



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Οι επιπτώσεις των ανθρωπογενών περιβαλλοντικών
πιέσεων στις κοινότητες ιών και βακτηρίων σε
παράκτια οικοσυστήματα**

Τσιώλα Αναστασία

Ηράκλειο, 2018

Εξεταστική επιτροπή

Επιβλέπων Καθηγητής:

Ιωάννης Καρακάσης (Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή:

Παρασκευή Πήττα (Ερευνήτρια Α, Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών)

Γεώργιος Κωτούλας (Ερευνητής Α, Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών)

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής:

Έρα Καραγιάννη (Επίκουρη Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Ιωαννίνων)

Γεώργιος Κουμουνδούρος (Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Εμμανουήλ Λαδουκάκης (Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Μανώλης Τσαπάκης (Ερευνητής Α, Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών)

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – Εισαγωγή	1 -
1.1. Πλαγκτονικές κοινότητες βακτηρίων και ιών και ανθρωπογενείς περιβαλλοντικές πιέσεις - 1 -	
1.2. Εισροή νανοσωματιδίων αργύρου στα θαλάσσια οικοσυστήματα.....	6 -
1.3. Κλιματική αλλαγή: οξίνιση και υπερθέρμανση των ωκεανών	11 -
1.4. Εισροή αερολυμάτων από την έρημο της Σαχάρας και την Ευρώπη στην Μεσόγειο Θάλασσα	16 -
1.5. Ανθρωπογενείς περιβαλλοντικές πιέσεις σε παράκτια θαλάσσια οικοσυστήματα .-	19 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - Η επίδραση της χαμηλής συγκέντρωσης νανοσωματιδίων αργύρου στο μικροβιακό πλαγκτόν	25 -
2.1. Συνοπτική εισαγωγή.....	25 -
2.2. Υλικά και Μέθοδοι	26 -
2.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός (μικρόκοσμοι).....	26 -
2.2.2. Πειραματικός σχεδιασμός (μεσόκοσμοι)	27 -
2.2.3. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων αργύρου και των διαλελυμένων ιόντων αργύρου	29 -
2.2.4. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης θρεπτικών στοιχείων και χλωροφύλλης	30 -
2.2.5. Προσδιορισμός των ρυθμών παραγωγής.....	31 -
2.2.6. Προσδιορισμός της πλαγκτονικής αφθονίας.....	32 -
2.2.7. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης δραστικών μορφών οξυγόνου	33 -
2.2.8. Προσδιορισμός του βαθμού ακεραιότητας της βακτηριακής μεμβράνης.....	33 -
2.2.9. Εξαγωγή γενετικού υλικού, πολλαπλασιασμός και αλληλούχηση.....	34 -
2.2.10. Επεξεργασία των προϊόντων αλληλούχησης.....	36 -
2.2.11. Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων	38 -
2.3. Αποτελέσματα.....	39 -
2.3.1. Επισκόπηση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων μικροκόσμων	39 -
2.3.2. Μέγεθος και κατανομή μεγέθους των ΝΣ αργύρου στους μεσοκόσμους	41 -
2.3.3. Χημικές παράμετροι στους μεσοκόσμους.....	43 -
2.3.4. Αφθονίες μικροβιακού πλαγκτού και ρυθμοί παραγωγής φυτοπλαγκτού και ετερότροφων βακτηρίων στους μεσοκόσμους.....	44 -
2.3.5. Σύσταση κοινοτήτων ιών, βακτηρίων και μικρο- πλαγκτού στους μεσοκόσμους -	46 -
2.4. Συζήτηση.....	53 -

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - Η επίδραση της οξίνισης και της θέρμανσης των ωκεανών στους κύκλους ζωής των ιών και τη βακτηριακή ποικιλότητα	60 -
3.1. Συνοπτική εισαγωγή.....	60 -
3.2. Υλικά και Μέθοδοι	61 -
3.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός πρώτου πειράματος (οξίνιση)	61 -
3.2.2. Προσδιορισμός pH και CO ₂	62 -
3.2.3. Προσδιορισμός συγκέντρωσης θρεπτικών στοιχείων και χλωροφύλλης	62 -
3.2.4. Προσδιορισμός συγκέντρωσης διάφανων εξωπολυμερικών σωματιδίων	63 -
3.2.5. Προσδιορισμός ρυθμού παραγωγής ετερότροφων βακτηρίων	63 -
3.2.6. Προσδιορισμός ρυθμού παραγωγής φυτοπλαγκτού.....	64 -
3.2.7. Προσδιορισμός της συχνότητας λυτικά μολυσμένων και λυσιγονικών κυττάρων -	64 -
3.2.8. Προσδιορισμός της ικής και βακτηριακής αφθονίας	66 -
3.2.9. Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων (πρώτο πείραμα)	66 -
3.2.10. Πειραματικός σχεδιασμός δεύτερου πειράματος (οξίνιση και υπερθέρμανση)..	67 -
3.2.11. Προσδιορισμός pH και θερμοκρασίας.....	67 -
3.2.12. Προσδιορισμός συγκέντρωσης θρεπτικών στοιχείων	68 -
3.2.13. Προσδιορισμός ικής και βακτηριακής αφθονίας	68 -
3.2.14. Εξαγωγή γενετικού υλικού, πολλαπλασιασμός, αλληλούχηση και επεξεργασία προϊόντων αλληλούχησης.....	68 -
3.2.15. Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων (δεύτερο πείραμα)	68 -
3.3. Αποτελέσματα.....	69 -
3.3.1. Επισκόπηση των περιβαλλοντικών συνθηκών του πρώτου πειράματος.....	69 -
3.3.2. Αφθονίες ιών και βακτηρίων.....	70 -
3.3.3. Λυτικός και λυσιγονικός κύκλος ζωής.....	72 -
3.3.4. Συσχέτιση ικών κύκλων ζωής και βιοτικών παραμέτρων.....	73 -
3.3.5. Επισκόπηση των περιβαλλοντικών συνθηκών του δεύτερου πειράματος.....	75 -
3.3.6. Βακτηριακή και ική αφθονία.....	76 -
3.3.7. Σύσταση της βακτηριακής κοινότητας	77 -
3.4. Συζήτηση.....	80 -
3.4.1. Οι κύκλοι ζωής των ιών στο μεσοτροφικό σύστημα του κόλπου της Villefranche... -	80 -
3.4.2. Η επίδραση της οξίνισης των ωκεανών στη λυσιγονία	82 -
3.4.3. Η ταυτόχρονη επίδραση της οξίνισης και της υπερθέρμανσης των ωκεανών στη βακτηριακή ποικιλότητα στο ολιγοτροφικό σύστημα του κόλπου του Ηρακλείου	84 -

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 - Η επίδραση της σκόνης από τη Σαχάρα και των ρυπασμένων αερολυμάτων από την Ευρώπη στους κύκλους ζωής των ιών	87 -
4.1. Συνοπτική εισαγωγή	87 -
4.2. Υλικά και Μέθοδοι	88 -
4.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός	88 -
4.2.2. Προσδιορισμός συγκέντρωσης θρεπτικών στοιχείων	89 -
4.2.3. Προσδιορισμός συγκέντρωσης χλωροφύλλης	90 -
4.2.4. Προσδιορισμός ρυθμού παραγωγής ετερότροφων βακτηρίων	90 -
4.2.5. Προσδιορισμός ικής και βακτηριακής αφθονίας	90 -
4.2.6. Προσδιορισμός της συχνότητας λυτικά μολυσμένων και λυσιγονικών κυττάρων -	90 -
4.2.7. Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων	91 -
4.3. Αποτελέσματα	91 -
4.3.1. Χημική σύσταση των αερολυμάτων και του θαλασσινού νερού στην αρχή του πειράματος	91 -
4.3.2. Αφθονία βακτηρίων και ιών	92 -
4.3.3. Ρυθμός παραγωγής ετερότροφων βακτηρίων	94 -
4.3.4. Λυτικός και λυσιγονικός κύκλος ζωής	94 -
4.3.5. Απώλεια βακτηριακής παραγωγής λόγω ικής λύσης	97 -
4.4. Συζήτηση	98 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 - Οι επιπτώσεις ανθρωπογενών μορφών πίεσης σε πλαγκτονικές κοινότητες ιών και βακτηρίων κατά μήκος της Ελληνικής ακτογραμμής	102 -
5.1. Συνοπτική εισαγωγή	102 -
5.2. Υλικά και Μέθοδοι	103 -
5.2.1. Δειγματοληψία πεδίου	103 -
5.2.2. Υπολογισμός του δείκτη πίεσης	106 -
5.2.3. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης χλωροφύλλης, θρεπτικών στοιχείων και βαρέων μετάλλων -	107 -
5.2.4. Προσδιορισμός της ικής και βακτηριακής αφθονίας	107 -
5.2.5. Εξαγωγή γενετικού υλικού, πολλαπλασιασμός και αλληλούχηση	108 -
5.2.6. Επεξεργασία των προϊόντων αλληλούχησης	108 -
5.2.7. Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων	108 -
5.3. Αποτελέσματα και Συζήτηση	109 -
5.3.1. Φυσικο-χημικός χαρακτηρισμός των κύριων σταθμών δειγματοληψίας	109 -
5.3.2. Σύσταση της βακτηριακής κοινότητας	112 -
5.3.3. Σύσταση της ικής κοινότητας	120 -

5.3.4. Λυσιγονία και αφθονία 67 βοηθητικών μεταβολικών γονιδίων.....	- 122 -
5.4. Επισκόπηση των αποτελεσμάτων και συμπεράσματα	- 126 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 – Σύνοψη	- 129 -
Βιβλιογραφία.....	- 139 -

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή δεν θα είχε πραγματοποιηθεί αν το 2013 ο Γιάννης Καρακάσης δεν είχε δεχτεί να είναι ο επιβλέπων της και, ακόμα πιο πριν, το 2008, αν ο ίδιος δεν μου είχε γνωρίσει την Βιβή Πήττα για την εκπόνηση της προπτυχιακής μου εργασίας. Ο Γιάννης με άφησε να πω το «ποίημά» μου στην πρώτη μας συζήτηση, με καθήλωσε (και συνεχίζει να το κάνει με τις σοφές μετρημένες κουβέντες του), με υποστήριξε μελλοντικά και για όλα αυτά τον ευχαριστώ. Ευχαριστώ ολόψυχα την Βιβή Πήττα για την πόρτα στην έρευνα που μου άνοιξε απλόχερα και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από το 2008 ως σήμερα. Ήταν στοργική μητέρα σε κάθε ανησυχία, επιστημονική ή προσωπική, με ακούραστες και προσεκτικές συμβουλές, προτροπές και στηρίγματα σε κάθε βήμα... Δεν θα ξεχάσω ούτε εγώ την Μασσαλία... και το ίδιο ισχύει για τις αξίες της. Ευχαριστώ τον Γιώργο Κωτούλα που άνοιξε τους ορίζοντες μου στη Βιολογία και μου πρόσφερε απλόχερα γνώση, συμβουλή και καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής, πάντα με την πιο αγνή και ειλικρινή διάθεση. Είναι ένα λαμπερό παράδειγμα ταπεινότητας και χαίρομαι που είχα την τύχη να μιλήσω μαζί του! Ευχαριστώ βαθύτατα τον Μανώλη Τσαπάκη... δεν ξέρω τι να πρωτοπώ, για την απέραντη εμπιστοσύνη που είχε απέναντι μου και γιατί δε δίστασε να γίνει πατέρας, φίλος και αδερφός όταν το χρειαζόμουν (εκτός από επιβλέποντας!).

Ευχαριστώ επίσης την Ήρα Καραγιάννη, τον Γιώργο Κουμουνδούρο και τον Μανώλη Λαδουκάκη που δέχτηκαν να είναι εξεταστές της διατριβής και με τα σχόλιά τους βελτίωσαν σημαντικά το κείμενο.

Οφείλω το μέγιστο ευχαριστώ σε φίλους και συναδέλφους που βοήθησαν στον πειραματικό σχεδιασμό και τις αναλύσεις. Ειδικότερα, ευχαριστώ τον πιο ζωντανό άνθρωπο που έχω γνωρίσει, την Χριστίνα Παυλούδη, καθώς και τον Jon Kristoffersen, και τους δύο για την υπομονή και ανεκτίμητη διδασκαλία στο εργαστήριο. Ευχαριστώ επίσης τις Κατερίνα Βασιλειάδου, Κατερίνα Οικονομάκη και Βάσω Τερζόγλου για την πολύτιμη βοήθειά τους στο εργαστήριο Γενετικής του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε και την Τατιάνα Τσαγκαράκη για τις πολύτιμες συμβουλές σε στατιστικές και εργαστηριακές αναλύσεις.

Ευχαριστώ θερμά τους Nigel Grimsley και Hugo Lebretonchel για την φιλοξενία και επίβλεψη στο Observatoire Océanologique de Banyuls sur Mer (Γαλλία) τον Ιανουάριο-Φεβρουάριο 2013 και την αγάπη για την μελέτη των ιών που μεταλαμπαδεύουν στους μαθητευόμενους! Επίσης, ευχαριστώ τους Daniele Daffonchio, Gregoire Michoud και Στέλιο Φοδελιανάκη για την φιλοξενία και επίβλεψη στο King Abdullah University of Science and

Technology (Σαουδική Αραβία) τον Μάιο-Ιούνιο 2016 και για την μετέπειτα συνεισφορά τους σε υπολογιστικές αναλύσεις και στη συγγραφή των άρθρων.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ πηγαίνει στην Βαρκελώνη, στην γλυκύτατη Elisabet Laia Sa Lago από το Instituto de Ciencias del Mar (Ισπανία) για την γενναιόδωρη βοήθειά της στον προσδιορισμό της ιικής παραγωγής και την απροσποίητη παρέα της.

Ευχαριστώ τον Αναστάσιο Οικονόμου και την Μαρίνα Κουκάκη για την φιλοξενία στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας στο Ινστιτούτο Έρευνας και Τεχνολογίας, όπου έγινε η εξαγωγή του ιικού γενετικού υλικού και την Έρη Παπαδοπούλου από το Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων που με βοήθησε στο εργαστήριο του ΙΤΕ με νεανικό και υπεύθυνο ενθουσιασμό το καλοκαίρι του 2015.

Για τις πολύτιμες συμβουλές που ήταν διατεθειμένη να προσφέρει σε επαγγελματικά (και άλλα...) θέματα ευχαριστώ την Ευγενία Αποστολάκη που με την παραδειγματική δυναμικότητά της μπορεί να κάνει τα αδύνατα δυνατά! Για τις σημαντικές συμβουλές στον χώρο της έρευνας ευχαριστώ επίσης τον Σπύρο Περγαντή.

Ευχαριστώ επίσης δύο ανθρώπους που ήταν για εμένα παραδείγματα ερευνητικής σκέψης και ευσυνειδησίας, με αδιάκοπη έμπνευση και επιθυμία για γνώση: τον Σπύρο Γκέλη από το Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης που ήταν δάσκαλός μου στο Λύκειο και με πάθος περιέγραφε το αντικείμενο της διατριβής του το 2004-5 (ναι, μελετούσε κυανοβακτήρια!) και τον Tsuneo Tanaka που ήταν παρών στο πρώτο πείραμα μεσοκόσμων που συμμετείχα και με καθοδήγησε βήμα-βήμα στην συγγραφή του πρώτου μου άρθρου με ανιδιοτέλεια και συνέπεια.

Δεν θα μπορούσα να έχω καλύτερους συνοδοιπόρους αυτά τα χρόνια από την Ειρήνη Τσκοπούλου (γνωστή και ως... η παιδική μου φίλη Ειρήνη), την Ιλιάνα Σαντή (ή Ιουλία ή Τζούλια... ακόμα δεν ξέρω πως να το πω αυτό το τρελοκόριτσο!) και την Κική Μυλώνα (γνωστή και ως nano-Kiki ή... «τα μπορεί και τα κάνει όλα»!) που φώτισαν κάθε μέρα, κάθε δειγματοληψία, κάθε αποτυχία και επιτυχία, κάθε μικρό ή μεγάλο εκνευρισμό και γέμισαν τις στιγμές με γέλια! Ευχαριστώ τις Κατερίνα Βασιλειάδου, Χριστίνα Παυλούδη, Μαρία Σμυρλή και Μαριάννα Τσέρτου που ο χρόνος μαζί τους, παρότι λίγος, ήταν πάντα ποιοτικός και με ασταμάτητα γέλια! Σας αγαπώ όλες!

Ευχαριστώ και στέλνω γλυκόφιλα στο «ΑΠΟ ΤΟ ΕΝΑ ΘΕΜΑ ΣΤΟ ΑΛΛΟ ΠΑΜΕ» τις μοναδικές αδερφές μου, την μεγάλη Ράνια και την μικρή Ναταλία, που αγαπώ όσο τίποτα άλλο στον κόσμο. Όταν τις σκέφτομαι, πλημμυρίζω μόνο με χαρά που με βοηθά να μηδενίσω τα χιλιόμετρα που μας χώρισαν, χωρίζουν ή θα χωρίζουν. Μαζί με τους γονείς μου, ήταν

πάντα «εκεί» με αγάπη, υπομονή, δοτικότητα και κατανόηση, με τηλεφωνικές και αληθινές αγκαλιές και πειράγματα (βρε, πήγαινε στη θέση σου). Ευχαριστώ την οικογένεια του άντρα μου Δημήτρη που μου χάρισαν μια καινούρια οικογενειακή στοργική αγάπη από το 2015 και τα δύο ανιψάκια μου που με ξανακάνουν παιδί: τον Δημητράκη (όταν μεγαλώσεις, θα σου πω την ιστορία από το ταξίδι στη Βέροια την ημέρα που γεννήθηκες!) και τον Νικολάκη (όταν μεγαλώσεις, θα σου πω την ιστορία από την ημέρα που με φώναξες πρώτη φορά και θα ξαναδούμε τον Νέμο!).

Για αμέτρητους λόγους που δε χωρούν σε κανένα βιβλίο, ευχαριστώ τον Δημήτρη. Τι να πω; Ότι άντεξε τα νεύρα μου; Ότι με βοήθησε σε κείμενα και παρουσιάσεις; Ότι με ενθάρρυνε; Ότι με γνώρισε σε μια δύσκολη περίοδο και όμως έδειξε τόση υπομονή...; Όχι, αυτά δεν είναι τίποτα. Με κάνει καλύτερο άνθρωπο κάθε μέρα. Συμπλήρωσε όλα μου τα κενά και πάνω απ' όλα, εξαιτίας του ένιωσα –επιτέλους– τι θα πει αυτό που λένε «ευτυχία».

*Αυτή η διατριβή είναι αφιερωμένη στον παππού Τάκη, γιατί μου δίδαξε την
εργατικότητα και την ακούραστη πάλη για ζωή, με δύναμη και σεβασμό*

*και στην κόρη του, την γλυκιά Μαριάνθη, την μαμά μου, γιατί ήταν το παράδειγμά
της που με στήριζε πάντα*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – Εισαγωγή

1.1. Πλαγκτονικές κοινότητες βακτηρίων και ιών και ανθρωπογενείς περιβαλλοντικές πιέσεις

Οι ωκεανοί καλύπτουν περίπου το 70% της επιφάνειας της Γης και οι πλαγκτονικοί μικροοργανισμοί παίζουν καθοριστικό ρόλο στη λειτουργία τους. Πράγματι, τα πλαγκτονικά μικρόβια και οι αλληλεπιδράσεις τους ελέγχουν μια σειρά από βιογεωχημικές διεργασίες, με κυριότερη αυτή της ροής ενέργειας (Karl 2007). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι πως περίπου το 50% της παραγωγής άνθρακα σε παγκόσμια κλίμακα οφείλεται στο φυτοπλαγκτόν (Falkowski et al. 2008). Από τη μια πλευρά λοιπόν, οι αυτότροφοι μικροοργανισμοί δεσμεύουν ηλιακή ενέργεια και παράγουν οργανική ύλη και από την άλλη πλευρά, οι ετερότροφοι τροποποιούν άμεσα τον δεσμευμένο άνθρακα μέσω της αναπνοής και παραγωγής. Εν τέλει, το ισοζύγιο μεταξύ της οργανικής ύλης που παράγεται από το φυτοπλαγκτόν και εκείνης που μεταβολίζεται από τα ετερότροφα βακτήρια καθορίζει το ποσό του διαλελυμένου υλικού που διατίθεται μετέπειτα στα ανώτερα τροφικά πλέγματα (DeLong and Karl 2005). Αυτή η δυναμική ισορροπία εξαρτάται από φυσικές, χημικές και βιολογικές αλληλεπιδράσεις [π.χ. θετικές και αρνητικές αναδράσεις (feedback), μη γραμμικές σχέσεις κ. ά.] που είναι περίπλοκες και μεταβαλλόμενες και τελικά καθιστούν τη μελέτη της ωκεάνιας λειτουργίας ένα δύσκολο εγχείρημα.

Στην εποχή μας, μια εποχή που έχει χαρακτηριστεί ως «Αναγέννηση» για την έρευνα στη θαλάσσια μικροβιολογία από τον DeLong (2007) – είναι πλέον αποδεκτό πως η γνώση της ποικιλότητας είναι το κλειδί για την κατανόηση της λειτουργίας του οικοσυστήματος (Galand et al. 2015). Συνεπώς, ολοένα και περισσότερες μελέτες στοχεύουν στην βαθύτερη κατανόηση της μικροβιακής ποικιλότητας, προσπαθώντας να εκτιμήσουν αν το θαλάσσιο οικοσύστημα είναι ευάλωτο στα πιθανά σενάρια περί κλιματικής αλλαγής και αν ναι, πως αυτό αναμένεται να αποκριθεί. Η μεγαλύτερη πρόκληση σε αυτό το πλαίσιο είναι πως δεν υπάρχει ένας καθολικός τρόπος που να συνδέει την (1) ποικιλότητα, (2) φυσιολογία και (3) οικολογία των μικροοργανισμών και το εγχείρημα γίνεται ακόμα δυσκολότερο αν σκεφτεί κανείς πως τα ευρήματα που προκύπτουν από πειράματα με καλλιέργειες συχνά δεν έχουν απόλυτη συνάφεια με το φυσικό πεδίο (Rappé et al. 2002).

Ανάμεσα στους πλαγκτονικούς μικροοργανισμούς, οι προκαρυώτες (εν συντομία, βακτήρια) έχουν πλέον αρχίσει να χρησιμοποιούνται εκτενώς ως «ιδανικός» δείκτης περιβαλλοντικής καταπόνησης (Quero et al. 2015) κυρίως επειδή είναι ευαίσθητοι σε χαμηλές συγκεντρώσεις ρυπογόνων ουσιών και μικρής έντασης φυσικο-χημικές αλλαγές, ενώ ταυτόχρονα αντιδρούν άμεσα καθώς διαθέτουν ταχείς ρυθμούς ανάπτυξης (Sun et al. 2012). Επιπροσθέτως, τα βακτήρια είναι ικανά να αποτοξικοποιήσουν μέταλλα και να αποικοδομήσουν οργανικούς ρύπους, γεγονός που τα καθιστά ικανούς δείκτες για ποικίλες πηγές ρύπανσης (Qian et al. 2017). Αντιθέτως, οι ιοί σπάνια έχουν μελετηθεί σε σχέση με ανθρωπογενείς περιβαλλοντικές πιέσεις. Η έλλειψη εκτίμησης της ιικής απόκρισης είναι πραγματικά αξιοπερίεργη, μιας και οι ιοί όχι μόνο προκαλούν θνησιμότητα και απώλεια βιομάζας στους βακτηριακούς ξενιστές τους [10-40% όπως υπολογίστηκε από τον Fuhrman (1999)], αλλά επιπλέον παρεμβαίνουν με τον πιο δραστικό τρόπο στη μεταβολική δυναμική τους. Ένα παράδειγμα που έχει μελετηθεί εκτενώς είναι η απελευθέρωση κυτταρικού περιεχομένου κατά τη διάρκεια της λύσης (Suttle 2007). Με αυτή τη διαδικασία, η ιική λύση παρεμβαίνει στον κύκλο του άνθρακα (Bonilla-Findji et al. 2008) καθώς η βακτηριακή παραγωγή δεν μεταφέρεται σε ανώτερα τροφικά επίπεδα αλλά ανακυκλώνεται σε μια «δεξαμενή» οργανικού άνθρακα που με τη σειρά της μπορεί να επαναπροσληφθεί και τελικά να ωφελήσει τα βακτήρια (Wommack and Colwell 2000). Επίσης, η επιλεκτικότητα που δείχνουν οι ιοί στον ξενιστή που θα προσβάλουν, ακόμα και σε επίπεδο στελέχους (Sullivan et al. 2003), έχει επίδραση στη σύσταση της κοινότητας (Thingstad 2000). Το αποτέλεσμα μάλιστα αυτής της επιλεκτικότητας είναι πολυδιάστατο, καθώς δεν επηρεάζεται μόνο η δομή αλλά και η λειτουργία του συστήματος, μιας και συνήθως τα πιο «ευάλωτα» βακτήρια είναι και τα πιο «ανταγωνιστικά» ως προς την πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων (Winter et al. 2010).

Μια πιο πρόσφατη ανακάλυψη σχετικά με την άμεση παρέμβαση των ιών στον μεταβολισμό των ξενιστών τους είναι η έκφραση ιικών γονιδίων που επιτρέπουν στους ιούς να τροποποιήσουν και να κατευθύνουν τον βακτηριακό μεταβολισμό προς όφελός τους. Διεργασίες όπως η φωτοσύνθεση, ο μεταβολισμός του άνθρακα, του θείου και των λιπαρών οξέων, η πρόσληψη θρεπτικών, η κινητικότητα και η αντίδραση στην καταπόνηση (Brum and Sullivan 2015; Hurwitz and U'Ren 2016) είναι μερικές ενδεικτικές περιπτώσεις από το ευρύ λειτουργικό φάσμα αυτών των γονιδίων. Τα γονίδια ονομάζονται ιικά βοηθητικά μεταβολικά γονίδια (viral auxiliary metabolic genes, AMGs) και η ανακάλυψή τους αποτέλεσε «επανάσταση» στον τρόπο που αντιμετωπίζονται πλέον οι ιοί (Hurwitz and U'Ren 2016).

Ως εκ τούτου, οι ιοί, αγγίζοντας τα 10^{30} σωματίδια στους ωκεανούς, θεωρούνται το «γενετικό απόθεμα» των βακτηρίων (Dinsdale et al. 2008). Για να γίνει αντιληπτή η οικολογική τους σημασία, οι πρώτες έρευνες επικεντρώθηκαν στην μελέτη της χωρικής και χρονικής τους μεταβλητότητας. Έτσι, είναι γνωστό πως οι ιοί έχουν μέση αφθονία στα επιφανειακά νερά της τάξης των 10^7 σωματίδια mL^{-1} και μάλιστα η αφθονία τους μειώνεται προς τη βαθυπελαγική ζώνη και προς την ανοιχτή θάλασσα (Wommack and Colwell 2000). Αυτά και άλλα παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν από έρευνες των τελευταίων δύο δεκαετιών που έγιναν στο επίπεδο της κοινότητας, όπου πλέον υπάρχει αρκετή πληροφορία σχετικά με την αφθονία, την παραγωγικότητα, τον ρυθμό αποικοδόμησης και την συχνότητα λυτικά μολυσμένων κυττάρων. Αντιθέτως, στο επίπεδο του ζεύγους ιού-ξενιστή η πληροφορία είναι λιγότερη μιας και μέχρι πρόσφατα η μελέτη της συνύπαρξης ενός συγκεκριμένου ζεύγους βασιζόταν στην στόχευση γονιδίων «δεικτών» (marker genes) που ήταν μάλλον δύσκολη διαδικασία. Ως αποτέλεσμα, είναι ακόμα δύσκολη η πρόβλεψη για τις αλληλεπιδράσεις ιών και βακτηρίων π.χ. σε ένα μελλοντικό ενδεχόμενο κλιματικής αλλαγής παραμένουν δύσκολες.

Ένας από τους πολλούς λόγους που η μετα-γονιδιωματική ανάλυση κατέκτησε τόσο μεγάλο έδαφος τα τελευταία χρόνια είναι η προσέγγιση της παραπάνω δυσκολίας: έδωσε τη δυνατότητα να μελετηθούν ευκολότερα η ποικιλότητα και ακολούθως η δυναμική των ιικών κοινοτήτων (Willner and Hugenholtz 2013). Τα περισσότερα από τα πολλά εμπόδια που υπήρχαν αρχικά (για παράδειγμα, χαμηλή συγκέντρωση DNA και μεγάλη πιθανότητα ύπαρξης μολυσμένου υλικού από εξωκυτταρικό υλικό ή βακτηριακό DNA) τελικά ξεπεράστηκαν. Έτσι, με τη χημική μέθοδο της συσσωμάτωσης με χλωριούχο σίδηρο (John et al., 2011), με τον καθαρισμό του ιικού γονιδιώματος είτε με ένζυμα είτε με διαβάθμιση πυκνότητας (Hurwitz et al., 2013) και με την αλληλούχηση τεχνολογίας με σύνδεσμο ή linker amplification (Solonenko et al. 2013) μελετήθηκε ακόμα και το πρωτεϊνικό προφίλ των ιών σε ποσοτικό επίπεδο και συνεπώς μελετήθηκε και ο οικολογικός τους ρόλος (Hurwitz and Sullivan 2013).

Πρόσφατες δημοσιεύσεις παρουσιάζουν τον ποικίλο ρόλο που παίζουν οι ιοί μέσω των AMGs. Συγκεκριμένα, τα γονίδια αυτά συνήθως κωδικοποιούν μεταβολικά μονοπάτια που υφίστανται περιορισμό από κάποιον παράγοντα, για παράδειγμα κωδικοποιούν για την πρόσληψη του φωσφόρου και το μεταβολισμό του αζώτου (Breitbart 2012). Όταν τα γονίδια τελικά εκφραστούν, βοηθούν το βακτήριο-ξενιστή να ενεργοποιήσει τον μεταβολισμό του, έμμεση απόρροια της οποίας είναι η αύξηση των πιθανοτήτων «επιβίωσης» του ιού. Τα AMGs έχουν βακτηριακή προέλευση, έχουν αποκτηθεί μέσω οριζόντιας μεταφοράς και

συνεχώς μεταφέρονται από και προς τα βακτήρια, με συνέπεια να τροποποιούν ριζικά το βακτηριακό γονιδίωμα άρα και την ίδια την εξέλιξη των βακτηρίων (Rohwer and Thurber 2009). Ένα από τα πιο τυπικά αρχικά παραδείγματα παρουσιάστηκε από τους Sullivan *et al.* (2005) και αφορούσε τη μελέτη των γονιδιωμάτων τριών ιών που προσβάλλουν το είδος *Prochlorococcus*: στα γονιδιώματα βρέθηκαν πολλά βακτηριακά γονίδια εκ των οποίων μερικά κωδικοποιούν για τον μεταβολισμό του άνθρακα στο σκοτάδι και την πρόσληψη χαμηλών συγκεντρώσεων φωσφόρου. Στη συνέχεια, βρέθηκε πως οι ιοί «οδηγούν» την οριζόντια μεταφορά αυτών των γονιδίων ανάμεσα σε *Prochlorococcus* και *Synechococcus*, ενώ όταν πλέον οι ιοί έχουν ενσωματωθεί στο βακτηριακό γονιδίωμα μπορούν να ανασυνδυαστούν με αυτό (Zeidner *et al.* 2005). Επίσης, το γονίδιο *hli* βρέθηκε πως μπορεί να μεταφερθεί στο ικό γονιδίωμα και πάλι πίσω στο «μητρικό» γονιδίωμα του *Prochlorococcus* (Lindell *et al.* 2004).

Τα AMGs έχουν κατηγοριοποιηθεί σε δύο ομάδες: την Κλάση ένα (Class I) που περιλαμβάνει γονίδια που κωδικοποιούν μεταβολικές λειτουργίες (σύμφωνα με την Kyoto Encyclopedia of Genes and Genoms, KEGG, Kanehisa and Goto, 2000) και την Κλάση δύο (Class II) που περιλαμβάνει γονίδια που έχουν παράπλευρο ρόλο στο μεταβολισμό των κυττάρων (π.χ. διαμεμβρανική κίνηση). Ειδικότερα, στην πρώτη κατηγορία έχουν αναγνωριστεί γονίδια με ρόλο στη φωτοσύνθεση των κυανοβακτηρίων, για παράδειγμα δομικά γονίδια του φωτοσυστήματος I και II (*psbA*, *psbD*), γονίδια για τη μεταφορά ηλεκτρονίων (*ptoX*, *petE*), γονίδια για τη σύνθεση των χρωστικών (*hoI*, *pebS*) και γονίδια για τον μεταβολισμό του άνθρακα (*talC*, *CP12*) [συνοψίζονται στους Hurwitz and Ren (2016)]. Για πολλά από αυτά τα γονίδια έχει αποδειχθεί πως μπορούν να ανακατευθύνουν τον μεταβολισμό του ξενιστή τους (reprogramming), για παράδειγμα όταν υπάρχει περιορισμός γλυκόζης μέσω των *gnd*, *tkl* και *tal* (Emmerling *et al.* 2002).

Στις μέρες μας, η μελέτη του ικού μετα-γονιδιώματος (δηλαδή της συνολικής ικής κοινότητας) μπορεί να δώσει πληροφορίες (ποσοτικές και μη) σχετικά με τις πιθανές λειτουργίες των ιών και περαιτέρω σχετικά με την λειτουργία ενός οικοσυστήματος. Πράγματι, το σύνολο των ικών γονιδίων σε μια κοινότητα μπορεί να δείξει την παραγωγικότητα των ξενιστών και την έκταση της λυσιγονίας. Η λυσιγονία έχει συχνά χρησιμοποιηθεί ως ένας έμμεσος δείκτης καταπόνησης του ξενιστή και του περιβάλλοντος, μιας και επιτρέπει στον ιό να ενσωματωθεί στο βακτηριακό γονιδίωμα και να παραμείνει εκεί προστατευμένο έως ότου οι συνθήκες του επιτρέψουν να λύσει το κύτταρο. Η προστασία έγκειται στο γεγονός ότι ένας ιός έξω από το κύτταρο «απειλείται» από την UV ακτινοβολία (Bettarel *et al.* 2008) και την έλλειψη θρεπτικών (Weinbauer *et al.* 2003), ενώ εντός του

κυττάρου εξασφαλίζει πως άλλοι ιοί δεν θα μολύνουν επιπλέον τον ξενιστή του (Long et al. 2008). Από την άλλη πλευρά, με τον λυτικό κύκλο ζωής οι ιοί διπλασιάζονται ταχύτατα και λύουν τα κύτταρα άμεσα. Επί της ουσίας, δεν είναι σαφές τι ελέγχει τη σχέση μεταξύ του λυσιγονικού και λυτικού κύκλου. Ενώ έχει παρατηρηθεί συχνά πως η λυσιγονία σχετίζεται αρνητικά με τη βακτηριακή παραγωγικότητα και αφθονία (Williamson et al. 2002; Laybourn-Parry et al. 2007; Evans and Brussaard 2012; Payet and Suttle 2013; Brum et al. 2016), υπάρχουν και αντίθετα ευρήματα (Boras et al. 2009; Thomas et al. 2011). Μια νέα διάσταση σε αυτόν τον τομέα δόθηκε πρόσφατα από τους Knowles *et al.* (2016) που πρότειναν την επικράτηση του λυσιγονικού κύκλου έναντι του λυτικού σε περιβάλλοντα όπου τα βακτήρια είναι άφθονα, διότι σε αυτές τις περιπτώσεις οι ιοί δεν λύουν τα κύτταρα, αλλά τα αφήνουν να επιβιώσουν. Επιπλέον, οι ίδιοι συγγραφείς, με δεδομένο πως το μεγάλο πλεονέκτημα της λυσιγονίας είναι η αποφυγή ιικής μόλυνσης από έναν νέο ιό (Thingstad et al. 2014), υπέθεσαν πως τα ίδια τα βακτήρια «προτιμούν» να παραμείνουν λυσιγονικά παρά να υποστούν μεταλλάξεις προκειμένου να αποκτήσουν ανθεκτικότητα στην μόλυνση (Knowles et al. 2016). Μέσα στο ιικό γονιδίωμα λοιπόν, μπορεί κανείς να εντοπίσει γονίδια-δείκτες της λυσιγονίας. Ένα τέτοιο γονίδιο είναι η ιική ενσωματάση (viral integrase) που υποδηλώνει την ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος στο γονιδίωμα του ξενιστή. Το γονίδιο είναι απαραίτητο για την ενσωμάτωση και είναι εξειδικευμένο ως προς τη θέση προσκόλλησης και φέρει τη ονομασία *att* από την αγγλική λέξη «attachment» (*attB*: βακτηριακό γονίδιο και *attP*: ιικό γονίδιο). Παρόλα αυτά, μιας και η ενσωμάτωση δεν είναι ο μοναδικός τρόπος με τον οποίο οι ιοί ακολουθούν την λυσιγονία, η παρουσία του γονιδίου της ενσωματάσης χρησιμοποιείται ως μια ένδειξη λυσιγονίας (Bellas et al. 2015).

