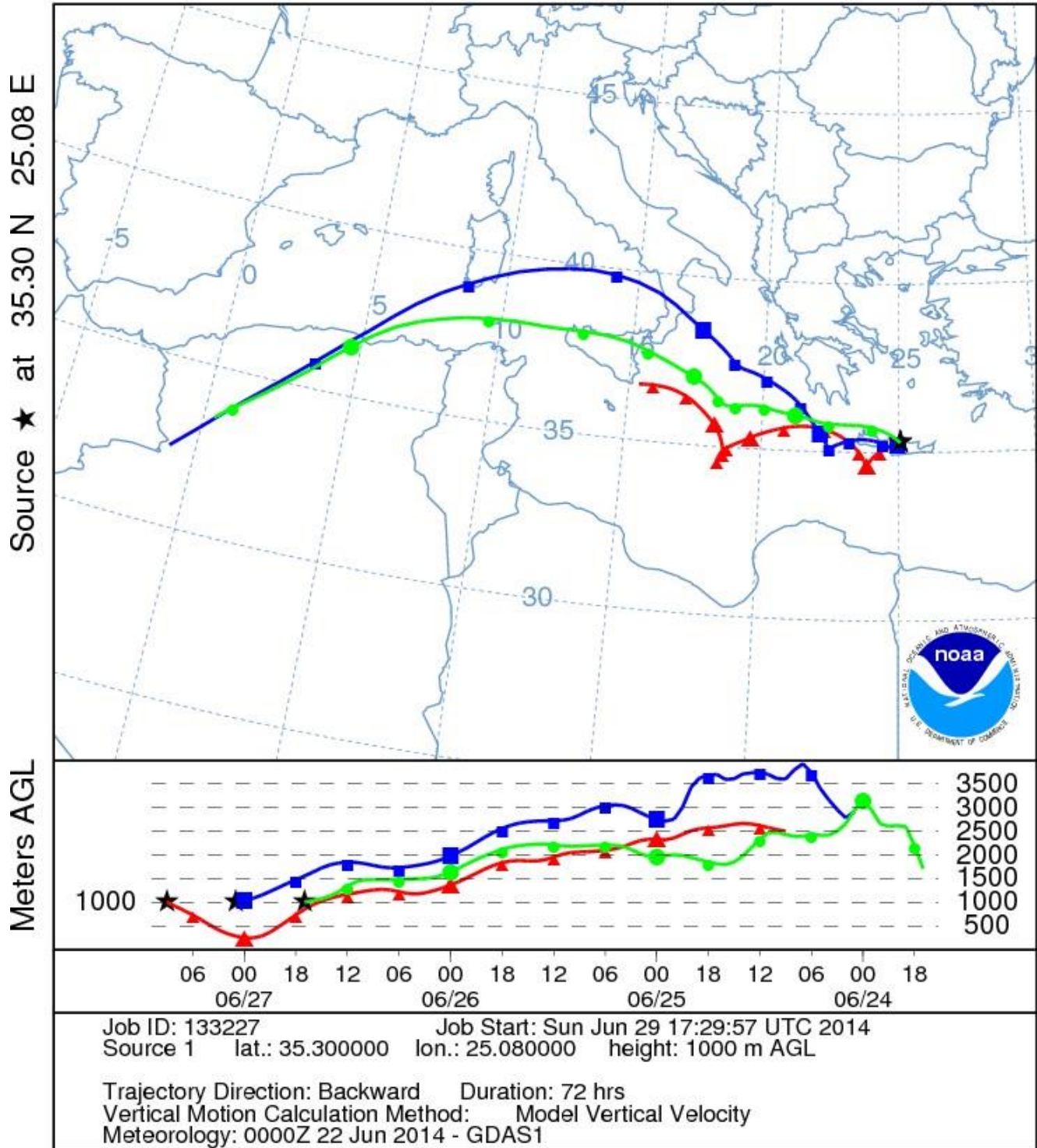
- ✓ `filter_fasta.py -f seqs.fna -o seqs_chimeras_filtered.fna -s usearch_checked_chimeras/chimeras.txt -n`: καθαρισμός των χμερικών αλληλουχιών από το αρχείο μας συμφωνά με κάποια κριτήρια
- ✓ `pick_open_reference_otus.py -i seqs.fna -r Users/ANTΩΝΗΣ/SILVA/SILVA_111/rep_set/97_Silva_111_rep_set.fasta -o open_ref_OTUs/ -p parameter_open_pick.txt`: να βρει και να εισέλθει στο αρχείο αναφοράς
- ✓ `pick_otus.py -i seqs_chimeras_filtered.fna -m uclust_ref -C -r Silva_111/rep_set/97_Silva_111_rep_set.fasta -o uclust_ref_picked_otus/`: Να πάρει τα OTUs αναφοράς
- ✓ `assign_taxonomy.py -i rep_set.fna -r Silva_111/rep_set/97_Silva_111_rep_set.fasta -t Silva_111/taxonomy/97_Silva_111_taxa_map_RDP_6_levels.txt -o taxonomy_results/ --rdp_max_memory 6000`: προσδιορίζεται η ταξινόμηση της κάθε αλληλουχίας σύμφωνα με τα αρχεία αναφοράς από τα οποία πήραμε τα στοιχεία
- ✓ `make_otu_table.py -i uclust_ref_picked_otus/seqs_chimeras_filtered_otus.txt taxonomy_results/rep_set_tax_assignments.txt -o otu_table_silva.biom`: να φτιαχτεί ένας πίνακας με τα OTUs που βρέθηκαν στις αλληλουχίες μας
- ✓ `summarize_taxa.py -i otu_table_silva.biom -o taxonomy_summaries/`: Να γίνει μια σύνοψη των βακτηριακών taxa που βρέθηκαν και να φτιαχτεί εκ νέου ένας πίνακας
- ✓ `plot_taxa_summary.py -i taxonomy_summaries/otu_table_silva_L2.txt -o taxonomy_plot_L2/`: Να γίνουν τα διαγράμματα ταξινόμησης στις αλληλουχίες μας σε επίπεδο φύλου(L2)
- ✓ `plot_taxa_summary.py -i taxonomy_summaries/otu_table_silva_L3.txt -o taxonomy_plot_L3/`: Να γίνουν τα διαγράμματα ταξινόμησης στις αλληλουχίες μας σε επίπεδο κλάσης(L3)
- ✓ `plot_taxa_summary.py -i taxonomy_summaries/otu_table_silva_L4.txt -o taxonomy_plot_L4/`: Να γίνουν τα διαγράμματα ταξινόμησης στις αλληλουχίες μας σε επίπεδο σειράς(L4)
- ✓ `plot_taxa_summary.py -i taxonomy_summaries/otu_table_silva_L5.txt -o taxonomy_plot_L5/`: Να γίνουν τα διαγράμματα ταξινόμησης στις αλληλουχίες μας σε επίπεδο οικογένειας(L5)
- ✓ `plot_taxa_summary.py -i taxonomy_summaries/otu_table_silva_L6.txt -o taxonomy_plot_L6/`: Να γίνουν τα διαγράμματα ταξινόμησης στις αλληλουχίες μας σε επίπεδο γένους(L6)
- ✓ `multiple_rarefactions.py -i otu_table_silva.biom -m 20 -x 100 -s 20 -n 10 -o rare_20-100/`: Να δημιουργηθεί ένας νέος πίνακας με τα βακτηριακά taxa που βρέθηκαν στα δείγματα μας, χρησιμοποιώντας ως ελάχιστο αριθμό αλληλουχιών τις 20 και ως μέγιστο τις 100 με βήμα 20 αλληλουχιών για το κάθε δείγμα και η διαδικασία να γίνει 10 φορές

- ✓ `align_seqs.py -i rep_set.fna -t core_set_aligned.fasta -o pynast_aligned_defaults/`: Να γίνει ευθυγράμμιση των αλληλουχιών
- ✓ `make_phylogeny.py -i pynast_aligned_defaults/rep_set_aligned.fasta -o rep_set_tree.tre`: Δημιουργείται ένα αρχείο στο οποίο φαίνεται η φυλογένεια των ευθυγραμμισμένων αλληλουχιών.
- ✓ `alpha_diversity.py -i rare_20-100/ -o alpha_rare/ -t rep_set_tree.tre -m observed_species,chaol,PD_whole_tree,ace,shannon,simpson,goods_coverage,observed_otus,osd`: Υπολογίζεται η ποικιλότητα με τη βοήθεια διάφορων δεικτών.

NOAA HYSPLIT MODEL
 Backward trajectories ending at 1300 UTC 28 Jun 14
 GDAS Meteorological Data



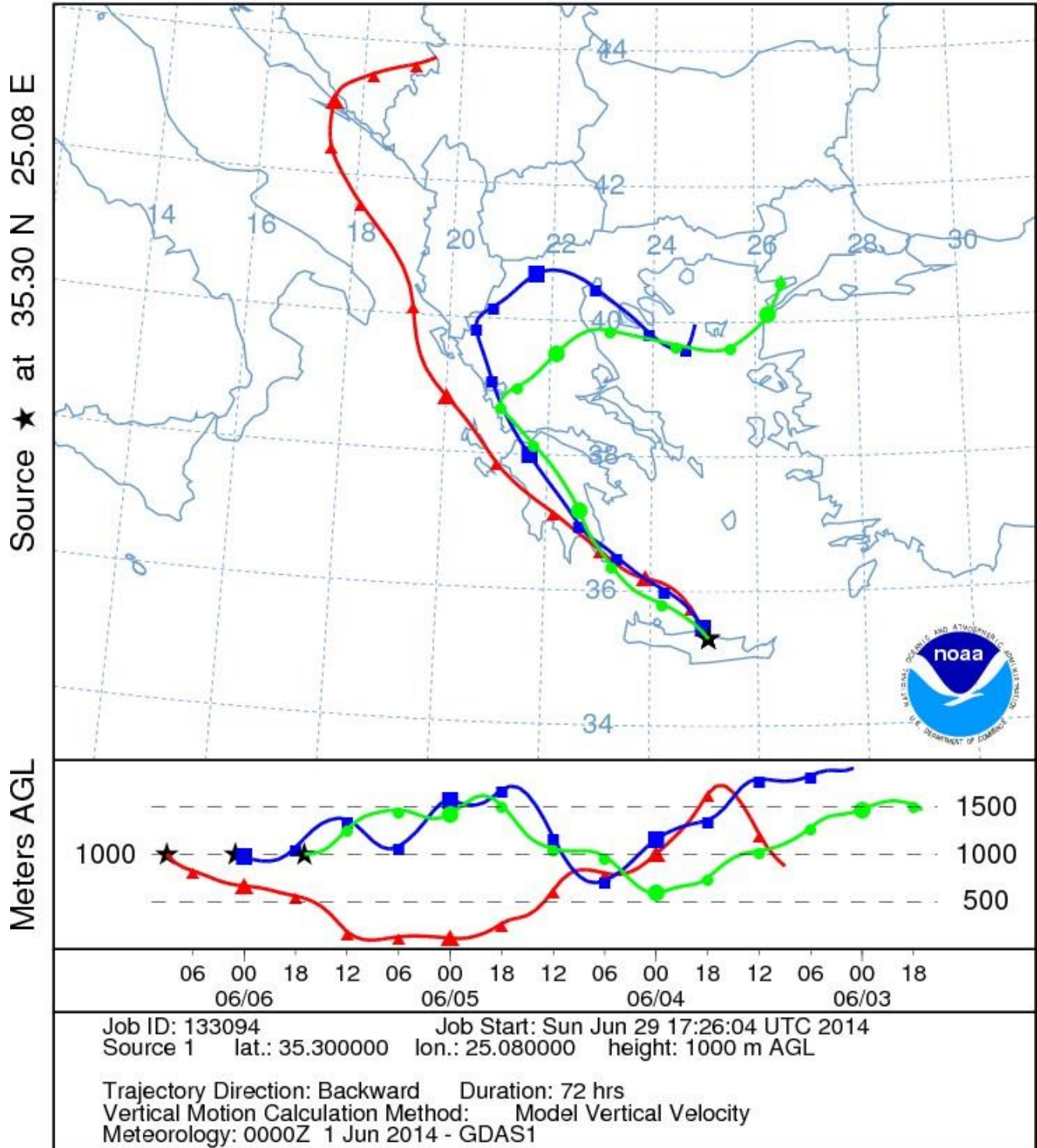
NOAA HYSPLIT MODEL
 Backward trajectories ending at 0900 UTC 27 Jun 14
 GDAS Meteorological Data



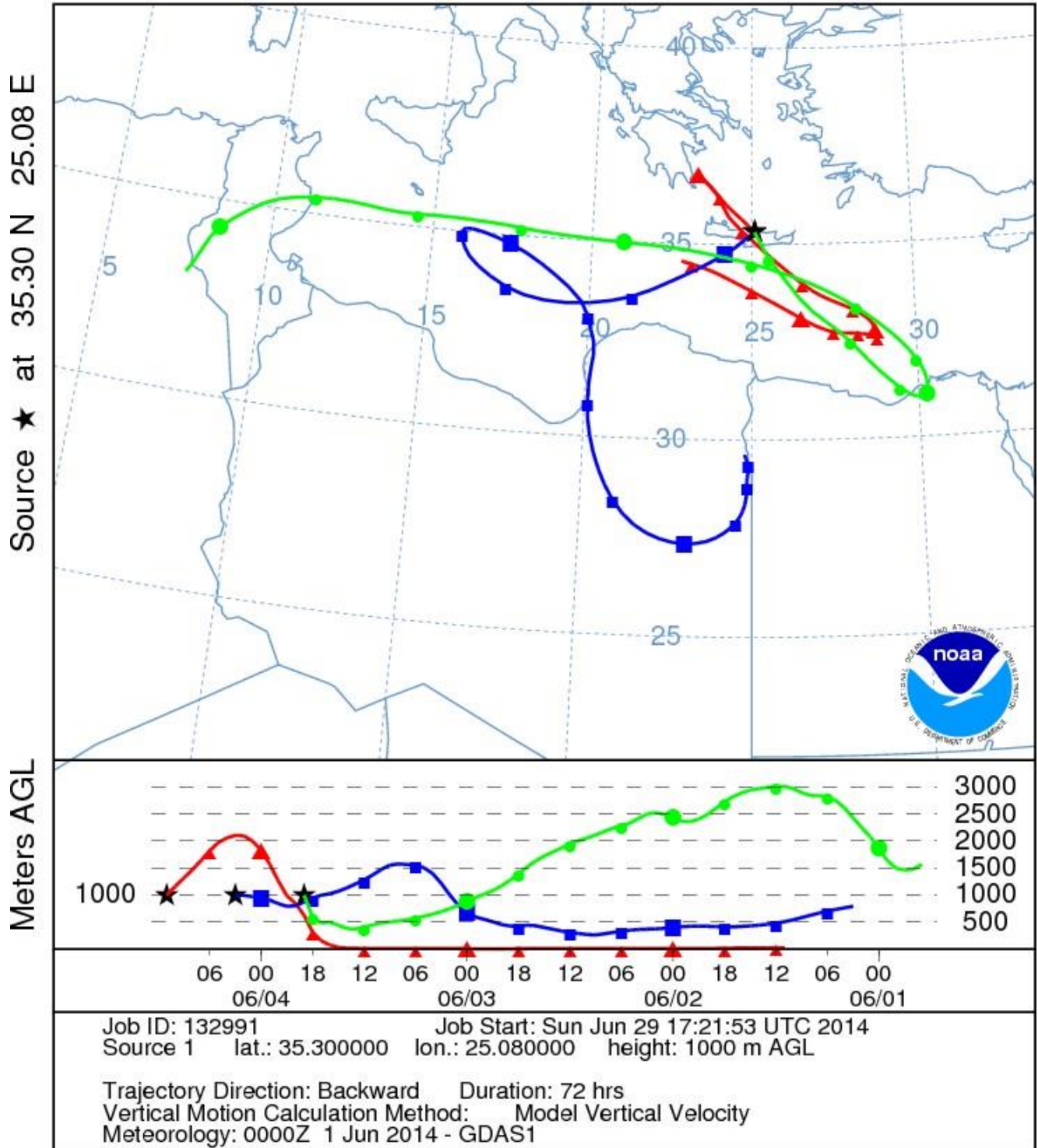
NOAA HYSPLIT MODEL

Backward trajectories ending at 0900 UTC 06 Jun 14

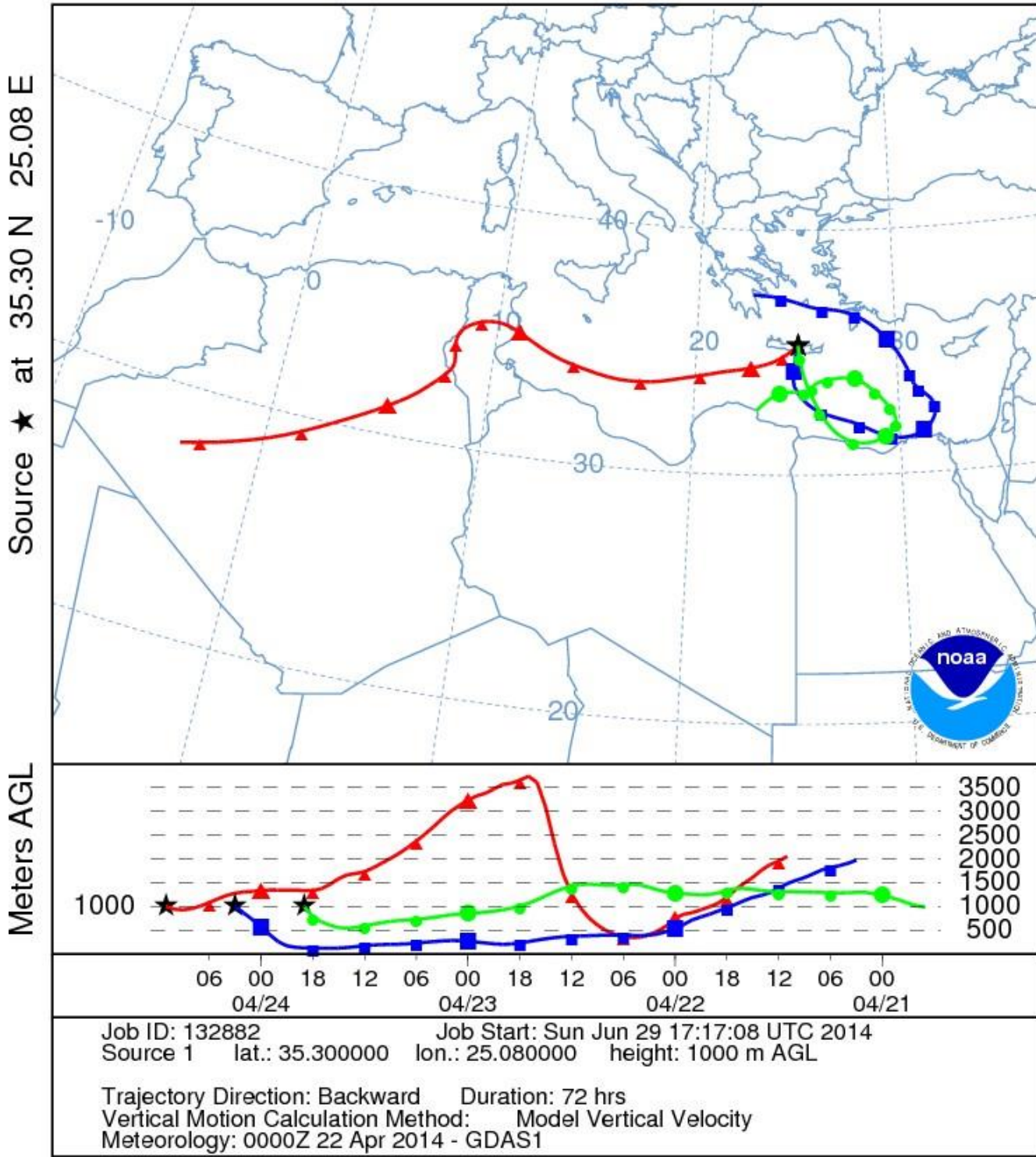
GDAS Meteorological Data



NOAA HYSPLIT MODEL
 Backward trajectories ending at 1100 UTC 04 Jun 14
 GDAS Meteorological Data

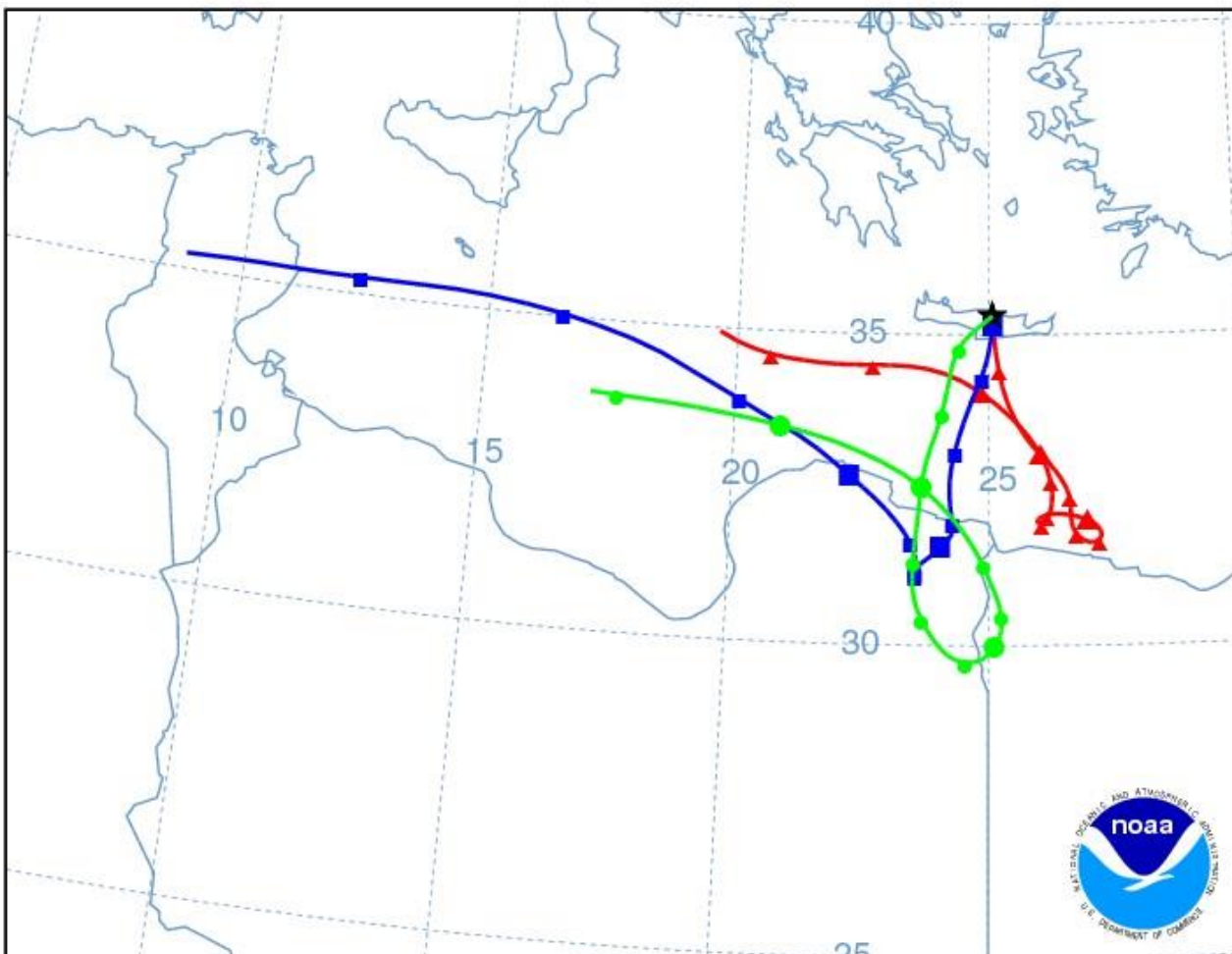


NOAA HYSPLIT MODEL
 Backward trajectories ending at 1100 UTC 24 Apr 14
 GDAS Meteorological Data

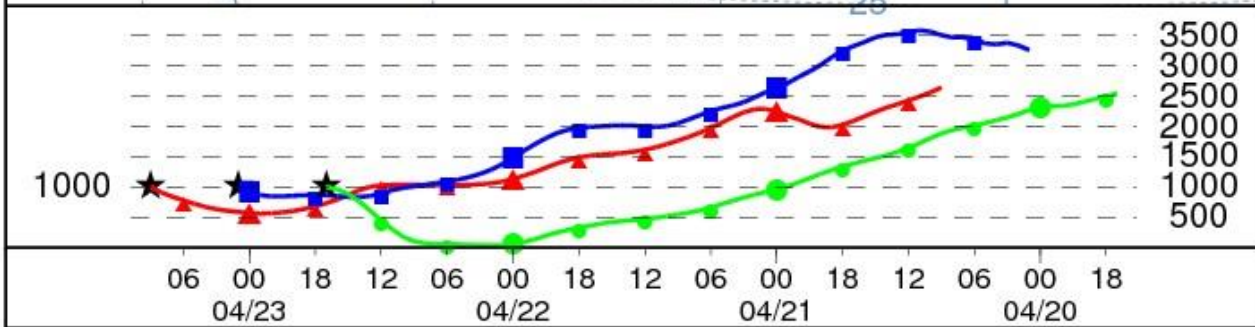


NOAA HYSPLIT MODEL
 Backward trajectories ending at 0900 UTC 23 Apr 14
 GDAS Meteorological Data