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή εξετάστηκε η σχέση μεταξύ της λυσιγονίας και τεσσάρων διαφορετικών συνθηκών ανθρωπογενούς περιβαλλοντικής πίεσης. Επίσης, περιγράφηκε η σύνθεση των κοινοτήτων ιών και βακτηρίων σε σχέση με αυτές τις πιέσεις. Οι τέσσερις συνθήκες απεικονίζουν ανθρωπογενείς περιβαλλοντικές πιέσεις που είτε λαμβάνουν χώρα στις μέρες μας σε μεγάλο, μέτριο ή μικρό βαθμό είτε προβλέπονται για το μέλλον.

Πιο συγκεκριμένα, η πρώτη πίεση είναι η εισροή τεχνητών νανοσωματιδίων αργύρου στο θαλάσσιο οικοσύστημα που προβλέπεται να αυξηθεί στο κοντινό μέλλον με σημαντικές και ανεξερεύνητες συνέπειες στο πλαγκτόν. Η δεύτερη πίεση αφορά την εισροή διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) και την επαγόμενη μείωση του pH της θάλασσας που είναι μια χημική αλλαγή που έχει ήδη μετρηθεί στους ωκεανούς και προβλέπεται να συνεχιστεί. Η τρίτη πίεση είναι επίσης μια καταγεγραμμένη χημική αλλαγή στο θαλάσσιο οικοσύστημα που προκαλείται από την εισροή ρυπασμένων αερολυμάτων. Στη Μεσόγειο Θάλασσα, αυτά τα

αερολύματα έχουν κυρίως Ευρωπαϊκή προέλευση και η είσοδός τους προκαλεί αλλαγές στο ισοζύγιο βασικών θρεπτικών στοιχείων. Τέλος, η τέταρτη πίεση περιλαμβάνει τις ποικίλες ανθρωπογενείς δραστηριότητες που λαμβάνουν χώρα στα παράκτια νερά της Ελληνικής ακτογραμμής και προκαλούν συνεχείς χημικές αλλοιώσεις. Για παράδειγμα, η απελευθέρωση είτε βαρέων μετάλλων από βιομηχανίες είτε θρεπτικών από υδατοκαλλιέργειες είναι δύο ενδεικτικά παραδείγματα που παρατηρούνται σε αυτά τα παράκτια συστήματα σε συνεχή βάση. Συνεπώς, για την τέταρτη μελέτη αναλύθηκαν φυσικές κοινότητες με δειγματοληψία πεδίου, ώστε να αποτυπωθεί η βακτηριακή και ιική κοινότητα μια δεδομένη στιγμή (snapshot). Εν αντιθέσει με την τέταρτη μελέτη, στις τρεις πρώτες χρησιμοποιήθηκε το πειραματικό εργαλείο των μεσοκόσμων. Οι μεσόκοσμοι χρησιμοποιούνται εκτενώς για να μελετηθούν συγκεκριμένες μορφές πίεσης στο πελαγικό οικοσύστημα, καθώς επιτρέπουν τον πειραματισμό σε μεγάλη κλίμακα, με καλή επαναληψιμότητα και με όλο το μικροβιακό πελαγικό τροφικό πλέγμα παρόν, ενώ συχνά λειτουργούν ως «γέφυρα» μεταξύ παρατηρήσεων στο φυσικό πεδίο και πειραμάτων εργαστηρίου (Taub, 1997).

Στα Κεφάλαια 1.2 έως 1.5 περιγράφονται λεπτομερώς οι τέσσερις μορφές ανθρωπογενών περιβαλλοντικών πιέσεων που μελετήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή. Γνωρίζοντας ήδη πως αυτές οι πιέσεις επηρεάζουν τις βακτηριακές κοινότητες, στόχος της διατριβής ήταν να ελεγχθεί αν η επιρροή παρατηρείται επίσης στο επίπεδο του ικού γονιδιώματος ή/και του ικού λυσιγονικού κύκλου ζωής. Μια βασική υπόθεση των πειραμάτων ήταν πως αν οι πιέσεις έχουν αρνητική επίδραση στα πλαγκτονικά βακτήρια, τότε η επίδραση θα είναι ορατή πρωτίστως στους ιούς, καθώς οι ιοί είναι ένας βιολογικός παράγοντας που ελέγχει και συχνά υποκινεί κυτταρικές αποκρίσεις των ανώτερων τροφικών επιπέδων. Για να ελεγχθεί η υπόθεση, χρησιμοποιήθηκαν ποσοτικές μέθοδοι (παραγωγή λυτικών και λυσιγονικών κυττάρων) και ποιοτικές μέθοδοι (μετα-γονιδιωματική ανάλυση).

1.2. Εισροή νανοσωματιδίων αργύρου στα θαλάσσια οικοσυστήματα

Τα τεχνητά νανοσωματίδια αργύρου (συνοπτικά ΝΣ αργύρου) έχουν οπτικές, φυσικές και χημικές ιδιότητες οι οποίες τα καθιστούν ιδανικό υλικό για ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, όπως η βιομηχανία τροφίμων, ηλεκτρονικών και καλλυντικών και ιδιαιτέρως η ιατρική. Η διαδεδομένη χρήση των ΝΣ αργύρου στην ιατρική σχετίζεται κυρίως με την αντιμικροβιακή δράση τους που – παρότι δεν έχει πλήρως σκιαγραφηθεί – φαίνεται να οφείλεται 1) στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της επιφάνειας των μικροβίων και των ΝΣ, 2) στην είσοδο ιόντων αργύρου (Ag^+) στο εσωτερικό των κυττάρων και 3) στη βλάβη κύριων λειτουργιών, όπως είναι ο διπλασιασμός και η παραγωγή ενέργειας (Durán et al. 2016). Ως εκ τούτου, η χρήση

των ΝΣ αργύρου έχει λάβει μεγάλη έκταση τα τελευταία χρόνια και η παγκόσμια παραγωγή τους εκτιμάται σε περίπου 500 τόνους ετησίως (Mueller and Nowack 2008). Έτσι, μεγάλες ποσότητες ΝΣ αργύρου καταλήγουν σε ποτάμια, λίμνες, εκβολές ποταμών και παράκτια συστήματα μέσω των αποχετεύσεων αλλά κυρίως των βιομηχανικών αποβλήτων (Liu et al. 2014), προκαλώντας ερωτήματα σχετικά με την πιθανή τοξικότητά τους στην υδρόβια ζωή. Επιπλέον, η ευρέως διαδεδομένη και χωρίς περιορισμούς χρήση των ΝΣ αργύρου πρόσφατα έδωσε το έναυσμα να μελετηθούν οι συνέπειες στη μικροβιακή ανθεκτικότητα απέναντι στα ΝΣ αργύρου (Gunawan et al. 2017). Ταυτόχρονα, επιπρόσθετες περιβαλλοντικές επιπτώσεις αναμένεται να γίνουν ορατές λόγω της συνδυασμένης δράσης των ΝΣ αργύρου και άλλων χημικών ενώσεων που είναι παρούσες στα υδατικά συστήματα (Durán et al. 2016).

Σημαντική ερευνητική προσπάθεια έχει επενδυθεί στη μελέτη της πιθανής τοξικότητας των ΝΣ αργύρου στην υδρόβια ζωή, παρά το γεγονός ότι δεν είναι εφικτή η ακριβής εκτίμηση ούτε της τρέχουσας ούτε της μελλοντικής συγκέντρωσης των ΝΣ αργύρου στο φυσικό περιβάλλον. Οι δυσκολίες της εκτίμησης αυτών των συγκεντρώσεων σχετίζονται με την ανεπάρκεια των μεθόδων για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των ΝΣ αργύρου (Wiesner et al. 2009), αλλά και με το γεγονός ότι η ακριβής κατανομή των ΝΣ αργύρου στα διάφορα προϊόντα και οι ποσότητες που απελευθερώνουν οι βιομηχανίες είναι ελάχιστα γνωστά (Piccinno et al. 2012).

Οι βιολογικές επιπτώσεις της έκθεσης σε ΝΣ αργύρου έχουν ερευνηθεί σε ένα ευρύ φάσμα οργανισμών (Sharma et al., 2014). Πολλές από αυτές τις μελέτες καταδεικνύουν ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των ΝΣ αργύρου και των κυττάρων προκαλεί την απελευθέρωση Ag^+ που συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στην τοξικότητα των ΝΣ αργύρου (Navarro et al. 2008). Παρόλα αυτά, στην πλειονότητα των πειραμάτων, τα Ag^+ δεν «εξηγούν» την συνολική τοξικότητα των ΝΣ αργύρου. Επιπροσθέτως, η αντιμικροβιακή δράση των ΝΣ αργύρου επηρεάζεται και από το μέγεθος των νανοσωματιδίων και κυρίως από τον οργανισμό που μελετάται. Παρά την πληθώρα μελετών, οι μηχανισμοί τοξικότητας δεν είναι ακόμα κατανοητοί (Durán et al. 2016) γιατί οι πειραματικές συνθήκες ποικίλλουν σημαντικά (δηλαδή, οργανισμοί, συγκεντρώσεις ΝΣ αργύρου και αναλυτικές μέθοδοι). Ενδεικτικά, οι αναφερόμενες συνέπειες της έκθεσης των ΝΣ αργύρου στο θαλάσσιο πλαγκτόν ποικίλλουν από μεταβολές της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης (Oukarroum et al. 2012) μέχρι και αλλαγές στη φυσιολογία διατόμων σε καλλιέργειες (Pletikaric et al. 2012) και θνησιμότητα πληθυσμών βακτηρίων σε καλλιέργειες (Dimkra et al. 2011). Οι παραπάνω συνέπειες έχουν καταγραφεί σε πειράματα όπου οι συγκεντρώσεις ΝΣ αργύρου που μελετώνται είναι κατά πολύ υψηλότερες από τις προβλεπόμενες για το μέλλον, δηλαδή στο επίπεδο των $mg Ag L^{-1}$

(Blaser et al. 2008; Gottschalk et al. 2009). Όταν ελέγχονται χίλιες φορές χαμηλότερες συγκεντρώσεις ΝΣ αργύρου, οι επιδράσεις σε φυσικές κοινότητες θαλάσσιου πλαγκτού περιλαμβάνουν αλλαγές σε μεταβολικές οδούς (Radniecki et al. 2011) και την αφθονία και ποικιλότητα βακτηρίων και φυτοπλαγκτού (Das *et al.*, 2012), ακόμα και ανθεκτικότητα ή αντιστάθμιση της έκθεσης μέσα σε λίγες ώρες (Doiron *et al.*, 2012; Baptista *et al.*, 2015). Επίσης, αντίθετα με πειράματα όπου οι συγκεντρώσεις που ελέγχονται είναι υψηλές (και άρα τοξικές), κύτταρα *Escherichia coli* αποκρίθηκαν θετικά σε 2-8 $\mu\text{g L}^{-1}$ ΝΣ αργύρου μέσω ενεργοποίησης μηχανισμών επιδιόρθωσης και τελικά αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης (Xiu et al. 2012a).

Συχνά παρατηρούνται παρόμοια αποτελέσματα όταν κύτταρα εκτίθενται είτε σε ΝΣ αργύρου είτε σε Ag^+ . Ιδιαίτερα συχνές συνέπειες της έκθεσης σε ΝΣ αργύρου ή/και σε Ag^+ είναι η διατάραξη της διαπερατότητας της μεμβράνης με πιθανή αδρανοποίηση ενζύμων που σχετίζονται με τις μεμβράνες (El Badawy et al. 2011). Επιπλέον, μπορεί να σχηματιστούν κοιλότητες (pits) στην επιφάνεια των κυττάρων και οι δομικές αυτές αλλαγές να καταλήξουν στην διείσδυση των ΝΣ αργύρου στο κυτταρόπλασμα. Επακόλουθες αποκρίσεις στο κυτταρικό επίπεδο περιλαμβάνουν τη δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species), παρεμπόδιση του διπλασιασμού του γενετικού υλικού (deoxyribonucleic acid, DNA) και παρεμπόδιση της σύνθεσης τριφωσφορικής αδενosίνης (adenosine triphosphate, ATP) (Durán et al. 2016).

Η τοξικότητα των ΝΣ αργύρου είναι πολυδιάστατη και πλέον θεωρείται ότι εξαρτάται από πολλές παραμέτρους: τον χρόνο έκθεσης, τις φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων [δηλαδή το μέγεθος, την κατανομή μεγέθους, το σχήμα, την επιφάνεια (επικάλυψη και φορτίο)], τον διαλύτη (ιοντική ισχύς, pH, ύπαρξη και ποιότητα οργανικής ύλης, υγρασία και συγκέντρωση οξυγόνου) και τον οργανισμό (Reidy et al. 2013). Για παράδειγμα, τα μικρότερα ΝΣ αργύρου ήταν πιο τοξικά από ό, τι τα μεγαλύτερα σε πολυάριθμες μελέτες λόγω της μεγαλύτερης έκτασης της «ειδικής περιοχής αλληλεπίδρασης» και λόγω των αλληλεπιδράσεων με τις κυτταρικές μεμβράνες που οδηγούν στην ταχύτερη και εντονότερη απελευθέρωση Ag^+ (π.χ. Choi and Hu, 2008; Ivask *et al.*, 2014). Τα συμπεράσματα όμως δίστανται και πολλές μελέτες έχουν αναφέρει ότι το μέγεθος δεν είναι απαραίτητως η κινητήρια δύναμη της τοξικότητας των ΝΣ αργύρου και ότι ενδεχομένως άλλοι παράγοντες έχουν περισσότερη σημασία (El Badawy et al. 2011; Fabrega et al. 2011).

Είναι αξιοσημείωτο ότι η επίδραση ξεχωριστά κάθε μιας από τις προαναφερθείσες παραμέτρους δεν επαρκεί για να γίνει πρόβλεψη της τοξικότητας των ΝΣ αργύρου στους

οργανισμούς. Αυτό περιπλέκει σοβαρά την μελέτη των ΝΣ αργύρου, ειδικότερα αν συνυπολογίσει κανείς ότι τα ΝΣ αργύρου υφίστανται αρκετούς μετασχηματισμούς όταν βρίσκονται στο υδατικό περιβάλλον. Συγκεκριμένα, οι αλληλεπιδράσεις με τα έμβια όντα και ο σχηματισμός συμπλόκων με οργανικές και ανόργανες ενώσεις όπως πρωτεΐνες, θειόλες (οργανικές ενώσεις που περιέχουν την ομάδα -SH), σάκχαρα, φωσφόρο και χλώριο (Bone et al. 2012), είναι συχνό φαινόμενο. Παρομοίως, συνέργειες μεταξύ οργανισμών, η μεταφορά μιας επίπτωσης κατά μήκος του τροφικού πλέγματος, οι μικροβιακές αφθονίες κατά την έναρξη της έκθεσης και φυσικές αλλαγές στις περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. ένταση φωτός) σπάνια αξιολογούνται, αλλά επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη συσσωμάτωση και βιοδιαθεσιμότητα των ΝΣ αργύρου (Reidy et al. 2013). Για παράδειγμα, ο φωτο-μετασχηματισμός των ΝΣ αργύρου και των συμπλόκων ΝΣ αργύρου μπορούν να οδηγήσουν στη διαλυτοποίηση και συσσωμάτωση αυτών των σωματιδίων (Sharma et al., 2014). Ταυτόχρονα με τη διαλυτοποίηση, η συσσωμάτωση μπορεί να συμβεί είτε μεταξύ των ίδιων των ΝΣ αργύρου είτε μεταξύ των ΝΣ αργύρου και άλλων μορίων, πιθανώς οδηγώντας σε καθίζηση και άρα μειωμένη βιο-διαθεσιμότητα των ΝΣ αργύρου.

Προκειμένου να αποφευχθεί συσσωμάτωση μεταξύ των νανοσωματιδίων και συνεπώς να ενισχυθεί η σταθεροποίησή τους σε υδατικά περιβάλλοντα, εφαρμόζονται στερεοχημικοί ή ηλεκτροστατικοί μηχανισμοί. Η παρουσία οργανικής επικάλυψης (coating) γύρω από τον πυρήνα των ΝΣ αργύρου είναι ένας τέτοιος μηχανισμός. Η επικάλυψη συχνά εισάγει φορτίο στην επιφάνεια των ΝΣ αργύρου και συνεπώς μεταβάλλει την αλληλεπίδραση τους με τα κύτταρα. Για παράδειγμα, οι El Badawy et al. (2011) βρήκαν πως και ο ρυθμός διαλυτοποίησης και το μέγεθος καθόρισαν ταυτόχρονα το βαθμό τοξικότητας μεταξύ των ΝΣ αργύρου με επικάλυψη πολυ-βινυλοπυρρολιδόνης (polyvinylpyrrolidone, PVP) και διακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης (branched-polyethylenimine, BPEI). Συγκεκριμένα, οι συγγραφείς παρατήρησαν πως τα ΝΣ αργύρου με επικάλυψη PVP διαλυτοποιήθηκαν με υψηλότερο ρυθμό από ό, τι αυτά με BPEI, αλλά τα μικρότερα μεγέθη ΝΣ αργύρου με επικάλυψη BPEI ήταν τοξικότερα από ό, τι αυτά με PVP (El Badawy et al. 2011).

Ένα μεγάλο μειονέκτημα των μελετών που προ-αναφέρθηκαν είναι πως έχουν πραγματοποιηθεί κυρίως σε «απλά» περιβάλλοντα: για παράδειγμα, σε καλλιέργειες ενός είδους. Ωστόσο, η τοξικότητα των ΝΣ αργύρου διαφοροποιείται έντονα στα διαφορετικά βιολογικά μέσα και υδατικά συστήματα (Kittler et al. 2010). Ένα ενδιαφέρον εύρημα είναι πως σε επίπεδο κοινότητας, η τοξικότητα των ΝΣ αργύρου φαίνεται πως είναι διαφορετική για το κάθε στέλεχος (species-specific). Για παράδειγμα, τα κυανοβακτήρια βρέθηκαν πιο ευαίσθητα από άλλα στελέχη φυτοπλαγκτού, ενώ ορισμένα βακτηριακά είδη έδειξαν

ανθεκτικότητα στην έκθεση σε ΝΣ αργύρου (Das et al. 2014). Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του κυτταρικού τοιχώματος των Gram αρνητικών βακτηρίων (Gram-) έχουν συχνά «ενοχοποιηθεί» ως αιτία της υψηλότερης ευαισθησίας τους (Flores et al. 2013). Κάτι αντίστοιχο έχει προταθεί και για άλλους οργανισμούς, όπως για παράδειγμα το γένος δινομαστιγωτών *Ceratium* (Boenigk et al. 2014) καθώς και είδη φυτοπλαγκτού (Schiavo et al. 2017). Επίσης, είναι άξιο αναφοράς πως η παρουσία οργανικής ύλης στο φυσικό περιβάλλον μπορεί να οδηγήσει στη μειωμένη διαθεσιμότητα των ΝΣ αργύρου ή/και Ag^+ και τελικά στη μείωση της συνολικής τοξικότητας, όπως για παράδειγμα στους Bone et al. (2012).

Παρότι οι οικο-τοξικολογικές αξιολογήσεις παρέχουν σημαντική πληροφορία, πάσχουν από ένα βασικό μειονέκτημα: οι συγκεντρώσεις ΝΣ αργύρου που εξετάζονται είναι τουλάχιστον 10 φορές υψηλότερες από αυτές που αναμένονται για το εγγύς μέλλον στα υδατικά οικοσυστήματα. Συνεπώς, η αξιολόγηση της τοξικότητας των ΝΣ αργύρου στο θαλάσσιο πλαγκτόν παραμένει μη ρεαλιστική, καθώς σχεδόν καμία μελέτη δεν συνδυάζει τις ακόλουθες σχετικές απαιτήσεις: 1) έκθεση και πειραματισμό σε επίπεδο φυσικής κοινότητας, 2) παρακολούθηση των ΝΣ αργύρου στο θαλάσσιο σύστημα γεγονός που σχετίζεται με σημαντικά μεθοδολογικά προβλήματα λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε άλατα και 3) εφαρμογή χαμηλών συγκεντρώσεων ΝΣ αργύρου, οι οποίες προβλέπεται να είναι $<1 \mu\text{g L}^{-1}$ σύμφωνα με αποτελέσματα μοντελοποίησης (McGillicuddy et al., 2017).

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση χαμηλών συγκεντρώσεων ΝΣ αργύρου. Αυτό έγινε εφικτό χάρη στην πρόσφατα αναπτυχθείσα αναλυτική μεθοδολογία που βασίζεται στην έγχυση ροής (flow injection) με αραίωση δείγματος σε απευθείας σύνδεση (on-line dilution) και ανάλυση με επαγωγικώς συζευγμένο πλάσμα με φασματοφωτομετρία μάζας σε μονή κατάσταση σωματιδίων (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry in single particle mode) στο Χημικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Κρήτης (Toncelli et al. 2016, 2017). Σε όλα τα πειράματα της παρούσας διατριβής η έκθεση της φυσικής κοινότητας πλαγκτού ήταν στο εύρος συγκεντρώσεων μεταξύ 200 και 10000 ng Ag L⁻¹. Ο στόχος ήταν μελετηθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ των μικροοργανισμών, του αβιοτικού συστήματος και των χημικών αναλυτών, μια προσέγγιση που αποτελεί πρόκληση στον τομέα της τοξικότητας των ΝΣ αργύρου. Για αυτό το λόγο, εξετάστηκαν ταυτόχρονα οι συγκεντρώσεις των ΝΣ αργύρου και των προϊόντων μετασχηματισμού τους στο θαλασσινό νερό σε άμεση σχέση με τις φυσικοχημικές παραμέτρους του περιβάλλοντος και την σύσταση της μικροβιακής πλαγκτονικής κοινότητας.

1.3. Κλιματική αλλαγή: οξίνιση και υπερθέρμανση των ωκεανών

Ένα μεγάλο εύρος ανθρώπινων δραστηριοτήτων έχει συντελέσει στην αποκαλούμενη «κλιματική αλλαγή» της Γης, που σύμφωνα με τους Cubash et al. (2013) περιλαμβάνει αλλαγές τόσο στην ατμόσφαιρα όσο και στα χερσαία και υδατικά συστήματα. Οι τρεις σημαντικότεροι δείκτες της κλιματικής αλλαγής είναι το αυξανόμενο επίπεδο της στάθμης της θάλασσας, η αυξανόμενη συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) στην ατμόσφαιρα και η απώλεια όγκου πάγων στο Βόρειο Ημισφαίριο.

Πιο συγκεκριμένα, η εκτενής καύση των ορυκτών καυσίμων (πετρέλαιο, φυσικό αέριο και άλλες οργανικές ενώσεις) τα τελευταία 150 χρόνια έχει οδηγήσει στην υψηλή απελευθέρωση CO₂ στην ατμόσφαιρα, που έχει ως αποτέλεσμα τη θέρμανση της ατμόσφαιρας και των ωκεανών. Ο ωκεανός όμως λειτουργεί ως «ρυθμιστής» του κλίματος, καθώς μπορεί να απορροφήσει το 93% της πρόσθετης θερμότητας, όπως έχει υπολογιστεί από τη δεκαετία του 1970 (Gattuso et al. 2015). Από την μία πλευρά, αυτή η ωκεάνια λειτουργία αντισταθμίζει την αύξηση θερμοκρασίας στην ατμόσφαιρα, αλλά οδηγεί επίσης σε αύξηση της θερμοκρασίας των ωκεανών και του επιπέδου της στάθμης της θάλασσας. Συμπερασματικά, αν και οι ωκεανοί παρέχουν μια πολύτιμη λειτουργία και μετριάζουν την υπερθέρμανση του πλανήτη, ταυτόχρονη και αναπόφευκτη συνέπεια είναι η αύξηση της οξύτητας των ωκεανών. Η αύξηση της οξύτητας είναι ταυτόσημη με τη μείωση του pH και συνήθως το φαινόμενο αναφέρεται ως «οξίνιση των ωκεανών». Πράγματι, το pH του θαλασσινού νερού έχει ήδη μειωθεί κατά 0.1 μονάδες από την αρχή της βιομηχανικής δραστηριότητας (Ciais et al. 2014). Σύμφωνα με πρόσφατα «σενάρια» περί μελλοντικών εκπομπών CO₂, επιπλέον μείωση που κυμαίνεται μεταξύ 0.06 και 0.32 μονάδων αναμένεται έως το 2100 (Ciais et al. 2014), ενώ ένα μελλοντικό πιο «όξινο» ωκεάνιο σύστημα θα είναι πιο ευάλωτο σε δευτερογενείς περιβαλλοντικές αλλαγές, π.χ. θερμοκρασία, περιορισμός θρεπτικών και άλλα.

Η μείωση του pH του θαλασσινού νερού έχει μια σειρά συνεπειών στη χημεία των ωκεανών. Συγκεκριμένα, οδηγεί σε μείωση της συγκέντρωσης των ανθρακικών ιόντων (CO₃²⁻) που είναι ένα από τα δομικά στοιχεία του ανθρακικού ασβεστίου (CaCO₃) και μεταβάλλει την ικανότητα πολλών οργανισμών να χρησιμοποιούν την ένωση αυτή (π.χ. Kroeker et al., 2013). Επιπλέον, η μείωση του pH του θαλασσινού νερού οδηγεί σε αύξηση του διαλελυμένου CO₂ και του όξινου ανθρακικού ιόντος (HCO₃⁻). Συνυπολογίζοντας πως η δέσμευση άνθρακα από τους θαλάσσιους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς ευθύνεται για περίπου 50% της παγκόσμιας πρωτογενούς παραγωγής (Field et al. 1998) και πως ένα μέρος

της παραγόμενης οργανικής ύλης στα επιφανειακά νερά μεταφέρεται στα βαθιά νερά μέσω της κρίσιμης λειτουργίας της βιολογικής αντλίας, είναι κατανοητό πως οποιαδήποτε τροποποίηση της φυσιολογικής λειτουργίας των ωκεανών μπορεί να επηρεάσει εκ νέου το ατμοσφαιρικό CO₂ και συνεπώς το κλίμα της Γης (Riebesell et al. 2007).

Η μείωση του pH έχει μελετηθεί σε σχέση με τη φυσιολογία αρκετών θαλάσσιων ειδών (Kroeker et al. 2013), αποδεικνύοντας πως υπάρχουν σημαντικές συνέπειες. Στις μέρες μας γίνονται προσπάθειες να προβλεφθούν οι αποκρίσεις των οργανισμών (Beardall et al. 2009) και ιδιαίτερα των πρωτογενών παραγωγών με ειδικότερη εστίαση στη δέσμευση του άνθρακα. Το CO₂ χρησιμοποιείται στη φωτοσυνθετική δέσμευση του άνθρακα και είναι το υπόστρωμα για το ένζυμο RubisCO που καταλύει αυτή την αντίδραση. Μιας και το ένζυμο έχει χαμηλή συγγένεια για το CO₂, θεωρητικά δεν είναι κορεσμένο στα τρέχοντα επίπεδα CO₂ (Badger et al. 1998). Ωστόσο, σχεδόν όλα τα θαλάσσια είδη έχουν αναπτύξει εναλλακτικούς μηχανισμούς δέσμευσης άνθρακα ώστε να αντισταθμίσουν τη χαμηλή τωρινή διαθεσιμότητα CO₂, π.χ. μέσω της ενεργειακά δαπανηρής χρήσης του ενζύμου της ανθρακικής ανυδράσης (Raven and Beardall 2014). Λόγω της μεγάλης διαφοράς αυτών των μηχανισμών μεταξύ ειδών ή ακόμα και στελεχών ειδών (Tortell 2000; Young and Morel 2015), οι προβλέψεις για το εάν το ποσοστό δέσμευσης άνθρακα ενός κυττάρου θα αλλάξει με άμεσο τρόπο στις αλλαγές της διαθεσιμότητας του CO₂ είναι περίπλοκες. Ένα επιπλέον πρόβλημα είναι πως ενώ έχει παρατηρηθεί μείωση της χρήσης ενεργειακά δαπανηρών μηχανισμών υπό συνθήκες αυξημένου CO₂, η σημασία αυτής της μεταβολής στη φυσιολογία και ανάπτυξη ενός κυττάρου δεν είναι καλά μελετημένη.

Δεν υπάρχουν όμως δυσκολίες μόνο λόγω ποικιλίας των μηχανισμών δέσμευσης άνθρακα στα διαφορετικά είδη. Μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ των ερευνών δημιουργούνται επειδή οι πειραματικές και περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. θερμοκρασία, φωτεινότητα και θρεπτικά στοιχεία λόγω εποχής ή συστήματος) διαφέρουν από μελέτη σε μελέτη. Για παράδειγμα, η ανάπτυξη του φυτοπλαγκτού δεν εξαρτάται μόνο από τη διαθεσιμότητα του άνθρακα, αλλά από ένα συνδυασμό φυσικο-χημικών και βιολογικών διεργασιών που παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο, π.χ. οι αβιοτικές παράμετροι στην παραπάνω παρένθεση, ο ανταγωνισμός μεταξύ των ειδών και η θήρευση. Επιπλέον, η σύσταση της μικροβιακής κοινότητας (λειτουργική, μορφολογική και ταξινομική) καθορίζει την αντίδραση σε μια πειραματική μείωση του pH (Dutkiewicz et al. 2015), ακόμα και εντός του φυτοπλαγκτού (π.χ. αναλογία σε διάτομα, pico- και nano- ευκαρυωτικά κύτταρα) (Eggers et al. 2014). Για τους παραπάνω λόγους, όταν μελετάται το σύνολο της πλαγκτονικής κοινότητας (δηλαδή όχι

μεμονωμένα είδη) και γίνεται σύγκριση διαφορετικών οικοσυστημάτων τα αποτελέσματα παρέχουν περισσότερες πληροφορίες (Tarling et al. 2016).

Πράγματι, τα τελευταία χρόνια, το φαινόμενο της οξίνισης των ωκεανών μελετήθηκε σε διάφορα θαλάσσια οικοσυστήματα χρησιμοποιώντας διαφορετικές προσεγγίσεις (είτε μικρές επώσεις σε μπουκάλια είτε μεγάλης κλίμακας πειράματα μεσοκόσμων, με χρονική διάρκεια ημερών έως εβδομάδων). Έτσι, έχει αποδειχτεί πως ο εμπλουτισμός με CO₂ φαίνεται να ευνοεί την ανάπτυξη μεγάλων κυττάρων, π.χ. τα διάτομα (Tortell et al. 2002, 2008; Feng et al. 2009), ενώ αρκετά πειράματα έδειξαν θετική επίδραση και σε μικρότερα κύτταρα [picoφυτοπλαγκτόν, Paulino et al. (2007); Newbold et al. (2012); Schulz et al. (2013)]. Οι Richier et al. (2014) ανέφεραν σημαντική μείωση της ανάπτυξης μικρών κυττάρων φυτοπλαγκτού (<10 μm) υποδηλώνοντας πως τα μικρά κύτταρα είναι λιγότερο προσαρμοσμένα στις μεταβολές του pH, ενώ τα μεγαλύτερα κύτταρα πιθανότατα μπορούν να αντιμετωπίσουν επιτυχώς μεγαλύτερες και συχνότερες μεταβολές του pH (Flynn et al. 2012).

Όσον αφορά τα ετερότροφα βακτήρια, οι Grossart et al. (2006) παρατήρησαν πως η αλλαγή του pH προκάλεσε αλλαγές στην εξωκυτταρική ενζυμική δραστηριότητα των βακτηρίων (συγκεκριμένα, αύξηση της δράσης της πρωτεάσης και α- και β-γλυκοσιδάσης). Οι εν λόγω συγγραφείς απέδωσαν τις αλλαγές αυτές σε έμμεσα γεγονότα μετά την αλλαγή στην παραγωγή οργανικού υλικού από το φυτοπλαγκτόν. Πρωτεολυτικές δράσεις βρέθηκαν ενισχυμένες, ανεπηρέαστες ή υπό αναστολή σε συνθήκες αυξημένης μερικής πίεσης του CO₂ (pCO₂), παρόμοια με τη δράση της λιπάσης, αλκαλικής φωσφατάσης και χιτινάσης, ενώ η αποδόμηση πολυσακχαριτών ενισχύθηκε από την οξίνιση, αλλά αυτό το αποτέλεσμα σχετίστηκε επίσης με το φυτοπλαγκτόν [αναφορές στους Cellusi et al. (2015)]. Ακόμα πιο πρόσφατα, οι Bunse et al. (2016) διερεύνησαν τις επιπτώσεις της οξίνισης κατά 0.2 μονάδες στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο και παρατήρησαν πως δεν υπήρξαν μεταβολές στη φυσιολογία, αφθονία και παραγωγικότητα των κυττάρων, αλλά υπήρξαν διαφορές στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων.

Συμπερασματικά, έχοντας υπόψη τη στενή σχέση αυτότροφων και ετερότροφων βακτηρίων, φαίνεται πως η τεχνητή μείωση του pH προκαλεί αυξημένη παραγωγή οργανικής ύλης και αυτή με τη σειρά της προκαλεί αυξημένη ετερότροφη παραγωγή και ανάπτυξη (Grossart et al., 2006). Ωστόσο, μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί αποτελέσματα που δεν συμφωνούν πάντα με αυτή τη θεώρηση. Για παράδειγμα, στο πείραμα των Motegi et al. (2013) αναφέρθηκε μείωση της πρόσληψης θυμιδίνης από τα ετερότροφα βακτήρια σε διαφορετικά επίπεδα pCO₂ μετά από εμπλουτισμό με θρεπτικά στοιχεία, υποδεικνύοντας ότι

άλλες παράμετροι εκτός από το CO₂ έπαιξαν σημαντικότερο ρόλο. Επιπλέον, η απόκριση των ιών στην οξίνιση των ωκεανών δεν έχει μελετηθεί εκτός από ελάχιστες εξαιρέσεις: πιο συγκεκριμένα, οι Rochelle-Newall *et al.* (2004) δε βρήκαν διαφορά στις ικές αφθονίες, ενώ οι Larsen *et al.* (2008) και Brussaard *et al.* (2013) εντόπισαν μεμονωμένες επιπτώσεις σε ιούς που προσβάλλουν φυτοπλαγκτόν.

Σε θεωρητικό επίπεδο, η ενισχυμένη βακτηριακή παραγωγικότητα και ική προσβολή μπορεί να μειώσουν την αποτελεσματικότητα της βιολογικής αντλίας του άνθρακα και την μεταφορά άνθρακα σε ανώτερα τροφικά επίπεδα (Suttle 2007). Από την άλλη πλευρά όμως, το αντίθετο αποτέλεσμα μπορεί να προκύψει λόγω έντονης συσσώματωσης οργανισμών και οργανικού υλικού και τελικά να υπάρξει έντονη καθίζηση (Brussaard *et al.* 2008). Όπως φαίνεται λοιπόν, οι παράλληλες δράσεις της ικής προσβολής και της οξίνισης των ωκεανών πιθανόν να έχουν διττές συνέπειες. Είναι χαρακτηριστικό πως σε συνθήκες αυξημένης συγκέντρωσης CO₂ παρατηρήθηκε επίσης αυξημένη παραγωγή διαφανών εξωπολυμερικών σωματιδίων (transparent exopolymer particles, TEP) (Engel 2002). Τα TEP σχηματίζονται από το φυτοπλαγκτόν, είναι σημαντικός παράγοντας συσσώματωσης της ύλης, ενώ είναι περισσότερο εμπλουτισμένα σε άνθρακα σε αναλογία με άζωτο και φωσφόρο. Συνεπώς, μια άλλη όψη του νομίσματος είναι πως η παραγωγή TEP μπορεί να μεταβάλει τον μεταβολικό ρυθμό των βακτηρίων και άρα και τους κύκλους ζωής των ιών σε συνθήκες οξίνισης (Danovaro *et al.* 2011), με συνέπειες στη ροή ενέργειας και θρεπτικών στους ωκεανούς.