Source ★ at 35.30 N 25.08 E



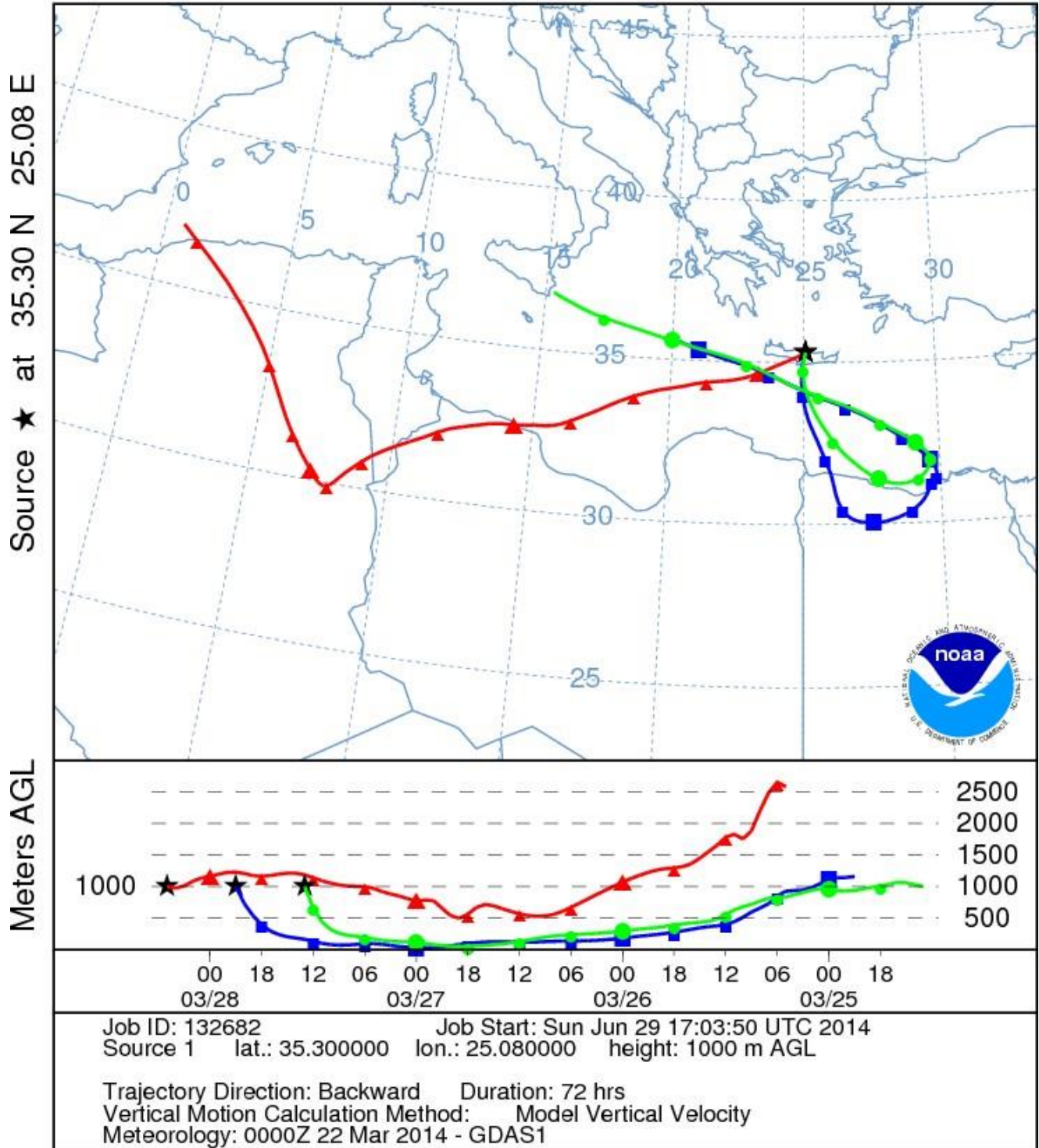
Meters AGL



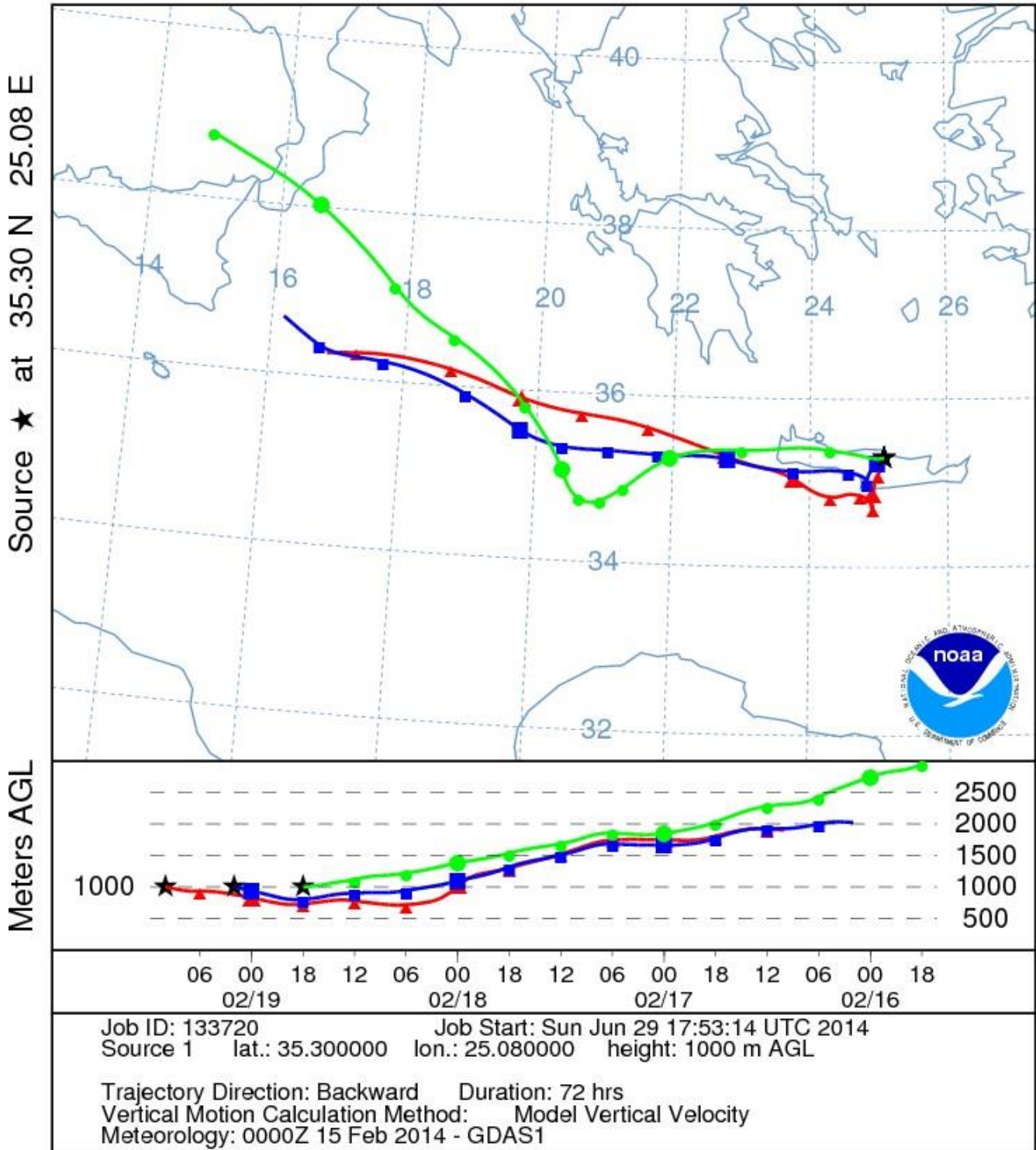
Job ID: 132865 Job Start: Sun Jun 29 17:15:27 UTC 2014
 Source 1 lat.: 35.300000 lon.: 25.080000 height: 1000 m AGL

Trajectory Direction: Backward Duration: 72 hrs
 Vertical Motion Calculation Method: Model Vertical Velocity
 Meteorology: 0000Z 22 Apr 2014 - GDAS1

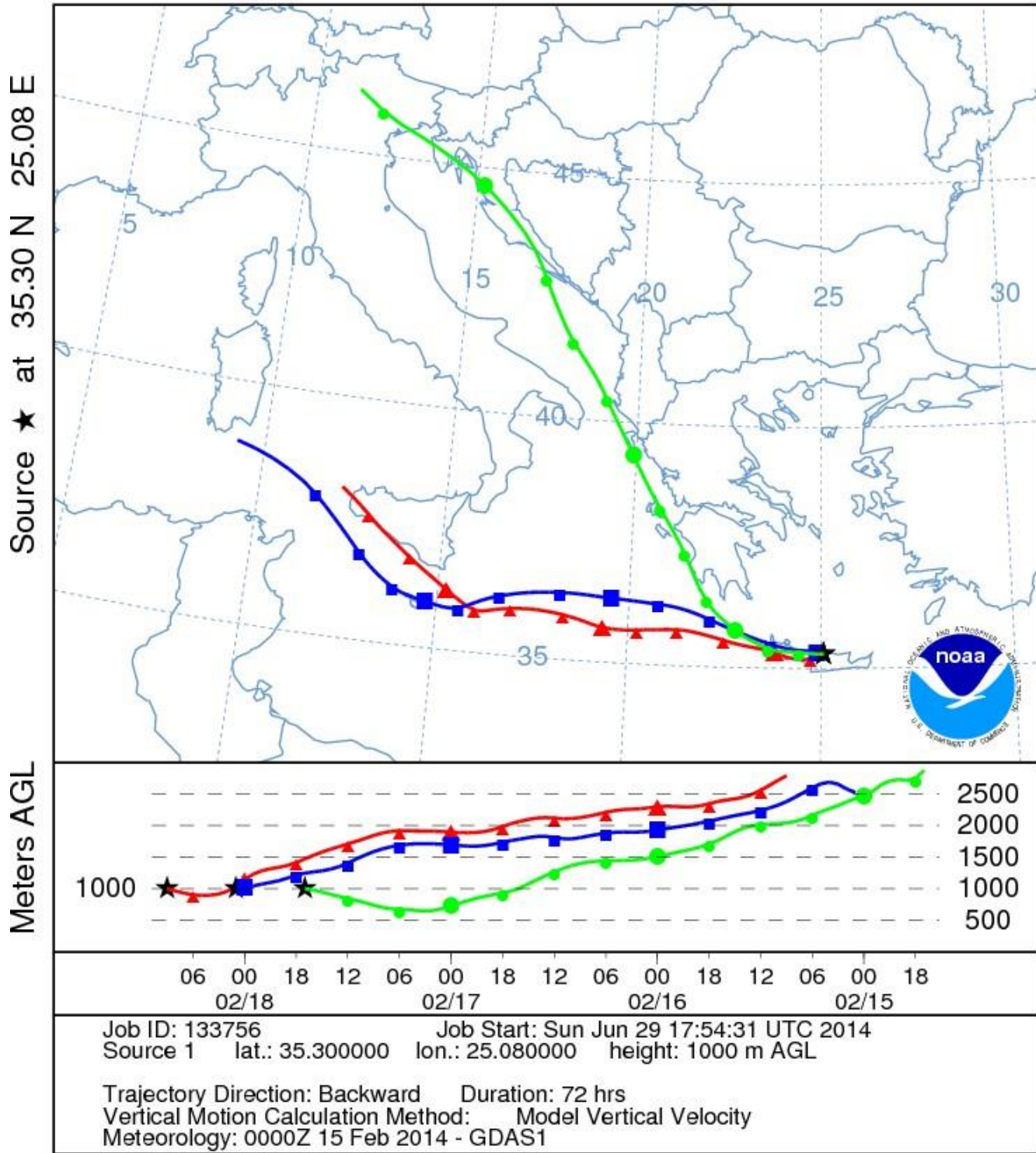
NOAA HYSPLIT MODEL
 Backward trajectories ending at 0500 UTC 28 Mar 14
 GDAS Meteorological Data



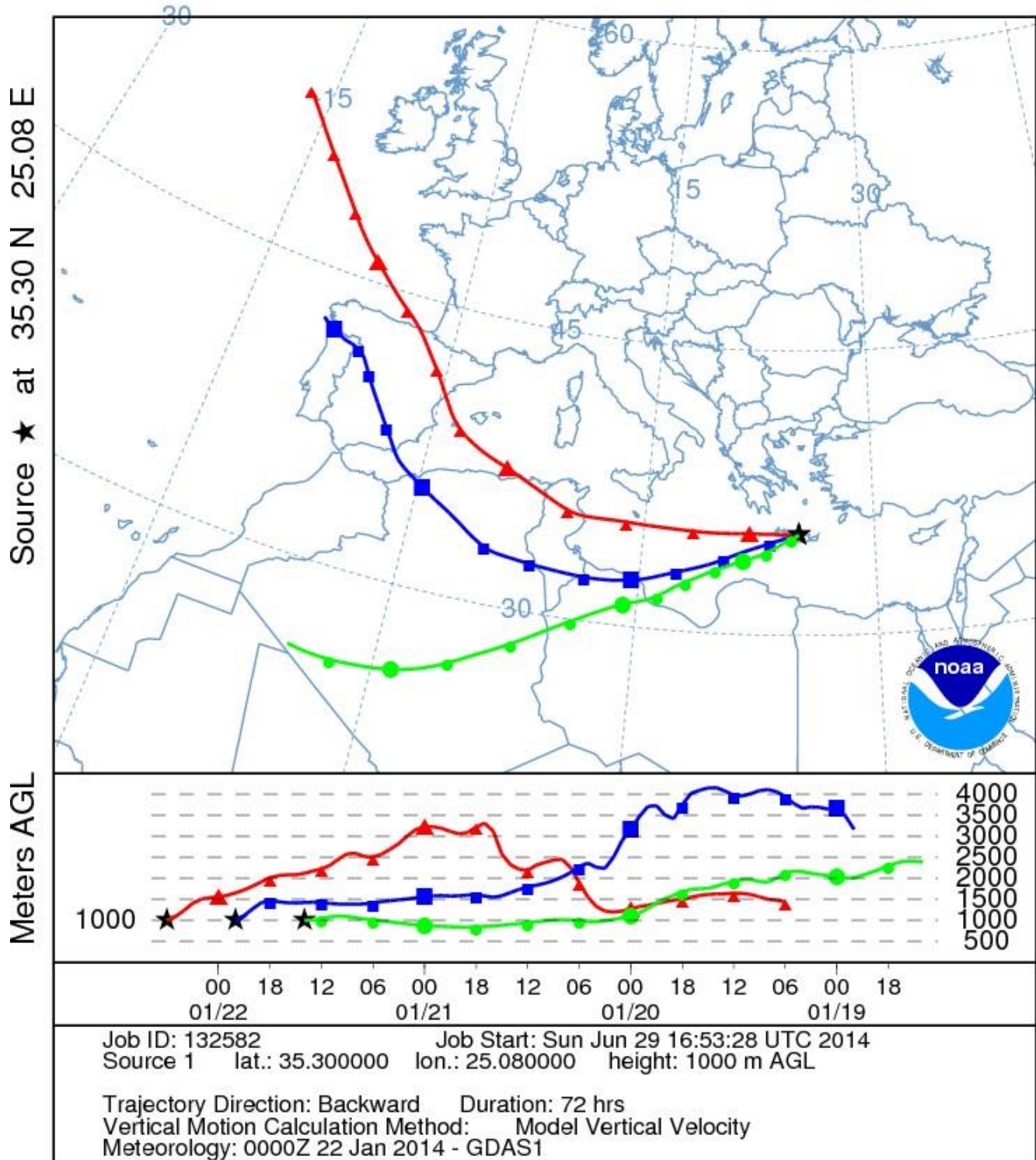
NOAA HYSPLIT MODEL
 Backward trajectories ending at 1000 UTC 19 Feb 14
 GDAS Meteorological Data



NOAA HYSPLIT MODEL
 Backward trajectories ending at 0900 UTC 18 Feb 14
 GDAS Meteorological Data

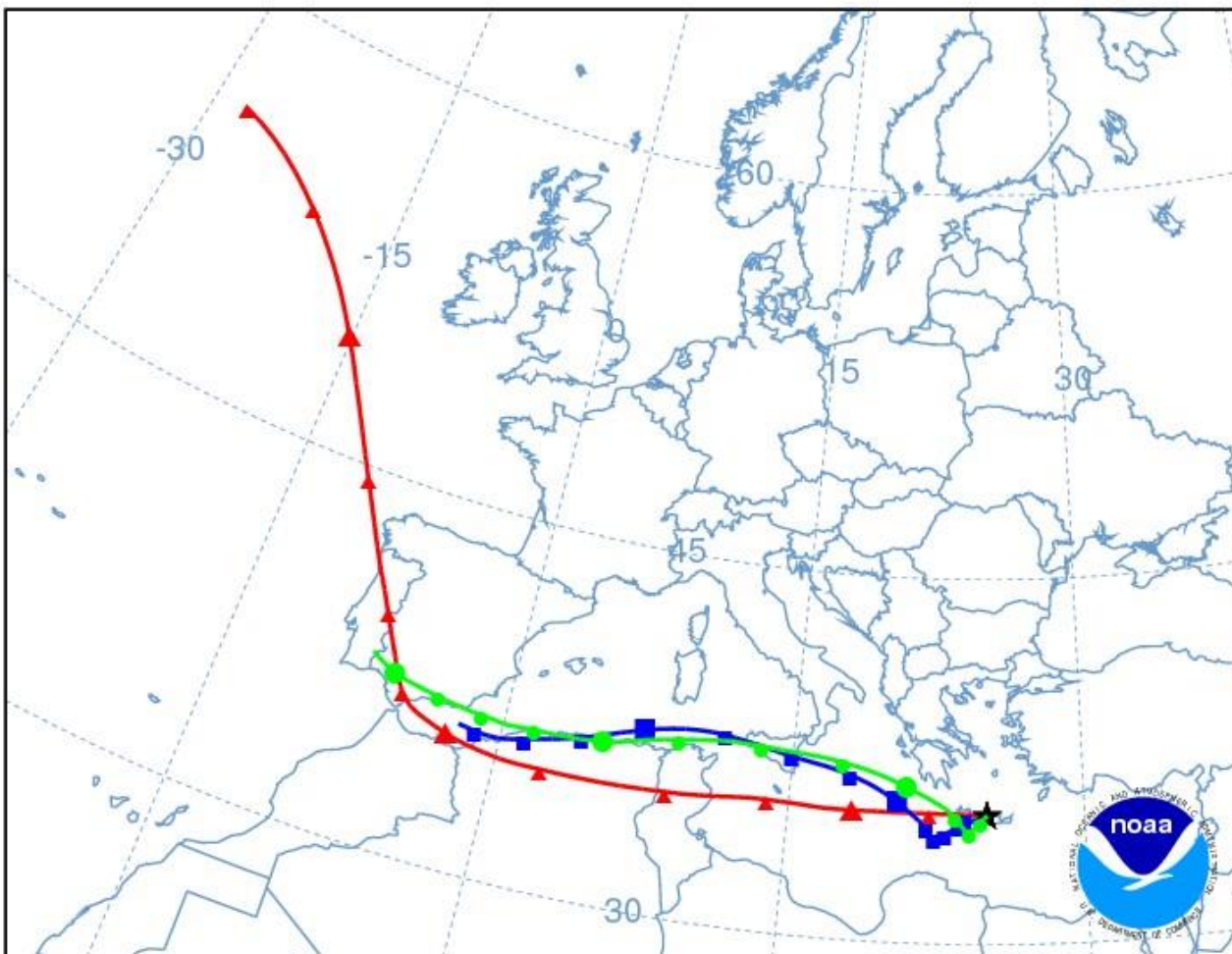


NOAA HYSPLIT MODEL
 Backward trajectories ending at 0600 UTC 22 Jan 14
 GDAS Meteorological Data

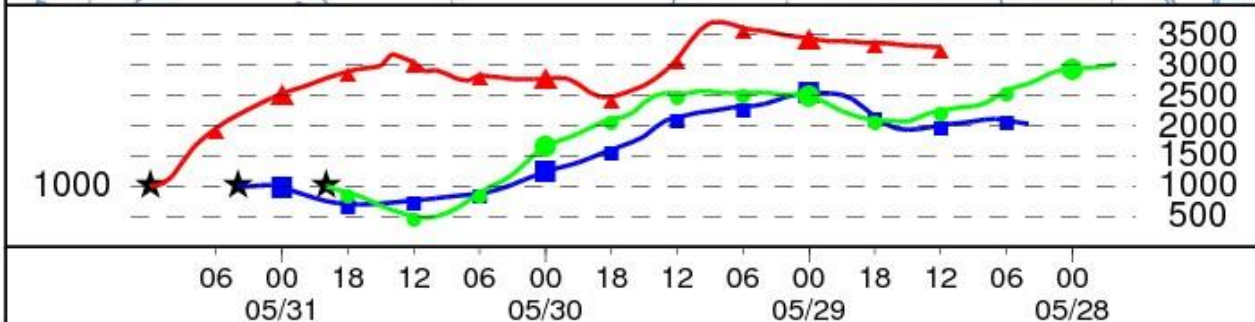


NOAA HYSPLIT MODEL
 Backward trajectories ending at 1200 UTC 31 May 13
 GDAS Meteorological Data

Source ★ at 35.30 N 25.08 E



Meters AGL

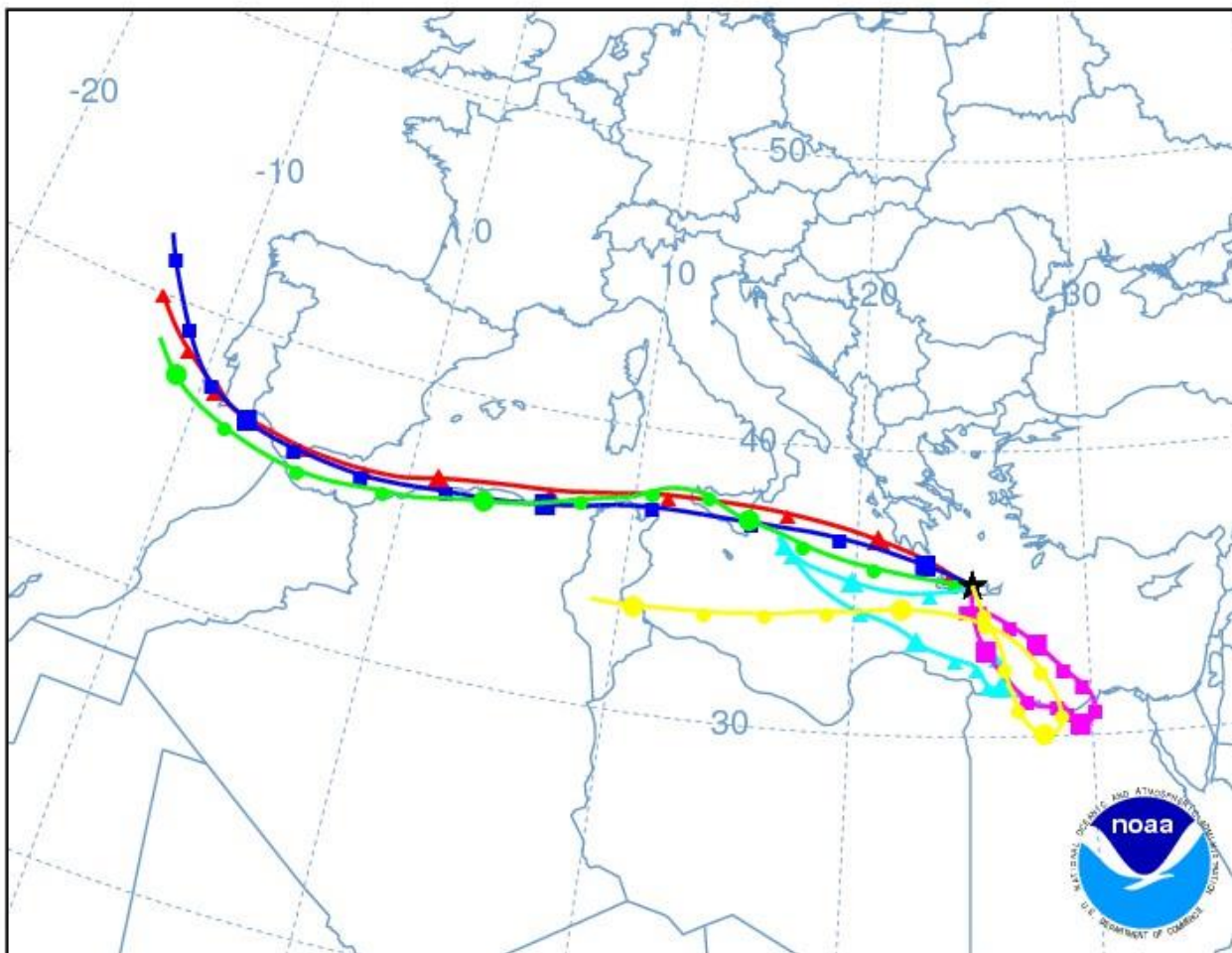


Job ID: 190887 Job Start: Fri Oct 17 11:09:42 UTC 2014
 Source 1 lat.: 35.300000 lon.: 25.080000 height: 1000 m AGL