Μεταξύ άλλων, οι Halpern *et al.* (2008, 2015) ανέφεραν πως οι ανθρωπογενείς περιβαλλοντικές πιέσεις έχουν την τάση να μην εμφανίζονται μία κάθε φορά. Συγκεκριμένα, η οξίνιση των ωκεανών έχει συσχετιστεί με την αυξημένη θερμοκρασία της ατμόσφαιρας και της επιφάνειας των ωκεανών και μάλιστα υπολογίζεται πως η επιφανειακή θερμοκρασία στη θάλασσα θα αυξηθεί μεταξύ 1.8 και 4.0 °C έως το 2100 (Solomon *et al.*, 2007). Το φαινόμενο της υπερθέρμανσης άρχισε να μελετάται νωρίτερα από ό, τι το φαινόμενο της οξίνισης και ως αποτέλεσμα υπάρχει πληθώρα αποτελεσμάτων που αποδεικνύουν σημαντικές επιπτώσεις στη σύσταση, λειτουργία και ακόμα την παραγωγή άνθρακα στα υδατικά συστήματα (Mousing *et al.* 2014). Μια συχνή παρατήρηση είναι πως η βακτηριακή παραγωγικότητα ευνοείται από την αύξηση της θερμοκρασίας (Endres *et al.* 2014), ενώ το μέγεθος των βακτηρίων πιθανόν να μειώνεται (Rasconi *et al.* 2015). Η ταυτόχρονη δράση των δύο φαινομένων όμως (οξίνιση και υπερθέρμανση των ωκεανών) έχει μελετηθεί ελάχιστα και δεν είναι κατανοητό ακόμα αν προκαλεί συνέργειες ή όχι. Σε μια από τις λίγες συνδυαστικές μελέτες βρέθηκε πως ο ρυθμός ανάπτυξης των *Synechococcus* αυξήθηκε εξαιτίας της ταυτόχρονης δράσης των πιέσεων, ενώ ο ρυθμός ανάπτυξης των *Prochlorococcus* είχε την αντίθετη απόκριση (Fu *et al.* 2007).

Επιπλέον, αλλαγές στην σύνθεση της βακτηριακής κοινότητας παρατηρήθηκαν από τους Lindh *et al.* (2013) και αυξημένη βιομάζα φυτοπλαγκτού από τους Sommer *et al.* (2015). Η συνδυαστική δράση έχει μελετηθεί στο βένθος σε γονιδιακό επίπεδο και τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι δύο μεταβολές είχαν διαφορετική απόκριση σε κρίσιμα μονοπάτια του κύκλου του αζώτου (Currie *et al.* 2017).

Φαίνεται ότι η υπερθέρμανση και η οξίνιση τροποποιούν τους ωκεάνιους βιογεωχημικούς κύκλους (Hutchins and Fu 2017), όμως δεν είναι γνωστό αν υπάρχει καθολική απόκριση μεταξύ των θαλάσσιων οικοσυστημάτων. Τα περισσότερα πρόσφατα πειράματα οξίνισης έχουν πραγματοποιηθεί σε περιοχές με υψηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών στοιχείων (ή έχει γίνει τεχνητός εμπλουτισμός με θρεπτικά κατά τη διάρκεια της επώασης), ενώ περιοχές με χαμηλές συγκεντρώσεις νιτρικών και φωσφορικών ιόντων είναι ελάχιστα μελετημένες (Sunagawa *et al.* 2015) μολονότι αντιπροσωπεύουν μεγάλο μέρος των ωκεανών και αναμένεται ότι η θερμική στρωματοποίηση και η εξάντληση των θρεπτικών θα τις επηρεάσει περισσότερο από ό, τι άλλες (Polovina *et al.* 2008). Πράγματι, το συμπέρασμα τριών πρόσφατων πειραμάτων μεσοκόσμων ήταν πως η απόκριση σε μια πιθανή μελλοντική αύξηση του CO₂ θα είναι πιο έντονη σε κοινότητες με χαμηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών από ό, τι είχε αρχικά εκτιμηθεί (Paul *et al.* 2015; Bunse *et al.* 2016; Bach *et al.* 2017).

Η Μεσόγειος Θάλασσα χαρακτηρίζεται από oligοτροφικές συνθήκες (Krom *et al.* 1991) και συνεπώς είναι ένα ιδανικό περιβάλλον για την μελέτη της επίδρασης του φαινομένου της οξίνισης στους ωκεανούς. Στην παρούσα μελέτη διεξήχθησαν δύο ανεξάρτητα πειράματα μεσοκόσμων προκειμένου να διερευνηθεί 1) η επίδραση της οξίνισης των ωκεανών στους κύκλους ζωής των ιών σε ένα μεσοτροφικό σύστημα και 2) η επίδραση της ταυτόχρονης οξίνισης και υπερθέρμανσης των ωκεανών στη βακτηριακή ποικιλότητα σε ένα oligοτροφικό σύστημα. Στο πρώτο πείραμα εκτιμήθηκε η συχνότητα του λυτικού έναντι του λυσιγονικού κύκλου ζωής των ιών μετά από τεχνητή μείωση του pH κατά ~ 0.3 μονάδες. Ο στόχος ήταν να εκτιμηθεί για πρώτη φορά ο ρυθμός παραγωγής των ιών υπό συνθήκες οξίνισης, ώστε μετέπειτα να γίνει οικολογική συσχέτιση με τον κύκλο του άνθρακα. Στο δεύτερο πείραμα περιγράφηκε η σύσταση της βακτηριακής ποικιλότητας ως απόκριση σε μια τεχνητή μείωση του pH κατά ~ 0.3 μονάδες και ταυτόχρονη αύξηση της θερμοκρασίας κατά ~ 3 °C. Ο στόχος ήταν να περιγραφούν οι ιδιαίτερες επιδράσεις των ταυτόχρονων αλλαγών σε δύο τάξεις μεγέθους βακτηρίων («μικρά» και «μεγάλα» βακτήρια) σε ένα σύστημα με χαμηλή συγκέντρωση θρεπτικών.

1.4. Εισροή αερολυμάτων από την έρημο της Σαχάρας και την Ευρώπη στην Μεσόγειο Θάλασσα

Η Μεσόγειος Θάλασσα χαρακτηρίζεται ως ένα από τα πιο ολιγοτροφικά ωκεάνια συστήματα, γεγονός που εκφράζεται, μεταξύ άλλων, και στις εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών στοιχείων στα επιφανειακά στρώματα της λεκάνης (Krom et al. 1991). Επιπλέον, η Μεσόγειος θάλασσα χαρακτηρίζεται από γρήγορο ρυθμό χρήσης των φωσφορικών ιόντων (phosphate turnover time) και ως «περιβάλλον με χαμηλή συγκέντρωση φωσφόρου και χαμηλή συγκέντρωση χλωροφύλλης» ή Low Phosphorus Low Chlorophyll (LPLC) (Moutin et al. 2008). Επίσης, σημαντικό χαρακτηριστικό της λεκάνης είναι η διαβάθμιση στην ένταση των ολιγοτροφικών συνθηκών και συγκεκριμένα η αυξητική τάση ολιγοτροφισμού από τη Δύση προς την Ανατολή (Moutin and Raimbault 2002). Ως επακόλουθο, στην Ανατολική Μεσόγειο παρατηρούνται πολύ χαμηλές τιμές πρωτογενούς παραγωγικότητας, βιομάζας φυτοπλαγκτού και χλωροφύλλης (Moutin and Raimbault 2002; Pulido-Villena et al. 2010). Ειδικότερα το καλοκαίρι που η στήλη του νερού είναι στρωματοποιημένη και το θερμοκλινές απότομο στα ~ 10-20 μέτρα βάθος, τα θρεπτικά στοιχεία στα επιφανειακά νερά της Ανατολικής Μεσογείου εξαντλούνται και συχνά οι συγκεντρώσεις φωσφόρου είναι στο επίπεδο των nM. Σε αυτήν την περίοδο, ο φωσφόρος και το άζωτο λειτουργούν ως περιοριστικοί παράγοντες για την ανάπτυξη του μικροβιακού πλαγκτού (Thingstad et al., 2005; Zohary et al., 2005; Tsiola et al., 2016), ενώ τον χειμώνα έχει αναφερθεί κυρίως περιορισμός λόγω των χαμηλών συγκεντρώσεων φωσφόρου (Krom et al. 1991).

Η υψηλή συχνότητα και η ιδιαίτερη χημική σύσταση των ατμοσφαιρικών εναποθέσεων αερολυμάτων από την έρημο της Σαχάρας καθώς και από την νότια Ευρώπη έχουν ως αποτέλεσμα την μετρίαση του φαινομένου του ολιγοτροφισμού στην Ανατολική Μεσόγειο, ιδιαίτερα κατά την καλοκαιρινή περίοδο. Αυτό συμβαίνει γιατί η εισροή αερολυμάτων (σκόνης) στο θαλάσσιο οικοσύστημα, είτε φυσικής είτε ανθρωπογενούς προέλευσης, καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την ποσότητα των βιο-διαθέσιμων θρεπτικών (κυρίως φωσφόρου, αζώτου και σιδήρου, Ternon et al. (2011) και συνεπώς υποστηρίζει την παραγωγικότητα των πλαγκτονικών κοινοτήτων (Volpe et al. 2009). Συγκεκριμένα, η εναπόθεση σκόνης ευθύνεται για το μεγαλύτερο ποσοστό εισροής ανόργανων θρεπτικών σε διάφορες περιοχές της Μεσογείου (Guerzoni et al. 1999), ενώ είναι αξιοσημείωτη η μεγάλη ποσοτική συνεισφορά της σκόνης από την έρημο της Σαχάρας (55%) στις παγκόσμιες ατμοσφαιρικές εναποθέσεις (Ginoux et al. 2012).

Η πιο έντονη εισροή σκόνης από τη Σαχάρα παρατηρείται στην Ανατολική Μεσόγειο λόγω της εγγύτητας των δύο περιοχών, συχνά μάλιστα με τη μορφή καταιγίδων την άνοιξη και το φθινόπωρο. Ανόργανα θρεπτικά στοιχεία εκρέουν (leach) από τα σωματίδια της σκόνης που εναποτίθενται στο θαλάσσιο περιβάλλον (Carbo et al. 2005; Herut et al. 2005). Εκτός των φυσικών, η Ανατολική Μεσόγειος εκτίθεται επίσης και σε πιο ρυπασμένα αερολύματα που η χημική τους σύσταση διαμορφώνεται από οικιακές και βιομηχανικές δραστηριότητες (Lelieveld et al. 2002). Αυτά τα ρυπασμένα αερολύματα έχουν συνήθως υψηλότερη περιεκτικότητα σε νιτρικά από ό, τι σε φωσφορικά ιόντα συγκριτικά με τη σκόνη από τη Σαχάρα (Bonnet et al. 2005). Αυτό συμβαίνει καθώς τα πρώτα περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις NO_x και NH_3 ενώσεων από τη βιομηχανική δραστηριότητα, την καύση ορυκτών και την εκτενή χρήση αυτοκινήτων. Μάλιστα, η βασική μελέτη των Guieu *et al.* (2002) έδειξε πως ένα τυπικό φαινόμενο υγρής εναπόθεσης σκόνης στη Μεσόγειο (δηλαδή μέσω της βροχής) περιέχει ρυπασμένα αερολύματα. Σε κάθε περίπτωση, η σκόνη και των δύο περιοχών είναι σημαντική πηγή φωσφόρου είτε σε μορφή άμεσα διαθέσιμων φωσφορικών ιόντων είτε σε μορφή απατίτη (Mahowald et al. 2008). Υπό συγκεκριμένες συνθήκες, διάφορες χημικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στην ατμόσφαιρα, όπως η οξίνιση και η αντίδραση με τους ρύπους NO_x και SO_x εν τέλει μετατρέπουν και τον απατίτη σε βιοδιαθέσιμες μορφές φωσφόρου (Shi et al. 2015). Επίσης, η σκόνη είναι σημαντική πηγή αζώτου και σε οργανική μορφή (Markaki et al. 2010).

Οι μελέτες που έγιναν στην περιοχή της Μεσογείου τα τελευταία χρόνια έδειξαν ότι τα βακτήρια ανταποκρίνονται άμεσα στα επεισόδια εναπόθεσης σκόνης και επιδεικνύουν αυξημένους ρυθμούς ανάπτυξης (Herut et al. 2005; Guieu et al. 2014a). Συγκεκριμένα, αύξηση της πρωτογενούς παραγωγικότητας παρατηρήθηκε από τη Δύση ως την Ανατολή της Μεσογείου είτε εν μέσω φυσικών επεισοδίων εναπόθεσης σκόνης από τη Σαχάρα (Ternon et al. 2011) ή σε πειράματα μικροκόσμων και μεσοκόσμων όπου προστέθηκε τεχνητά σκόνη (Ridame and Guieu 2002; Herut et al. 2005; Lekunberri et al. 2010). Ο μεταβολικός ρυθμός των ετερότροφων βακτηρίων επίσης αυξήθηκε κατά τη διάρκεια ενός πειράματος μεσοκόσμων όπου προστέθηκε σκόνη (Pulido-Villena et al. 2014). Στην τελευταία μελέτη, ο φωσφόρος που απελευθερώθηκε από τη σκόνη ήταν ένας από τους πιο καθοριστικούς αβιοτικούς παράγοντες της βακτηριακής παραγωγικότητας και ποικιλότητας (Laghdass et al. 2011; Pulido-Villena et al. 2014). Οι αλλαγές στις χημικές και βιολογικές παραμέτρους του συστήματος μετά από εναπόθεση σκόνης έχουν εκτιμηθεί ακόμα και με μοντελοποίηση. Για παράδειγμα, οι Christodoulaki *et al.* (2013) εκτίμησαν ότι η σκόνη επηρέασε τον λόγο ανόργανου αζώτου προς ανόργανο φωσφόρο, καθώς επίσης και τη φυτοπλαγκτονική και βακτηριακή βιομάζα με μέγιστη επίδραση το καλοκαίρι.

Συνολικά, η αντίδραση της πλαγκτονικής κοινότητας στην προσθήκη σκόνης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διαλυτότητα και τη στοιχειακή σύνθεση των αερολυμάτων. Έτσι, η σκόνη Ευρωπαϊκής προέλευσης πιθανόν να έχει αρνητική επίδραση στην παραγωγικότητα του οικοσυστήματος, μιας και περιέχει τοξικές ουσίες σε υψηλές συγκεντρώσεις, κάποιες εποχές του χρόνου (Gallissai et al. 2014). Μια τέτοια τοξική ουσία είναι ο χαλκός, ο οποίος εμπλέκεται στην πρόσληψη άλλων σημαντικών ιχνοστοιχείων και τελικά εμποδίζει φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες κατά την εναπόθεσή του (Paytan et al. 2009). Σκόνη Ευρωπαϊκής προέλευσης μπορεί να περιέχει επίσης και άλλα μέταλλα όπως σίδηρο, κάδμιο και ψευδάργυρο (Paytan et al. 2009). Η ιδιαίτερη συμπεριφορά του σιδήρου ξεχώρισε σε ένα πείραμα μεσοκόσμων· συγκεκριμένα, ο σίδηρος που μεταφερόταν μέσω των σωματιδίων της σκόνης τελικά οδήγησε σε πολύ αυξημένο ρυθμό απομάκρυνσης του ολικού σιδήρου από τη στήλη του νερού («sink of iron», Wagener et al., 2010). Ο βαθμός των ολιγοτροφικών συνθηκών του συστήματος όπου εναποτίθεται η σκόνη φαίνεται πως επίσης διαμορφώνει σε μεγάλο βαθμό την αντίδραση της κοινότητας (Marañón et al. 2010). Παρότι ο βαθμός ολιγοτροφισμού δεν συνδέεται πάντα γραμμικά με την ένταση των εναποθέσεων σκόνης, φάνηκε να παίζει κυρίαρχο ρόλο στον ανταγωνισμό μεταξύ των ειδών της κοινότητας και άρα στην τελική σύνθεσή της μετά την εναπόθεση (Marañón et al., 2010).

Υπό το πρίσμα της κλιματικής αλλαγής, η μελέτη του φαινομένου της εναπόθεσης αερολυμάτων στην Μεσόγειο θεωρείται κρίσιμη. Η υπερθέρμανση της ατμόσφαιρας θεωρητικά θα οδηγήσει σε πιο εκτεταμένη περίοδο στρωμάτωσης της στήλης του νερού, γεγονός που θα αυξήσει τον βαθμό των ολιγοτροφικών συνθηκών της λεκάνης (Ternon et al. 2011). Συνεπώς, τα φαινόμενα εναπόθεσης σκόνης στα επιφανειακά στρώματα θα έχουν ιδιαίτερο ρόλο στην παραγωγικότητα του μικροβιακού πλαγκτού και άρα στον κύκλο του άνθρακα και τη ροή ενέργειας στο οικοσύστημα συνολικά.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η απόκριση της βακτηριακής και ιικής κοινότητας στην εναπόθεση αερολυμάτων διαφορετικής προέλευσης. Στη πρώτη περίπτωση η σκόνη είχε προέλευση από την έρημο της Σαχάρας και στην δεύτερη από την Ευρώπη. Έγινε εκτίμηση του λυτικού έναντι του λυσιγονικού κύκλου ζωής των ιών και μετέπειτα εκτίμηση του ποσοστού απώλειας βακτηριακής βιομάζας λόγω της ιικής λύσης. Η προσθήκη των δύο ειδών σκόνης έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε να προσομοιάζει με ρεαλιστικό τρόπο επεισόδια εναπόθεσης σκόνης στην Ανατολική Μεσόγειο. Ο στόχος ήταν να ελεγχθεί αν τα δύο είδη σκόνης θα ευνοήσουν την παραγωγικότητα των βακτηρίων με τον ίδιο τρόπο, δεδομένου ότι είχαν διαφορετική σύσταση θρεπτικών στοιχείων. Επιπλέον, στόχος ήταν να ελεγχθεί αν η

αύξηση ή μείωση της βακτηριακής παραγωγικότητας θα έχει άμεση απόκριση στους κύκλους ζωής των ιών.

1.5. Ανθρωπογενείς περιβαλλοντικές πιέσεις σε παράκτια θαλάσσια οικοσυστήματα

Τα παράκτια θαλάσσια οικοσυστήματα είναι παραγωγικά συστήματα που παρέχουν αγαθά και υπηρεσίες με μεγάλο κοινωνικό και οικονομικό αποτύπωμα. Παρόλα αυτά, συχνά βρίσκονται υπό την έντονη πίεση ενός ευρέος φάσματος ανθρωπογενών δραστηριοτήτων (Nogales et al. 2011) οι οποίες προκαλούν μεταβολές στις προσφερόμενες υπηρεσίες των οικοσυστημάτων. Εκτενείς μελέτες σχετικά με την επίδραση των ανθρώπινων δραστηριοτήτων στους ωκεανούς διενεργούνται εδώ και πολλά χρόνια και συνεχώς εξελίσσονται. Παρόλα αυτά, υπάρχουν ακόμα αβεβαιότητες σχετικά με το 1) ποιές πιέσεις είναι υπεύθυνες για τις παρατηρούμενες αλλαγές, 2) ποιές περιοχές υφίστανται μεγαλύτερη πίεση και 3) ποιες είναι οι διαδραστικές συνέπειες των πιέσεων αυτών (Halpern et al. 2015).

Σύμφωνα με τους Halpern *et al.* (2008), οι περισσότερες δραστηριότητες συχνά συνυπάρχουν σε ένα χώρο, γεγονός που καθιστά τη μελέτη τους περίπλοκη. Επιπλέον, οι επιπτώσεις των δραστηριοτήτων σχετίζονται με την ένταση και συχνότητα της πίεσης, που μπορεί να μεταβάλλονται στο χώρο και χρόνο (Nogales et al. 2011), με τη μεταβλητότητα των ίδιων των κοινοτήτων στο χώρο και χρόνο (Fortunato et al. 2012) καθώς και με άλλες πιο σταθερές παραμέτρους, όπως η υδρολογία του παράκτιου συστήματος. Στην πιο πρόσφατη και εκτενή μελέτη των Halpern *et al.* (2015) συνοψίστηκαν οι αλλαγές στην ένταση των διαφορετικών πιέσεων στο χρόνο, παγκοσμίως. Σε ελάχιστες περιοχές παρατηρήθηκε μείωση της συνολικής πίεσης, για παράδειγμα στον Βορειοανατολικό και Κεντρικό Ειρηνικό και στον Ανατολικό Ατλαντικό ωκεανό. Οι περισσότερες περιοχές που υπέστησαν αύξηση της συνολικής ανθρωπογενούς πίεσης βρίσκονταν στην τροπική, υποτροπική και παράκτια ζώνη και ήταν ενδιαφέρον πως δεν σχετίστηκαν άμεσα με τον ανθρώπινο πληθυσμό, παρότι τα πολυπληθέστερα συστήματα υπέστησαν την πιο έντονη αύξηση πιέσεων μεταξύ 2008 και 2013 (Halpern et al. 2015). Δύο ακόμα ιδιαίτερα στοιχεία που παρουσιάζει η ίδια μελέτη είναι πως οι παράνομες (π.χ. παράνομη αλιεία) και αρκετές άλλες δραστηριότητες (π.χ. θαλάσσια πάρκα, υποθαλάσσια έργα, εξόρυξη και απόρριψη στερεών αποβλήτων) δεν έχουν συμπεριληφθεί στην μελέτη λόγω έλλειψης δεδομένων, παρόλο που παίζουν σπουδαίο ρόλο (Halpern et al. 2015).

Συγκεκριμένα στον Ελλαδικό παράκτιο χώρο, ο άνθρωπος δραστηριοποιείται ποικιλοτρόπως, κυρίως με βιομηχανικές, τουριστικές, γεωργικές, υδατοκαλλιέργειες και άλλες θαλάσσιες δραστηριότητες (όπως είναι η βυθοκόρηση και οι λιμενικές δράσεις), ενώ επιπλέον διευρύνεται διαρκώς και η αστικοποίηση στην παράκτια ζώνη (Pavlidou et al. 2015). Όλα τα παραπάνω μπορούν δυνητικά να επηρεάσουν τη δομή και λειτουργία των θαλάσσιων πλαγκτονικών κοινοτήτων, δεδομένου ότι παρουσιάζουν τον υψηλότερο δείκτη «απειλής» σε παγκόσμιο επίπεδο (Crain et al. 2008). Οι περιβαλλοντικές πιέσεις δεν έχουν μόνο άμεσο τρόπο δράσης, αλλά και έμμεσο. Για παράδειγμα, οι χερσαίες δραστηριότητες οδηγούν στην απορροή θρεπτικών στοιχείων και ρυπογόνων ουσιών στα παράκτια συστήματα, ενώ πιο άμεσοι τρόποι πίεσης όπως η εξόρυξη ορυκτών πόρων και η απόρριψη των αποβλήτων αυτής της διαδικασίας είναι συχνοί. Επίσης, η άμεση απελευθέρωση λυμάτων από μονάδες επεξεργασίας χωρίς να περιλαμβάνουν στάδιο απολύμανσης (π.χ. UV ακτινοβολία) σε ποτάμια και παραπόταμους που συχνά παραβλέπονται στις μελέτες είναι ένας άλλος τρόπος άμεσης δράσης της πίεσης (Kirschner et al. 2017). Και στις δύο περιπτώσεις, τα φυσικά ενδιαίτηματα μπορεί να αλλοιωθούν ή υποβαθμιστούν και η σύσταση των κοινοτήτων να αλλάξει σημαντικά.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας ανέφερε πως το 4% των συνολικών θανάτων και περίπου το 6% των ασθενειών σε παγκόσμιο επίπεδο οφείλονταν στην κακή ποιότητα νερού και την έλλειψη υγιεινής και, πιο συγκεκριμένα, στην απελευθέρωση περιττωμάτων στο θαλάσσιο περιβάλλον που μπορούν να μεταδώσουν ασθένειες (Savichtcheva and Okabe 2006). Πράγματι, παράκτια οικοσυστήματα που βρίσκονται κοντά σε μεγάλα αστικά κέντρα δέχονται συχνά μεγάλες ποσότητες λυμάτων και άλλων χημικών ενώσεων, όπως είναι τα παρασιτοκτόνα, οι ορμόνες και τα αντιβιοτικά, κυρίως λόγω της εγγύτητάς τους με κέντρα υγείας (κλινικές, κτηνιατρεία κ.ά.). Ειδικότερα τα αντιβιοτικά προέρχονται από την επεξεργασία και απόρριψη αστικών και αγροτοκτηνοτροφικών λυμάτων καθώς και τις υδατοκαλλιέργειες (Ding and He 2010) και η χρήση τους έχει γίνει ανεξέλεγκτη τα τελευταία χρόνια. Το πρόβλημα έγκειται στο γεγονός πως παθογόνα βακτήρια μπορούν να αποκτήσουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά λόγω των απορρίψεων (Martinez 2008) και αυτό έχει παρατηρηθεί κοντά σε υδατοκαλλιέργειες (στη στήλη του νερού, το ίζημα, το εσωτερικό των ψαριών) ακόμα και σε περιπτώσεις που δεν χρησιμοποιούνταν αντιβιοτικά στις μονάδες καλλιέργειας (Huang et al. 2015). Επιπροσθέτως, το γεγονός ότι τα περιβάλλοντα που δέχονται μεγάλες ποσότητες αντιβιοτικών δέχονται συχνά και μεγάλες ποσότητες βαρέων μετάλλων (δηλαδή, οι γεωργικές καλλιέργειες και υδατοκαλλιέργειες, Seiler and Berendonk 2012) έχει προκαλέσει το ερευνητικό ενδιαφέρον, καθώς έχει αποδειχτεί πως η ανθεκτικότητα σε τοξικούς παράγοντες συνήθως καθοδηγείται μέσω συν-εξέλιξης (Baker-

Austin et al. 2006). Έτσι, η συνεχής επιβάρυνση ενός περιβάλλοντος με βαρέα μέταλλα ταυτόχρονα με αντιβιοτικά μπορεί να οδηγήσει σε κοινότητες όπου επικρατούν ανθεκτικοί μικροοργανισμοί.

Παρότι η χρήση των αντιβιοτικών στις υδατοκαλλιέργειες έχει μειωθεί λόγω της ανάπτυξης εμβολίων, η παρατήρηση σχετικά με την συν-εξέλιξη ανθεκτικών μικροοργανισμών σε μέταλλα και αντιβιοτικά εξακολουθεί να έχει μεγάλη σημασία για τις περιοχές όπου αναπτύσσονται υδατοκαλλιέργειες. Αυτό συμβαίνει γιατί οι υδατοκαλλιέργειες αναπτύσσονται ραγδαία (με εκθετικό βαθμό στη Μεσόγειο τα τελευταία 20 χρόνια), αντιπροσωπεύουν περίπου 30% της παγκόσμιας παραγωγής ψαριών και ταυτόχρονα επιφέρουν αλλοιώσεις στο θαλάσσιο οικοσύστημα. Άμεσες αλλοιώσεις έχουν αναφερθεί ως προς τη σύσταση του βένθους κάτω από τους κλωβούς (Kalantzi and Karakassis 2006) και την καταστροφή των λιβαδιών Ποσειδωνίας (Holmer et al. 2008), ενώ έμμεσες αλλοιώσεις στις συγκεντρώσεις των διαλυτών θρεπτικών στοιχείων μπορούν με τη σειρά τους να προκαλέσουν κρίσιμες αλλαγές στις βιοχημικές λειτουργίες των ωκεανών (Sarà 2007).

Εκτός από βιολογικούς παράγοντες, όπως τα αντιβιοτικά, το θαλάσσιο περιβάλλον δέχεται στις μέρες μας και μεγάλες ποσότητες άλλων ενώσεων, όπως για παράδειγμα αζωτούχες ενώσεις από αγροτικές και άλλες δραστηριότητες (Anderson et al. 2002). Η αυξημένη συγκέντρωση αζώτου στη θάλασσα μπορεί να οδηγήσει στο φαινόμενο του ευτροφισμού στην παράκτια ζώνη, καθώς το άζωτο μπορεί να ευνοήσει την ανάπτυξη των πλαγκτονικών οργανισμών και συγκεκριμένα του φυτοπλαγκτού στα επιφανειακά στρώματα. Στη συνέχεια, ετερότροφος μεταβολισμός της νέο-παραχθείσας οργανικής ύλης μπορεί να οδηγήσει στην εξάντληση του οξυγόνου στα βαθύτερα στρώματα και τη δημιουργία «νεκρών ζωνών» («dead zones», Diaz and Rosenberg, 2008). Το φαινόμενο του ευτροφισμού έχει προκαλέσει μερικές από τις πιο σοβαρές αλλοιώσεις του φυσικού θαλάσσιου περιβάλλοντος που κυμαίνονται από αλλαγές στις κοινότητες και θνησιμότητα βενθο-πελαγικών ειδών έως και απώλειες ενδιαιτημάτων και μείωση αλιευτικής απόδοσης (Zhang et al. 2010). Εκτός από αζωτούχες ενώσεις, τα θαλάσσια οικοσυστήματα δέχονται ποσότητες και άλλων θρεπτικών στοιχείων, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε ευτροφισμό, π.χ. φωσφόρο (Galloway et al. 2004). Η εισροή φωσφόρου στα θαλάσσια οικοσυστήματα έχει αυξηθεί ~ 3 φορές σε σχέση με την προ-βιομηχανική εποχή (Anderson et al. 2002) και έχει προκληθεί από την εξόρυξη φωσφόρου, την γεωργία και κτηνοτροφία και ειδικά την προσθήκη λιπασμάτων. Επιπλέον, η σύσταση των λιπασμάτων έχει αλλάξει ριζικά τα τελευταία χρόνια και έχει παρατηρηθεί μια αυξανόμενη τάση χρήσης ουρίας στα αζωτούχα λιπάσματα, κάτι που έχει επιφέρει

δραματικές αλλαγές στη σύσταση θρεπτικών αλάτων των γλυκών νερών και στην επακόλουθη άνθιση επιβλαβών ειδών φυκών (harmful algae) (Anderson et al. 2002).

Επιπλέον, βαρέα μέταλλα εισέρχονται στην θάλασσα μέσω ποικίλων οδών, όπως είναι οι βιομηχανικές δραστηριότητες, η γεωργία και η απόρριψη λυμάτων και κοπριάς. Τα βαρέα μέταλλα μπορεί να βρίσκονται σε οργανική και ανόργανη μορφή και μπορούν να μεταφερθούν στο τροφικό πλέγμα, ενώ μπορούν εύκολα να γίνουν πιο τοξικά μέσω βιοτικών και αβιοτικών διαδικασιών. Για παράδειγμα, η παρουσία οξυγόνου μπορεί να αυξήσει τον ρυθμό διάλυσης των μετάλλων και ως εκ τούτου, τα προκύπτοντα μόρια ίσως είναι περισσότερο βιο-διαθέσιμα και άρα τοξικότερα για τους οργανισμούς (Fonti et al. 2015). Αλλαγές στη βιο-διαθεσιμότητα των μετάλλων μπορεί να προκύψουν και από το ίδιο το «βιολογικό δυναμικό» μιας κοινότητας, καθώς υπάρχουν στελέχη που μειώνουν την κινητικότητα των μετάλλων, π.χ. βακτήρια που ανάγουν το θείο και είναι ικανά να εξυγιάνουν ένα οικοσύστημα ρυπασμένο από βαρέα μέταλλα (Jiang and Fan 2008). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, πρόσφατα επισημάνθηκε πως η ανεξέλεγκτη χρήση των αντιβιοτικών έχει διττό ρόλο, καθώς από την μια πλευρά, προκαλεί ανθεκτικότητα σε βακτηριακά στελέχη με πιθανές σοβαρές συνέπειες στη δημόσια υγεία και από την άλλη πλευρά, εμφανίζεται ταυτόχρονα με την διάδοση σημαντικών γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα, γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα επιλέγονται ταυτόχρονα με γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, γεγονός που έχει παρατηρηθεί σε υδατοκαλλιέργειες (Huang et al. 2015). Στις υδατοκαλλιέργειες, τα βαρέα μέταλλα έχουν προέλευση κυρίως από τη χρήση αντι-ρυπαντικών προϊόντων (antifouling) με σκοπό να μειωθούν οι ακαθαρσίες στα δίχτυα των κλωβών. Ως αποτέλεσμα, διάφορα βαρέα μέταλλα έχουν μετρηθεί κοντά σε υδατοκαλλιέργειες (ψάρια, ίζημα ή στήλη νερού), με κυριότερα τα Hg, Zn, Cu, Cd και Pb (Seiler and Berendonk 2012).

Στις μέρες μας, οι διαχειριστικές αρχές χρειάζονται πληροφορίες για τη λήψη αποφάσεων σχετικά με τη διαχείριση της «υγείας» και βιωσιμότητας των θαλάσσιων οικοσυστημάτων, γεγονός που έχει αποδειχθεί περίπλοκη διαδικασία λόγω της έντονης χωρικής και χρονικής μεταβλητότητας των πιέσεων και επιπλέον λόγω έντονων πολιτικο-οικονομικών αντιπαραθέσεων (Micheli et al. 2013). Μια λύση θα ήταν να χρησιμοποιείται ένα καθολικό εργαλείο παρακολούθησης των συστημάτων, δηλαδή ένα εργαλείο που θα μπορούσε να «αντιστοιχίσει» την ανθρώπινη ενέργεια με περιβαλλοντική επίπτωση. Προς αυτήν την κατεύθυνση, οικολογικοί δείκτες έχουν αναπτυχθεί και εξελιχθεί ώστε να αποτυπώνουν την οικολογική κατάσταση μιας περιοχής. Έτσι, υπάρχουν δείκτες που αποτυπώνουν τον βαθμό ευτροφισμού, την βενθική και φυτοπλαγκτονική κοινότητα, τα

φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ή και όλα τα παραπάνω (συνδυαστικοί δείκτες). Πιο συγκεκριμένα, παράμετροι όπως είναι η συγκέντρωση της χλωροφύλλης, των θρεπτικών στοιχείων και του οξυγόνου, η σύσταση της μακροπανίδας, η θολερότητα του νερού και η συγκέντρωση βαρέων μετάλλων έχουν συνυπολογιστεί σε τέτοιους δείκτες (π.χ. Bald *et al.*, 2005; Borja *et al.*, 2009). Συχνά όμως, οι περιβαλλοντικοί δείκτες δεν είναι επαρκείς για να περιγράψουν με ακρίβεια την υγεία ενός οικοσυστήματος, μιας και υπολογίζουν ένα μέρος μόνο των βιολογικών ή/και χημικών παραμέτρων. Αντίστοιχα, υπάρχουν ενδεικτικά βακτηριακά στελέχη που έχουν χρησιμοποιηθεί ως «δείκτες» ρύπανσης και ως εργαλείο παρακολούθησης της ποιότητας των υδάτων. Χαρακτηριστικότερο είναι το βακτήριο *Enterococcus* που προσβάλλει το γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου (Byappanahalli *et al.* 2012) και έχει μελετηθεί και σε περιοχές με υδατοκαλλιέργειες (Di Cesare *et al.* 2016), όπως και το *Aeromonas* που εντοπίστηκε σε αντίστοιχες τοποθεσίες (Deng *et al.* 2014). Πρόσφατα προτάθηκε πως η περιγραφή της συνολικής μικροβιακής κοινότητας σε ρυπασμένες περιοχές με υψηλή ευκρίνεια θα βοηθούσε στην ανάδειξη ειδών που τυπικά υποδηλώνουν ρύπανση και στην επακόλουθη ένδειξη περιβαλλοντικής επιβάρυνσης στο κατώτερο επίπεδο του τροφικού πλέγματος.

Μέχρι τώρα, οι Simboura *et al.* (2016) έχουν βαθμολογήσει με «δείκτη πίεσης» μια σειρά σταθμών κατά μήκος της Ελληνικής ακτογραμμής, σύμφωνα με στοιχεία σχετικά με όλες τις μορφές πίεσης που δέχονται οι περιοχές όπως αυτές αναφέρονται στο Σύστημα Πληροφοριών για τα Ύδατα της Ευρώπης (Water Information System for Europe-SoE). Στη συνέχεια, οι Simboura *et al.* (2016) τροποποίησαν τον υπολογισμό του δείκτη σε σχέση με την αρχική δημοσίευση (Borja *et al.*, 2011a; Borja *et al.*, 2011b) ώστε να περιλαμβάνει 5 επίπεδα εκτίμησης πίεσης (0: καθόλου πίεση, 0.1–0.44: ελαφριά πίεση, 0.56–1: μέτρια πίεση, 1.11–1.44: υψηλή πίεση και 1.56–2: έντονη πίεση).

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν παράκτιοι σταθμοί με «ελαφρύ», «μέτριο», «υψηλό» και «έντονο» δείκτη πίεσης από ανθρωπογενείς δραστηριότητες (Simboura *et al.* (2016) αλλά και από φυσικές πιέσεις (π.χ. υδρομορφολογικές αλλαγές) στο πλαίσιο της Ευρωπαϊκής Οδηγίας για την ποιότητα του νερού και του περιβάλλοντος (European Water Framework Directive, WFD, EK 2000). Ο στόχος ήταν να περιγραφεί η βακτηριακή και ιική κοινότητα στους σταθμούς δειγματοληψίας με μετα-γονιδιωμιακή ανάλυση και να ελεγχθεί αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της περιβαλλοντικής πίεσης, του κύκλου ζωής της λυσιγονίας και των επιμέρους αβιοτικών παραμέτρων. Επιπλέον, στόχος ήταν να μελετηθεί η σύσταση της κοινότητας σε ικά βοηθητικά μεταβολικά γονίδια και να εκτιμηθεί ο οικολογικός τους ρόλος στους διαφορετικούς σταθμούς. Τέλος, στόχος ήταν να επαληθευτεί η απόδοση του δείκτη

πίεσης στους σταθμούς ως προς τις βιολογικές μετρήσεις του βακτηριακού και ιικού πλαγκτού.

Δεδομένα που παρουσιάζονται στο Κεφάλαιο 2 έχουν χρησιμοποιηθεί για την συγγραφή των ακόλουθων δημοσιεύσεων:

- Tsiola A., Toncelli C., Fodelianakis S., *et al.* (2018). Low-dose addition of silver nanoparticles stresses marine plankton communities. *Environmental Science: Nano*. DOI: 10.1039/c8en00195b
- Tsiola A., Pitta P., Callol A. J., *et al.* (2017c). The impact of silver nanoparticles on marine plankton dynamics : Dependence on coating, size and concentration. *Science of the Total Environment*. 601-602 : 1838-1848. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.042>

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - Η επίδραση της χαμηλής συγκέντρωσης νανοσωματιδίων αργύρου στο μικροβιακό πλαγκτόν

2.1. Συνοπτική εισαγωγή

Τα ΝΣ αργύρου έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, οπότε η συγκέντρωσή τους αναμένεται να αυξηθεί στο μέλλον στην υδατική ζώνη, με πιθανές επιπτώσεις στη δομή και λειτουργία του θαλάσσιου οικοσυστήματος. Η αξιολόγηση της τοξικότητας των ΝΣ αργύρου σε φυσικές κοινότητες θαλάσσιου πλαγκτού είναι στις μέρες μας μη ρεαλιστική και για αυτό το λόγο η παρακολούθηση των μεταβολών του μικροβιακού πλαγκτού με ολιστική προσέγγιση (συμπεριλαμβανομένων ιών, βακτηρίων και πρωτίστων) μετά την έκθεση σε ΝΣ αργύρου είναι μια κρίσιμη ερευνητική πτυχή. Συγκεκριμένα, οι μελέτες που χρησιμοποιούν ολιστική προσέγγιση έχουν μοναδική αξία, καθώς οι πιθανές τοξικές επιπτώσεις των ΝΣ αργύρου καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από βιοτικές και αβιοτικές διεργασίες που αλλάζουν διαρκώς (π.χ. διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων, ποιότητα και ποσότητα οργανικής ύλης, θήρευση, ιική λύση, ανταγωνισμός, συμβίωση). Μέσω της διεξαγωγής πειραμάτων μεσοκόσμων, υπάρχει δυνατότητα να εκτεθούν πλαγκτονικές κοινότητες σε ΝΣ αργύρου με σημαντικά πειραματικά πλεονεκτήματα. Ενδεικτικά, υπάρχει η δυνατότητα μελέτης 1) συγκεκριμένων οργανισμών και μεταβολικών μονοπατιών, 2) των επιπτώσεων στο επίπεδο του τροφικού πλέγματος, 3) της μεταφοράς θρεπτικών και ενέργειας στους ωκεανούς και 4) των επιπτώσεων ΝΣ αργύρου στο θαλάσσιο περιβάλλον σε συγκέντρωση $<1 \mu\text{g L}^{-1}$.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση χαμηλών συγκεντρώσεων ΝΣ αργύρου στις διάφορες συνιστώσες του θαλάσσιου πλαγκτού. Η επιλογή της συγκέντρωσης έγινε σύμφωνα με τους Mitrano *et al.* (2014) που προβλέπουν για το προσεχές μέλλον συγκεντρώσεις ΝΣ αργύρου εντός του εύρους $\text{ng} - \mu\text{g L}^{-1}$, καθώς και τους Blaser *et al.* (2008), Gottschalk *et al.* (2009) και Quik *et al.* (2015) που προβλέπουν με μαθηματικά μοντέλα το ίδιο εύρος συγκεντρώσεων για επιφανειακά οικοσυστήματα γλυκών νερών ($<1 \mu\text{g L}^{-1}$). Σε ένα χρονικό διάστημα έκθεσης 33 ημερών παρακολούθηθηκε η συμπεριφορά των ΝΣ αργύρου (δηλαδή διακύμανση και κατανομή μεγέθους, μεταβολές αφθονίας ΝΣ αργύρου και συγκέντρωσης μάζας αργύρου). Αξιολογήθηκε η δυναμική του θαλάσσιου πλαγκτού χρησιμοποιώντας αναλυτικά εργαλεία υψηλής ευκρίνειας για τον χαρακτηρισμό των

κοινοτήτων των ιών, βακτηρίων και πρωτίστων. Έγινε προσπάθεια να συνδεθούν τα χημικά χαρακτηριστικά και οι μετασχηματισμοί των ΝΣ αργύρου με την αφθονία και δομή της κοινότητας των διαφορετικών πλαγκτονικών ομάδων, καθώς και με τα επίπεδα παραγωγικότητας των αυτότροφων και ετερότροφων βακτηρίων. Προσδιορίστηκαν η αφθονία ενός γονιδίου σχετιζόμενου με τη λυσιγονία (ικκή ενσωματάση, βλ. Κεφάλαιο 1.1.) και μιας σειράς ικών βοηθητικών μεταβολικών γονιδίων (AMGs, βλ. Κεφάλαιο 1.1) προκειμένου να αποτυπωθεί η πιθανή απόκριση των ιών στην έκθεση σε ΝΣ αργύρου. Στόχος του προσδιορισμού ήταν η σύγκριση της ικής απόκρισης με τις βακτηριακές αποκρίσεις στο «στρες» δεδομένου του κεντρικού ρόλου των AMGs. Προκαταρκτικά πειράματα σε μικρότερη κλίμακα (μικρόκοσμοι) βοήθησαν ώστε να επιλεγεί ένας τύπος ΝΣ αργύρου που έχει υψηλή σταθερότητα στο θαλασσινό νερό (Toncelli et al. 2017). Στα εν λόγω πειράματα εξετάστηκαν δύο διαφορετικοί τύποι επικάλυψης ΝΣ αργύρου (PVP και BPEI), δύο μεγέθη (40 και 60 nm), δύο διαφορετικές μορφές αργύρου (ΝΣ αργύρου και ιόντα Ag^+) και ένα εύρος συγκεντρώσεων (200-10000 ng $Ag L^{-1}$).

2.2. Υλικά και Μέθοδοι

2.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός (μικρόκοσμοι)

Πραγματοποιήθηκαν τρία πειράματα μικροκόσμων (Οκτώβριος και Νοέμβριος 2014 και Μάρτιος 2015). Το θαλασσινό νερό συλλέχθηκε από τον κόλπο του Ηρακλείου (Κρητικό Πέλαγος, 35ο20'05.46 "N 25ο16'50.38" E). Η συλλογή έγινε από την επιφάνεια της θάλασσας (1-2 m), χρησιμοποιώντας πλαστικούς σωλήνες και δοχεία πολυαιθυλενίου χαμηλής πυκνότητας και χωρητικότητας 20 L (όλα τα δοχεία ήταν πλυμένα με 10% υδροχλωρικό οξύ και απιονισμένο νερό). Τα δοχεία μεταφέρθηκαν με αυτοκίνητο στις εγκαταστάσεις του CRETACOSMOS του Ελληνικού Κέντρου Θαλάσσιων Ερευνών (HCMR) και στη συνέχεια το νερό μοιράστηκε στους μικροκόσμους (δοχεία πολυαιθυλενίου χαμηλής πυκνότητας Nalgene®) σε τελικό ακριβή όγκο 10 L. Όλοι οι μικρόκοσμοι επώαστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε μια μεγάλη τιμεντένια δεξαμενή (350 m³). Η θερμοκρασία παρέμεινε σταθερή λόγω της συνεχούς ροής νερού εντός της δεξαμενής, το οποίο εξασφάλισε επίσης μια ήπια κίνηση και ανάμειξη των μικροκόσμων προκειμένου να αποφευχθεί στρωμάτωση του νερού. Πριν την προσθήκη ΝΣ αργύρου, έγινε δειγματοληψία νερού (T0) προκειμένου να προσδιοριστούν οι αρχικές συνθήκες του θαλασσινού νερού.

Για το πρώτο πείραμα (Οκτώβριος 2014), αμέσως μετά από την στιγμή T0, μικρόκοσμοι σε τρεις επαναλήψεις εμπλουτίστηκαν με αρχική συγκέντρωση 200 ng $Ag L^{-1}$ ΝΣ αργύρου

τεσσάρων τύπων: AgNPs ΝΣ αργύρου καλυμμένα με διακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη [(branched-polyethylenimine), BPEI] με ονομαστική διάμετρο 40 ή 60 nm και ΝΣ αργύρου καλυμμένα με πολυβινυλοπυρρολιδόνη (Polyvinylpyrrolidone, PVP) με ονομαστική διάμετρο 40 ή 60 nm. Οι κωδικοί των μικρόκοσμων είναι αντίστοιχα: BPEI 40, BPEI 60, PVP 40 και PVP 60. Τρεις άλλοι μικρόκοσμοι χρησίμευσαν ως μάρτυρες (μηδενική προσθήκη) και φέρουν την συντομογραφία C. Οι επόμενες δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν 5 (T5) και 48 (T48) ώρες μετά τις προσθήκες.

Για το δεύτερο πείραμα (Νοέμβριος 2014), αμέσως μετά από την T0, μικρόκοσμοι σε δύο επαναλήψεις εμπλουτίστηκαν με ΝΣ αργύρου τύπου BPEI με ονομαστική διάμετρο 60 nm σε τελικές συγκεντρώσεις 200, 500, 2000, 5000 και 10000 ng Ag L⁻¹ (κωδικές ονομασίες: 0,2, 0,5, 2, 5 και 10 με τον Ag μετρημένο σε μg L⁻¹). Δύο άλλοι μικρόκοσμοι χρησίμευσαν ως μάρτυρες (μηδενική προσθήκη) και φέρουν την συντομογραφία C. Οι ακόλουθες δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν 5 (T5), 24 (T24), 48 (T48) και 72 (T72) ώρες μετά τις προσθήκες.

Για το τρίτο πείραμα (Μάρτιος 2015), αμέσως μετά από την T0, μικρόκοσμοι σε τρεις επαναλήψεις εμπλουτίστηκαν με ΝΣ αργύρου τύπου BPEI με ονομαστική διάμετρο 60 nm σε τελικές συγκεντρώσεις 200, 500 και 2000 ng Ag L⁻¹ (κωδικές ονομασίες: 0, 2, 0,5 και 2 με τον Ag μετρημένο σε μg L⁻¹). Τρεις άλλοι μικρόκοσμοι εμπλουτίστηκαν με διαλελυμένα ιόντα αργύρου που περιείχαν 2% νιτρικό οξύ σε τελική συγκέντρωση 200 ng Ag L⁻¹ (κωδική ονομασία: DissAg). Τέλος, τρεις άλλοι μικρόκοσμοι χρησίμευσαν ως μάρτυρες (μηδενική προσθήκη) και φέρουν την συντομογραφία C. Οι ακόλουθες δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν 5 (T5), 24 (T24), 48 (T48) και 72 (T72) ώρες μετά τις προσθήκες.

Κατά τη διάρκεια όλων των δειγματοληψιών συλλέχθηκε νερό για την εκτίμηση της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης και της αφθονίας των αυτότροφων και ετερότροφων βακτηρίων και των αυτότροφων πικο- ευκαρυωτικών κυττάρων. Και στα τρία πειράματα συλλέχθηκαν δείγματα για την καταμέτρηση και σύνθεση της κοινότητας του μικροπλαγκτού (διάτομα και δινομαστιγωτά) την T0, και στη συνέχεια την T48 (Οκτώβριος), T24 και T72 (Νοέμβριος) και T24, T48 και T72 (Μάρτιος).

2.2.2. Πειραματικός σχεδιασμός (μεσόκοσμοι)

Το πείραμα μεσοκόσμων πραγματοποιήθηκε μεταξύ Απριλίου και Μαΐου του έτους 2015. Θαλασσινό νερό συλλέχθηκε από τον κόλπο του Ηρακλείου (35ο20'05.46 "N 25ο16'50.38" E,

Κρητικό Πέλαγος, Ανατολική Μεσόγειος) από βάθος περίπου 2 m με άντληση. Το νερό συλλέχθηκε σε νεπεόζιτα από πολυπροπυλένιο υψηλής πυκνότητας και χωρητικότητας 1 m³, που είχαν πλυθεί με 10% υδροχλωρικό οξύ μια φορά και ξεπλυθεί με απιονισμένο νερό τρεις φορές πριν από την χρήση τους.

Το νερό κατανεμήθηκε ομοιόμορφα σε 6 μεσοκόσμους όγκου 3 m³ από πολυαιθυλένιο. Η κατανομή έγινε χωρίς άντληση, μόνο με τη βαρύτητα (με πλαστικούς σωλήνες πλυμένους επίσης με υδροχλωρικό οξύ και απιονισμένο νερό), μεταφέρθηκε στις εγκαταστάσεις CRETACOSMOS εντός μίας ώρας από τη συλλογή προκειμένου να εξασφαλιστεί η ομοιογένεια των αρχικών συνθηκών του πειράματος. Οι μεσόκοσμοι τοποθετήθηκαν στην ίδια τσιμεντένια δεξαμενή όπως παραπάνω (350 m³) και παρέμειναν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος που ρυθμιζόταν με σύστημα συνεχούς ροής νερού. Εισροή αέρα μέσα στους μεσοκόσμους εξασφάλισε την ήπια ανάμιξη και αποφυγή της στρωμάτωσης της στήλης του νερού. Καπάκια από πλεξιγκλάς προσαρτήθηκαν σε όλους τους μεσοκόσμους ώστε να αποφευχθεί η μόλυνση από αερολύματα. Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος και λόγω των ακραίων ολιγοτροφικών συνθηκών που χαρακτηρίζουν το περιβάλλον της Ανατολικής Μεσογείου, καταβλήθηκε ιδιαίτερη προσπάθεια προκειμένου να αποφευχθεί μόλυνση από αερολύματα και άλλους παράγοντες. Όλος ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε κατά τους χειρισμούς και τη δειγματοληψία ήταν πάντα πλυμένος με HCl και ξεπλυμένος με απιονισμένο νερό, ενώ πάντα γινόταν χρήση γαντιών. Σωλήνες δειγματοληψίας από σιλικόνη προεκτείνονταν έξω από τους μεσοκόσμους και διατηρούνταν καθαροί ανά πάσα στιγμή για την καθημερινή δειγματοληψία.

Μετά από 12 ώρες πραγματοποιήθηκε η πρώτη δειγματοληψία και μετρήθηκαν οι αρχικές αβιοτικές και βιοτικές συνθήκες (D-1). Την επόμενη ημέρα σε τρεις μεσοκόσμους (σε συντομογραφία: +NP) έγινε προσθήκη ΝΣ αργύρου. Τα ΝΣ αργύρου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν καλυμμένα με διακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη [branched poly(ethyleneimine), BPEI] και είχαν ονομαστική διάμετρο 60 nm (Nanocomposix, NanoXact, San Diego, CA, καθαρότητα αργύρου 99.99%). Τα ΝΣ αργύρου προστέθηκαν σε μορφή υδατικού εναιωρήματος, σε συγκέντρωση 100 ng Ag L⁻¹ ανά μεσόκοσμο ανά ημέρα για τις πρώτες 10 ημέρες του πειράματος. Αρχικά, ετοιμάστηκε ένα διάλυμα που περιείχε 300 μg Ag L⁻¹ με τη μορφή ΝΣ αργύρου σε δοχείο των 1000 mL με υπερκάθαρο νερό (18.2 MΩ Milli-Q, Millipore). Στη συνέχεια, αυτό το διάλυμα προστέθηκε στους μεσοκόσμους για να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 100 Ag ng L⁻¹. Η δεύτερη δειγματοληψία διεξήχθη μία ώρα πριν από την προσθήκη ΝΣ αργύρου (D0), ενώ στις ακόλουθες ημέρες D1-D10 το νερό συλλεγόταν μία ώρα μετά την προσθήκη ΝΣ αργύρου. Σε τρεις άλλους μεσοκόσμους δεν

προστέθηκαν ΝΣ αργύρου και αυτοί χρησίμευσαν ως μάρτυρες (σε συντομογραφία: C). Το νερό για όλες τις μετρήσεις συλλεγόταν σε δοχεία πολυαιθυλενίου χαμηλής πυκνότητας 10 L.

2.2.3. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων αργύρου και των διαλελυμένων ιόντων αργύρου

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ΝΣ αργύρου του ισοτόπου ^{107}Ag ή ^{109}Ag με χρόνο παραμονής 10 msec χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο μάζας επαγωγικώς συζευγμένου πλάσματος (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer, ICP-MS) τύπου NexION 300X ICP-MS (PerkinElmer, Shelton, CT, U.S.A.). Τα δείγματα θαλασσινού νερού αναλύθηκαν με χρήση ICP-MS με τη μέθοδο της έγχυσης ροής σε κατάσταση μονού σωματιδίου (flow injection single particle ICP-MS), όπως περιγράφεται λεπτομερώς στους Toncelli *et al.* (2016). Η συγκέντρωση των ΝΣ αργύρου μετρήθηκε επίσης στους C μεσοκόσμους αλλά τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται καθώς η συγκέντρωση ήταν πάντοτε κάτω από το όριο ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου.

Για να προσδιοριστούν τα διαλελυμένα ιόντα Ag^+ , ένα μέρος των δειγμάτων θαλασσινού νερού τοποθετήθηκε σε φιαλίδια 1.5 mL και φυγοκεντρήθηκε χρησιμοποιώντας φυγόκεντρο με συσκευή διήθησης με μεμβράνη 3 kDa για 3 min στις 10.000 στροφές ανά min^{-1} . Για τον έλεγχο της διαδικασίας, πρότυπα διαλύματα που περιείχαν ΝΣ αργύρου διηθήθηκαν και τελικά τα προκύπτοντα διηθήματα αναλύθηκαν με sp ICP-MS. Δεν ανιχνεύθηκαν ΝΣ αργύρου, επιβεβαιώνοντας την αποτελεσματικότητα της διήθησης. Για όλα τα δείγματα, η συγκέντρωση των διαλελυμένων Ag^+ του διηθήματος προσδιορίστηκε με συμβατική ICP-MS. Για τη συγκέντρωση διαλελυμένων Ag^+ συλλέχθηκε νερό από δύο μεσοκόσμους (C1 και NP1) και η μέθοδος περιγράφεται αναλυτικά στους Toncelli *et al.* (2016, 2017).

Η συγκέντρωση των ΝΣ αργύρου και του διαλελυμένου Ag προσδιορίστηκε επίσης μεμονωμένα στα σωματιδιακά κλάσματα, δηλαδή του αργύρου που ήταν είτε προσκολλημένος είτε εντός μικροβιακών κυττάρων. Για το σκοπό αυτό, έγινε σειριακή διήθηση περίπου 15 L θαλασσινού νερού μέσω πολυανθρακικών μεμβρανών με πόρους 0.2, 2.0 και 5 μm , ώστε να συγκεντρωθεί μια σημαντική ποσότητα κυττάρων σε κάθε κατηγορία μεγέθους. Οι μεμβράνες κατόπιν τοποθετήθηκαν ξεχωριστά σε απιονισμένο νερό και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με υπερήχους για 10 min. Μετά τους υπερήχους, τα διαλύματα που προέρχονταν από τις μεμβράνες 0.2 και 2.0 μm αναλύθηκαν με sp ICP-MS. Οι μεμβράνες 5.0 μm υποβλήθηκαν σε πέψη με μικροκύματα σε διαλύματα HNO_3 (69%) και

H₂O₂ (≥30%) και στη συνέχεια αναλύθηκαν μετά από κατάλληλη αραίωση για τη συνολική συγκέντρωσή τους σε Ag χρησιμοποιώντας συμβατική ICP-MS. Η ακεραιότητα των ΝΣ αργύρου κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας με υπερήχους αξιολογήθηκε πριν από την έναρξη του πειράματος μεσοκόσμων με ανάλυση ενός πρότυπου διαλύματος θαλασσινού νερού όπου είχαν προστεθεί ΝΣ αργύρου. Τα αποτελέσματα των δοκιμαστικών πειραμάτων έδειξαν ότι δεν υπήρχε επίδραση στην κατανομή μεγέθους των BPEI ΝΣ αργύρου λόγω της επεξεργασίας με υπερήχους (Toncelli et al. 2016, 2017).

2.2.4. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης θρεπτικών στοιχείων και χλωροφύλλης

Αμέσως μετά τη συλλογή των δειγμάτων, μετρήθηκε η συγκέντρωση των φωσφορικών (PO₄⁻³), νιτρικών (NO₂⁻), νιτρικών (NO₃⁻) (Strickland and Parsons 1972) και αμμωνιακών ιόντων (NH₄⁺) (Ivančić and Degobbis, 1984). Τα όρια ανίχνευσης για τις αναλύσεις της συγκέντρωσης φωσφορικών, νιτρικών και αμμωνιακών ήταν 0.0137, 0.0168 και 0.0187 μM, αντίστοιχα. Για την ανάλυση του ολικού οργανικού άνθρακα (total organic carbon, TOC) τα δείγματα συλλέχθηκαν και μεταφέρθηκαν σε γυάλινες αμπούλες, επεξεργάστηκαν με υδροχλωρικό οξύ και σφραγίστηκαν με φλόγα (Sugimura and Suzuki 1988; Cauwet 1994). Η μέτρηση έγινε σε αναλυτή 5000 Shimadzu. Η ακρίβεια και εγκυρότητα των μετρήσεων TOC ελέγχθηκε με βάση το υλικό αναφοράς για τα θαλάσσια ύδατα Florida Strait Seawater Reference Material από DOC-CRM program, batch 10 FS-2008 (University of Miami - D.A. Hansell). Για την ανάλυση της συγκέντρωσης του σωματιδιακού οργανικού άνθρακα (particulate organic carbon, POC) και αζώτου (particulate organic nitrogen, PON) δείγματα νερού διηθήθηκαν και αναλύθηκαν όπως στους Hedges and Stern (1984) σε αναλυτή Perkin Elmer 2400 CHN Elemental Analyzer.

Επιπλέον, η συγκέντρωση της χλωροφύλλης *a* (Chl *a*) εκτιμήθηκε φθοριομετρικά (Yentsch and Menzel 1963) μετά από σειριακή διήθηση 1 L νερού μέσω πολυανθρακικών μεμβρανών με πόρους 5.0, 2.0 και 0.2 μm, υπό χαμηλή πίεση κενού (<200 mm Hg). Ακολούθησε εκχύλιση των μεμβρανών σε 90% ακετόνη στους 4 °C στο σκοτάδι ολονυχτίς. Η μέτρηση έγινε σε αναλυτή Turner TD-700 και τελικά υπολογίστηκε το άθροισμα των τριών κλασμάτων (0.2-2.0, 2.0-5.0 και > 5 μm) για την ολική συγκέντρωση Chl *a*.

2.2.5. Προσδιορισμός των ρυθμών παραγωγής

Για την εκτίμηση της πρωτογενούς παραγωγής (primary production, PP) σύμφωνα με τον Steeman (1952), δύο πολυανθρακικά μπουκάλια με νερό από όπου διερχόταν το φως (light) και ένα μπουκάλι από το οποίο δεν διερχόταν φως (dark) χωρητικότητας 320 mL επώαστηκαν με 5 μCi ιχνηθέτη $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$. Η επώαση έγινε εντός της τσιμεντένιας δεξαμενής για περίπου 3 ώρες. Στο τέλος της επώασης, το νερό διηθήθηκε σε πολυανθρακικές μεμβράνες με πόρους 0.2 και 2.0 μm υπό χαμηλή πίεση κενού. Προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του ^{14}C -διττανθρακικού άλατος, οι μεμβράνες εμποτίστηκαν σε 1 mL HCl 0.1N και τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια των 5 mL που έμειναν ανοιχτά ολονυχτίς. Μετά την προσθήκη 4 mL κοκτέιλ σπινθηρισμού, η ραδιενέργεια μετρήθηκε σε μετρητή σπινθηρισμού. Το κλάσμα των 0.2-2.0 μm αντιστοιχεί στην πικο- και το κλάσμα >2.0 μm αντιστοιχεί στην νανο- και μικρο- πλαγκτονική PP, αντίστοιχα. Τα κλάσματα παρουσιάζονται ως ποσοστά επί τοις εκατό (% πικο- και % νανο-/μικρο- PP). Οι επώσεις έγιναν το μεσημέρι όταν το προσπίπτον φως ήταν μέγιστο και η περιοχή επώασης έλαβε την ίδια ένταση φωτός με τους μεσοκόσμους. Για τη συγκέντρωση του διαλελυμένου ανόργανου άνθρακα χρησιμοποιήθηκε η τιμή 26.400 mg C m^{-3} .

Για τη μέτρηση της ετερότροφης βακτηριακής παραγωγής (bacterial production, BP) σύμφωνα με τους (Kirchman et al. 1985), δείγματα θαλασσινού νερού σε δύο επαναλήψεις (1.5 mL) και ένα δείγμα μάρτυρα που είχε υποβληθεί σε επεξεργασία με τριχλωροξικό οξύ επώαστηκαν σε φιαλίδια των 2 mL με μίγμα [4,5- ^3H] λευκίνης (Perkin Elmer, ειδική δραστηριότητα 115 Ci mmol^{-1}) και μη ραδιενεργούς λευκίνης σε τελικές συγκεντρώσεις 16 και 7 nM, αντίστοιχα. Όλα τα δείγματα επώαστηκαν για 2 ώρες στο σκοτάδι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η επώαση τερματίστηκε με την προσθήκη 90 μl (100%) τριχλωροξικού οξέος. Στη συνέχεια τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους 4 °C στο σκοτάδι μέχρι περαιτέρω επεξεργασία. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 16000 g για 10 min. Μετά την απόρριψη του υπερκείμενου, προστέθηκε 1.5 mL 5% τριχλωροξικού οξέος, τα δείγματα ανακινήθηκαν έντονα χρησιμοποιώντας ένα όργανο στροβιλισμού (vortex) και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν και πάλι στην ίδια ταχύτητα. Αφού απορρίφθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκε 1.5 mL (80%) αιθανόλης και κατόπιν τα δείγματα ανακινήθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν και πάλι. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και προστέθηκε 1.5 mL κοκτέιλ σπινθηρισμού. Η ραδιενέργεια μετρήθηκε με τη χρήση ενός μετρητή σπινθηρισμού (Packard LS 1600) και η BP υπολογίστηκε από τα ποσοστά ενσωμάτωσης ^3H -λευκίνης (Smith and Azam 1992). Η γραμμική ενσωμάτωση της λευκίνης στο χρόνο αποδείχθηκε με πείραμα στο χρόνο ενώ πραγματοποιήθηκαν επίσης δύο πειράματα κινητικής για να επιβεβαιωθεί ότι η

συγκέντρωση της προστιθέμενης λευκίνης ήταν επαρκής για να επιτευχθεί κορεσμένη ενσωμάτωση. Τα αποτελέσματα της κινητικής έδειξαν ότι ο βαθμός κορεσμού των 20 nM που χρησιμοποιήθηκε ήταν πάντα >90%, οπότε η ισοτοπική αραιώση ήταν αμελητέα.

2.2.6. Προσδιορισμός της πλαγκτονικής αφθονίας

Οι αφθονίες των ιικών σωματιδίων (virus-like particles, VLPs), ετερότροφων βακτηρίων (heterotrophic bacteria, HB), κυανοβακτηρίων (συμπεριλαμβανομένων στελεχών *Synechococcus* και *Prochlorococcus*) και αυτότροφων και ετερότροφων πικο- (Auto-Pico και Hetero-Pico, αντίστοιχα) και νανο- ευκαρυωτικών κυττάρων (Auto-Nano και Hetero-Nano, αντίστοιχα) προσδιορίστηκαν με κυτταρομετρία ροής. Για το σκοπό αυτό, δείγματα θαλασσινού νερού συντηρήθηκαν σε 0.5% τελική συγκέντρωση (25%) γλουταραλδεΐδης που προηγουμένως είχε διηθηθεί σε μεμβράνη πόρου 0.2 μm . Τα δείγματα φυλάχθηκαν στους 4 °C για 30 min μετά την συντήρηση και έπειτα βυθίστηκαν σε υγρό άζωτο και φυλάχθηκαν στους -80 °C μέχρι την καταμέτρηση. Τμήμα των δειγμάτων υπέστη χρώση για την καταμέτρηση των ιών (Marie et al. 1999), HB (Marie et al. 1999) και Auto- και Hetero-Nano και Hetero-Pico ευκαρυωτικών κυττάρων (Zubkov et al. 2007). Για τα VLPs και HB, πριν την ανάλυση έγινε αραιώση σε ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) Tris-EDTA (pH=8, Sigma-Aldrich) ώστε η καταμέτρηση των σωματιδίων να γίνει με ρυθμό <1000 γεγονότων ανά δευτερόλεπτο. Για αμφότερα τα VLPs και HB έγινε χρώση με SYBR Green I (Molecular Probes) σε τελική αραιώση 5×10^{-5} και 4×10^{-4} του αρχικού διαλύματος (stock), αντίστοιχα. Για τους ιούς, η επώαση με τη χρώση ήταν 10 min στους 80 °C στο σκοτάδι και για τα HB, η επώαση ήταν για το ίδιο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία δωματίου. Επιπλέον, τα VLPs και HB διακρίθηκαν σε κατηγορίες με βάση το σήμα του φθορισμού τους (δηλαδή το περιεχόμενό τους σε γενετικό υλικό) σε High και Low DNA ιούς και βακτήρια. Χρησιμοποιήθηκαν κιτρινοπράσινα σφαιρίδια λατέξ ονομαστικού μεγέθους 1 μm (Polysciences) ως πρότυπο φθορισμού (standard). Για τα Auto-Nano, Hetero-Pico και Hetero-Nano ευκαρυωτικά κύτταρα έγινε χρώση με SYBR Green I (Molecular Probes) σε τελική αραιώση 2×10^{-4} του stock και επώαση για 60 min στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Οι αυτότροφοι διακρίθηκαν από τους ετερότροφους σε διάγραμμα πράσινου έναντι κόκκινου φθορισμού. Χρησιμοποιήθηκαν και εδώ κιτρινοπράσινα σφαιρίδια λατέξ ονομαστικού μεγέθους 1 και 10 μm (Polysciences) ως πρότυπο φθορισμού. Ο ρυθμός άντλησης νερού του οργάνου προσδιοριζόταν καθημερινά και χρησιμοποιήθηκε για την μετατροπή της καταμέτρησης σε αφθονία κυττάρων (cells mL^{-1}), ζυγίζοντας με ακρίβεια ένα δοκιμαστικό δείγμα TRIS-EDTA buffer πριν και μετά από την κυτταρομετρική λειτουργία 5 min στην υψηλή ταχύτητα ροής.

Τα κυανοβακτήρια και τα αυτότροφα πύκο- ευκαρυωτικά κύτταρα καταμετρήθηκαν αμέσως μετά τη δειγματοληψία χωρίς συντήρηση και χρώση (Marie et al. 1999). Η διάκριση των κυττάρων έγινε με βάση το σήμα του αυτο-φθορισμού τους λόγω χλωροφύλλης και φυκοερυθρίνης. Χρησιμοποιήθηκε το όργανο FACSCalibur™ (Becton Dickinson) σε συμβατική πίεση αέρα για 1-3 λεπτά, με εξοπλισμό αερόψυκτου λέιζερ που εκπέμπει στα 488 nm και κανονική διάταξη φίλτρων. Τα δεδομένα της καταμέτρησης επεξεργάστηκαν με το λογισμικό Cell Quest Pro (Becton Dickinson).

Δείγματα συντηρήθηκαν επίσης για την καταμέτρηση μικρο- πλαγκτού (δηλαδή διατόμων, δινομαστιγωτών και βλεφαριδιωτών) σε διάλυμα όξινου Lugol (τελική συγκέντρωση 2%). Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους 4 °C στο σκοτάδι. Ένα τμήμα του δείγματος συγκεντρώθηκε χρησιμοποιώντας θαλάμους καθίζησης (Utermöhl, 1958) και εξετάστηκε οπτικά 24 ώρες αργότερα σε ανεστραμμένο μικροσκόπιο (Olympus, IX 70). Η εξέταση έγινε με σύστημα ανάλυσης εικόνας (Image-Pro Plus 6.1, MediaCybernetics) και τα διάτομα και δινομαστιγωτά ταξινομήθηκαν σε γένη όποτε αυτό ήταν δυνατόν.

2.2.7. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης δραστικών μορφών οξυγόνου

Η πιθανή παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) από πύκο-πλαγκτονικά κύτταρα αξιολογήθηκε ακολουθώντας τη μέθοδο φθορισμού με χρώση οξικής διχλωρο- διυδρο- φλουορεσκεΐνης (H₂DCFDA, Molecular Probes) των Choi and Hu (2008). Ένα τμήμα του αρχικού δείγματος υπέστη χρώση με H₂DCFDA (τελική συγκέντρωση 50 μM) και επώαστηκε για 60 min στο σκοτάδι. Χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος κυτταρομετρητής ροής όπως για την καταμέτρηση μικροβιακού πλαγκτού (Κεφάλαιο 2.2.6.). Επιπλέον δείγματα μάρτυρες που περιείχαν μόνο νερό Milli-Q χρωματίστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για να υπολογιστούν και μετέπειτα αφαιρεθούν ψευδο-θετικές μετρήσεις λόγω του οργάνου.

2.2.8. Προσδιορισμός του βαθμού ακεραιότητας της βακτηριακής μεμβράνης

Προκειμένου να προσδιοριστεί η αφθονία των «ενεργών» και «μη ενεργών» βακτηρίων, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της διπλής χρώσης νουκλεϊκού οξέος (Nucleic Acid Double Staining) (Grégori et al. 2001), με μικρές τροποποιήσεις. Τα κύτταρα διακρίθηκαν σε διαγράμματα πράσινου έναντι κόκκινου φθορισμού. Ένα τμήμα του αρχικού δείγματος χρωματίστηκε ταυτόχρονα με τις φθορίζουσες χρωστικές SYBR Green I (Molecular Probes, τελική συγκέντρωση: 4×10^{-4}) και ιωδιούχο προπίδιο (PI, Molecular Probes, τελική

συγκέντρωση: $50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Τα δείγματα επώστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 20 min. Ένα επιπλέον δείγμα χρωματίστηκε μόνο με SYBR Green I και χρησιμοποιήθηκε για να υπολογιστεί και μετέπειτα αφαιρεθεί το ποσοστό των μη ενεργών κυττάρων από τα συνολικά βακτήρια. Το ποσοστό των ενεργών κυττάρων (δηλαδή αυτών που οι μεμβράνες τους δεν είναι διαπερατές στο PI) και μη ενεργών κυττάρων (δηλαδή αυτών που οι μεμβράνες τους είναι κατεστραμμένες και άρα διαπερατές στο PI) παρουσιάζεται επί της ολικής πικτοπλαγκτονικής αφθονίας. Χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος κυτταρομετρητής ροής όπως για την καταμέτρηση μικροβιακού πλαγκτού (Κεφάλαιο 2.2.6).