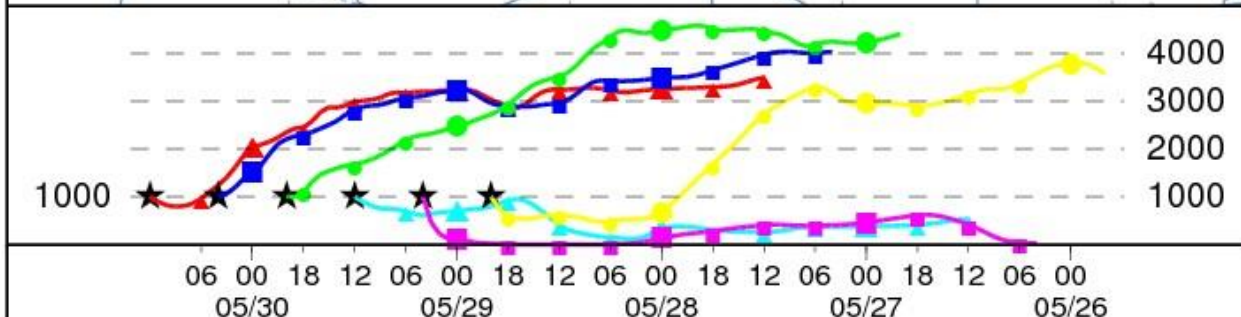
Trajectory Direction: Backward Duration: 72 hrs
 Vertical Motion Calculation Method: Model Vertical Velocity
 Meteorology: 0000Z 29 May 2013 - GDAS1

NOAA HYSPLIT MODEL
 Backward trajectories ending at 1200 UTC 30 May 13
 GDAS Meteorological Data

Source ★ at 35.30 N 25.08 E



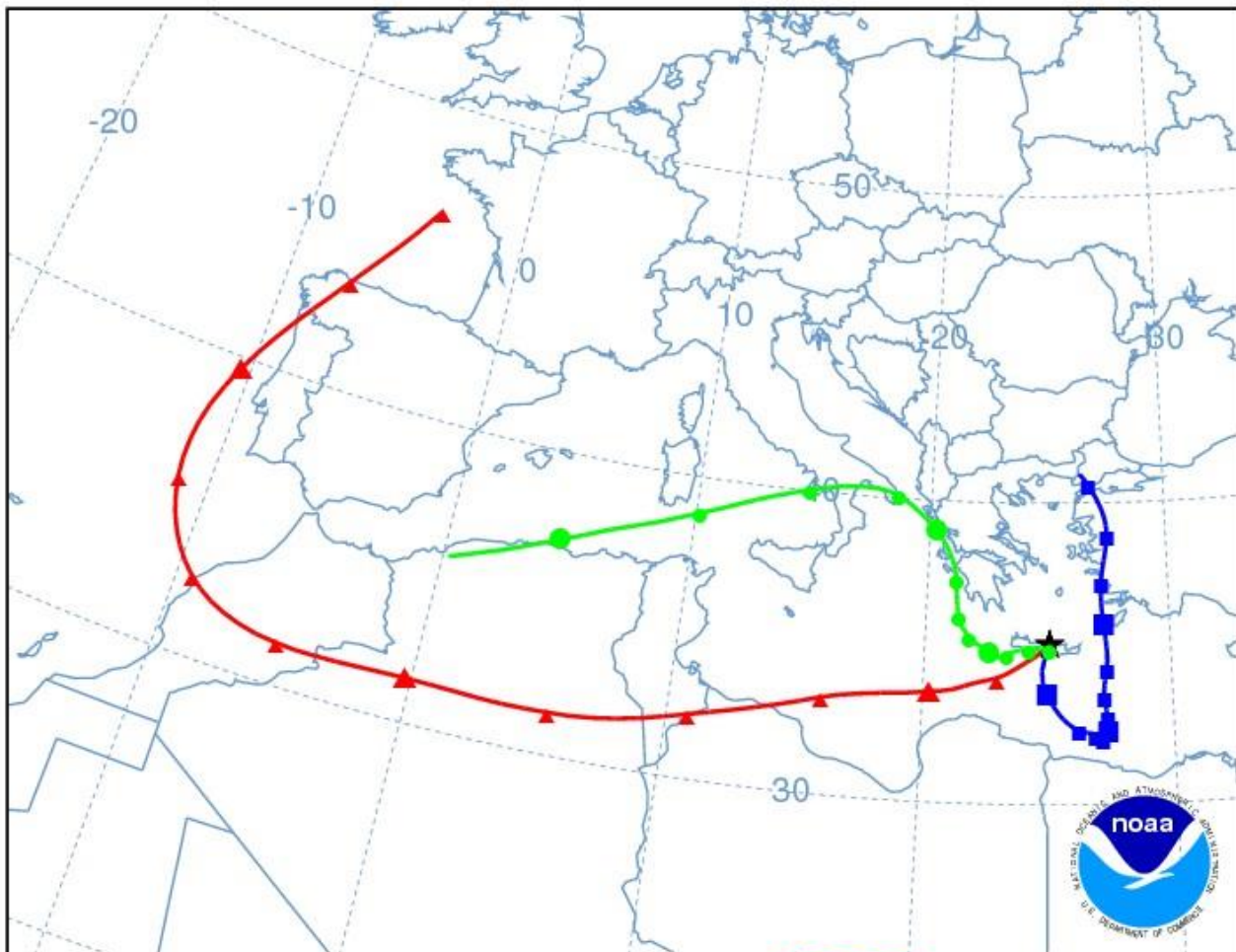
Meters AGL



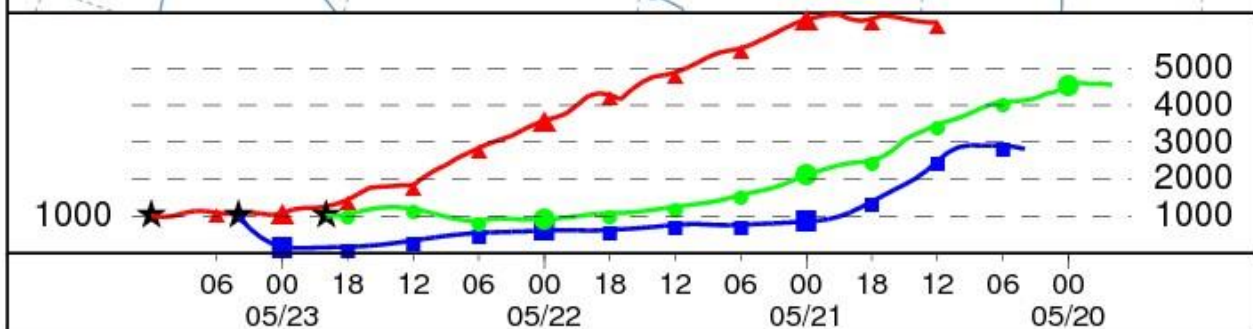
Job ID: 190837 Job Start: Fri Oct 17 11:07:25 UTC 2014
 Source 1 lat.: 35.300000 lon.: 25.080000 height: 1000 m AGL
 Trajectory Direction: Backward Duration: 72 hrs
 Vertical Motion Calculation Method: Model Vertical Velocity
 Meteorology: 0000Z 29 May 2013 - GDAS1

NOAA HYSPLIT MODEL
 Backward trajectories ending at 1200 UTC 23 May 13
 GDAS Meteorological Data

Source ★ at 35.30 N 25.08 E



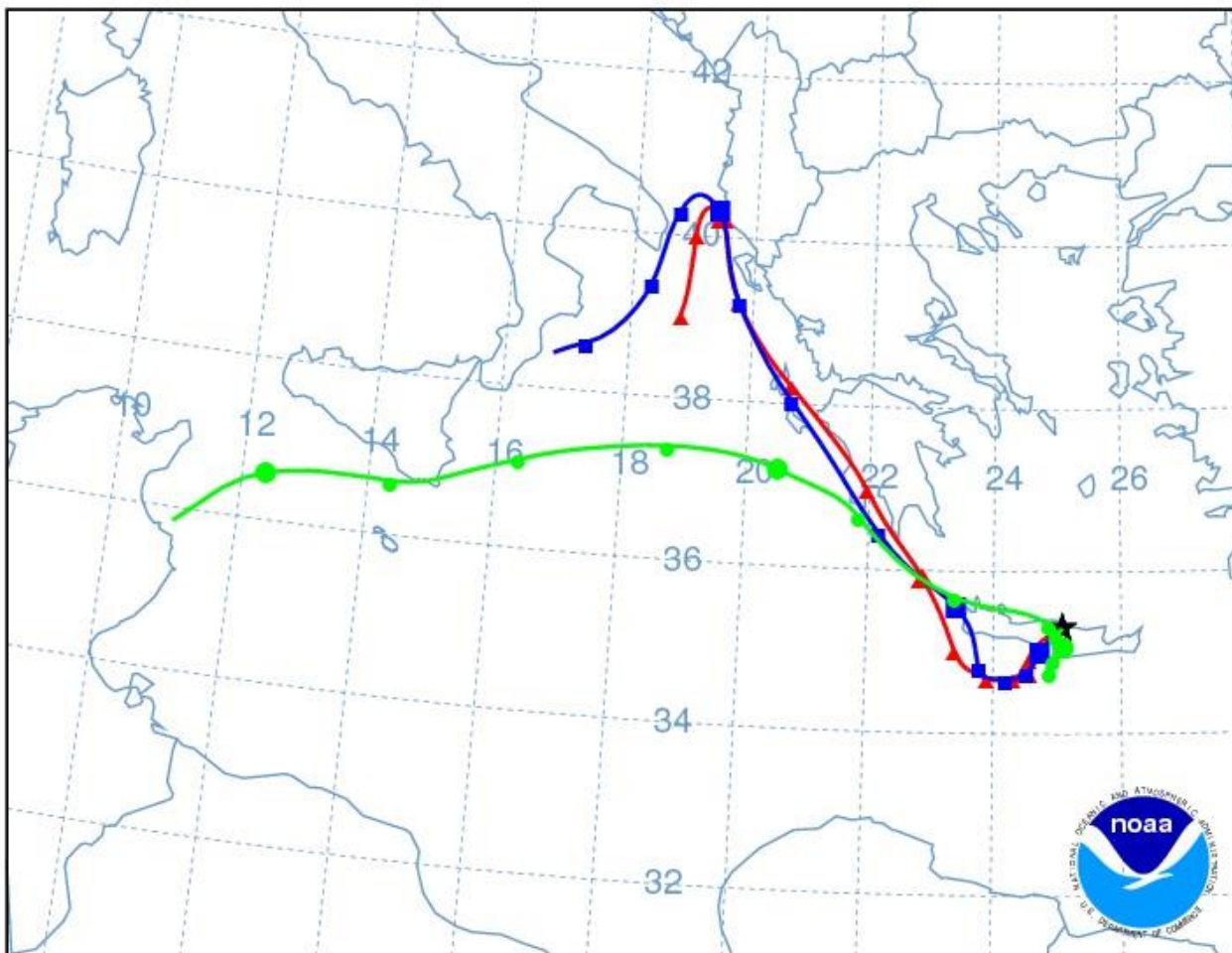
Meters AGL



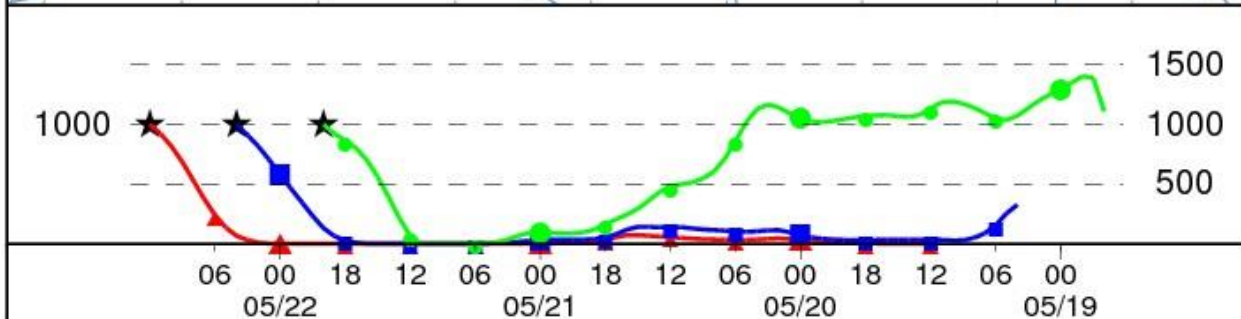
Job ID: 190796 Job Start: Fri Oct 17 11:03:26 UTC 2014
 Source 1 lat.: 35.300000 lon.: 25.080000 height: 1000 m AGL
 Trajectory Direction: Backward Duration: 72 hrs
 Vertical Motion Calculation Method: Model Vertical Velocity
 Meteorology: 0000Z 22 May 2013 - GDAS1