2.2.9. Εξαγωγή γενετικού υλικού, πολλαπλασιασμός και αλληλούχηση

Περίπου 20 L θαλασσινού νερού διηθήθηκαν μέσω πλέγματος πόρου $20 \mu\text{m}$ και έπειτα μέσω πολυανθρακικής μεμβράνης πόρου $1.0 \mu\text{m}$ ώστε να απομακρυνθούν τα μεγάλα σωματίδια και τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Στη συνέχεια, το νερό διηθήθηκε μέσω πολυανθρακικής μεμβράνης πόρου $0.2 \mu\text{m}$ (διαμέτρου 142 mm) για τη συλλογή των βακτηριακών κυττάρων. Το διήθημα μέσω του πόρου $0.2 \mu\text{m}$ συλλέχθηκε σε δοχείο πολυαιθυλενίου χαμηλής πυκνότητας 20 L και υπέστη χημική επεξεργασία με $1 \text{ mg L}^{-1} \text{ FeCl}_3$ με την οποία επιτεύχθηκε η συσσωμάτωση των ικών σωματιδίων, όπως περιγράφεται στους (John et al. 2011b). Συγκεκριμένα, το διάλυμα FeCl_3 παρασκευαζόταν την ημέρα της δειγματοληψίας και διατηρούνταν σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Μετά από τη χημική επεξεργασία, ακολούθησε έντονη ανακίνηση με τα χέρια των δοχείων με το διήθημα. Τα ικά σωματίδια συσσωματώθηκαν εντός των επόμενων περίπου 6-10 ωρών και στη συνέχεια συλλέχθηκαν εκ νέου σε μεμβράνη πόρου $1 \mu\text{m}$ (διαμέτρου 142 mm). Οι μεμβράνες αποθηκεύτηκαν στους 4°C στο σκοτάδι εν αναμονή επαναιώρησης. Για τη διήθηση χρησιμοποιήθηκε ανοξειδωτος υποδοχέας και περισταλτική αντλία (Masterflex) υπό χαμηλό κενό ($<150 \text{ mmHg}$) για να αποφευχθεί η θραύση των κυττάρων. Οι $0.2 \mu\text{m}$ μεμβράνες βυθίστηκαν σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι την εκχύλιση του γενετικού υλικού (DNA), η οποία έγινε χρησιμοποιώντας το CTAB πρωτόκολλο των Winneperenninckx *et al.* (1993). Συγκεκριμένα, οι μεμβράνες $0.2 \mu\text{m}$ θρυμματίστηκαν με γουδοχέρι κάτω από την συνεχή ροή υγρού αζώτου. Τα φίλτρα στη συνέχεια επώστηκαν στους 60°C για 2 ώρες σε 2 στροφές ανά λεπτό με 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος CTAB [2% CTAB (βρωμιούχο κετυλοτριμεθυλαμμώνιο), 100 mM TrisHCl (pH = 8), 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 0,2% β-μερκαπτοαιθανόλη, 0.1 mg mL^{-1} πρωτεΐνάση K, 10 mM DTT (διθειοθρεϊτόλη)]. Για τον καθαρισμό του DNA χρησιμοποιήθηκε ίσος όγκος διαλύματος χλωροφορμίου: ισοαμυλικής αλκοόλης (24: 1) και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 75000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά στους 4°C . Η υδατική φάση υποβλήθηκε σε κατεργασία με το ένζυμο RNάση και το στάδιο καθαρισμού με

χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη επαναλήφθηκε. Το DNA κατόπιν κατακρημνίστηκε με 2/3 όγκου ισοπροπανόλης ολονυχτίς και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 75000 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά στους 4 °C. Το DNA ξεπλύθηκε με 76% v/v αιθανόλη και 10 mM διάλυμα οξικού αμμωνίου. Το εκχυλισμένο DNA αραιώθηκε σε υπερκάθαρο νερό και αποθηκεύτηκε στους -20 °C μέχρι τον πολλαπλασιασμό με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και την μετέπειτα αλληλούχηση. Το βακτηριακό DNA προσδιορίστηκε ποσοτικά με φθοριόμετρο 3.0 Qubit™ (Thermo Fisher) και η ποιότητά του αξιολογήθηκε με φασματοφωτόμετρο NanoDrop (ND-100, Thermo Scientific), καθώς και με ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης.

Για τον πολλαπλασιασμό του DNA, χρησιμοποιήθηκε ένα πρωτόκολλο PCR δύο σταδίων: η πρώτη αντίδραση PCR έγινε με τους ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο 16S rRNA (341F: 5-CCTACGGGNGGCWGCAG-3 και 805RB: 5-GACTACNVGGGTATCTAATCC-3) ακολουθούμενο από μια καθολική 5' αλληλουχία-ουρά προσχεδιασμένη από την Illumina (Apprill et al. 2015). Η αντίδραση περιείχε το υπόστρωμα DNA, το ρυθμιστικό PCR διάλυμα με μείγμα νουκλεοτιδίων (dNTPs, 10x ρυθμιστικό διάλυμα AccuPrime™ PCR II), εμπρόσθιους και αντίστροφους εκκινητές (10 μM) και AccuPrime™ Taq DNA πολυμεράση υψηλής ακρίβειας (1 μονάδα). Η συγκέντρωση του αρχικού DNA ήταν περίπου 50 ng μL⁻¹. Τα στάδια του πρωτοκόλλου PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν: 98 °C για 3 min, 28 κύκλοι στους 98 °C για 30 sec, 55 °C για 30 sec, 72 °C για 30 sec, 72 °C για 5 min. Η δεύτερη PCR έγινε με εκκινητές που περιλάμβαναν τους δείκτες και τους συνδέτες Illumina και περιείχε το καθαρό υπόστρωμα DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης PCR (5x Q5, New England BioLabs®), μίγμα dNTPs (10 mM), εμπρόσθιους και αντίστροφους εκκινητές (10 μM) και την Q5® πολυμεράση υψηλής ακρίβειας (0.02 μονάδες μL⁻¹). Τα στάδια του πρωτοκόλλου PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν: 98 °C για 3 min, 8 κύκλοι στους 98 °C για 30 sec, 55 °C για 30 sec, 72 °C για 30 sec, 72 °C για 5 min. Το προϊόν της πρώτης PCR καθαρίστηκε χρησιμοποιώντας ειδικό κιτ καθαρισμού αντιδράσεων PCR ExoProStar™ ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το κιτ SequalPrep™ χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό και την κανονικοποίηση των προϊόντων της δεύτερης PCR, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η επεξεργασία των προϊόντων της PCR έγινε με όργανο Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) για να εξακριβωθεί η ποιότητά τους. Αρνητικοί έλεγχοι υπήρχαν σε όλες τις PCR. Η παρουσία και το μήκος των προϊόντων της PCR επιβεβαιώθηκαν με ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 1% w/v. Η αλληλούχηση των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε σε πλατφόρμα Illumina MiSeq στο Πανεπιστήμιο King Abdullah Science and Technology.

Για να γίνει η επαναιώρηση του ιικού γενετικού υλικού από τις μεμβράνες (μόνο για double stranded DNA), χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο John *et al.* (2011) που περιλαμβάνει υπερφυγοκέντρηση στα 141,000 g και εκχύλιση ακολουθώντας το ίδιο πρωτόκολλο CTAB όπως για τις παραπάνω μεμβράνες 0.2 μm (Winnepenninckx *et al.* 1993). Συγκεκριμένα, η επαναιώρηση έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα ασκορβικού οξέος το οποίο παρασκευαζόταν καθημερινά (0.25 M ασκορβικό οξύ, 0.2 M Mg₂EDTA, pH 6-7 ρυθμισμένο με Tris HCl και NaOH) και διατηρούνταν στο σκοτάδι. Μετά την προσθήκη του διαλύματος ακολούθησε ανακίνηση με το χέρι και περιστροφή κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 4 °C. Μετά την επαναιώρηση, τα ιικά σωματίδια στην υγρή φάση απομονώθηκαν από τη μεμβράνη με φυγοκέντρηση σε χαμηλή ταχύτητα. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ιικού DNA χρησιμοποιήθηκε το kit Qubit® ρυθμισμένο για υψηλή ευαισθησία σε φθορόμετρο 3.0 Qubit™ (Thermo Fisher). Στη συνέχεια, οι τρεις επαναλήψεις των μεσοκόσμων (C1- C2- C3 και NP1- NP2- NP3) ενώθηκαν για να αυξηθεί η συγκέντρωση του DNA για την μετέπειτα αλληλούχηση ολόκληρου του ιικού γονιδιώματος. Έγινε τμηματοποίηση του ιικού DNA στα 300 ζεύγη βάσεων (bp) χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο για Covaris υπερηχοβολέα (sonicator). Η ιική μετα-γονιδιωματική βιβλιοθήκη κατασκευάστηκε με σκοπό την αλληλούχηση σε πλατφόρμα Illumina Hiseq 4000 χρησιμοποιώντας το NEBNext Ultra DNA library Prep Kit for Illumina (New England BioLabs®), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η επιλογή του σωστού μήκους τμημάτων DNA έγινε χρησιμοποιώντας σφαιρίδια AMPure® XP (Beckman Coulter). Οι κύκλοι PCR ήταν 6 σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή που αφορούσαν την προστιθέμενη ποσότητα DNA. Η ποσότητα και η κατανομή μεγέθους του συνολικού προϊόντος προσδιορίστηκαν με kit ρυθμισμένο σε υψηλή ευαισθησία Qubit® και το όργανο Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies), αντίστοιχα, όπως περιγράφεται παραπάνω.

2.2.10. Επεξεργασία των προϊόντων αλληλούχησης

Οι ακατέργαστες αλληλουχίες των 16S rRNA γονιδίων ελέγχθηκαν ποιοτικά και αναλύθηκαν με τη χρήση τόσο του UPARSE v82 όσο και του QIIME v1.93. Οι αλληλουχίες των δύο άκρων σχηματίστηκαν με τον αλγόριθμο fastq-join (<https://code.google.com/p/ea-utils/wiki/FastqJoin>), συναρμολογώντας τις ακατέργαστες ορθές και ανάστροφες αναγνώσεις κάθε δείγματος με ελάχιστη επικάλυψη ορισμένη στα 50 νουκλεοτίδια και μέγιστο μιας μη αντιστοίχησης εντός της επικαλυπτόμενης περιοχής. Η ποιότητα των της συναρμολόγησης των αναγνώσεων ελέγχθηκε στη συνέχεια στο QIIME και οι εμπρόσθιοι και αντίστροφοι εκκινητές αφαιρέθηκαν από τα άκρα των αλληλουχιών. Το μοναδικό αρχείο που περιείχε όλες τις αναγνώσεις δειγμάτων εισήχθη στην UPARSE, όπου επιλέχθηκαν οι φυλότυποι

(operational taxonomic units, OTUs) που είχαν ομοιότητα αλληλουχίας 97%. Οι αλληλουχίες χίμαιρες αφαιρέθηκαν με ανίχνευση βάσει αναφοράς. Για την ανίχνευση βάσει αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων "Gold" (<http://microbiomeutil.sourceforge.net/>). Στη συνέχεια, οι αντιπροσωπευτικές αλληλουχίες των OTUs ταξινομήθηκαν στο QIIME με UClust4 χρησιμοποιώντας την πιο πρόσφατη βάση δεδομένων Greengenes. Τέλος, ο αριθμός των OTUs για κάθε δείγμα και η ταξινομική τους ανάλυση ενσωματώθηκαν σε έναν πίνακα OTU. Τα OTUs που συνδέονταν με το Βασίλειο των Αρχαίων και τα OTUs που δεν είχαν ταξινομική αναγνώριση αφαιρέθηκαν από τις περαιτέρω αναλύσεις. Ο προκύπτων πίνακας OTUs χρησιμοποιήθηκε για τις αναλύσεις για α και β ποικιλότητας.

Ιικά μετα-γονιδιώματα σε μορφή FASTQ εισήχθησαν στο CLC Genomics Workbench v.7 (CLC Bio) και τμηματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα ελάχιστο συντελεστή phred 20, ελάχιστο μήκος 50 bp, επιτρέποντας μη αμφιλεγόμενα νουκλεοτίδια και την περικοπή των adaptors Illumina (εφόσον βρίσκονταν). Οι προκύπτουσες αναγνώσεις συναρμολογήθηκαν χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο συναρμολόγησης *de novo* του CLC, χρησιμοποιώντας ένα k-mer 63 και ένα ελάχιστο μήκος αλληλουχίας 500 bp. Οι συναρμολογημένες αλληλουχίες στη συνέχεια αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τη σειρά αλγορίθμων iVirus (Bolduc et al. 2017) μέσω της πλατφόρμας Cyverse (Goff et al. 2011). Εν συντομία, αναγνωρίστηκαν ικές αλληλουχίες χρησιμοποιώντας το λογισμικό VirSorter, το οποίο ταξινομεί τις αλληλουχίες ιών (λυτικών και λυσιγονικών) με τρία επίπεδα βεβαιότητας πρόβλεψης. Σε αυτήν την εργασία, μόνο τα δύο πρώτα επίπεδα βεβαιότητας λήφθηκαν υπόψη για την ανάλυση. Με το λογισμικό VirSorter έγινε επίσης αναγνώριση ιών σε ταξινομικό επίπεδο. Στη συνέχεια, το λογισμικό vContact χρησιμοποιήθηκε για την αυτόματη ταξινόμηση του συνόλου των ιών στα δείγματα (guilt-by-contig-association automatic classification of viral contigs) και για τη ομαδοποίηση των προβλεπόμενων ικών πρωτεϊνών. Η κανονικοποίηση των αλληλουχιών έγινε χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής για τα ιικά σωματίδια. Ο κατάλογος των βοηθητικών μεταβολικών γονιδίων (AMGs) κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας την αναφορά (Hurwitz and U'Ren 2016). Συγκεκριμένα, τα AMGs που σχετίζονται με την φωτοσύνθεση στα κυανοβακτήρια (Puxty et al. 2015) μετρήθηκαν με σύγκριση των καθαρών αλληλουχιών έναντι μίας πρόσφατης βάσης δεδομένων των AMGs χρησιμοποιώντας το λογισμικό που περιγράφεται στους Buchfink et al. (2014) με μια τιμή $e < 10^{-6}$. Τα γονίδια ήταν τα ακόλουθα: *CP12*, *cpeT*, *gnd*, *hli*, *hol*, *pcyA*, *pebS*, *petF*, *petE*, *psbA*, *psbD*, *ptoX*, *talC* και *zwf*. Κατόπιν, τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με την αφθονία των ιικών σωματιδίων κάθε δείγματος που προέκυψε με κυτταρομετρία ροής. Η θέση πρόσδεσης του ιού (*attP*) που έχει πλήρη αντιστοιχία με το βακτηριακό γονίδιο tRNA (*attB*) (Mizuno et al. 2013) ταυτοποιήθηκε με σύγκριση των ιικών αλληλουχιών έναντι της

βάσης δεδομένων tRNADB-CE (Abe et al. 2014) με ελάχιστο όριο ταυτότητας ορισμένο στο 100%, όπως περιγράφεται στους Bellas *et al.* (2015).

2.2.11. Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων

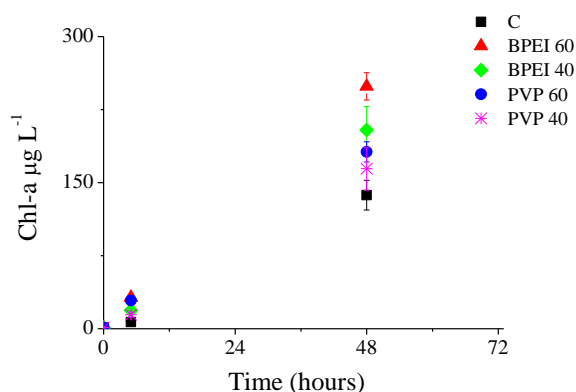
Έγινε ανάλυση της διακύμανσης τύπου επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (Repeated Measures ANalysis Of Variance, RM ANOVA) για να ελεγχθεί αν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε μια δεδομένη μεταβλητή μεταξύ των διαφορετικών πειραματικών συνθηκών (δηλαδή για τους μεσοκόσμους C και +NP) για όλη τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου. Επίσης, έγινε ανάλυση διακύμανσης με έναν παράγοντα (one way ANOVA) για να ελεγχθεί αν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε μια δεδομένη μεταβλητή κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου. Οι σημαντικές διαφορές μεταξύ των πειραματικών συνθηκών αξιολογήθηκαν με post-hoc Tukey τεστ (Tukey HSD). Πριν την εκτέλεση των αναλύσεων για τις RM ANOVAs ελέγχθηκε η υπόθεση της σφαιρικότητας (τεστ Mauchly) και για τις one way ANOVAs ελέγχθηκε η ομοιογένεια της διακύμανσης (τεστ Levene). Οι ANOVAs έγιναν στο λογισμικό IBM SPSS (v.22). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος (\pm τυπική απόκλιση) τριπλών επαναλήψεων. Εξάιρεση αποτελεί η ταξινομική ανάλυση των ιόντων και η συγκέντρωση των διαλελυμένων ιόντων Ag^+ που προέρχονται από μεμονωμένες μετρήσεις, όπως περιγράφηκε αναλυτικά παραπάνω.

Έγιναν περαιτέρω αναλύσεις για να εκτιμηθεί η επίδραση του «χρόνου» και της «πειραματικής συνθήκης», με την μηδενική υπόθεση ότι δεν υπάρχουν διαφορές χρησιμοποιώντας πολυπαραγοντική ανάλυση της διακύμανσης. Έγινε ανάλυση κύριων συνιστωσών για την ομαδοποίηση των δεδομένων και προσδιορισμός των πιθανών συσχετίσεων μεταξύ βιοτικών και αβιοτικών μεταβλητών με την ανάλυση BIO-ENV (Clarke and Ainsworth 1993). Τα πλέγματα ανομοιότητας τύπου Bray-Curtis υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας μετασχηματισμένα βιολογικά δεδομένα (τετραγωνική ρίζα) και οι Ευκλείδειες αποστάσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας κανονικοποιημένα αβιοτικά δεδομένα (Clarke and Warwick 1994). Ο έλεγχος υποθέσεων έγινε με 999 μεταθέσεις και για τις δοκιμές ανά ζεύγη χρησιμοποιήθηκε το επίπεδο σημαντικότητας 0.05. Οι τελευταίες αναλύσεις έγιναν με το λογισμικό πακέτο PRIMER v6 (PRIMER-E Ltd, Plymouth Marine Laboratory, Natural Environmental Research Council, UK) με πρόσθετο λογισμικό PERMANOVA + (Anderson et al. 2008; Somerfield 2008).

2.3. Αποτελέσματα

2.3.1. Επισκόπηση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων μικροκόσμων

Τα αποτελέσματα του πρώτου πειράματος μικροκόσμων οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι στη συγκέντρωση 200 ng Ag L^{-1} τα ΝΣ αργύρου με επικάλυψη PVP προκάλεσαν σημαντικά υψηλότερη τοξικότητα από ό,τι τα ΝΣ αργύρου με επικάλυψη BPEI. Πράγματι, ο ρυθμός διαλυτοποίησης των PVP ΝΣ αργύρου ήταν υψηλότερος (Toncelli et al. 2017) καθώς και η συγκέντρωση χλωροφύλλης (Εικόνα 2. 1) και η αφθονία των διατόμων *Nitzschia* ήταν χαμηλότερες. Για αυτό το λόγο, στο μετέπειτα πείραμα μεσοκόσμων επιλέχθηκαν τα BPEI ΝΣ αργύρου, ως λιγότερα τοξικά. Για τα ΝΣ αργύρου με επικάλυψη BPEI, τα αποτελέσματα για την τοξικότητα των διαφορετικών μεγεθών τους είχαν υψηλή επαναληψιμότητα, ενώ αυτό δεν ίσχυε για τα ΝΣ αργύρου με επικάλυψη PVP. Αφενός, τα 40 nm BPEI ήταν πιο τοξικά από τα 60 nm, με αρνητικές επιδράσεις των πρώτων στην συγκέντρωση της χλωροφύλλης και την αφθονία των διατόμων *Nitzschia*, επιβεβαιώνοντας πολυάριθμα βιβλιογραφικά ευρήματα πως η τοξικότητα των μικρών ΝΣ αργύρου είναι υψηλότερη. Αφετέρου, η πλακτονική κοινότητα που εκτέθηκε σε 40 nm PVP δεν φάνηκε να επηρεάζεται σημαντικά, ενώ η συγκέντρωση της χλωροφύλλης ήταν υψηλότερη μετά την έκθεση σε PVP 60 nm από ό,τι στους C μικρόκοσμούς. Το τελευταίο αυτό εύρημα ήταν ένας ακόμα λόγος που οδήγησε στην επιλογή των BPEI ΝΣ αργύρου για το πείραμα μεσοκόσμων.



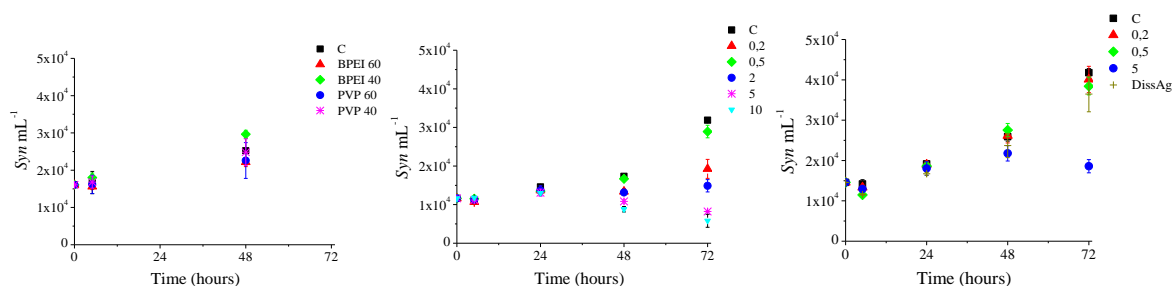
Εικόνα 2. 1. Συγκέντρωση χλωροφύλλης α (Chl-a, μέση τιμή και τυπική απόκλιση) στο πρώτο πείραμα μικροκόσμων στις χρονικές στιγμές 0 και 48 ώρες μετά την επώαση με ΝΣ αργύρου τύπου branched-polyethylenimine (BPEI) και Polyvinylpyrrolidone (PVP) με διάμετρο 40 και 60 nm. Το C αναφέρεται στους μικρόκοσμούς μάρτυρες.

Παρόλα αυτά, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων ήταν αρκετά περίπλοκη, καθώς η συγκέντρωση της χλωροφύλλης δεν επηρεάστηκε αρνητικά και στα τρία πειράματα μικροκόσμων, υπογραμμίζοντας τον κυρίαρχο ρόλο που παίζουν οι αρχικές συνθήκες του

διαλύτη: τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικές εποχές, με την θερμοκρασία του νερού, την ηλιακή ακτινοβολία και κυρίως την αρχική σύνθεση της κοινότητας να είναι πολύ διαφορετικές. Αρνητική επίδραση στην αφθονία των κυανοβακτηρίων (ειδικότερα των *Synechococcus*) βρέθηκε μόνο στο δεύτερο και τρίτο πείραμα μετά από έκθεση σε 200-10000 ng Ag L⁻¹ (Εικόνα 2. 2), επιβεβαιώνοντας την ευαισθησία του είδους στα ΝΣ αργύρου. Αυτό ήταν το μοναδικό εύρημα που παρατηρήθηκε σχεδόν σε όλα τα πειράματα (συνυπολογίζοντας τους μεσοκόσμους) και πιθανόν οφείλεται στα φυσιολογικά χαρακτηριστικά αυτών των κυττάρων.

Μόνο στο τρίτο πείραμα μικροκόσμων επηρεάστηκαν επίσης στελέχη μικρο-πλαγκτού. Συγκεκριμένα, η αφθονία και σύνθεση των δινομαστιγωτών τροποποιήθηκαν ως απόκριση στην προσθήκη 2000 ng Ag L⁻¹. Συγκεκριμένα, τα γένη *Gymnodinium*, *Prorocentrum* και *Gyrodinium* αυξήθηκαν σε αφθονία μετά την έκθεση σε ΝΣ αργύρου και ορισμένα γένη διατόμων είτε αυξήθηκαν (*Climacosphenia*) είτε μειώθηκαν (*Nitzschia* και *Navicula*).

Όταν συγκρίθηκε η επίδραση των Ag⁺ και του αργύρου σε νανοσωματιδιακή μορφή (ΝΣ αργύρου), παρατηρήθηκαν σχεδόν ταυτόσημα αποτελέσματα στα κυανοβακτήρια, διάτομα και δινομαστιγωτά. Υπήρχε μόνο ένα γένος δινομαστιγωτών (*Protoperdinium*) όπου τα Ag⁺ είχαν διαφορετική επιρροή και αυτό το εύρημα θα μπορούσε να είναι μια ένδειξη ότι ορισμένες ήπιες διαφοροποιήσεις καθοδηγούνται από τη μορφή του προστιθέμενου Ag. Παρότι ο ρυθμός απελευθέρωσης Ag⁺ από ΝΣ αργύρου στη φύση είναι μια αργή και μη συνεχής διαδικασία λόγω συσσωμάτωσης, καθίζησης και αλληλεπιδράσεων με τους οργανισμούς, στην αρχή αυτής της μελέτης εντοπίστηκαν αποκρίσεις σε διάφορα μικροβιακά στελέχη στο επίπεδο των ng Ag L⁻¹. Για τον λόγο αυτό, στο ακόλουθο, μεγάλης κλίμακας, πείραμα μεσοκόσμων επιλέχθηκε μια χαμηλή (άρα ρεαλιστική για το μέλλον) και ανιχνεύσιμη συγκέντρωση ΝΣ αργύρου.



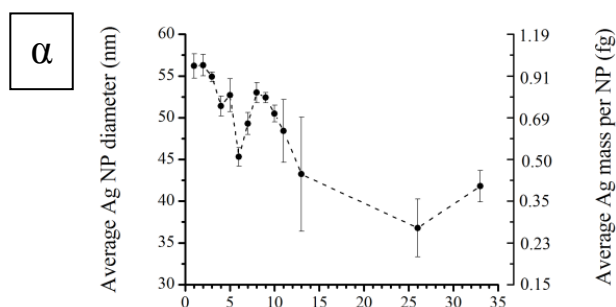
Εικόνα 2. 2. Αφθονία κυανοβακτηρίων (*Synechococcus*, *Syn*) στο πρώτο (αριστερά, Οκτώβριος), δεύτερο (κέντρο, Νοέμβριος) και τρίτο (δεξιά, Μάρτιος) πείραμα μικροκόσμων σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά την επώαση με ΝΣ αργύρου (BPEI: branched-polyethylenimine, PVP: Polyvinylpyrrolidone, 40 και 60 nm: διάμετρος,

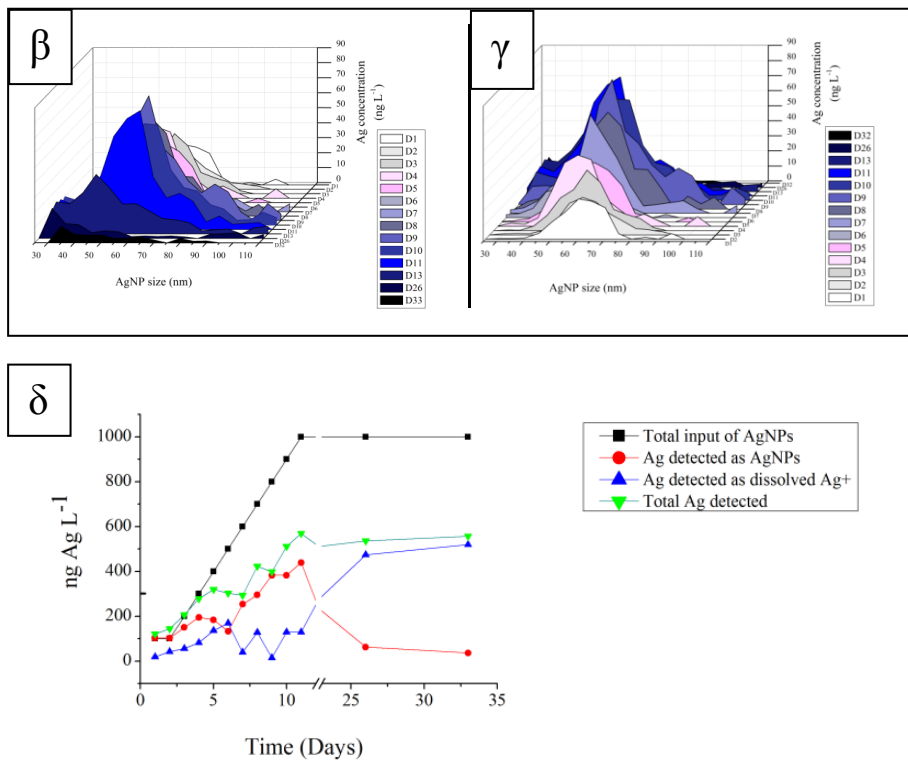
0,2-10: συγκεντρώσεις ΝΣ αργύρου σε $\mu\text{g L}^{-1}$, Diss Ag: ιόντα αργύρου). Το C αναφέρεται στους μικροκόσμους μάρτυρες όπου δεν προστέθηκαν ΝΣ αργύρου.

Σε αυτά τα πειράματα μικροκόσμων μελετήθηκε για πρώτη φορά η πλαγκτονική κοινότητα υπό έκθεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις ΝΣ αργύρου και φάνηκε πως κάποια γέννη μικρο-πλαγκτού επωφελήθηκαν και άλλα ζημιώθηκαν. Δεν υπήρχε καμία επίδραση στα ετερότροφα βακτήρια και τα βλεφαριδιωτά σε κανένα πείραμα. Η παρατήρηση πως μεμονωμένα στελέχη επηρεάστηκαν αρνητικά σε κάποιες κοινότητες έθεσε τη βάση για περαιτέρω ερωτήματα ως προς την αλλαγή της δομής της κοινότητας (και όχι της συνολικής αφθονίας) που μελετήθηκε στο επόμενο πείραμα μεσοκόσμων.

2.3.2. Μέγεθος και κατανομή μεγέθους των ΝΣ αργύρου στους μεσοκόσμους

Το μέσο μέγεθος των ΝΣ αργύρου άλλαξε σημαντικά στο χρόνο [RM ANOVA, $F(13)=15.39$, $p<0.05$]. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μια σταθερή μείωση του μεγέθους των ΝΣ αργύρου κατά τις αρχικές τέσσερις ημέρες του πειράματος (Tukey HSD, $p<0.05$, Εικόνα 2. 3). Την D6, παρατηρήθηκε μια ελάχιστη τιμή μεγέθους που ακολουθήθηκε από αύξηση και τελικά μια σταθερή μείωση ως την D10 μετά την τελευταία προσθήκη ΝΣ αργύρου (Εικόνα 2. 3). Η κατανομή μεγέθους των ΝΣ αργύρου την D1 αντικατόπτριζε μια τυπική κατανομή του βασικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα με BPEI επικάλυψη (Εικόνα 2. 3). Μετά την D3, η κατανομή μεγέθους των ΝΣ αργύρου άρχισε να γίνεται ευρύτερη. Ωστόσο, ακόμα και τότε, το μεγαλύτερο μέρος της μάζας Ag που ανιχνεύθηκε αντιστοιχούσε σε ΝΣ αργύρου μεταξύ 40 και 80 nm (Εικόνα 2. 3). Μια ιδιαίτερα έντονη αύξηση της αφθονίας ΝΣ αργύρου μικρότερων μεγεθών (δηλαδή <40 nm) ήταν πιο ευδιάκριτη τις τελευταίες ημέρες της προσθήκης ΝΣ αργύρου (Εικόνα 2. 3), ενώ παρατηρήθηκε και αυξανόμενη συγκέντρωση ΝΣ αργύρου μεγαλύτερων μεγεθών (ως προς την συνολική μάζα Ag) μετά τις D7 και D8, αλλά αυτή η συσσωμάτωση δεν ήταν πλέον ορατή τις D26 και D33 (Εικόνα 2. 3).





Εικόνα 2. 3. (α) Μέσος όρος μεγέθους ΝΣ αργύρου και αντίστοιχη μάζα αργύρου (δεξιός άξονας). (β-γ) Κατανομή συγκέντρωσης ΝΣ αργύρου από την αρχή προς το τέλος (αριστερά) και από το τέλος προς την αρχή (δεξιά) του πειράματος. (δ) Συγκεντρώσεις της συνολικής ποσότητας αργύρου που προστέθηκε (μαύρη γραμμή), της ποσότητας που ανιχνεύτηκε ως ΝΣ αργύρου (κόκκινη γραμμή), της ποσότητας που ανιχνεύτηκε ως ιόντα αργύρου (μπλε γραμμή) και της ποσότητας που ανιχνεύτηκε συνολικά σε οποιαδήποτε μορφή (πράσινη γραμμή). Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση τριπλών μετρήσεων και των τριών μεσοκόσμων, εκτός από τα ιόντα αργύρου που μετρήθηκαν μόνο στους C1 και NP1. C: μεσοκόσμοι μάρτυρες και +NP: μεσοκόσμοι όπου προστέθηκαν ΝΣ αργύρου.

Η συγκέντρωση του Ag που ανιχνεύτηκε ως ΝΣ αργύρου ($Ag_{\text{detected AgNPs}}$) άλλαξε σημαντικά στο χρόνο [RM ANOVA, $F(13)= 15.93$, $p<0.05$]. Η διαφορά χαρακτηρίστηκε από ανοδική τάση ενόσω γινόταν προσθήκη ΝΣ αργύρου (D0- D10) και σταδιακή πτώση μετά από την D11 (Tukey HSD, $p<0.05$) (Εικόνα 2. 3). Επιπλέον, η συγκέντρωση των διαλελυμένων Ag^+ αυξήθηκε από την D0 στην D6 και μετά ακολούθησε περίοδος έντονης διακύμανσης 3 ημερών (Εικόνα 2. 3). Τέλος, μεταξύ των ημερών D10 και D33 παρατηρήθηκε σταθερή αύξηση των Ag^+ . Εν τέλει, το άθροισμα των Ag^+ και $Ag_{\text{detected AgNPs}}$ (Ag_{total}) παρέμεινε σταθερό μεταξύ των D11 και D33. Ο άργυρος που ανιχνεύτηκε σε σωματιδιακή μορφή (δηλαδή στο κλάσμα μεγέθους $>0.2 \mu\text{m}$, που υποδηλώνει παρουσία μέσα σε ή συνδεδεμένο με μικροβιακά κύτταρα) ήταν λιγότερος σε σύγκριση με τις υπόλοιπες μορφές (Πίνακας 2. 1) και αντιπροσώπευε μόνο 0-8% του Ag_{total} . Μεταξύ των ημερών D6 και D33, ανιχνεύθηκε κατά μέσο όρο το $55 \pm 4\%$ του προστιθέμενου Ag είτε σε σωματιδιακή, διαλελυμένη ιοντική ή νανοσωματιδιακή μορφή, ενώ αυτό το ποσοστό ήταν πολύ υψηλότερο ($86 \pm 9\%$) κατά τη διάρκεια των ημερών D4-D5 (Εικόνα 2. 3).

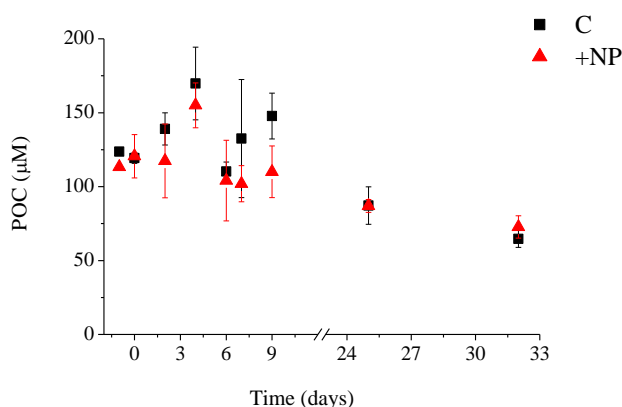
Πίνακας 2. 1. Συγκέντρωση αργύρου σε μορφή διαλελυμένων ιόντων (πρώτη στήλη, κλάσμα 0.2-5.0 μm), σε νανο-σωματιδιακή μορφή (δεύτερη στήλη, κλάσμα 0.2-5.0 μm) και συγκέντρωση ολικού ανιχνεύσιμου αργύρου στο κλάσμα $>5.0 \mu\text{m}$.

Ημέρα	Διαλελυμένα ιόντα Ag^+ (0.2-5.0 μm)	ΝΣ αργύρου (0.2-5.0 μm)	Συνολικός ανιχνεύσιμος Ag ($> 5.0 \mu\text{m}$)
2	8.63E-04	0.90	3.71
4	2.14E-03	1.86	18.69
8	8.61E-04	1.67	32.70
10	3.09E-03	2.57	33.84
13	5.71E-03	4.04	67.14
26	1.14E-03	0.84	16.40
33	2.49E-04	1.27	12.25

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 2. 3, η μεγαλύτερη συνεισφορά των Ag^+ στο Ag_{total} μετρήθηκε μεταξύ των D13-D33, των ΝΣ αργύρου μεταξύ D1-D4 και D7-D11 και η υψηλότερη συνεισφορά των σωματιδιακών μορφών Ag την D4 και D8, που οφειλόταν κυρίως στο κλάσμα μεγέθους $>5 \mu\text{m}$ (Πίνακας 2. 1).