NOAA HYSPLIT MODEL
 Backward trajectories ending at 1200 UTC 22 May 13
 GDAS Meteorological Data

Source ★ at 35.30 N 25.08 E



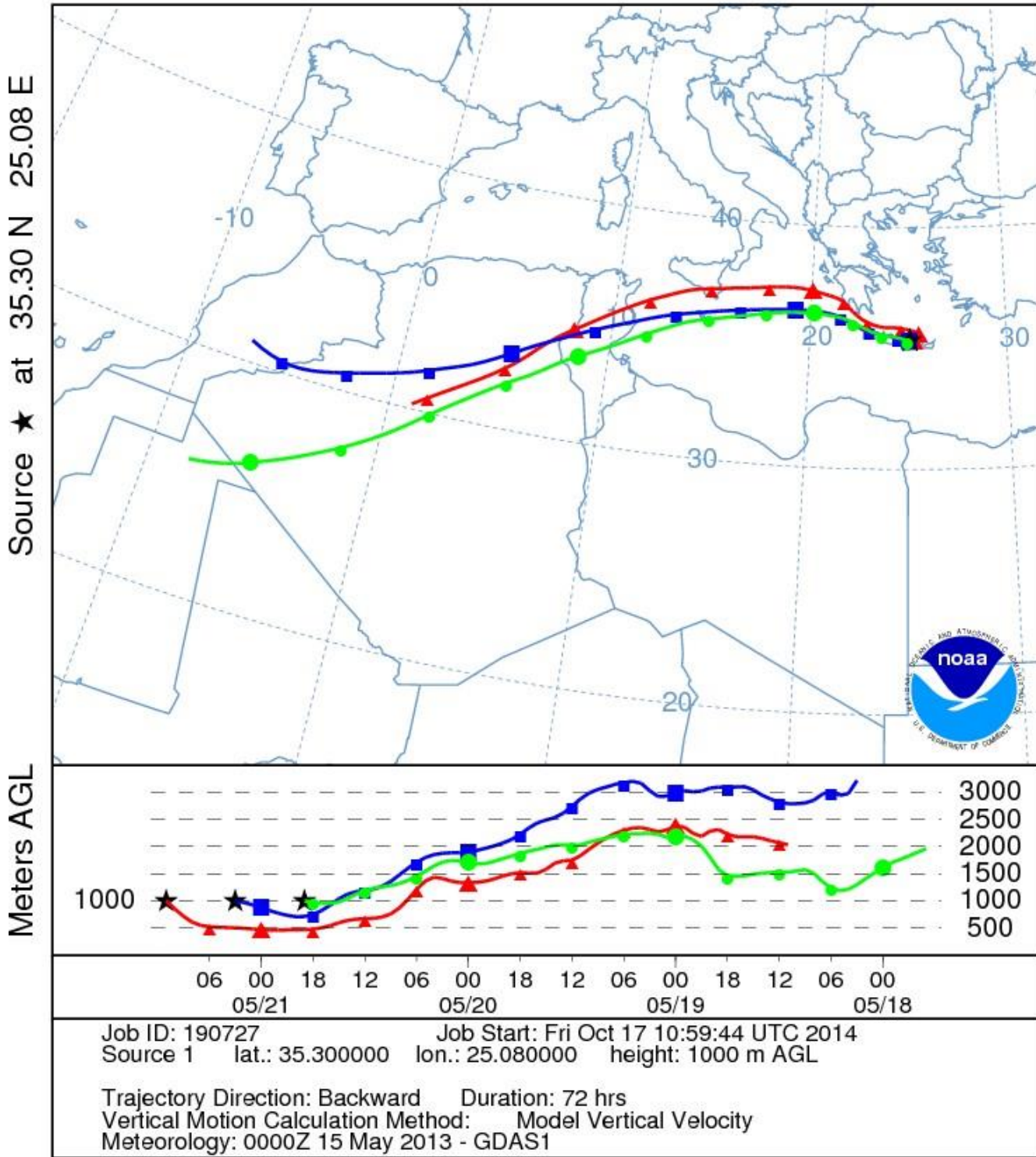
Meters AGL

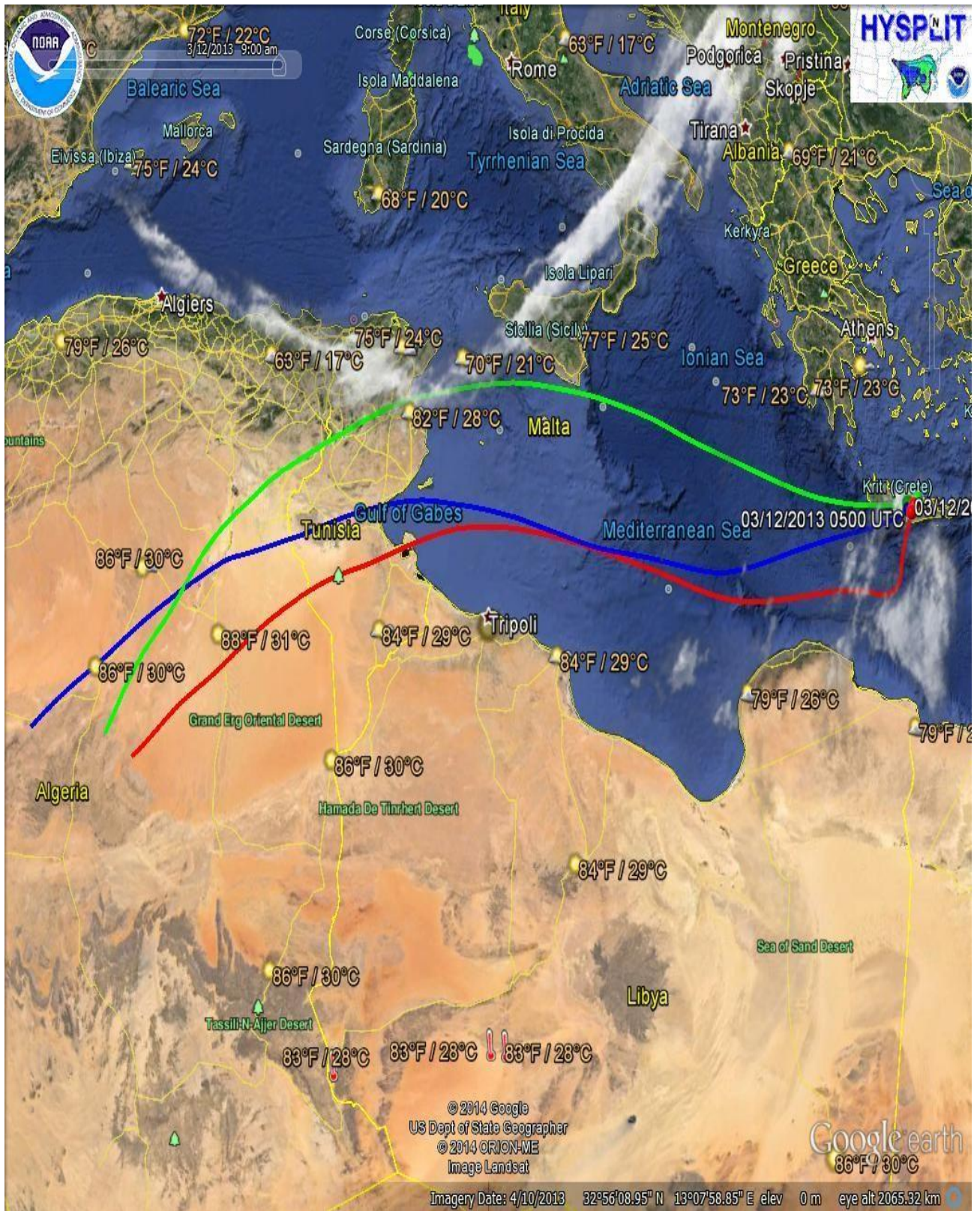


Job ID: 190775 Job Start: Fri Oct 17 11:01:51 UTC 2014
 Source 1 lat.: 35.300000 lon.: 25.080000 height: 1000 m AGL

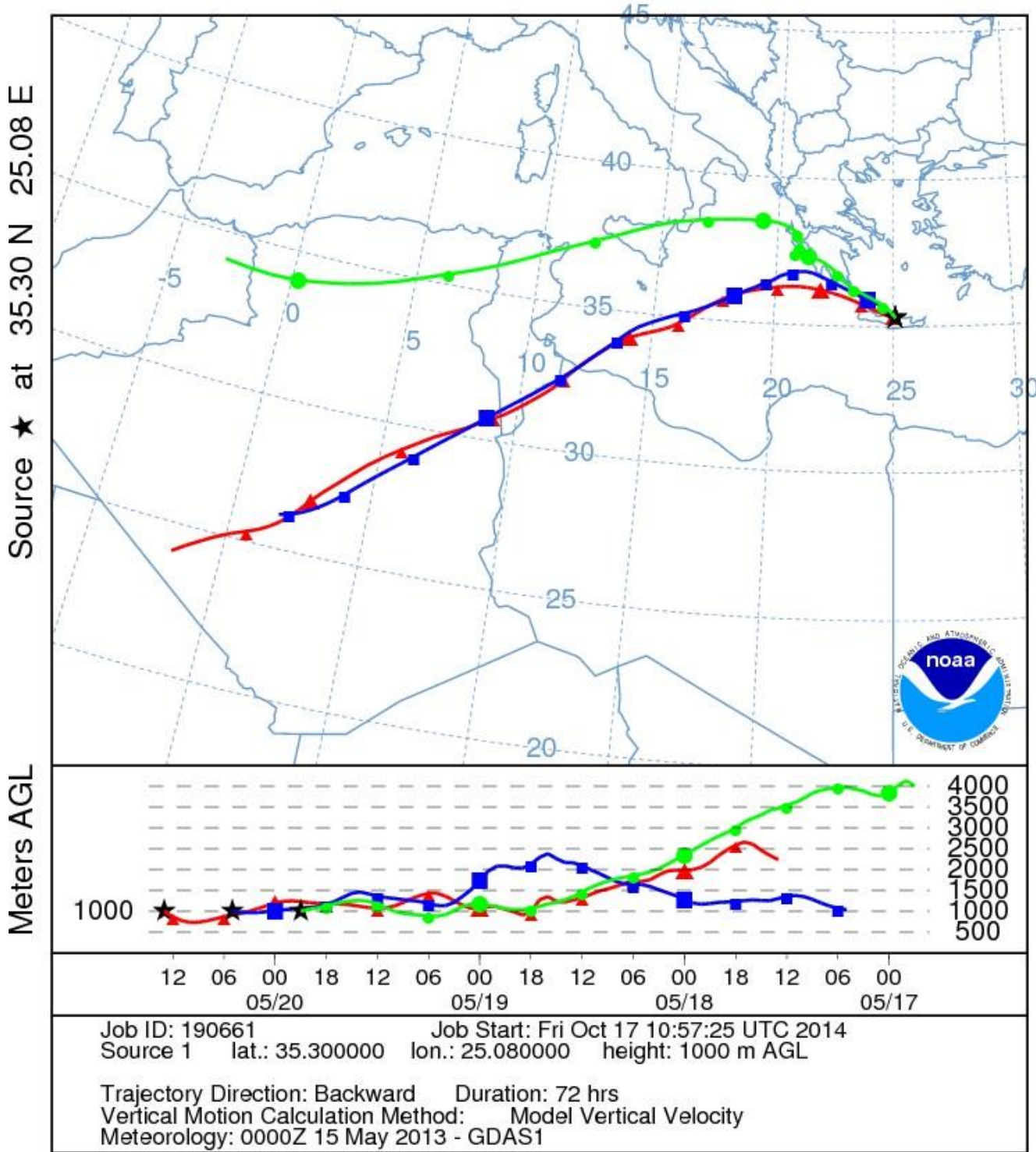
Trajectory Direction: Backward Duration: 72 hrs
 Vertical Motion Calculation Method: Model Vertical Velocity
 Meteorology: 0000Z 22 May 2013 - GDAS1

NOAA HYSPLIT MODEL
 Backward trajectories ending at 1100 UTC 21 May 13
 GDAS Meteorological Data