2.3.3. Χημικές παράμετροι στους μεσοκόσμους

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις των διαλελυμένων και σωματιδιακών θρεπτικών στοιχείων και της χλωροφύλλης μεταξύ των μεσοκόσμων (δεν παρουσιάζονται). Οι μέσες αρχικές συγκεντρώσεις των φωσφορικών ιόντων και του διαλελυμένου ανόργανου αζώτου στους μεσοκόσμους ήταν $0.012 \mu\text{M}$ (± 0.002) και $1.51 \mu\text{M}$ (± 0.20), αντίστοιχα. Η συγκέντρωση του σωματιδιακού οργανικού άνθρακα αυξήθηκε από $118.51 \mu\text{g L}^{-1}$ (± 4.47) την D-1 έως $156.48 \mu\text{g L}^{-1}$ (± 20.54) την D4 (Εικόνα 2. 4), ενώ οι συγκεντρώσεις του σωματιδιακού οργανικού αζώτου και ολικού οργανικού άνθρακα διέφερε ελάχιστα στο χρόνο και στους μεσοκόσμους.

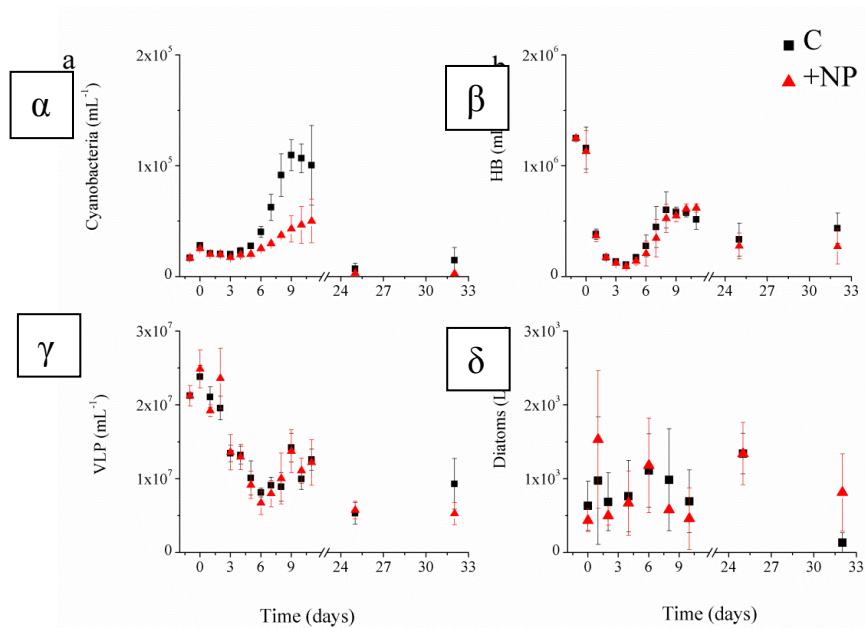


Εικόνα 2. 4. Συγκέντρωση σωματιδιακού οργανικού άνθρακα (particulate organic carbon, POC) στους μεσοκόσμους στην διάρκεια του πειράματος. C: μεσόκοσμοι μάρτυρες και +NP: μεσόκοσμοι όπου προστέθηκαν ΝΣ αργύρου.

Οι μεταβολές της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης (ολικής και των υποκατηγοριών πικο- και νανο-/μικρο-, αντίστοιχα) ήταν σχεδόν όμοιες μεταξύ των μεσοκόσμων και χαρακτηρίστηκαν από μια απότομη αύξηση (από 0.14 ± 0.01 την D0 σε $0.48 \pm 0.13 \mu\text{g L}^{-1}$ την D2).

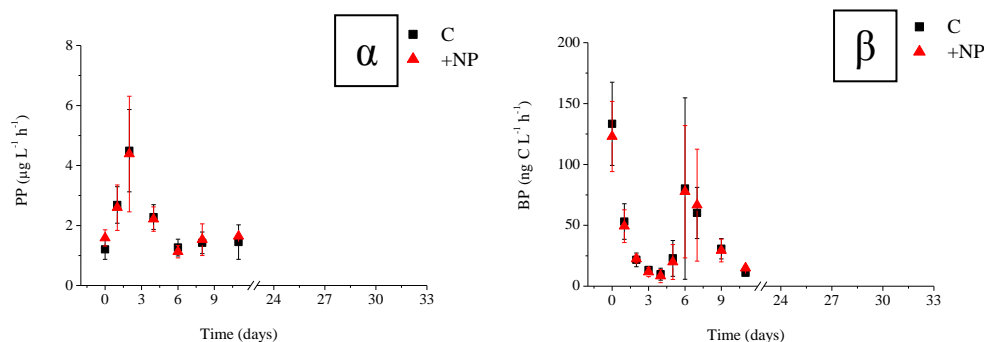
2.3.4. Αφθονίες μικροβιακού πλαγκτού και ρυθμοί παραγωγής φυτοπλαγκτού και ετερότροφων βακτηρίων στους μεσοκόσμους

Παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην αφθονία των κυανοβακτηρίων μεταξύ των μεσοκόσμων C και +NP [RM ANOVA, $F(14)= 43$, $p<0.05$], κατά κύριο λόγο λόγω της μείωσης της αφθονίας των *Synechococcus*. Την D-1, η μέση αφθονία των κυανοβακτηρίων *Synechococcus* και *Prochlorococcus* σε όλους τους μεσοκόσμους ήταν 1.68×10^4 κύτταρα mL^{-1} ($\pm 1.71 \times 10^3$) και μετά την D6 ήταν χαμηλότερη στους +NP σε σύγκριση με τους C (Tukey HSD, $p<0.05$) (Εικόνα 2. 5). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 2. 5, παρατηρήθηκε επίσης μικρή αυξητική τάση στο χρόνο στα *Synechococcus* και στους +NP μεταξύ των ημερών D6 και D11. Παρόλα αυτά, η αφθονία αυτών των κυττάρων ήταν σημαντικά χαμηλότερη από ό, τι στους C (Tukey HSD, $p<0.05$). Αντίθετα, δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στις αφθονίες των HB και VLPs μεταξύ των μεσοκόσμων. Τα HB και VLPs είχαν μια απότομη μείωση από την αρχή ως την D4 και επανήλθαν σχεδόν στο ήμισυ των αρχικών επιπέδων τους την D10 σε όλους τους μεσοκόσμους (Εικόνα 2. 5). Η συγκέντρωση των ROS που παρήχθησαν από το πικο- πλαγκτόν δεν διέφερε μεταξύ των μεσοκόσμων και ο φθορισμός ήταν χαμηλός καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται). Παρόλα αυτά, λαμβάνοντας υπόψη τους περιορισμούς της μεθόδου όσον αφορά την ποσοτικοποίηση του H_2O_2 και άλλων τύπων ROS (Kalyanaraman et al. 2012) καθώς και το γεγονός ότι εξετάστηκε μόνο το πικο- κλάσμα μεγέθους, τα δεδομένα ROS αντιμετωπίστηκαν μόνο ως ένδειξη.



Εικόνα 2. 5. Αφθονίες κυανοβακτηρίων (Cyanobacteria, α), ετερότροφων βακτηρίων (heterotrophic bacteria, HB, β), ικών σωματιδίων (virus-like particles, VLP, γ) και διατόμων (Diatoms, δ) στους μεσοκόσμους στην διάρκεια του πειράματος. C: μεσόκοσμοι μάρτυρες και +NP: μεσόκοσμοι όπου προστέθηκαν ΝΣ αργύρου.

Η αφθονία των High DNA βακτηρίων (βάσει κυτταρομετρικής ανάλυσης) και των «ενεργών» βακτηρίων μειώθηκε και έφθασε στο ελάχιστο τις D5 και D4, αντίστοιχα, σε όλους τους μεσοκόσμους (High DNA βακτήρια: $42 \pm 7\%$ και «ενεργά» βακτήρια: $<50\%$, δεν παρουσιάζονται). Η αφθονία των πικο- και νανο- ευκαρυωτικών κυττάρων δεν διέφερε μεταξύ των μεσοκόσμων (δεν παρουσιάζονται). Πιο συγκεκριμένα, η αφθονία των αυτότροφων ήταν χαμηλή στις αρχικές συνθήκες και αυξήθηκε την D2, ενώ των ετερότροφων εμφάνισε διαφορετικά πρότυπα στο χρόνο. Παρομοίως, η συνολική αφθονία δινομαστιγωτών δεν διέφερε μεταξύ των μεσοκόσμων: αρχικά ήταν υψηλή (5463 ± 2088 κύτταρα L^{-1}) και αυξήθηκε περαιτέρω την D6 σε όλους τους μεσοκόσμους. Τέλος, η συνολική αφθονία των διατόμων και βλεφαριδωτών δεν διέφερε μεταξύ των μεσοκόσμων. Ειδικότερα, τα διάτομα διαφοροποιήθηκαν ελάχιστα στο χρόνο (Εικόνα 2. 5), ενώ τα βλεφαριδωτά έφτασαν σε μέγιστη αφθονία την D6, που ήταν περίπου 100 φορές υψηλότερη από ό, τι η αρχική (δεν παρουσιάζονται).



Εικόνα 2. 6. Πρωτογενής παραγωγή (primary production, PP, α) και παραγωγή ετερότροφων βακτηρίων (heterotrophic bacterial production, BP, β) στους μεσοκόσμους στην διάρκεια του πειράματος. C: μεσόκοσμοι μάρτυρες και +NP: μεσόκοσμοι όπου προστέθηκαν ΝΣ αργύρου.

Ούτε η πρωτογενής παραγωγή ούτε η παραγωγή των ετερότροφων βακτηρίων επηρεάστηκαν από την προσθήκη ΝΣ αργύρου. Παρατηρήθηκε μια έντονη αύξηση στην πρωτογενή παραγωγή την D2 (Εικόνα 2. 6), οπότε και κυριαρχούσε το κλάσμα μεγέθους των νανο-/μικρο-πλαγκτονικών κυττάρων (~55%). Η χαρακτηριστική μεταβολή της BP ήταν μια γρήγορη και έντονη μείωση από την αρχή του πειράματος ως την D4 (Εικόνα 2. 6).

2.3.5. Σύσταση κοινοτήτων ιών, βακτηρίων και μικρο-πλαγκτού στους μεσοκόσμους

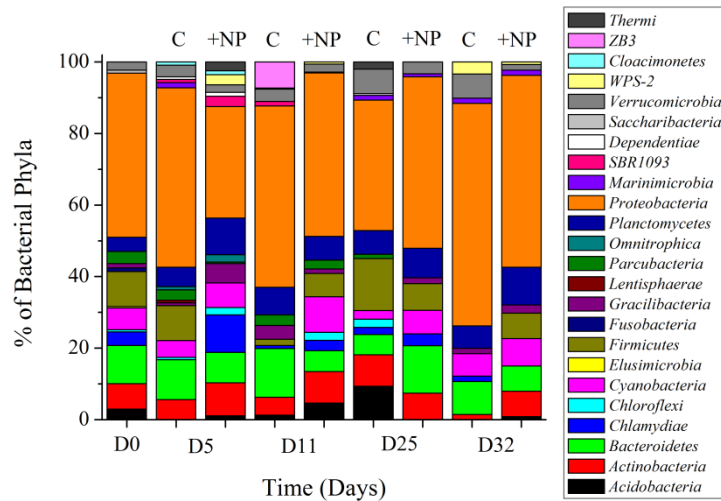
Συνολικά 3.060.263 ακατέργαστες 16S rRNA αλληλουχίες προέκυψαν από την αλληλούχηση στην πλατφόρμα MiSeq. Μετά την αφαίρεση των αλληλουχιών χαμηλής ποιότητας (~25%), των χιμαιρών (~2%) και των OTUs που δεν είχαν γνωστή ταξινομική ή αποδίδονταν στο Βασίλειο των *Archaea* (363 OTUs), ο τελικός πίνακας OTUs περιελάμβανε 1.434.253 αλληλουχίες που αποτέλεσαν 1359 OTUs. Ο αριθμός των αλληλουχιών ανά δείγμα κυμαινόταν από 15.621 (D32 στον C2) έως 166.466 (D25 στον C2) με κατά μέσο όρο 65.197 αλληλουχίες ανά δείγμα.

Πίνακας 2. 2. Δείκτης ομοιογένειας (Pielou) και ποικιλότητας (Shannon-Wiener) για τη βακτηριακή και ιική κοινότητα με βάση τα πληθυσμιακά δεδομένα για τις ημέρες 0, 5, 11, 25 και 32. C: μεσόκοσμοι μάρτυρες και +NP: μεσόκοσμοι όπου προστέθηκαν ΝΣ αργύρου. Οτιδήποτε είναι έντονα μαρκαρισμένο υποδηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας ($p < 0.05$).

Ημέρα	Βακτήρια				Ιοί			
	Pielou δείκτης ομοιογένειας		Shannon-Wiener δείκτης ποικιλότητας		Pielou δείκτης ομοιογένειας		Shannon-Wiener δείκτης ποικιλότητας	
	C	+NP	C	+NP	C	+NP	C	+NP
D0	0.44	0.78	4.10	6.47	0.61	0.61	4.31	4.31
D5	0.46±0.02	0.53±0.05	3.76±0.21	4.18±0.39	0.63	0.70	4.64	4.96
D11	0.50±0.08	0.52±0.05	3.85±0.54	4.45±0.45	0.66	0.64	5.05	4.64
D25	0.58±0.03	0.46±0.01	5.11±0.48	3.90±0.04	0.70	0.61	5.43	4.01
D32	0.53±0.02	0.45±0.01	4.20±0.03	3.79±0.07	0.63	0.65	4.24	4.72

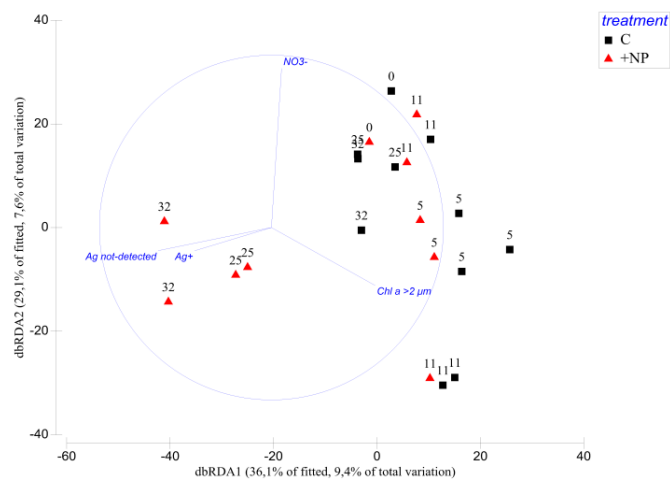
Τα πρότυπα του δείκτη βακτηριακής ομοιογένειας Pielou και ποικιλότητας Shannon (Πίνακας 2. 2) ήταν στατιστικά διαφορετικά μεταξύ των μεσοκόσμων C και +NP [RM ANOVA, $F(2)=15.83$, $p<0.05$ και RM ANOVA, $F(2)=17.13$, $p<0.05$, αντίστοιχα]. Συγκεκριμένα, και οι δύο δείκτες ήταν υψηλότεροι στους +NP σε σύγκριση με τους C τις D5 και D11, και χαμηλότεροι στους +NP σε σύγκριση με τους C τις D25 και D32 (Tukey HSD, $p<0.05$). Πράγματι, τα αποτελέσματα της ανάλυσης PERMANOVA έδειξαν ότι στο ταξινομικό επίπεδο της οικογένειας, η συνδυαστική επίδραση των παραμέτρων «χρόνος» και «πειραματική συνθήκη» προκάλεσε σημαντικές διαφορές στα πρότυπα της βακτηριακής κοινότητας (Pseudo-F = 1.36, $p<0.05$), ενώ στο επίπεδο του γένους ο σημαντικός παράγοντας ήταν μόνο ο «χρόνος» (Pseudo-F = 1.39, $p<0.05$).

Η αφθονία των *Proteobacteria* ήταν χαμηλότερη στους +NP από ότι στους C κατά την D5 (Tukey HSD, $p<0.05$) (Εικόνα 2. 7), με την τάξη των *Gammaproteobacteria* να εμφανίζει μείωση ~70% μεταξύ D0 και D5 στους +NP. Τα φύλα *Firmicutes*, *Bacteroidetes* και *Verrucomicrobia* παρουσίασαν επίσης χαμηλότερες αφθονίες στους +NP σε σύγκριση με τους C τις D5 και D11. Το αντίθετο παρατηρήθηκε για τα φύλα *Acidobacteria*, *Actinobacteria* και *Planctomycetes*, τα οποία ήταν περισσότερο εμπλουτισμένα στους +NP σε σύγκριση με τους C όλες τις ημέρες, εκτός από την D25. Την D0 τα κυρίαρχα OTUs ταξινομήθηκαν ως *Proteobacteria* (45.8%) και τα επόμενα πιο άφθονα φύλα ήταν τα *Bacteroidetes* (10.7%), *Firmicutes* (9.7%) και *Actinobacteria* (7.1%) (Εικόνα 2. 7). Το ποσοστό των *Deltaproteobacteria* διέφερε ελαφρώς στο χρόνο μέχρι την D11 και τελικά στις D25 και D32 ήταν χαμηλότερο στους C σε σχέση με τους +NP (6.1 και 0% για τους C, και 12.1 και 4.1% για τους +NP, αντίστοιχα). Τα *Betaproteobacteria* ήταν σταθερά σε όλους τους μεσοκόσμους όσον αφορά την ποσοστιαία συνεισφορά τους και μια ήπια διαφορά παρατηρήθηκε μόνο τις D25 και D32 μεταξύ των C και +NP (χαμηλότερη συνεισφορά στους +NP).



Εικόνα 2. 7. Αλλαγές στη σύσταση της βακτηριακής κοινότητας στο επίπεδο του φύλου (% Bacterial Phyla) στους μεσοκόσμους τις ημέρες 0, 5, 11, 25 και 32. C: μεσοκόσμοι μάρτυρες και +NP: μεσοκόσμοι όπου προστέθηκαν ΝΣ αργύρου.

Παρομοίως, η συμβολή των *Alphaproteobacteria* ήταν επίσης ίδια μεταξύ των διαφορετικών μεσοκόσμων, εκτός από την D25 όπου ήταν υψηλότερη στους +NP. Σπάνια φύλα, συμπεριλαμβανομένων των *Elusimicrobia*, *Fusobacteria* και *TM7*, απουσίαζαν από όλους τους μεσοκόσμους εκτός από την αρχή του πειράματος (D0). Τα φύλα *SBR1093*, *Omnitrphica* και *Gracilibacteria* παρουσίασαν υψηλότερο ποσοστό μόνο την D5 στους +NP σε σύγκριση με τους C.



Εικόνα 2. 8. Ανάλυση τύπου distance-based redundancy analysis (dbRDA) για τις βακτηριακές κοινότητες στο επίπεδο του γένους βάσει των παραμέτρων «πειραματική συνθήκη» (δηλαδή, C και +NP) και «χρόνος» (ημέρες 0, 5, 11, 25 και 32). Μόνο οι στατιστικά σημαντικές βιοτικές παράμετροι χρησιμοποιούνται στο μοντέλο (δηλαδή: συγκέντρωση χλωροφύλλης [Chl a >2 μm], νιτρικών [NO₂⁻], αργύρου που ανιχνεύτηκε ως ιόντα [Ag⁺] και αργύρου που δεν ανιχνεύτηκε [Ag not detected]). Το μήκος των γραμμών επισημαίνουν τη σχετική ένταση της

συσχέτισης. Η ομοιότητα των κοινοτήτων βασίστηκε στον υπολογισμό του δείκτη Bray Curtis μετά από μετασχηματισμό των 16S rRNA γονιδίων (τετραγωνική ρίζα).

Τα πρότυπα της βακτηριακής κοινότητας στο ταξινομικό επίπεδο της οικογένειας συσχετίστηκαν σημαντικά με τις ακόλουθες μεταβλητές: χλωροφύλλη στο κλάσμα μεγέθους >2 μm, NO₃⁻, ιόντα Ag⁺ και Ag που δεν ανιχνεύθηκε (R² = 0.25, AICc = 187.46, p<0.05). Όταν στο γραμμικό μοντέλο εισήχθησαν μόνο οι τέσσερις σημαντικές παράμετροι (κριτήρια επιλογής: AICc, διαδικασία επιλογής: σταδιακή), βρέθηκε ότι το 24.71% της μεταβλητότητας των βακτηριακών οικογενειών εξηγήθηκε από τη σωρευτική δράση τους (p<0.05) (Εικόνα 2. 8). Στο ταξινομικό επίπεδο της τάξης, η συγκέντρωση των NO₂⁻ αύξησε την εξήγηση της μεταβλητότητας των βακτηριακών προτύπων στο 30.81%.

Εκτός από την ταξινομική ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA, τα ιικά γονίδια (λυτικά και λυσιγονικά) ταξινομήθηκαν επίσης στο χαμηλότερο δυνατό επίπεδο. Η επεξεργασία των ικών μετα-γονιδιωμάτων είχε ως αποτέλεσμα την πρόβλεψη 38.592 επεξεργασμένων ικών αλληλουχιών με τον υψηλότερο δείκτη αξιοπιστίας. Στον Πίνακα 2. 3 παρουσιάζεται η αφθονία των κυκλικών αλληλουχιών, των λυσιγονικών γονιδίων (δηλαδή όσων είναι ενσωματωμένα σε αλληλουχία μικροβιακής προέλευσης), των λυτικών γονιδίων (ιοί ds και ssDNA), των αλληλουχιών που δεν είχαν γνωστή ταξινομική και των ικών φάγων και επίσης παρουσιάζεται ο αριθμός των υποθετικών πρωτεϊνών που προβλέπονται από τις ικές αλληλουχίες στους μεσοκόσμους στο χρόνο. Το 26.1-37.7% των προβλεπόμενων αλληλουχιών δεν είχε αντιστοίχιση σε αλληλουχία ικής προέλευσης. Κατά μέσο όρο, το 83.4% (± 1.5) των υπολοίπων γονιδίων είχε συγγένεια με την κλάση των *Caudovirales*, ενώ το 12.1% (± 1.1) δεν είχε συγγένεια με καμία γνωστή ομάδα ιών.

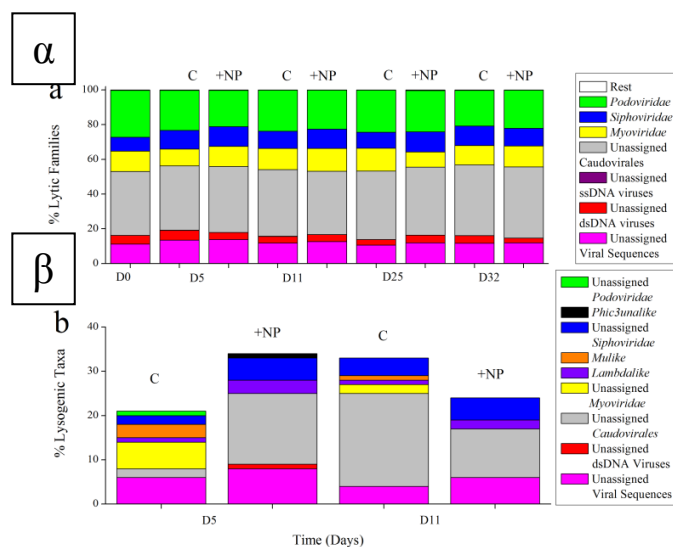
Πίνακας 2. 3. Καταμερισμός του τύπου ικών αλληλουχιών που βρέθηκαν με το λογισμικό VirSorter στους μεσοκόσμους τις ημέρες 0, 5, 11, 25 και 32. Οι αλληλουχίες περιλαμβάνουν: αλληλουχίες κυκλικές, λυσιγονικές, λυτικές, άγνωστες ικές, άγνωστες μη ικές και αλληλουχίες ικών φάγων. Η αναγνώριση έγινε με βάση την Κατηγορία 3 του προγράμματος (ύψιστη αξιοπιστία).

Ημέρα	Κυκλικές αλληλουχίες		Λυσιγονικά γονίδια		Λυτικά γονίδια		Άγνωστες ικές αλληλουχίες		Ιικοί φάγοι		Αλληλουχίες μη ικής προέλευσης		Αντίγραφα γονιδίου <i>attP</i>	
	C	+NP	C	+NP	C	+NP	C	+NP	C	+NP	C	+NP	C	+NP
D0	42	42	0	0	2824	2824	353	353	0	0	37.7	37.7	73	73
D5	73	82	21	26	3685	3329	574	526	12	8	34.2	33.1	55	388
D11	92	80	33	24	5874	3757	787	541	11	11	36.2	35.8	138	79
D25	155	30	23	0	6344	1751	764	237	10	0	37.4	34.0	111	0
D32	44	128	0	10	2482	3739	324	494	4	13	26.1	29.5	0	47

Η ταξινομική ανάλυση των λυτικών γονιδίων έδειξε πως δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των C και +NP ούτε στο επίπεδο οικογένειας ούτε σε αυτό του γένους. Η συνεισφορά των οικογενειών *Myoviridae*, *Podoviridae* και *Siphoviridae* ήταν παρόμοια στα

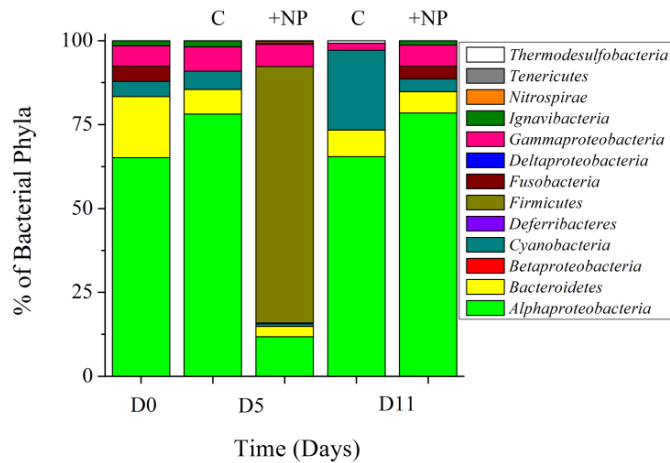
διαφορετικά χρονικά σημεία και στους μεσοκόσμους (Εικόνα 2. 9). Εξαίρεση αποτελεί η ελαφρώς χαμηλότερη αφθονία των *Μυοιριδαε* στους +NP (8.8%) από ότι στους C (13.2%) την D25 και η υψηλότερη αφθονία των σπάνιων οικογενειών *Μικροβιριδαε*, *Ινοβιριδαε* και *Λιποθριξβιριδαε* στους +NP σε σχέση με τους C κατά τη διάρκεια αρκετών ημερών (δεν παρουσιάζονται). Παρόλα αυτά, όπως και για τα βακτήρια, ο δείκτης ομοιογένειας Ριελου για τους ιούς έδειξε αντίθετες τάσεις μεταξύ C και +NP (Πίνακας 2. 2). Εντός των *Σιφονβιριδαε*, τα γένη *Λαμβδαλικε*, *Τ5λικε*, *Τυναλικε* και *Υαλικε* συνεισέφεραν ελαφρώς περισσότερο στους +NP από ότι στους C ορισμένες μέρες. Τα *Ποδovιριδαε* είχαν την αντίθετη συμπεριφορά, με ελαφρώς χαμηλότερα ποσοστά στους +NP, ενώ τα γένη *Ν4λικε* και *Τ7λικε* ήταν κυρίως υπεύθυνα. Η οικογένεια *Τεκτιβιριδαε* ήταν παρούσα μόνο τις D0 και D5 στους C.

Σε αντίθεση με τα λυτικά γονίδια, τα λυσιγονικά *Σιφονβιριδαε* (μη αναγνωρισμένα γένη και το γένος *Phic3unalike*) ήταν πιο άφθονα από ότι τα *Μυοιριδαε* (μη αναγνωρισμένα γένη και τα γένη *Λαμβδαλικε* και *Μυλικε*) στους +NP. Αντιθέτως, τα λυσιγονικά *Σιφονβιριδαε* ήταν είτε ίσα είτε λιγότερο άφθονα από ότι τα *Μυοιριδαε* στους C (Εικόνα 2. 9). Τα *Σιφονβιριδαε* ήταν επίσης πιο άφθονα στους +NP από ότι στους C τις D5 και D11 (Εικόνα 2. 9).



Εικόνα 2. 9. Αλλαγές στη σύσταση της λυτικής (α) και λυσιγονικής (β) ικής κοινότητας στο κατώτερο δυνατό ταξινομικό επίπεδο στους μεσοκόσμους τις ημέρες 0, 5, 11, 25 και 32. C: μεσοκόσμοι μάρτυρες και +NP: μεσοκόσμοι όπου προστέθηκαν ΝΣ αργύρου.

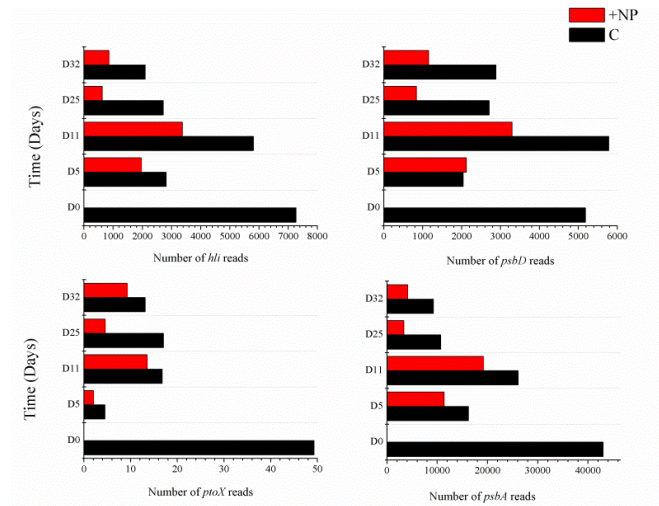
Λυσιγονικά γονίδια ανιχνεύθηκαν την D25 μόνο στους C και την D32 μόνο στους +NP (αυτά τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Και σε αυτές τις ικές αλληλουχίες η πλειονότητα (65.0-87.0%) είχε συγγένεια με την τάξη *Caudovirales*. Το λυσιγονικό γένος *Μυλικε* της οικογένειας *Μυοιριδαε* δεν βρέθηκε στους +NP την D5 και D11, σε αντίθεση με τους C όπου ανιχνεύθηκε ένας μικρός αριθμός.



Εικόνα 2. 10. Θεωρητική αντιστοίχιση βακτηριακού ξενιστή στους λυσιγονικούς ιούς στους μεσοκόσμους τις ημέρες 0, 5 και 11 (επί τοις εκατό). Παρουσιάζονται μόνο οι 100% αντιστοιχίσεις των γονιδίων με όριο e-value $<10^{-5}$.

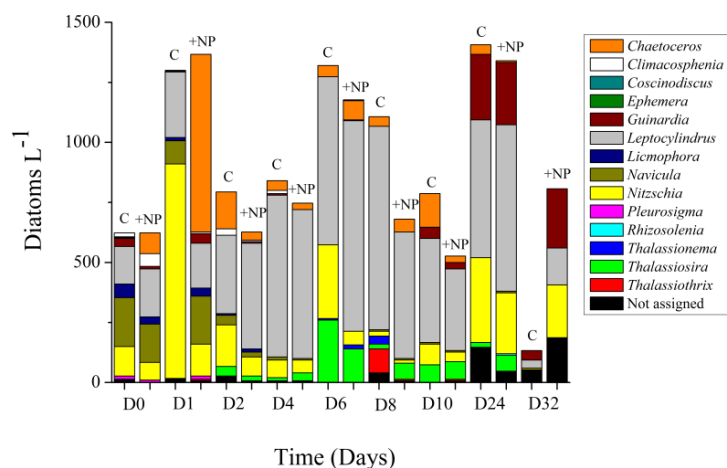
Εξαιρετικά υψηλή αφθονία αντιγράφων του γονιδίου ιική ενσωματάση παρατηρήθηκε την D5 στους +NP (Πίνακας 2. 3). Κάνοντας την ανάλυση για την υποθετική ταξινομική αντιστοίχιση αυτού του γονιδίου σε βακτηριακό ξενιστή, διαπιστώθηκε ότι η πλειοψηφία των ξενιστών των λυσιγονικών ιών ανήκε στο φύλο *Firmicutes* (Εικόνα 2. 10). Είναι αξιοσημείωτο ότι τα φύλα *Firmicutes* και *Cyanobacteria* ήταν πάντοτε λιγότερο άφθονοι ξενιστές στους +NP σε σχέση με τους C (Εικόνα 2. 7).

Σε αντίθεση με την αφθονία του γονιδίου ιική ενσωματάση, παρατηρήθηκαν σημαντικά χαμηλότερες αφθονίες των AMGs που σχετίζονταν με τη μεταφορά ηλεκτρονίων κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης (*psbA*, *hli*, *psbD*, *ptoX*) στους +NP από ότι στους C (Εικόνα 2. 11). Άλλα AMGs που επίσης εμπλέκονται στη φωτοσύνθεση των κυανοβακτηρίων είχαν ελαφριά διακύμανση μεταξύ μεσοκόσμων και χρονικών σημείων (δεν παρουσιάζονται).



Εικόνα 2. 11. Αφθονία των ικών βοηθητικών μεταβολικών γονιδίων *hli*, *psbD*, *ptoX* και *psbA* στους μεσοκόσμους στην διάρκεια του πειράματος. C: μεσοκόσμοι μάρτυρες και +NP: μεσοκόσμοι όπου προστέθηκαν ΝΣ αργύρου.

Τέλος, η σύσταση της κοινότητας των δινομαστιγωτών (συμπεριλαμβανομένων των γενών *Ceratium*, *Gymnodinium*, *Gyrodinium*, *Noctiluca*, *Oxytoxum*, *Peridinium*, *Prorocentrum* και *Protoperidinium*) και των διατόμων (συμπεριλαμβανομένων των γενών *Bacteriastrium*, *Chaetoceros*, *Climacosphenia*, *Coscinodiscus*, *Ephemera*, *Guinardia*, *Leptocylindurs*, *Licmophora*, *Navicula*, *Nitzschia*, *Pleurosigma*, *Rhizosolenia*, *Thalassiosira*, *Thalassionema* και *Thalassiosithrix*) διέφερε ως προς τον «χρόνο» (Pseudo-F(8)= 23.08, $p < 0.05$ και Pseudo-F(8)= 5.67, $p < 0.05$, αντίστοιχα), αλλά όχι ως προς την «πειραματική συνθήκη». Υπήρξε επίδραση μόνο στις αφθονίες ορισμένων γενών διατόμων: η αφθονία του γένους *Nitzschia* ήταν υψηλότερη στους C από ότι στους +NP τις D1, D2 και D6. Η αφθονία του γένους *Thalassiosira* ήταν υψηλότερη στους C από ότι στους +NP την D6. Η αφθονία του γένους *Leptocylindurs* ήταν υψηλότερη στους +NP από ότι στους C τις D6 και D24, και τέλος η αφθονία του γένους *Chaetoceros* ήταν υψηλότερη στους +NP από ότι στους C την D1 (Εικόνα 2. 12).



Εικόνα 2. 12. Αλλαγές στη σύσταση της κοινότητας διατόμων στους μεσοκόσμους στην διάρκεια του πειράματος. C: μεσόκοσμοι μάρτυρες και +NP: μεσόκοσμοι όπου προστέθηκαν ΝΣ αργύρου.

2.4. Συζήτηση

Σε αυτή τη μελέτη, σχεδιάστηκε ένα πείραμα μεσοκόσμων με σκοπό να γίνει μια αξιολόγηση της αντίδρασης μιας πλαγκτονικής κοινότητας όταν εκτίθεται σε μελλοντικές (δηλαδή ρεαλιστικές) συγκεντρώσεις ΝΣ αργύρου. Παρά τις υπάρχουσες αβεβαιότητες σχετικά με τις συγκεντρώσεις των ΝΣ αργύρου στα υδατικά οικοσυστήματα στο μέλλον, χρήση μοντελοποίησης προβλέπει συγκεντρώσεις της τάξης των ng L^{-1} (Fabrega *et al.*, 2011; McGillicuddy *et al.*, 2017). Συνεπώς, σε αυτό το πείραμα προστέθηκαν ΝΣ αργύρου σε προβλεπόμενα επίπεδα, δηλαδή $100\text{-}1000 \text{ ng L}^{-1}$. Ο τύπος επικάλυψης των ΝΣ αργύρου ήταν ο ΒΡΕΙ και επιλέχθηκε για δύο λόγους: από την μια πλευρά, αυτός ο τύπος ΝΣ αργύρου χρησιμοποιείται συχνά για την κάλυψη των ΝΣ αργύρου λόγω της ηλεκτροστατικής σταθερότητας που προσφέρει (El Badawy *et al.* 2010) και από την άλλη πλευρά, σε φυσικές συνθήκες έκθεσης στο θαλασσινό νερό, έχει δείξει πως έχει υψηλή σταθερότητα και αυτό προέκυψε από τρία προκαταρκτικά πειράματα μικροκόσμων (Toncelli *et al.* 2017).

Η έκθεση σε ΝΣ αργύρου είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης των *Synechococcus*, γεγονός που επιβεβαιώθηκε από την σημαντικά χαμηλότερη αφθονία και την βραδύτερη ανάπτυξη αυτής της ομάδας στους +NP σε σύγκριση με τους C όπου η ομάδα ήταν αυξημένη στο χρόνο. Η κλάση των *Synechococcophycidae* απουσίαζε από τους +NP κυρίως την ημέρα D5. Πράγματι, η προσθήκη ΝΣ αργύρου συσχετίστηκε με αλλαγές στη δομή, αλλά όχι στη συνολική πληθυσμιακή αφθονία των βακτηρίων, ιών και διατόμων. Συνολικά, οι μεσόκοσμοι +NP φαίνεται να ήταν πιο έντονα επιβαρυνμένοι σε σύγκριση με τους C: το γονίδιο της ικής ενσωματάσης, το οποίο υποδηλώνει την ύπαρξη του λυσιγονικού

κύκλου ζωής και συχνά επικρατεί όταν η παραγωγικότητα και αφθονία των βακτηρίων είναι χαμηλή (Payet and Suttle 2013), ήταν πιο άφθονο στους +NP από ότι στους C. Αυτό το εύρημα υποδηλώνει πως επικράτησαν περισσότερο «καταπονημένα» βακτήρια αμέσως μετά την έκθεση σε ΝΣ αργύρου. Επιπλέον, η χαμηλότερη αφθονία των ιικών βοηθητικών μεταβολικών γονιδίων που εμπλέκονται σε διάφορα κρίσιμα στάδια της φωτοσύνθεσης έδειξε ότι η μεταφορά ηλεκτρονίων πιθανώς υπέστη βλάβη λόγω της προσθήκης ΝΣ αργύρου. Δεδομένου ότι η παρουσία των AMGs είναι διαφορετική στο κάθε οικοθέση (niche-specific) (Hurwitz *et al.*, 2013) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης των συνθηκών του οικοσυστήματος και του λειτουργικού δυναμικού των βακτηρίων, οι μεταβολές στα AMGs ως προς το χρόνο και την πειραματική συνθήκη αποκάλυψε τις συνέπειες της χαμηλής δόσης ΝΣ αργύρου στο γονιδιακό επίπεδο.

Ειδικότερα, η αναστολή της ανάπτυξης των *Synechococcus* επιβεβαίωσε ότι αυτό το είδος είναι ευαίσθητο στα ΝΣ αργύρου ή/και σε ιόντα Ag^+ (Burchardt *et al.* 2012; Taylor *et al.* 2016). Τα *Synechococcus* ανήκουν στα Gram – βακτήρια και περιβάλλονται από ένα ιδιόμορφο λεπτό κυτταρικό τοίχωμα που αποτελείται από «ασυνήθιστους» λιποπολυσακχαρίτες και λιπαρά οξέα (Hoiczuk and Hansel 2000; Durai *et al.* 2015) και η πλειονότητα των λιπιδίων είναι σουλφολιπίδια (Van Mooy *et al.* 2006; Gifford *et al.* 2013). Οι μηχανισμοί τοξικότητας των ΝΣ αργύρου δεν είναι ακόμη κατανοητοί, παρόλα αυτά, είναι πιθανό ότι η συνάφεια των ΝΣ αργύρου με τις θειούχες ενώσεις των μεμβρανικών λιπιδίων των *Synechococcus* μπορεί να είναι υψηλότερη από ότι σε άλλα βακτήρια. Το πιο σημαντικό είναι ότι η απελευθέρωση Ag^+ αυξανόταν συνεχώς κατά τη διάρκεια των πρώτων 6 ημερών και μάλλον τα ιόντα ήταν καθοριστικά για την ευπάθεια των *Synechococcus* (και άλλων βακτηρίων) (Xiu *et al.* 2012b). Επιβεβαιωμένο και στατιστικά, η συγκέντρωση των Ag^+ ήταν μία από τις τέσσερις αβιοτικές μεταβλητές που επηρέασαν τα πρότυπα της βακτηριακής κοινότητας, ενώ η συγκέντρωση των ΝΣ αργύρου δεν ήταν. Όπως αναλύεται λεπτομερώς παρακάτω, το γεγονός ότι οι μεταβολές στη σύνθεση της βακτηριακής κοινότητας και οι μετασχηματισμοί των ΝΣ αργύρου ήταν συγχρονισμένες διεργασίες, υποδηλώνει ότι, αρχικά, τα ΝΣ αργύρου προκάλεσαν άμεσες αποκρίσεις σε ορισμένα είδη και αργότερα η απελευθέρωση των Ag^+ προκάλεσε μεταβολές στη σύνθεση της κοινότητας.

Εκτός από τα *Synechococcus*, υπήρξαν δύο γένη διατόμων που επηρεάστηκαν αρνητικά από την προσθήκη ΝΣ αργύρου: τα γένη *Nitzschia* και *Thalassiosira*. Εκ πρώτης όψεως, αυτό φάνηκε απροσδόκητο, καθώς οι επιδράσεις της προσθήκης ΝΣ αργύρου σε διάτομα είναι γνωστό πως είναι ευρύτερες (Das *et al.*, 2012; Bielmyer-Fraser *et al.*, 2014; Baptista *et al.*, 2015). Όμως στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις ΝΣ

αργύρου σε σύγκριση με άλλες μελέτες. Επίσης, ο Ag ανιχνεύθηκε σε σωματιδιακή μορφή (δηλαδή εντός κυττάρων ή σε επαφή με κύτταρα) σε πολύ μικρές ποσότητες σε σύγκριση με τις υπόλοιπες μορφές Ag (δηλαδή ΝΣ αργύρου, Ag^+ και Ag που δεν ανιχνεύθηκε και περιλαμβάνει συσσωματωμένα ή κατακρημνισμένα άλατα αργύρου). Προηγούμενα πειράματα με το γένος *Thalassiosira* έδειξαν ότι τα ΝΣ αργύρου συγκεντρώνονται σε συστάδες στο κυτταρόπλασμα, οδηγώντας σε εστιασμένες επιδράσεις στο φωτοσύστημα II και τη γλωροφύλλη (García et al. 2014), ενώ πρόσφατα αναφέρθηκε και η ευαισθησία του γένους *Nitzschia* σε βενθικές καλλιέργειες (González et al. 2016). Δεν αποτελεί έκπληξη ότι η ευαισθησία και του γένους *Nitzschia* αποδόθηκε στα φυσιολογικά χαρακτηριστικά του, αλλά οι μηχανισμοί τοξικότητας εξακολουθούν να μην είναι σαφείς.

Στην παρούσα μελέτη, εντοπίστηκαν αμφότεροι οι παράγοντες τοξικότητας, δηλαδή και τα Ag^+ και τα μικρότερα μεγέθη ΝΣ αργύρου. Επομένως είναι δύσκολο να αποσαφηνιστούν τα μεμονωμένα αποτελέσματα των δύο παραγόντων. Είναι επίσης δύσκολο να εξακριβωθεί εάν (α) άμεσα, οι διακυμάνσεις στις αφθονίες και μεγέθη των ΝΣ αργύρου και Ag^+ ή (β) έμμεσα, οι βιολογικές διεργασίες και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του θαλασσινού νερού, τελικά καθόρισαν την τοξικότητα των ΝΣ αργύρου. Σύμφωνα με το σενάριο (α), οι μετασχηματισμοί των ΝΣ αργύρου στο θαλάσσιο περιβάλλον (δηλαδή μεταβολές στο μέγεθος και την επικάλυψη, διαλυτοποίηση, σχηματισμός διαλυτών αλάτων όπως $AgCl$ ή Ag_2S) και η απελευθέρωση και επακόλουθη χημική ένωση των ιόντων Ag^+ επηρέασαν τους ιούς, βακτήρια και διάτομα με άμεσο τρόπο. Δεδομένου ότι μόνο το 25% της μεταβλητότητας της βακτηριακής κοινότητας εξηγήθηκε από την αθροιστική επίδραση των $Chl\ a >2\ \mu m$, NO_3^- , Ag^+ και Ag που δεν ανιχνεύθηκε, η υπόλοιπη μεταβλητότητα πιθανόν οφειλόταν σε παράγοντες που δεν μετρήθηκαν σε αυτή τη μελέτη. Για παράδειγμα, μπορεί να έπαιξαν ρόλο ενώσεις που περιείχαν Ag (Guo et al., 2016; Zhang et al., 2018). Σύμφωνα με το σενάριο (β), ο συνδυασμός των βιολογικών διεργασιών της παραγωγικότητας, θήρευσης και λύσης, καθώς και η εξάντληση/ανανέωση των θρεπτικών στοιχείων και η καθίζηση εντός των μεσοκόσμων επηρέασαν τον βαθμό τοξικότητας των ΝΣ αργύρου. Πράγματι, παρατηρήθηκε μια έντονη παραγωγή φυτοπλαγκτού και οργανικής ύλης κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών, η οποία θα πρέπει να ακολουθήθηκε από θήρευση και ική λύση που πιθανόν οδήγησε σε αλλοιώσεις της ποιότητας και ποσότητας των θρεπτικών στοιχείων. Τέτοιες αλλαγές είναι γνωστό ότι επηρεάζουν σημαντικά την δομή της μικροβιακής κοινότητας (Falcón et al. 2008; Gómez-Consarnau et al. 2012) καθώς και το βαθμό της τοξικότητας των ΝΣ αργύρου (Joshi et al. 2012). Ειδικά η αυξημένη παραγωγή οργανικής ύλης θα μπορούσε να λειτουργήσει ως «προστασία» για ορισμένα κύτταρα (Miao et al. 2009; Joshi et al. 2012) καθώς παράγει μια συμπαγή δομή «αντίστασης» γύρω από τα βακτήρια.

Στο παρόν πείραμα, ο σωματιδιακός οργανικός άνθρακας αυξήθηκε σημαντικά προς την D6, υποδεικνύοντας ότι θα μπορούσε να έχει επηρεάσει την τοξικότητα των ΝΣ αργύρου στους +NP μεσοκόσμους. Τα φωσφορικά ιόντα και το θείο θα μπορούσαν επίσης να παίζουν τον ίδιο ρόλο με την οργανική ύλη («προστασία») καθώς και τα δύο στοιχεία είναι φυσικοί συνδέτες των Ag^+ (Levard et al. 2012). Είναι ενδιαφέρον ότι πολλές έρευνες έχουν αποδείξει ότι υψηλές συγκεντρώσεις φωσφορικών ιόντων μειώνουν την εισροή Ag^+ στο φυτοπλαγκτόν (Das et al., 2012), ενώ η προσθήκη φωσφόρου σε μια φυσική κοινότητα φυτοπλαγκτού τελικά μείωσε δραστικά την τοξικότητα των ΝΣ αργύρου. Συνολικά, παρατηρώντας ότι ορισμένες μορφές Ag δεν ανιχνεύθηκαν και γνωρίζοντας ότι η ετερο-συσσωμάτωση των ΝΣ αργύρου επηρεάζουν την τοξικότητα στο μικροβιακό πλαγκτόν (Guo et al. 2016b) φαίνεται πως μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να εξετάσουν αυτές τις διαδικασίες.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ «χρόνου» και «πειραματικής συνθήκης» ήταν ορατή στην ιική και βακτηριακή ποικιλότητα που παρομοίασε τη δυναμική των ΝΣ αργύρου και Ag^+ . Συγκεκριμένα, όταν η αφθονία των ΝΣ αργύρου με μικρό μέγεθος και η συγκέντρωση των Ag^+ αυξήθηκαν, η ποικιλότητα των ιών και βακτηρίων ήταν χαμηλότερη στους +NP από ότι στους C. Η προσθήκη ΝΣ αργύρου φαίνεται πως είχε άμεση αρνητική επίδραση σε διάφορα φύλα (*Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Parcubacteria* και *Marinimicrobia*) και θετική επίδραση σε σπανιότερα φύλα. Μεταξύ των πρώτων, πρόσφατα αναφέρθηκε ευαισθησία των *Firmicutes*, *Bacteroidetes* και *Proteobacteria* σε έκθεση σε ΝΣ αργύρου, που οφειλόταν ως επί το πλείστον στην απελευθέρωση Ag^+ , όπως σε πολλές άλλες μελέτες (Sun et al. 2013; Yang et al. 2016; Eduok et al. 2017). Έτσι, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι βρέθηκαν σημαντικές αλλαγές στη βακτηριακή κοινότητα όταν αυξήθηκε η συγκέντρωση των ιόντων Ag^+ . Επιπλέον, οι αλλαγές των ΝΣ αργύρου, δηλαδή η τάση προς μικρότερα μεγέθη που είναι δυνητικά πιο τοξικά από ότι τα μεγαλύτερα (Choi and Hu 2008), πιθανόν επηρέασαν με τη σειρά τους την ευαισθησία των κυττάρων.

Την D5 τα ετερότροφα βακτήρια ήταν έντονα «στρεσαρισμένα» σε όλους τους μεσοκόσμους όπως φάνηκε από τα πολύ χαμηλά επίπεδα παραγωγικότητας, αφθονίας και δραστηριότητας. Παρόλα αυτά, τα βακτήρια στους +NP φαίνονταν να είναι ακόμη πιο έντονα «στρεσαρισμένα»: ο λόγος για αυτήν την θεώρηση είναι πως η αφθονία του γονιδίου ιική ενσωμάτωση που αντιπροσωπεύει την πιθανή ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος στο βακτηριακό γονιδίωμα (McDaniel et al. 2008; Bellas et al. 2015) ήταν περίπου 10 φορές υψηλότερη στους +NP από ότι στους C. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι η λυσιγονία ήταν μια σημαντική στρατηγική στους +NP μεσοκόσμους εκείνη την ημέρα. Σύμφωνα με την άποψη ότι η λυσιγονία είναι ένας έμμεσος δείκτης της «πίεσης» των ξενιστών, φαίνεται ότι όντως οι

βακτηριακοί ξενιστές στους +NP αντιμετώπιζαν πιο δυσμενείς συνθήκες από ότι στους C. Με την λυσιγονία οι ιοί μπορούν να διατηρήσουν τον μεταβολισμό του ξενιστή σε υψηλά επίπεδα και ως εκ τούτου, οι πιθανότητες και της δικής τους επιβιώσης είναι υψηλότερες. Ωστόσο, η ενσωμάτωση με το γονίδιο της ενσωματάσης δεν είναι ο μόνος τρόπος λυσιγονίας (Bellas et al. 2015) και η υψηλή αφθονία του γονιδίου μπορεί να οφείλεται στην παρουσία βακτηριακών ξενιστών που περιέχουν αυτό το γονίδιο σε πολλά αντίγραφα. Έτσι, η παρούσα ανάλυση υποδεικνύει ότι μια κλίση προς λυσιγονία θα μπορούσε να είχε συμβεί στους +NP, αλλά τα λυσιγονικά κύτταρα θα πρέπει να εκτιμηθούν ποσοτικά για να υπάρξει επιβεβαίωση. Ο ταξινομικός προσδιορισμός του ξενιστή των λυσιγονικών κυττάρων αποκάλυψε ότι εξαιρετικά άφθονοι ξενιστές ανήκαν στο φύλο *Firmicutes*, που ήταν ευαίσθητα στην έκθεση σε ΝΣ αργύρου σε διάφορους έρευνες (Sun et al. 2013; Yang et al. 2016; Eduok et al. 2017). Συνολικά, παρατηρήθηκαν αρνητικές επιδράσεις σε φύλα που δεν συνίστανται απαραίτητως από Gram – βακτήρια (π.χ. *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*) και μια πιθανή εξήγηση αυτής της παρατήρησης είναι το γεγονός ότι ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στις κυτταρικές μεμβράνες δεν περιορίζονται μόνο στα *Cyanobacteria* (Gifford et al. 2013).

Εκτός από την ιική ενσωματάση που διέφερε μεταξύ των C και +NP, διαπιστώθηκε επίσης ότι η ταξινομική των λυσιγονικών ιών ήταν διαφορετική. Η πλειονότητα των λυσιγονικών ιών ανήκε στην οικογένεια *Siphoviridae*, η οποία ήταν πιο άφθονη στους +NP από ότι στους C, και πιο άφθονη από την οικογένεια *Myoviridae*. Οι περισσότεροι γνωστοί λυσιγονικοί ιοί (σε καλλιέργειες) ανήκουν στην οικογένεια *Siphoviridae* (Hurwitz et al. 2015). Ομοίως με τις παρατηρήσεις για τα βακτήρια, οι λυσιγονικοί ιοί (τόσο η ταξινομική τους όσο και η αφθονία της ιικής ενσωματάσης) εμφάνισαν τις μεγαλύτερες διαφορές μεταξύ C και +NP την D5, υποδεικνύοντας ότι αμέσως μετά την προσθήκη ΝΣ αργύρου η κοινότητα διαφοροποιήθηκε. Σε αυτό το πρώιμο στάδιο του πειράματος, η συγκέντρωση των Ag^+ ακολούθησε μία αυξητική τάση, αλλά το μεγαλύτερο μέρος του Ag ανιχνεύθηκε ως ΝΣ αργύρου. Έτσι, φαίνεται πως σε χαμηλές συγκεντρώσεις έκθεσης, οι αλλαγές της κοινότητας προκλήθηκαν από τις αλληλεπιδράσεις της κυτταρικής επιφάνειας και των ΝΣ αργύρου, ενώ αργότερα, η απελευθέρωση Ag^+ προκάλεσε μεταγενέστερες αλλαγές. Σε αντίθεση με τους λυσιγονικούς ιούς, οι λυτικοί δεν διέφεραν μεταξύ των μεσοκόσμων.

Τέλος, μια βασική ένδειξη ότι το σύστημα στους +NP ήταν ένα επιβαρυνόμενο σύστημα είναι η χαμηλότερη αφθονία των βοηθητικών μεταβολικών γονιδίων *psbA* και *psbD* στους +NP σε σχέση με τους C. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν δομικά στοιχεία του κέντρου αντίδρασης του φωτοσυστήματος II (PSII) και συμβάλλουν στην παραγωγή οξυγόνου μέσω της μεταφοράς ηλεκτρονίων. Το αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι η μεταφορά ηλεκτρονίων

αναστάλθηκε ακόμα και στο επίπεδο ικού γονιδιώματος με την προσθήκη ΝΣ αργύρου, επομένως η αναπαραγωγή των ιών μπορεί επίσης να είχε επηρεαστεί σημαντικά (Lindell et al. 2005; Thompson et al. 2011). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η απόκριση δεν ήταν ορατή σε παραμέτρους που είναι συνήθως ευαίσθητες, όπως η συγκέντρωση της χλωροφύλλης, η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου, η δραστηριότητα και παραγωγικότητα των κυττάρων. Η αναστολή της δράσης βακτηριακών ενζύμων που εμπλέκονται στη μεταφορά ηλεκτρονίων έχει παρατηρηθεί μετά την προσθήκη mg Ag L^{-1} σε βακτήρια (Zheng et al. 2018). Επίσης, η καταστολή των PSII γονιδίων στο διάτομο *Skeletonema* έχει αναφερθεί (Huang et al. 2016) και, στην προσπάθεια τους να περιγράψουν τους μηχανισμούς αυτής της απόκρισης, οι ερευνητές παρατήρησαν ότι τα ΝΣ αργύρου προσκολλώνται στην επιφάνεια του κυττάρου και εμποδίζουν την απορρόφηση του φωτός. Τα άλλα δύο ικά γονίδια που ήταν επίσης λιγότερο άφθονα στους +NP ήταν τα *hli* και *ptoX*. Τα γονίδια αυτά είναι ευρέως διαδεδομένα σε ιούς που προσβάλλουν κυανοβακτήρια αλλά ο λειτουργικός τους ρόλος δεν είναι ακόμη σαφής (McDonald et al. 2011; Hurwitz and U'Ren 2016). Ενδιαφέρον όμως είναι ότι το *ptoX* μπορεί να λειτουργήσει ως εναλλακτική «οδός» για τη μεταφορά ηλεκτρονίων όταν δεν υπάρχουν άλλοι τρόποι (McDonald et al. 2011). Ως αποτέλεσμα, η χαμηλότερη αφθονία των συγκεκριμένων AMGs υποδηλώνει ότι ορισμένοι κυανοβακτηριακοί ξενιστές υπέστησαν έντονη πίεση, έχοντας μη αποτελεσματικούς μηχανισμούς μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά την έκθεση σε ΝΣ αργύρου. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το PSII είναι ευαίσθητο στη φωτογήρανση και ότι τα AMGs υποτίθεται ότι ενισχύουν τη φωτοσύνθεση του ξενιστή ως απόκριση στο στρες, φαίνεται ότι τα ΝΣ αργύρου ουσιαστικά παρεμπόδισαν ακόμη και τον ρόλο των AMGs που στοχεύουν στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Η συχνότητα της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων και ο μοναδικός ρόλος της ανταλλαγής των AMGs στη λειτουργική δυναμική των βακτηριακών ξενιστών θα πρέπει να ληφθούν υπόψη περισσότερο σε μελλοντικές μελέτες της τοξικότητας των ΝΣ αργύρου. Για παράδειγμα, η βακτηριακή ανθεκτικότητα και η προσαρμοστικότητα στην έκθεση σε ΝΣ αργύρου θα μπορούσαν να σχετίζονται με (ή ακόμη και να οδηγούνται από) τις συχνές αλληλεπιδράσεις ιών-βακτηρίων στο επίπεδο του γονιδιώματος και την ανταλλαγή γονιδίων που προσφέρουν κρίσιμες λειτουργίες.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες για την εργασία του Κεφαλαίου 2

Η παρούσα εργασία συγχρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΣΠΑ) - ARISTEIA II στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» (έργο AQUANANO, αριθ. 4705) και από το Πανεπιστήμιο King Abdullah University of Science and Technology (KAUST) μέσω της βασικής χρηματοδότησης στον Daniele Daffonchio. Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνονται στους Γεώργιο Πιπεράκη, Santi Diliberti και Ελένη Καμπέρη για την

πολύτιμη βοήθειά τους στην εγκατάσταση των μεσοκόσμων, την Ελένη Δαφνομήλη και Snezana Zivanovic για την ανάλυση των θρεπτικών στοιχείων, την Παρασκευή Μάρα για τη μέτρηση της πρωτογενούς παραγωγής, την Χριστίνα Ζέρη για την ανάλυση του ολικού οργανικού άνθρακα, την Μαρίνα Κουκάκη και Αναστάσιο Οικονόμου από το Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, ΙΤΕ) για την ευγενική τους υποστήριξη κατά την εκχύλιση του ιικού DNA, και τέλος τους Χριστίνα Παυλούδη, Κατερίνα Βασιλειάδου και Jon Bent Kristoffersen για την πολύ σημαντική καθοδήγησή τους κατά τη διάρκεια της μοριακής ανάλυσης.

Δεδομένα που παρουσιάζονται στο Κεφάλαιο 3 έχουν χρησιμοποιηθεί για την συγγραφή της ακόλουθης δημοσίευσης:

Tsiola A., Pitta P., Giannakourou A., *et al.* (2017b). Ocean acidification and viral replication cycles: Frequency of lytically infected and lysogenic cells during a mesocosm experiment in the NW Mediterranean Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 186:139-151. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecss.2016.05.003>

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - Η επίδραση της οξίνισης και της θέρμανσης των ωκεανών στους κύκλους ζωής των ιών και τη βακτηριακή ποικιλότητα

3.1. Συνοπτική εισαγωγή

Στις μέρες μας, η αύξηση των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) λόγω ανθρώπινων δραστηριοτήτων, όπως για παράδειγμα η καύση ορυκτών καυσίμων, είναι ένα καλά εδραιωμένο φαινόμενο (Cubash *et al.* 2013). Οι ωκεανοί απορροφούν ένα ποσοστό της τάξης του ~ 25% των εκπομπών CO₂ και οι επακόλουθες χημικές αλλαγές αναφέρονται ως «οξίνιση των ωκεανών» (Gattuso *et al.* 2015) με σημαντικές επιπτώσεις σε διάφορες βιολογικές διεργασίες (Riebesell *et al.* (2013), τους κύκλους θρεπτικών στοιχείων (Hutchins *et al.* 2009) καθώς και την ποιότητα και ποσότητα της διαλυμένης οργανικής ύλης (Grossart *et al.* 2006). Ωστόσο, ένα μεγάλο μειονέκτημα των περισσότερων ερευνών μέχρι σήμερα είναι πως επικεντρώνονται σε μεμονωμένους οργανισμούς και εκτελούν επώσεις μικρής διάρκειας. Ως αποτέλεσμα, ο αντίκτυπος της οξίνισης των ωκεανών στο επίπεδο της κοινότητας, δηλαδή σε ένα σύστημα όπου οι αλληλεπιδράσεις των ειδών είναι περίπλοκες, είναι ακόμα ασαφής (Riebesell and Gattuso 2014).

Σύμφωνα με τους Halpern *et al.* (2015), οι ανθρωπογενείς περιβαλλοντικές πιέσεις και συγκεκριμένα η οξίνιση των ωκεανών είναι περισσότερο πιθανό να εμφανιστεί ταυτόχρονα με άλλη (ή άλλες) πίεση (πιέσεις). Συγκεκριμένα, η υπερθέρμανση της ατμόσφαιρας και της επιφάνειας των ωκεανών είναι κάτι που προβλέπεται να συμβεί ταυτόχρονα με την οξίνιση και υπολογίζεται πως μπορεί να φτάσει έως και τους 4.0 °C αύξησης έως το 2100 (Solomon *et al.*, 2007). Είναι όμως ακόμα αβέβαιο αν ο συνδυασμός οξίνισης και υπερθέρμανσης θα επηρεάσουν το μικροβιακό πλαγκτόν με διαφορετικό τρόπο από ό, τι η μεμονωμένη δράση των φαινομένων. Την τελευταία δεκαετία έχουν διεξαχθεί πολλά πειράματα μεσοκόσμων που μελετούν την οξίνιση των ωκεανών σε σχέση με το μικροβιακό πλαγκτόν (Riebesell *et al.*, 2008, 2013), ενώ η υπερθέρμανση έχει μελετηθεί από παλαιότερα και μεμονωμένα. Η συνδυαστική επίδραση των δύο φαινομένων στις βακτηριακές και κυρίως στις ικές κοινότητες (Larsen *et al.* 2008; Danovaro *et al.* 2011; Brussaard *et al.* 2013; Carreira *et al.* 2013) έχει λάβει λίγη προσοχή και ως αποτέλεσμα, δεν είναι γνωστό αν η ική προσβολή και η οξίνιση θα αλληλεπιδράσουν (Danovaro *et al.* 2011).

Στο πρώτο μέρος της παρούσας μελέτης εξετάστηκε η απόκριση της λυσιγονίας και εκτιμήθηκε η συχνότητα τόσο των λυτικά μολυσμένων όσο και των λυσιγονικών κυττάρων (βλέπε Κεφάλαιο 1.1) σε μια τεχνητή μείωση του pH. Ο υπολογισμός έγινε χρησιμοποιώντας την προσέγγιση της ιικής παραγωγής κατά μείωση (viral reduction approach) και το πείραμα έγινε στον κόλπο της Villefranche (Γαλλία) που χαρακτηρίζεται από χαμηλή-μέτρια συγκέντρωση θρεπτικών. Ο κύριος στόχος ήταν να ελεγχθεί εάν η πιθανή μείωση του pH της θάλασσας θα επηρεάσει την ισορροπία μεταξύ των δυο ικών κύκλων ζωής άμεσα ή έμμεσα και δευτερευόντως ποιές περιβαλλοντικές παράμετροι εμπλέκονται σε αυτήν την ισορροπία. Στο δεύτερο μέρος της παρούσας μελέτης περιγράφηκε η απόκριση της βακτηριακής κοινότητας ενός ολιγοτροφικού συστήματος σε μια τεχνητή μείωση του pH και ταυτόχρονη αύξηση της θερμοκρασίας. Η περιγραφή έγινε με μετα-γονιδιωματική ανάλυση μικρών και μεγάλων βακτηρίων στον κόλπο του Ηρακλείου που χαρακτηρίζεται από χαμηλή συγκέντρωση θρεπτικών. Ο στόχος ήταν να ελεγχθεί αν ένα ρεαλιστικό σενάριο κλιματικής αλλαγής θα επιφέρει αλλαγές στη βακτηριακή κοινότητα και να εξεταστεί η σχέση με τα επίπεδα των θρεπτικών στοιχείων του συστήματος, μια σχέση που επεσήμαναν οι Alvarez-Fernandez *et al.* (2018).

3.2. Υλικά και Μέθοδοι

3.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός πρώτου πειράματος (οξίνιση)

Το πείραμα μεσοκόσμων πραγματοποιήθηκε μεταξύ 21 Φεβρουαρίου και 5 Μαρτίου 2013 στον κόλπο της Villefranche, ο οποίος βρίσκεται στο βόρειο τμήμα της θάλασσας της Λιγυρίας (ΒΔ Μεσογείου Θάλασσας). Η πειραματική διάταξη περιελάμβανε εννέα κυλινδρικούς μεσοκόσμους οι οποίοι κατασκευάστηκαν μόνο με πλαστικά υλικά. Το κυλινδρικό τμήμα των μεσοκόσμων ήταν 2.3 m σε διάμετρο και 12.5 m σε ύψος, με αποτέλεσμα να προκύπτει ένας θεωρητικός τελικός όγκος νερού περίπου 50 m³. Τρεις ομάδες των τριών μεσοκόσμων κατασκευάστηκαν και ρυμουλκήθηκαν με σκάφος στη θέση αγκυροβόλησης και καλύφθηκαν με ειδική οροφή, διαπερατή στην υπεριώδη ακτινοβολία, προκειμένου να αποφευχθεί η ατμοσφαιρική επιμόλυνση. Στις 15 Φεβρουαρίου 2013, οι μεσοκόσμοι είχαν τοποθετηθεί στον κόλπο της Villefranche, γέμισαν με θαλασσίνο νερό από το γύρω περιβάλλον και στη συνέχεια έκλεισαν στο κάτω μέρος τους από δύτες, ενώ είχε προηγουμένως τοποθετηθεί ένα δίχτυ με πόρο 5 χιλιοστά για να μην εισέλθουν μεγάλοι οργανισμοί στους μεσοκόσμους. Η οξίνιση των μεσοκόσμων διήρκεσε τις επόμενες τέσσερις ημέρες, ώστε να μην γίνει απότομη αλλαγή του pH που θα ήταν έντονη αλλαγή για τους οργανισμούς. Σε έξι εξ' αυτών έγινε τροποποίηση ως προς την pCO₂ (κλιμακούμενη συγκέντρωση) και τα στοχευόμενα επίπεδα ήταν 450, 550, 750, 850, 1000 και 1250 μatm , τα

οποία επιτεύχθηκαν με την προσθήκη διαφόρων ποσοτήτων θαλασσινού νερού κορεσμένου σε CO₂. Τα επίπεδα αυτά αντιστοιχούσαν στους μεσοκόσμους με κωδικές ονομασίες P1, P2, P3, P4, P5 και P6, αντίστοιχα. Η ανάμιξη του κορεσμένου σε CO₂ θαλασσινού νερού μέσα στους μεσοκόσμους έγινε με ένα σύστημα διάχυσης. Το κορεσμένο σε CO₂ θαλασσινό νερό προέκυψε από την ανάμειξη 100% CO₂ με νερό φιλτραρισμένο σε πόρο 5 χιλιοστών, μέσα σε δοχεία χωρητικότητας 25 L. Περίπου 75-300 L κορεσμένου σε CO₂ νερού προστέθηκαν, ανάλογα με το στοχευόμενο επίπεδο pH. Στις 21 Φεβρουαρίου 2013, τελικά ο στόχος της pCO₂ επιτεύχθηκε και το πείραμα ξεκίνησε (ημέρα 0). Τρεις άλλοι μεσοκόσμοι δεν υπέστησαν τροποποίηση και χρησίμευσαν ως μάρτυρες (C1, C2 και C3). Η λεπτομερής πειραματική διάταξη περιγράφεται στους (Gazeau *et al.*, 2017). Για τις μετρήσεις της ικής παραγωγής συλλέχθηκε περίπου 1 L νερού πριν από την ανατολή του ηλίου (τοπική ώρα 05:00) κάθε τέσσερις ημέρες, από δύο μεσοκόσμους μάρτυρες (C1 και C3) και από τους P1, P5 και P6, με αρχικά επίπεδα pCO₂ 595, 1174 και 1327 μatm , αντίστοιχα.

3.2.2. Προσδιορισμός pH και CO₂

Δείγματα για τις μετρήσεις ολικής αλκαλικότητας (AT, 500 mL) διηθήθηκαν σε μεμβράνες GF/F και αναλύθηκαν εντός μιας ημέρας. Η AT προσδιορίστηκε με τιτλοδότηση (Titrand 888) και γυάλινο ηλεκτρόδιο (Metrohm®, electrode plus) βαθμονομημένο, χρησιμοποιώντας ρυθμιστικά διαλύματα NBS (pH 4.0 και pH 7.0) και TRIS (αλατότητα 35). Έγιναν τρεις τιτλοδοτήσεις σε υποδείγματα 50 mL στους 22 °C και η AT υπολογίστηκε όπως περιγράφεται στους Dickinson *et al.* (2007). Σε δείγματα θαλασσινού νερού για τις μετρήσεις του ολικού ανόργανου άνθρακα (CT: 120 mL) προστέθηκαν 20 μL κορεσμένου διαλύματος χλωριούχου υδραργύρου (HgCl₂). Ο CT προσδιορίστηκε σε τρεις επαναλήψεις δειγμάτων 1.2 mL, χρησιμοποιώντας αναλυτή ανόργανου άνθρακα (AIRICA, Marianda ©, Kiel, Γερμανία) συζευγμένο με αναλυτή υπέρυθρων αερίων (LI-COR © 6262). Η ακρίβεια στις μετρήσεις ήταν 0.8 και 0.6 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ (n = 22), αντίστοιχα. Το pH του θαλασσινού νερού και άλλες μετρήσεις οργανικής χημείας προσδιορίστηκαν από τις μετρήσεις CT, AT, θερμοκρασίας και αλατότητας (οι τελευταίες δύο προσδιορίστηκαν με ένα όργανο CTD Seabird 19plusV2 που έδινε μετρήσεις από τα 0 έως τα 10 m βάθος εντός και εκτός των μεσοκόσμων σε καθημερινή βάση με αισθητήρες για τη διαλυτότητα του οξυγόνου, την αλατότητα και θερμοκρασία, το φθορισμό και την ένταση του φωτός).

3.2.3. Προσδιορισμός συγκέντρωσης θρεπτικών στοιχείων και χλωροφύλλης

Η μεθοδολογία της ανάλυσης των θρεπτικών στοιχείων περιγράφεται λεπτομερώς στους Louis *et al.* (2017). Για την ανάλυση των φωσφορικών ιόντων (PO₄⁻³) στο επίπεδο nM

χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο και οι μετρήσεις έγιναν στο ορατό φως στα 710 nm. Οι τυπικές αποκλίσεις επαναληψιμότητας και πιστότητας αναπαραγωγής ήταν ~ 4.8% και 7% αντίστοιχα. Οι συγκεντρώσεις PO_4^{3-} υπολογίστηκαν με βαθμονόμηση σε υπερκάθαρο νερό, σύμφωνα με το νόμο Beer-Lambert. Το ίδιο πρωτόκολλο και ο εξοπλισμός που περιγράφεται στους Louis *et al.* (2017) χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης διαλελυμένου ανόργανου αζώτου. Εν συντομία, η ανάλυση των ιόντων NO_x ($= \text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$) έγινε φασματοφωτομετρικά στο ορατό φως στα 540 nm. Το όριο ανίχνευσης ήταν ~ 10 nM και η πιστότητα αναπαραγωγής ήταν ~6%.