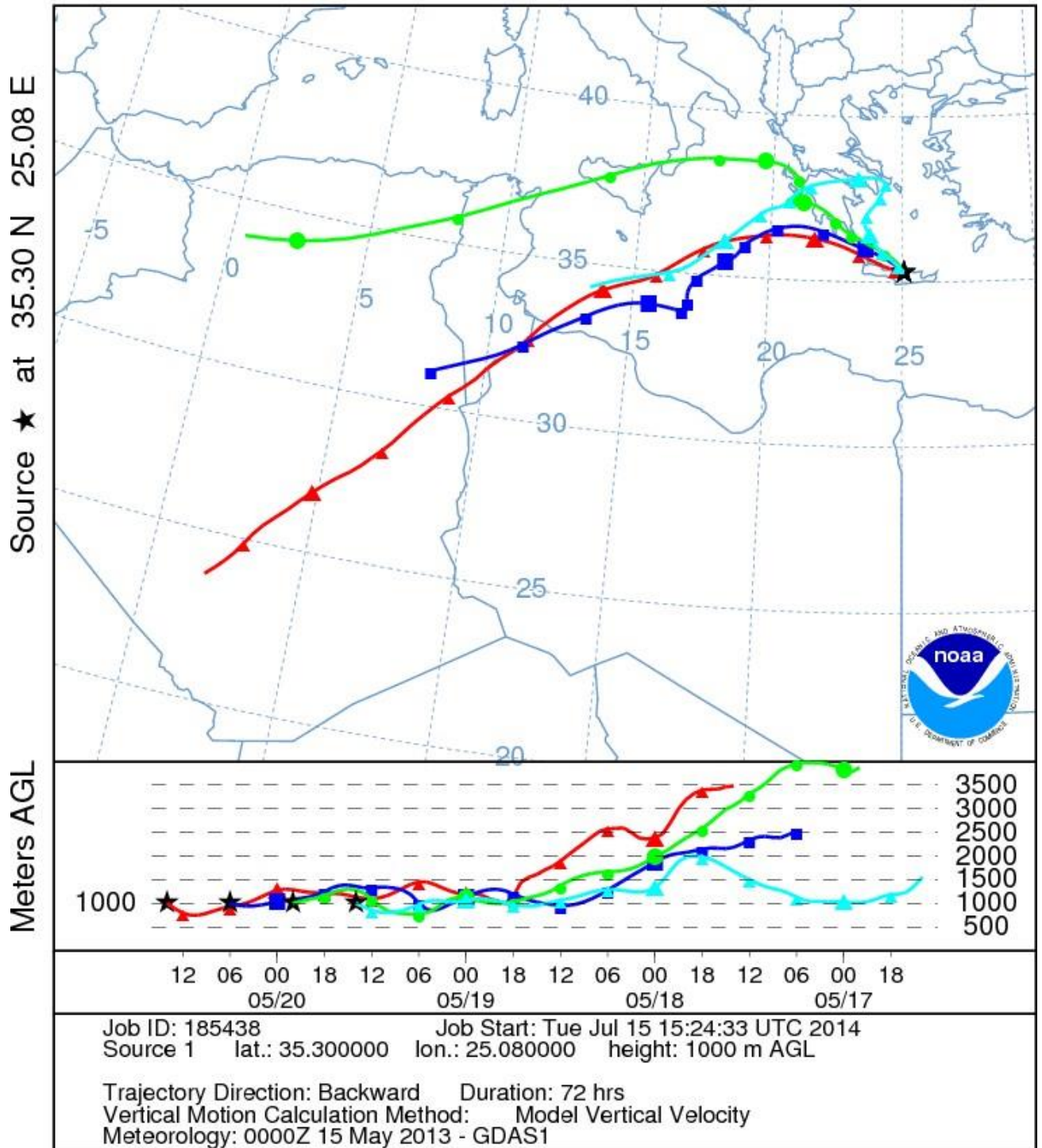




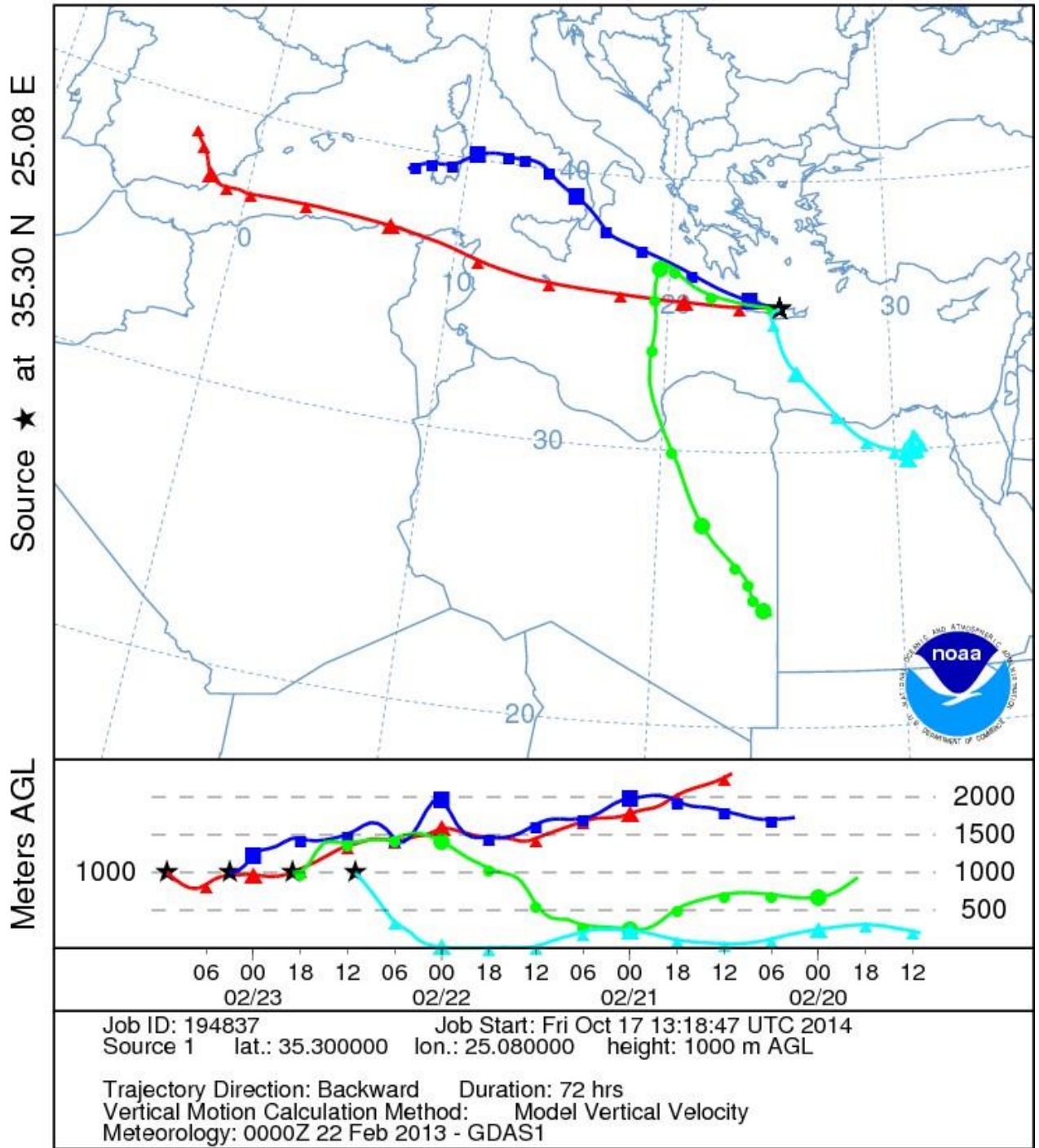
NOAA HYSPLIT MODEL
 Backward trajectories ending at 1300 UTC 20 May 13
 GDAS Meteorological Data



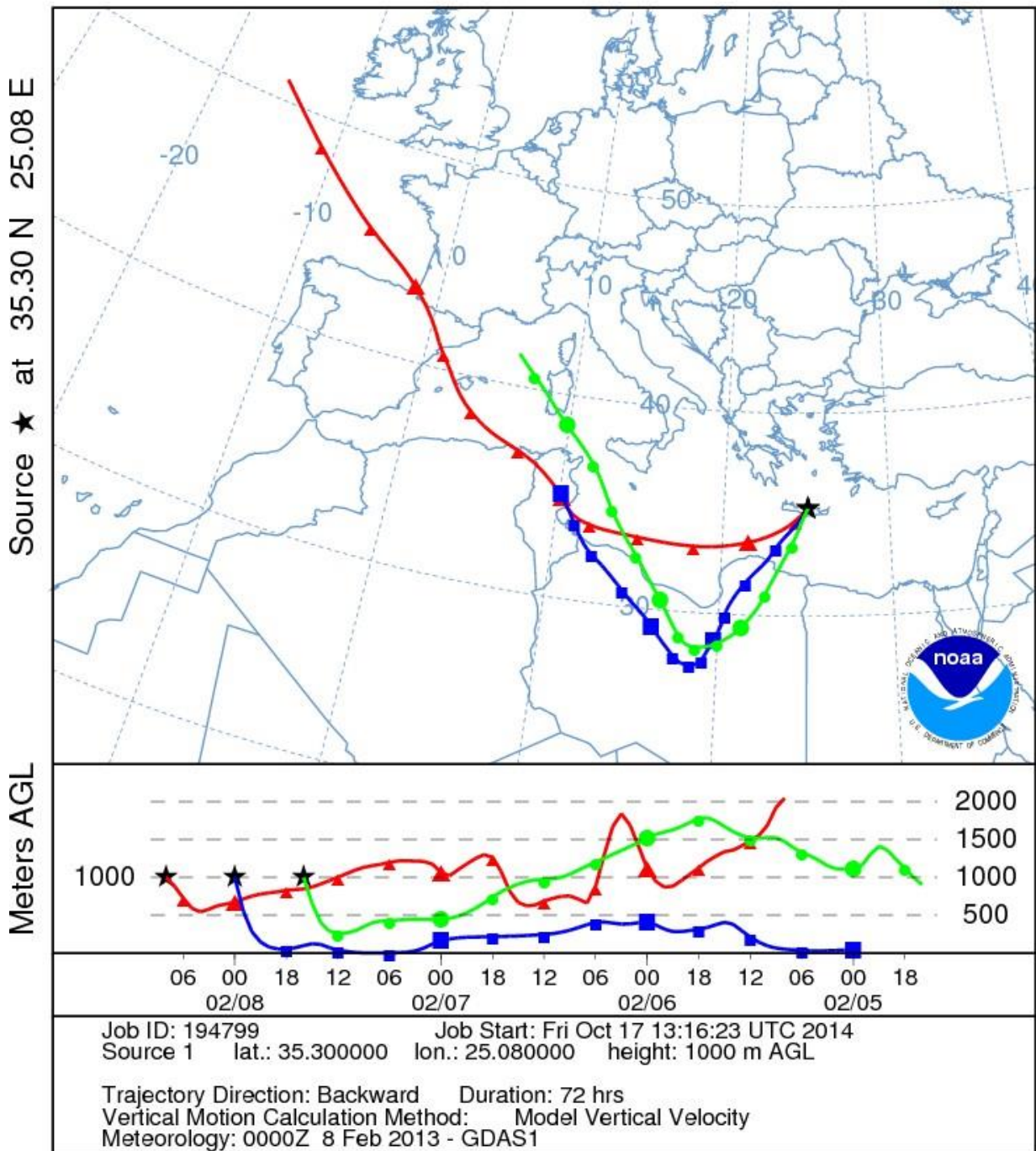
NOAA HYSPLIT MODEL
 Backward trajectories ending at 1400 UTC 20 May 13
 GDAS Meteorological Data



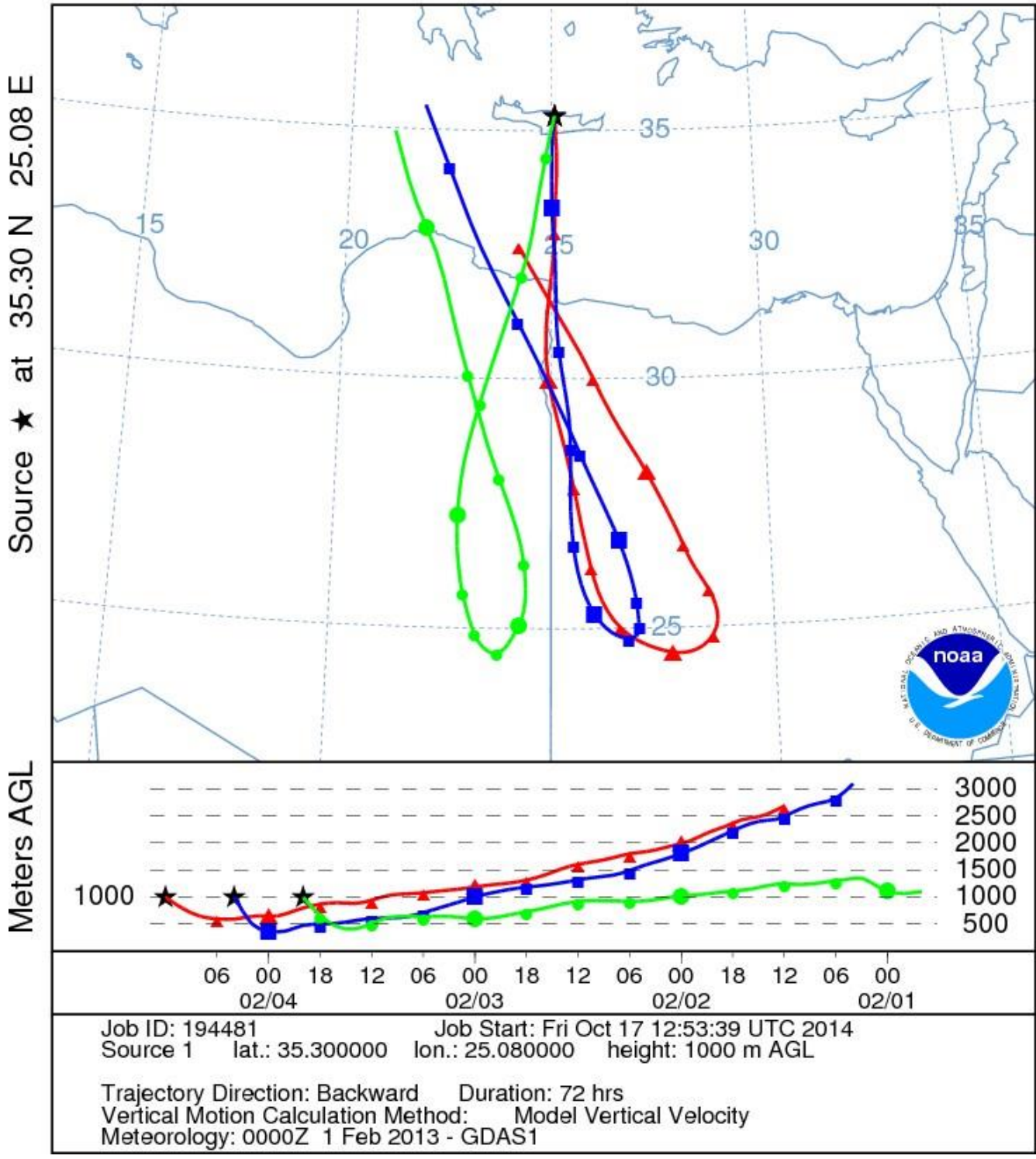
NOAA HYSPLIT MODEL
 Backward trajectories ending at 1100 UTC 23 Feb 13
 GDAS Meteorological Data



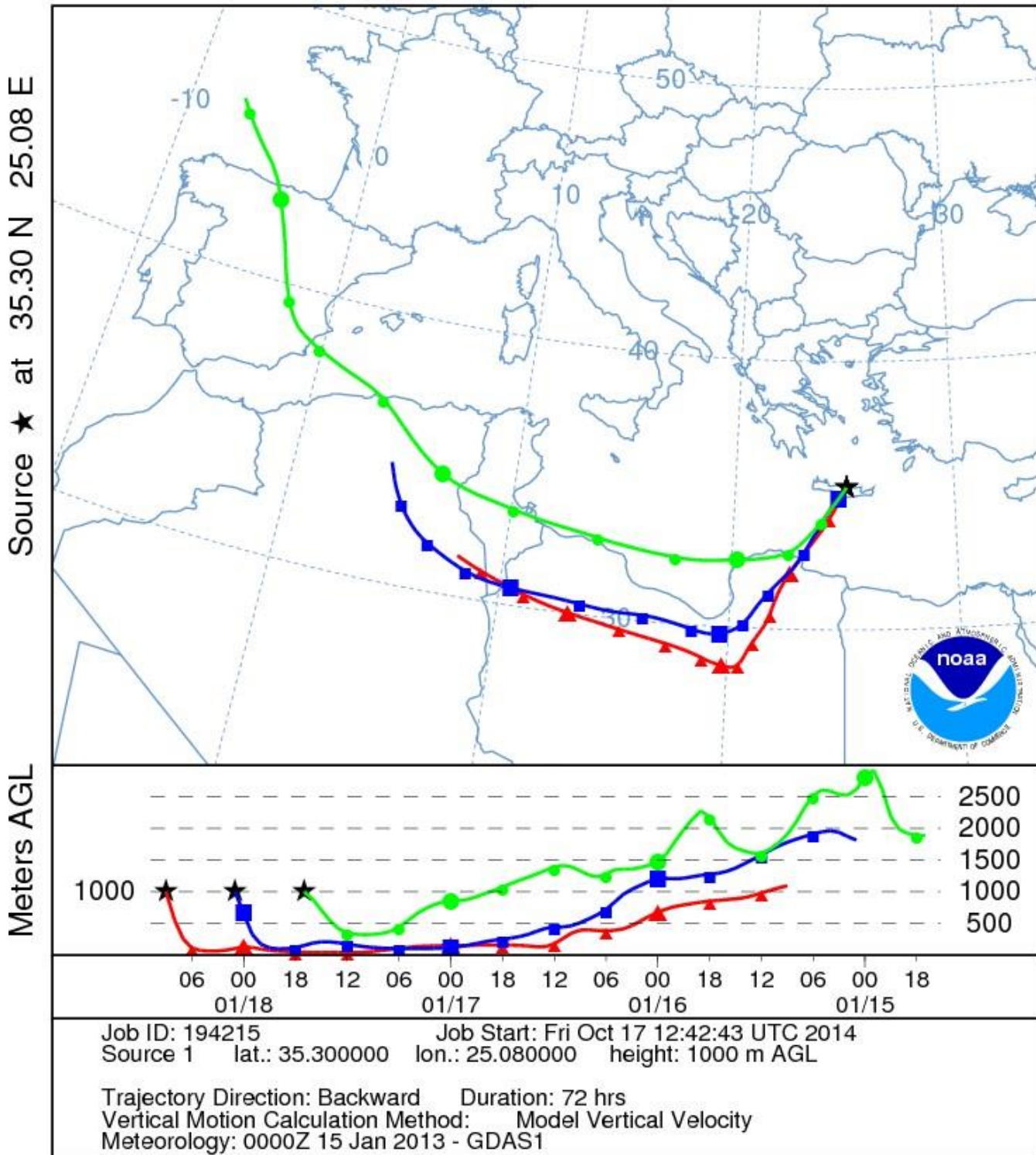
NOAA HYSPLIT MODEL
 Backward trajectories ending at 0800 UTC 08 Feb 13
 GDAS Meteorological Data



NOAA HYSPLIT MODEL
 Backward trajectories ending at 1200 UTC 04 Feb 13
 GDAS Meteorological Data

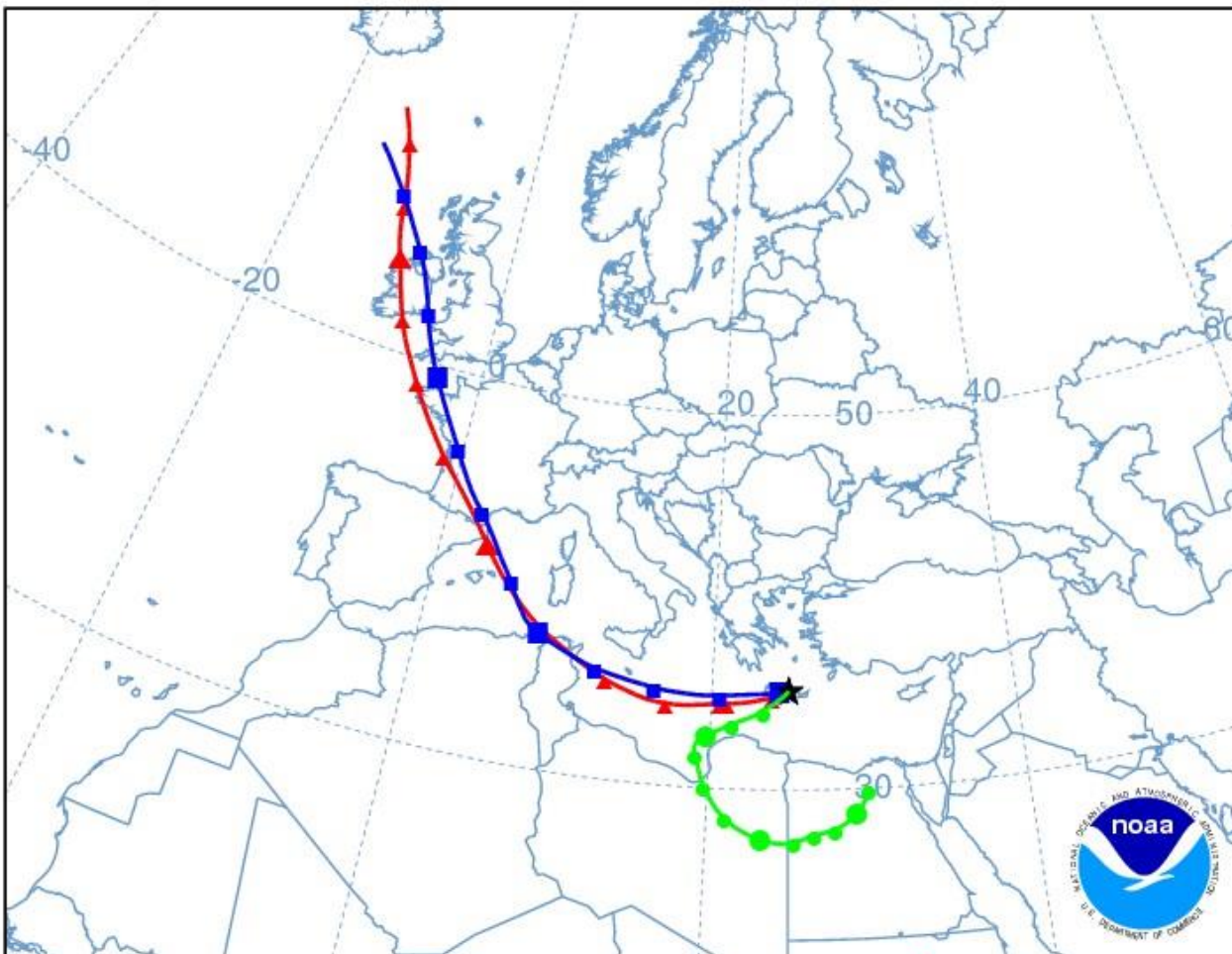


NOAA HYSPLIT MODEL
 Backward trajectories ending at 0900 UTC 18 Jan 13
 GDAS Meteorological Data

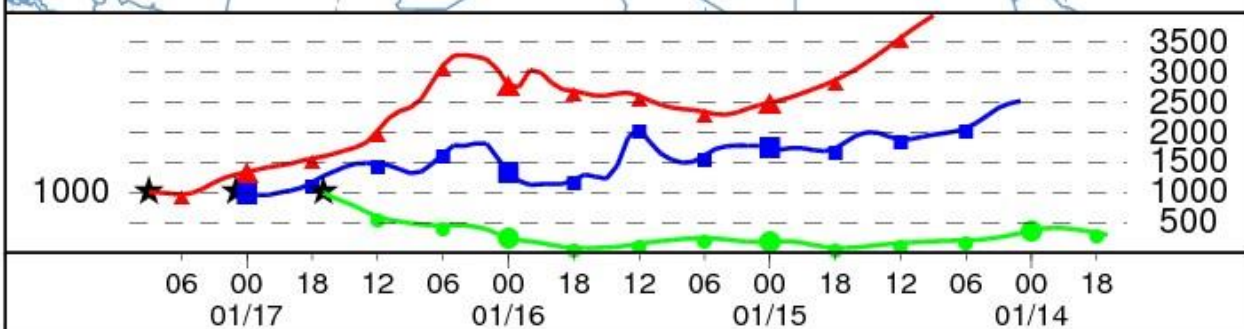


NOAA HYSPLIT MODEL
 Backward trajectories ending at 0900 UTC 17 Jan 13
 GDAS Meteorological Data

Source ★ at 35.30 N 25.08 E



Meters AGL



Job ID: 194174 Job Start: Fri Oct 17 12:41:01 UTC 2014
 Source 1 lat.: 35.300000 lon.: 25.080000 height: 1000 m AGL

Trajectory Direction: Backward Duration: 72 hrs
 Vertical Motion Calculation Method: Model Vertical Velocity
 Meteorology: 0000Z 15 Jan 2013 - GDAS1