Για την συγκέντρωση της χλωροφύλλης συλλέχθηκαν 2 L θαλασσινού νερού και διηθήθηκαν σε μεμβράνες GF/F, οι οποίες καταψύχθηκαν άμεσα σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους -80°C . Όλες οι χρωστικές εκχυλίστηκαν στους -20°C σε 3 mL μεθανόλης (100%), διασπάστηκαν με υπερήχους και συλλέχθηκαν μία ώρα αργότερα με διήθηση υπό κενό σε μεμβράνες GF/F. Τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν εντός 24 ωρών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) σε ένα πλήρες σύστημα Agilent Technologies. Οι χρωστικές διαχωρίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν (Ras *et al.* 2008). Περισσότερες λεπτομέρειες για αυτές τις αναλύσεις δίδονται στους Gazeau *et al.* (2017).

3.2.4. Προσδιορισμός συγκέντρωσης διάφανων εξωπολυμερικών σωματιδίων

Οι συγκεντρώσεις των διάφανων εξωπολυμερικών σωματιδίων (transparent exopolymeric substances, TEP) μετρήθηκαν φασματοφωτομετρικά και η μέθοδος που αναπτύχθηκε από τους Passow and Alldredge (1994) τροποποιήθηκε σύμφωνα με τους Villacorte *et al.* (2015) προκειμένου να συμπεριληφθούν μικρότερα κλάσματα TEP (0.05-0.4 μm). Δείγματα θαλασσινού νερού (250 mL) αρχικά διηθήθηκαν μέσω πολυανθρακικών μεμβρανών με πόρο 0.4 μm και έπειτα μέσω μεμβρανών με πόρο 0.05 μm σε χαμηλή και σταθερή πίεση (<150 mmHg). Η περιεκτικότητα των TEP σε άνθρακα προσδιορίστηκε σύμφωνα με τον συντελεστή μετατροπής βάρος/βάρος $\Delta\text{TEP}:\Delta\text{C}=0.40$ (Engel *et al.* 2011). Λεπτομερής περιγραφή του προσδιορισμού της συγκέντρωσης TEP δίνεται στους Bourdin *et al.* (2017).

3.2.5. Προσδιορισμός ρυθμού παραγωγής ετερότροφων βακτηρίων

Η ετερότροφη βακτηριακή παραγωγή εκτιμήθηκε με το ίδιο πρωτόκολλο όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.2.5.

3.2.6. Προσδιορισμός ρυθμού παραγωγής φυτοπλαγκτού

Ο ρυθμός πρωτογενούς παραγωγής (primary production, PP) προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας την τεχνική σήμανσης με ^{14}C , όπως περιγράφεται λεπτομερώς στους Maudgandre *et al.* (2017). Δείγματα θαλασσινού νερού μεταφέρονταν σε τέσσερα φιαλίδια των 40 mL και εμπλουτίζονταν με 10 έως 50 μCi διαλύματος διτανθρακικού νατρίου σημασμένου με ^{14}C . Τρία φιαλίδια επώαστηκαν επί τόπου για 24 ώρες σε βάθος 4 m (δηλαδή, στο βάθος της μέσης ακτινοβολίας του συνολικού βάθους 12 m των μεσοκόσμων). Το τέταρτο φιαλίδιο εμπλουτίστηκε αμέσως με 1 mL διαλύματος φορμαλδεΐδης ρυθμισμένου με βόρακα και διηθήθηκε μέσω φίλτρου σύριγγας πόρου 0.2 μm και αποθηκεύτηκε στο εργαστήριο για να εκτιμηθεί η αβιοτική σήμανση με ^{14}C . Μετά την επώαση, 37 mL δείγματος διηθήθηκαν μέσω πολυανθρακικών μεμβρανών πόρου 0.4 μm και ξεπλύθηκαν με διηθημένο θαλασσινό νερό σε πόρο 0.7 μm . Οι μεμβράνες τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια σπινθηρισμού τα οποία κλείστηκαν αεροστεγώς και ένα φίλτρο GF/A στο φιαλίδιο εμποτίστηκε με β -φαινυλαιθυλαμίνη. Ένα mL φωσφορικού οξέος 1% εγχύθηκε στο φίλτρο για να διαλυθεί ο ^{14}C -σωματιδιακός ανόργανος άνθρακας (Balch *et al.* 2000). Μετά από ακόμα 24 ώρες, τα εμποτισμένα φίλτρα GF/A τοποθετήθηκαν ξεχωριστά σε νέα φιαλίδια σπινθηρισμού. Στο φιαλίδιο που περιείχαν το DOC και την πολυανθρακική μεμβράνη (PP- ^{14}C) προστέθηκε κοκτέιλ σπινθηρισμού (Ultima Gold MV, Perkin Elmer) και προσδιορίστηκαν οι παραγωγές σε μετρητή Packard Tri Carb (1600 CA). Η μετατροπή σε ρυθμό παραγωγής έγινε μετά από διόρθωση της αβιοτικής σήμανσης ^{14}C με τη χρήση της μετρημένης συγκέντρωσης διαλελυμένου ανόργανου άνθρακα (Gazeau *et al.*, 2017).

3.2.7. Προσδιορισμός της συχνότητας λυτικά μολυσμένων και λυσιγονικών κυττάρων

Η συχνότητα των λυτικά μολυσμένων και λυσιγονικών κυττάρων (FLIC και FLC, αντίστοιχα) εκτιμήθηκε την ημέρα 1 (22 Φεβρουαρίου), ημέρα 5 (26 Φεβρουαρίου) και ημέρα 9 (2 Μαρτίου). Περίπου 1 L θαλασσινού νερού από κάθε μεσόκοσμο αρχικά διηθήθηκε μέσω πολυανθρακικών μεμβρανών με μέγεθος πόρου 0.8 μm προκειμένου να απομακρυνθούν τα μεγάλα σωματίδια και οι θηρευτές. Το διήθημα από το φίλτρο 0.8 μm στη συνέχεια συμπυκνώθηκε χρησιμοποιώντας ένα σύστημα διήθησης (tangential flow, Millipore, 0.22 μm διάμετρος πόρου), που φυλασσόταν πάντα στους 4 °C με 1 N NaOH. Το διήθημα από το φίλτρο 0.22 μm αναστράφηκε με υπερκάθαρο νερό Milli-Q, με αντίστροφη ροή της περισταλτικής αντλίας (Masterflex), προκειμένου να παραχθεί ένας όγκος θαλασσινού νερού εξαιρετικά συμπυκνωμένου σε βακτήρια (100 mL). Το υπόλοιπο διήθημα από το φίλτρο 0.22 μm διηθήθηκε περαιτέρω με ένα σύστημα υπερ-διήθησης με σπειροειδές περίβλημα (μέγεθος

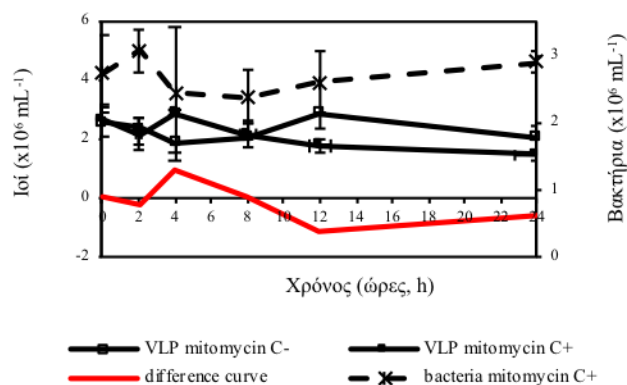
πόρου 30 kDa, Millipore), που επίσης φυλασσόταν στους 4 °C σε 1 N NaOH πριν από τη χρήση. Το τελευταίο στάδιο διήθησης είχε ως αποτέλεσμα την συλλογή νερού ελεύθερου από ιούς (200 mL). Οι δύο ποσότητες νερού (υπερσυμπυκνωμένο σε βακτήρια και απαλλαγμένο από ιούς) αναμείχθηκαν ήπια και στη συνέχεια κατανεμήθηκαν ίσα σε έξι σωληνάρια των 50 mL. Ο χημικός παράγοντας μιτομυκίνη C (Sigma Aldrich) που προκαλεί λύση των λυσιγονικών κυττάρων προστέθηκε σε συγκέντρωση 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ σε τρία σωληνάρια, ενώ τα υπόλοιπα τρία χρησίμευσαν ως μάρτυρες. Όλα τα σωληνάρια επωάστηκαν αμέσως στο σκοτάδι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, όπως αυτή προέκυψε από τις ημερήσιες μετρήσεις CTD. Η επώαση διήρκεσε 24 ώρες και ελήφθησαν υπο-δείγματα πριν από την προσθήκη μιτομυκίνης C (t_0), και μετά από 2, 4, 8, 12 και 24 ώρες (t_2 , t_4 , t_8 , t_{12} και t_{24} , αντίστοιχα). Η συντήρηση των υποδειγμάτων για την μέτρηση της ιικής και βακτηριακής αφθονίας εξηγείται στο Κεφάλαιο 2.2.6.

Η FLIC εκτιμήθηκε σύμφωνα με τους Weinbauer *et al.* (2003) και τις τροποποιήσεις των Winter *et al.* (2004) από τις επωάσεις χωρίς μιτομυκίνη C (Εικόνα 3. 1, συμπαγής γραμμή με κενά σύμβολα), με βάση τον τύπο:

$$\text{FLIC} = 100 \times [(\text{VP}_{\text{lytic}1} + \dots + \text{VP}_{\text{lytic}n}) / \text{BS} \times \text{B}_0]$$

όπου BS είναι ο αριθμός των ιικών σωματιδίων (VLPs) εντός ενός βακτηριακού κυττάρου, B_0 είναι η βακτηριακή αφθονία στην αρχή των επωάσεων και VP_{lytic} (σε VLPs ανά ώρα) υπολογίστηκε για τα χρονικά διαστήματα που χαρακτηρίζονται από μια καθαρή αύξηση στην ιική αφθονία. Ως εκ τούτου,

$$\text{VP}_{\text{lytic}} = [(V_{\text{max}1} - V_{\text{min}1}) / (t_{\text{max}1} - t_{\text{min}1}) + \dots + (V_{\text{max}n} - V_{\text{min}n}) / (t_{\text{max}n} - t_{\text{min}n})]$$



Εικόνα 3. 1. Αφθονία ιών (αριστερός άξονας, συμπαγείς γραμμές) και αφθονία βακτηρίων (δεξιά άκρη, διακεκομμένη γραμμή) στις επωάσεις όπου προστέθηκε (mitomycin C+) και δεν προστέθηκε (mitomycin C-) μιτομυκίνη C, με την πάροδο του χρόνου (μέση τιμή ± SD τριπλών). Το παράδειγμα αναφέρεται στην ημέρα 9 και τον μεσόκοσμο P1. Τα συμπαγή σύμβολα αντιπροσωπεύουν ικές αφθονίες στις mitomycin C- επωάσεις, ενώ τα κενά σύμβολα αντιπροσωπεύουν ικές αφθονίες στις mitomycin C+ επωάσεις. Η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύει την καμπύλη διαφοράς των ικών αφθονιών μεταξύ των 2 τύπων επωάσεων. Όταν αυτή η γραμμή είναι θετική υποδηλώνει επαγωγή λύσης.

Η FLC υπολογίστηκε σύμφωνα με τους Weinbauer *et al.* (2003) από την καμπύλη διαφοράς (Εικόνα 3. 1, κόκκινη γραμμή) που υπολογίστηκε ως η διαφορά στην ική αφθονία (viral direct counts, VDCs) μεταξύ των δοχείων που επωάστηκαν με και χωρίς μιτομυκίνη C (σταθερές γραμμές με κενά και συμπαγή σύμβολα, αντίστοιχα), σύμφωνα με τον τύπο:

$$FLC = 100 \times [(VP_{lysogenic1} + \dots + VP_{lysogenicn}) / (BS \times B_0)],$$

όπου το BS είναι ο αριθμός των VLPs εντός ενός βακτηριακού κυττάρου, B₀ είναι η βακτηριακή αφθονία στην αρχή των επωάσεων και

$$VP_{lysogenic} = [(VDC_{max1} - VDC_{min1}) / (t_{max1} - t_{min1}) + \dots + (VDC_{maxn} - VDC_{minn}) / (t_{maxn} - t_{minn})].$$

Χρησιμοποιήθηκαν οι μέσες τιμές τριπλών επαναλήψεων επωάσεων και θεωρήθηκε ότι έγινε επαγωγή των λυσιγονικών κυττάρων όταν μετρήθηκε στατιστικά σημαντική υψηλότερη ική αφθονία και σημαντική χαμηλότερη βακτηριακή αφθονία στις επωάσεις με μιτομυκίνη C σε σχέση με τους μάρτυρες (Cochran and Paul 1998; Tapper and Hicks 1998). Ένα παράδειγμα τέτοιας επαγωγής, μαζί με τις παραμέτρους που απαιτούνται για την εκτίμηση FLIC και FLC, παρουσιάζεται στην Εικόνα 3. 1 που αντιστοιχεί στον μεσόκοσμο P1 την ημέρα 9. Για τα VLPs εντός ενός βακτηριακού κυττάρου χρησιμοποιήθηκε η μέση δημοσιευμένη τιμή (24) για τη Βορειοδυτική Μεσογείου (Weinbauer *et al.* 2002).

3.2.8. Προσδιορισμός της ικής και βακτηριακής αφθονίας

Η ική και βακτηριακή αφθονία εκτιμήθηκε με το ίδιο πρωτόκολλο όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.2.6.

3.2.9. Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων (πρώτο πείραμα)

Οι τριπλές επαναλήψεις που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με και χωρίς μιτομυκίνη C εξετάστηκαν σε κάθε χρονικό σημείο για διαφορές με ανάλυση διακύμανσης με έναν παράγοντα (one way ANOVA). Έτσι, έγινε προσδιορισμός για το εάν έλαβε χώρα ή όχι

επαγωγή λυσιγονίας και για αυτή την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό IBM SPSS Statistic.

3.2.10. Πειραματικός σχεδιασμός δεύτερου πειράματος (οξίνιση και υπερθέρμανση)

Το πείραμα μεσοκόσμων πραγματοποιήθηκε μεταξύ 30 Αυγούστου και 12 Σεπτεμβρίου 2013 στον κόλπο του Ηρακλείου (Γούρνες). Η συλλογή του νερού και η μεταφορά του στις εγκαταστάσεις CRETACOSMOS του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. έγινε όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 4.2.1 και το στήσιμο των μεσοκόσμων όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.2.2. Σε αυτό το πείραμα, οι μεσόκοσμοι που επώαστηκαν ήταν συνολικά 12 και περιελάμβαναν: 3 μεσοκόσμους όπου δεν έγινε καμία τροποποίηση και η επώαση έγινε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και σε pH περιβάλλοντος (κωδική ονομασία: C, από τη λέξη «control»). Άλλοι 3 μεσόκοσμοι επώαστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και σε pH μειωμένο κατά περίπου 0.3 μονάδες (κωδική ονομασία: OA, από το φαινόμενο «ocean acidification»). Άλλοι 3 μεσόκοσμοι επώαστηκαν σε ξεχωριστή δεξαμενή όπου η θερμοκρασία ρυθμίστηκε σε 3 °C υψηλότερη από αυτήν του περιβάλλοντος και το pH ήταν σε επίπεδα περιβάλλοντος (κωδική ονομασία: W, από το φαινόμενο «warming»). Τέλος, άλλοι 3 μεσόκοσμοι επώαστηκαν στην δεξαμενή όπου η θερμοκρασία ρυθμίστηκε σε ~ 2-3 °C υψηλότερη από αυτήν του περιβάλλοντος και ταυτόχρονα το pH υπέστη μείωση κατά περίπου 0.3 μονάδες (κωδική ονομασία: GH, από το φαινόμενο «greenhouse heating»).

Η μείωση του pH έγινε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται παραπάνω για το πείραμα στον κόλπο της Villefranche (Κεφάλαιο 3.2.1), με τη διαφορά όμως ότι στόχος ήταν ένα επίπεδο pH (όχι κλιμακούμενη διαβάθμιση). Συγκεκριμένα, η οξίνιση των μεσοκόσμων διήρκησε 2 ημέρες (2 και 3 Σεπτεμβρίου) και από αρχική μέση τιμή 8.113 ± 0.004 μειώθηκε σε 7.832 ± 0.009 και 7.797 ± 0.006 στους μεσοκόσμους OA και GH, αντίστοιχα, την πρώτη ημέρα του πειράματος (T0). Η θερμοκρασία από αρχική μέση τιμή 25.49 ± 0.05 αυξήθηκε σε 27.60 ± 0.04 και 27.60 ± 0.03 στους μεσοκόσμους W και GH, αντίστοιχα, την πρώτη ημέρα του πειράματος (T0).

3.2.11. Προσδιορισμός pH και θερμοκρασίας

Η μέτρηση του pH έγινε με τη χρήση ειδικού οργάνου (Metrohm electrodes). Η μέτρηση της θερμοκρασίας έγινε με τη χρήση αισθητήρα Aanderaa CT sensor 3919 (Aanderaa Data Instruments) και HOBO UA-002-64T (Onset Computer Corporation).

3.2.12. Προσδιορισμός συγκέντρωσης θρεπτικών στοιχείων

Η συγκέντρωση των ανόργανων νιτρικών, νιτρωδών, αμμωνιακών, φωσφορικών και πυριτικών ιόντων προσδιορίστηκε σύμφωνα με τους Strickland and Parsons (1972) όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.2.4.

3.2.13. Προσδιορισμός ικής και βακτηριακής αφθονίας

Η αφθονία των ικών σωματιδίων και των βακτηρίων εκτιμήθηκε όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.2.6.

3.2.14. Εξαγωγή γενετικού υλικού, πολλαπλασιασμός, αλληλούχηση και επεξεργασία προϊόντων αλληλούχησης

Περίπου 10 L θαλασσινού νερού συλλέχθηκαν τις ημέρες T-1, T0, T3, T6 και T10, διηθήθηκαν αρχικά μέσω πλέγματος πόρου 20 μm ώστε να απομακρυνθούν τα μεγάλα σωματίδια. Έπειτα έγινε διήθηση μέσω πολυανθρακικής μεμβράνης πόρου 0.2 μm ώστε να συλλεχθούν τα μεγάλα βακτηριακά κύτταρα και πολυαιθεροσουλφονικής μεμβράνης πόρου 0.1 μm ώστε να συλλεχθούν τα μικρά βακτηριακά κύτταρα. Για τη διήθηση χρησιμοποιήθηκε πολυσουλφονικό σύστημα διήθησης (Thermo Scientific™ Nalgene™ Reusable Filter Holders with Receiver) υπό χαμηλό κενό (<150 mmHg) για να αποφευχθεί η θραύση των κυττάρων. Οι 0.2 και 0.1 μm μεμβράνες βυθίστηκαν σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C μέχρι την εκχύλιση του γενετικού υλικού (DNA), η οποία έγινε χρησιμοποιώντας το CTAB πρωτόκολλο των Winperenninckx *et al.* (1993), όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.2.9. Ο πολλαπλασιασμός και η αλληλούχηση του DNA έγινε όπως στο Κεφάλαιο 2.2.9 και η επεξεργασία των προϊόντων της αλληλούχησης όπως στο Κεφάλαιο 2.2.10. Τα δεδομένα της βακτηριακής σύστασης που προέκυψαν από τις μεμβράνες 0.1 μm δεν παρουσιάζονται για τις ημέρες T-1 και T0 λόγω χαμηλής ποιότητας γενετικού υλικού.

3.2.15. Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων (δεύτερο πείραμα)

Έγινε ανάλυση της διακύμανσης τύπου επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (Repeated Measures ANalysis Of Variance, RM ANOVA) για να ελεγχθεί αν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη βακτηριακή και ική αφθονία μεταξύ των διαφορετικών πειραματικών συνθηκών (δηλαδή για τους μεσοκόσμους C, W, OA και GH) για όλη τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου. Οι σημαντικές διαφορές μεταξύ των πειραματικών συνθηκών αξιολογήθηκαν με post-hoc Tukey τεστ (Tukey HSD), αφού ελέγχθηκε η υπόθεση της

σφαιρικότητας (τεστ Mauchly) Επιπλέον, έγιναν περαιτέρω αναλύσεις για να εκτιμηθεί η επίδραση του «χρόνου» και της «πειραματικής συνθήκης», με την μηδενική υπόθεση ότι δεν υπάρχουν διαφορές χρησιμοποιώντας πολυπαραγοντική ανάλυση της διακύμανσης. Έγινε ανάλυση κύριων συνιστωσών για την ομαδοποίηση των δεδομένων και προσδιορισμός των πιθανών συσχετίσεων μεταξύ βιοτικών και αβιοτικών μεταβλητών με την ανάλυση BIO-ENV (Clarke and Ainsworth 1993). Τα πλέγματα ανομοιότητας τύπου Bray-Curtis υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας μετασχηματισμένα βιολογικά δεδομένα (τετραγωνική ρίζα) και οι Ευκλείδειες αποστάσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας κανονικοποιημένα αβιοτικά δεδομένα (Clarke and Warwick 1994). Ο έλεγχος υποθέσεων έγινε με 999 μεταθέσεις και για τις δοκιμές ανά ζεύγη χρησιμοποιήθηκε το επίπεδο σημαντικότητας 0.05. Οι τελευταίες αναλύσεις έγιναν με το λογισμικό πακέτο PRIMER v6 (PRIMER-E Ltd, Plymouth Marine Laboratory, Natural Environmental Research Council, UK) με πρόσθετο λογισμικό PERMANOVA + (Anderson et al. 2008; Somerfield 2008).

3.3. Αποτελέσματα

3.3.1. Επισκόπηση των περιβαλλοντικών συνθηκών του πρώτου πειράματος

Η επισκόπηση των περιβαλλοντικών συνθηκών (pH, θερμοκρασία, αλατότητα και συγκεντρώσεις χλωροφύλλης α, νιτρικών, νιτροδών και φωσφορικών ιόντων) στους μεσοκόσμους κατά τη διάρκεια του πειράματος δίδεται στον Πίνακα 3. 1. Στην αρχή του πειράματος (ημέρα 0), το pH στους μεσοκόσμους όπου έγινε προσθήκη κορεσμένου σε CO₂ νερού κυμάνθηκε μεταξύ 7.63 (P6) και 7.99 (P1), ενώ παρατηρήθηκε σταδιακή αύξησή του με τον χρόνο, λόγω των ισχυρών ανέμων που επικρατούσαν στην περιοχή και την επακόλουθη σημαντική απώλεια (degas) του CO₂ (Gazeau *et al.*, 2017). Το pH παρέμεινε σταθερό τις ημέρες 1, 5 και 9 στους C σε σημερινά επίπεδα (8.12-8.13 μονάδες).

Πίνακας 3. 1. Περιβαλλοντικές συνθήκες κατά την ημέρα 0 (πρώτος πίνακας) και ο μέσος όρος (\pm τυπική απόκλιση, SD) κατά τη διάρκεια των 12 πειραματικών ημερών (δεύτερος πίνακας). pH, θερμοκρασία: T, αλατότητα: S, συκέντρωση χλωροφύλλης: Chl, συκέντρωση νιτρικών και νιτροδών ιόντων: NO_x και συκέντρωση φωσφορικών ιόντων: PO₄³⁻. Το OUT αναφέρεται στο εξωτερικό περιβάλλον. Τα C1 και C3 αναφέρονται στους μεσοκόσμους μάρτυρες και τα P1, P5 και P6 αναφέρονται στους μεσοκόσμους με αυξανόμενη μερική πίεση CO₂ (αρχικές τιμές 595, 1174 και 1327 matm αντίστοιχα).

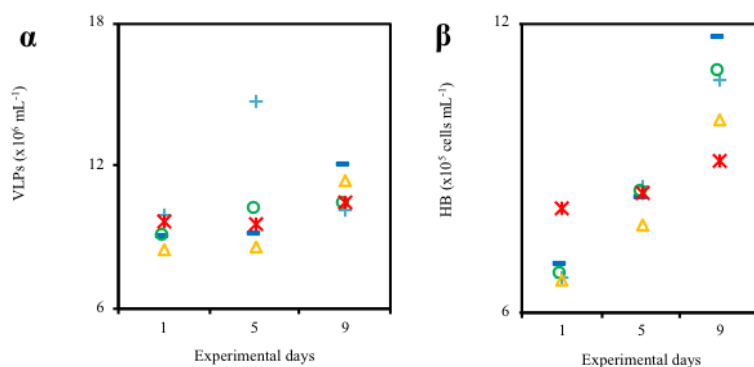
Ημέρα 0	pH	T (°C)	S	Chl (μg L ⁻¹)	NO _x (nM)	PO ₄ ³⁻ (nM)
OUT	8.03	13.2	38.11	0.95	1170	10.3
C1	8.10	13.2	38.15	1.22	167	9.8
C3	8.13	13.2	38.15	1.12	110	8.9
P1	7.99	13.2	38.15	1.16	135	10.2
P5	7.77	13.2	38.15	1.19	134	15.2
P6	7.63	13.2	38.15	0.94	159	8.3

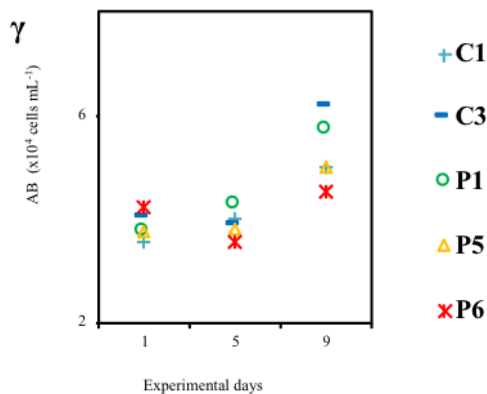
Μέσος όρος \pm SD του 12ήμερου πειράματος	pH	T (°C)	S	Chl ($\mu\text{g L}^{-1}$)	NO _x (nM)	PO ₄ ³⁻ (nM)
OUT	8.09 (± 0.04)	13.2 (± 0.1)	38.14 (± 0.04)	0.81 (± 0.10)	1306 (± 12)	12.9 (± 3.1)
C1	8.14 (± 0.02)	13.2 (± 0.1)	38.16 (± 0.01)	1.04 (± 0.20)	233 (± 9)	9.1 (± 1.3)
C3	8.15 (± 0.01)	13.2 (± 0.1)	38.17 (± 0.02)	1.01 (± 0.11)	139 (± 9)	8.8 (± 1.2)
P1	8.07 (± 0.04)	13.2 (± 0.1)	38.16 (± 0.02)	0.99 (± 0.20)	118 (± 10)	9.1 (± 0.9)
P5	7.95 (± 0.12)	13.2 (± 0.1)	38.16 (± 0.01)	1.04 (± 0.15)	188 (± 10)	9.4 (± 2.4)
P6	7.85 (± 0.16)	13.2 (± 0.1)	38.16 (± 0.01)	0.96 (± 0.10)	165 (± 9)	8.6 (± 1.2)

Δεν παρατηρήθηκε έντονη διακύμανση στη συγκέντρωση PO₄³⁻, ενώ οι συγκεντρώσεις των NO_x ήταν χαμηλές στους μεσοκόσμους (Πίνακας 3. 1), πιθανότατα λόγω της γρήγορης κατανάλωσής τους από τους αυτότροφους οργανισμούς (Louis et al. 2017) κατά τη διάρκεια της 4-ήμερης φάσης οξίνισης. Επίσης, οι συγκεντρώσεις ήταν χαμηλές πιθανόν λόγω της μη αναπλήρωσης θρεπτικών στους μεσοκόσμους, σε αντίθεση με τον περιβάλλοντα χώρο όπου γινόταν ανανέωση λόγω (εποχιακής) ανάμιξης με βαθιά νερά. Η εξέλιξη των θρεπτικών στοιχείων και της χλωροφύλλης δεν σχετίστηκε με τις αλλαγές στο pH (Πίνακας 3. 1).

3.3.2. Αφθονίες ιών και βακτηρίων

Οι αφθονίες των ιών σωματιδίων (virus-like particles, VLP) και βακτηρίων (ετερότροφων και αυτότροφων, HB και AB, αντίστοιχα) δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των C και P- μεσοκόσμων (Εικόνα 3. 2). Η μέση τιμή VLPs την ημέρα 1 σε όλους τους μεσοκόσμους ήταν $9.25 \times 10^6 \pm 5.76 \times 10^5$ VLPs mL⁻¹ και εμφάνισε μια αυξητική τάση μεταξύ των ημερών 1 και 5 στους C και P1, αλλά παρέμεινε σταθερή στους P5 και P6.





Εικόνα 3. 2. Αφθονία ικών σωματιδίων (α: virus-like particles, VLPs), ετερότροφων βακτηρίων (β: heterotrophic bacteria, HB) και αυτότροφων βακτηρίων (γ: autotrophic bacteria, AB) τις ημέρες 1, 5 και 9. Τα C1 και C3 αναφέρονται στους μεσοκόσμους μάρτυρες και τα P1, P5 και P6 αναφέρονται στους μεσοκόσμους με αυξανόμενη μερική πίεση CO₂ (αρχικές τιμές 595, 1174 και 1327 μatm αντίστοιχα).

Οι μέγιστες αφθονίες VLPs παρατηρήθηκαν την ημέρα 5 στους C (14.7×10^6 VLP mL⁻¹) και οι χαμηλότερες στον P5 την ίδια ημέρα. Η ική αφθονία παρέμεινε σταθερή από την 5η έως την 9η ημέρα στους P1 και P6, ενώ αυξήθηκε στους C3 και P5 και μειώθηκε στον C1 (Εικόνα 3. 2). Τα VLPs χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες σύμφωνα με την περιεκτικότητα των σωματιδίων σε DNA. Το ποσοστό των ιών με χαμηλή περιεκτικότητα σε DNA (Low DNA, LVLP) αποτέλεσε 55-61% της συνολικής ικής κοινότητας την ημέρα 1 σε όλους τους μεσοκόσμους (Πίνακας 3. 2), ενώ το ποσοστό των ιών με μέτρια περιεκτικότητα σε DNA (Medium DNA, MVLP) αποτέλεσε 29-36% και το αντίστοιχο ποσοστό των ιών με υψηλή περιεκτικότητα σε DNA (High DNA, HVLP) ήταν 9-10%. Το ποσοστό HVLP παρέμεινε σταθερό μέχρι την ημέρα 5, αλλά στη συνέχεια μειώθηκε μέχρι την ημέρα 9. Η πιο έντονη μεταβολή παρατηρήθηκε στο μεσοκόσμο P6, όπου το ποσοστό LVLP αυξήθηκε ως και ~75% μεταξύ ημέρας 5 και 9 (Πίνακας 3. 2) και η τάση αυτή διέφερε σημαντικά σε σχέση με τους C και P1 (ANOSIM, $p < 0.05$).

Η αφθονία των HB κυμάνθηκε μεταξύ 6.68 και 8.17×10^5 κύτταρα mL⁻¹ την ημέρα 1, με την υψηλότερη τιμή να παρατηρείται στον P6 (Εικόνα 3. 2). Η αφθονία των HB αυξήθηκε σχεδόν 2 φορές από την ημέρα 1 έως την ημέρα 9 σε όλους τους μεσοκόσμους, εκτός από τον P6 όπου η αφθονία παρέμεινε σταθερή μέχρι την ημέρα 5 και έπειτα αυξήθηκε ελαφρώς έως την ημέρα 9. Τα HB χωρίστηκαν επίσης σε δύο ομάδες ανάλογα με την περιεκτικότητά τους σε DNA. Το ποσοστό των βακτηρίων με υψηλή περιεκτικότητα σε DNA (High, HDNA βακτήρια) αντιπροσώπευσε το 52% των συνολικών ετερότροφων βακτηρίων στους C και τον P1 την ημέρα 1, ενώ το ποσοστό ήταν 54% και 60% στους P5 και P6, αντίστοιχα (Πίνακας 3.

2). Το ποσοστό των HDNA βακτηρίων μειώθηκε στον P6 από 60% σε 55% (Πίνακας 3. 2) και παρέμεινε σταθερό στους άλλους μεσοκόσμους (ANOSIM, $p < 0.05$).

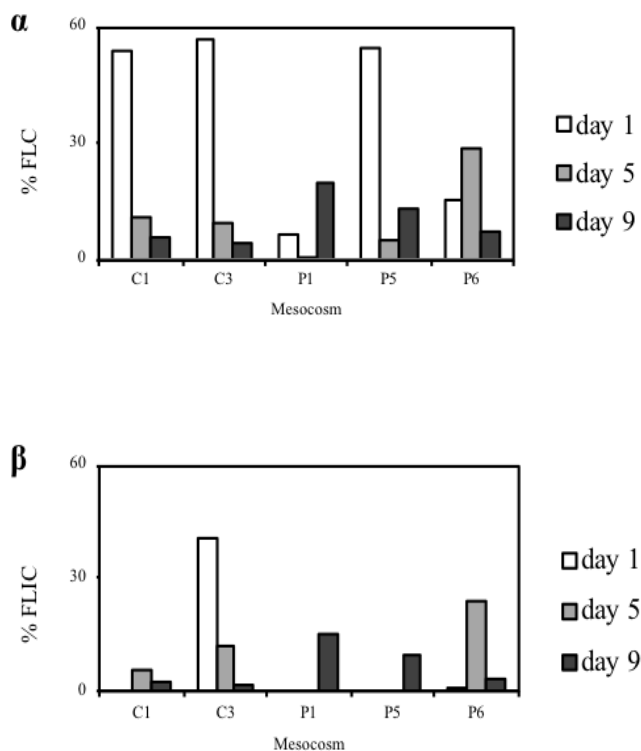
Πίνακας 3. 2. Το ποσοστό των ιών με χαμηλή περιεκτικότητα σε DNA (LVLP), το ποσοστό των βακτηρίων με υψηλή περιεκτικότητα σε DNA (HDNA βακτήρια) και το ποσοστό των διαφανών εξωπολυμερικών σωματιδίων (TEP) στο κλάσμα μεγέθους $>0.4 \mu\text{m}$ τις ημέρες 1, 5 και 9. Τα C1 και C3 αναφέρονται στους μεσοκόσμους μάρτυρες και τα P1, P5 και P6 αναφέρονται στους μεσοκόσμους με αυξανόμενη μερική πίεση CO_2 (αρχικές τιμές 595, 1174 και 1327 μatm αντίστοιχα).

Μεσοκόσμος	Ημέρα	LVLP	HDNA βακτήρια	$>0.4 \mu\text{m}$ TEP
C1	1	61	52	60
C1	5	49	52	62
C1	9	63	52	17
C3	1	54	52	46
C3	5	55	53	34
C3	9	63	52	22
P1	1	57	52	56
P1	5	52	50	37
P1	9	60	49	26
P5	1	55	54	63
P5	5	48	54	50
P5	9	66	53	28
P6	1	61	60	21
P6	5	51	58	58
P6	9	75	55	31

Η αφθονία των AB (άθροισμα των *Prochlorococcus* και *Synechococcus*) την ημέρα 1 κυμάνθηκε μεταξύ 3.56×10^4 και 4.21×10^4 κύτταρα mL^{-1} (Εικόνα 3. 2). Στους C, P1 και P5 η αφθονία ήταν είτε σταθερή είτε ελαφρώς αυξημένη από την ημέρα 1 έως την ημέρα 5 και μετέπειτα ήταν αυξημένη ως την ημέρα 9. Στον P6 η συμπεριφορά των AB ήταν διαφορετική από τους άλλους μεσοκόσμους και συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μια σημαντική πτώση στην αφθονία από την ημέρα 1 έως την ημέρα 5. Η μείωση ήταν κυρίως λόγω μείωσης των *Prochlorococcus* από 1.41×10^4 σε 8.5×10^3 κύτταρα mL^{-1} (Εικόνα 3. 2). Την ημέρα 9, η αφθονία των αυτότροφων βακτηρίων στον P6 ήταν σχεδόν ίδια με την αρχική τιμή, ωστόσο ήταν ακόμα χαμηλότερη από αυτή των C και P1.

3.3.3. Αυτικός και λυσιγονικός κύκλος ζωής

Σε όλα τα πειράματα επαγωγής λύσης παρατηρήθηκε πως όταν προστέθηκε μιτομυκίνη C υπήρξε στατιστικά σημαντική αύξηση VLPs σε σύγκριση με τις επώσεις που δεν προστέθηκε μιτομυκίνη C, κυρίως 4 ώρες μετά την έναρξη της επώασης. Η συχνότητα των λυσιγονικών κυττάρων (frequency of lysogenic cells, FLC) δεν συσχετίστηκε με το CO_2 (συσχέτιση Pearson, $p > 0.05$). Η FLC διέφερε κατά πολύ μεταξύ των μεσοκόσμων την ημέρα 1 και κυμαινόταν μεταξύ 6-56% (Εικόνα 3. 3). Η υψηλότερη FLC παρατηρήθηκε στους C την ημέρα 1, η οποία μειώθηκε πολύ (~10%) την ημέρα 5 και ακόμα περισσότερο (~5%) την ημέρα 9.



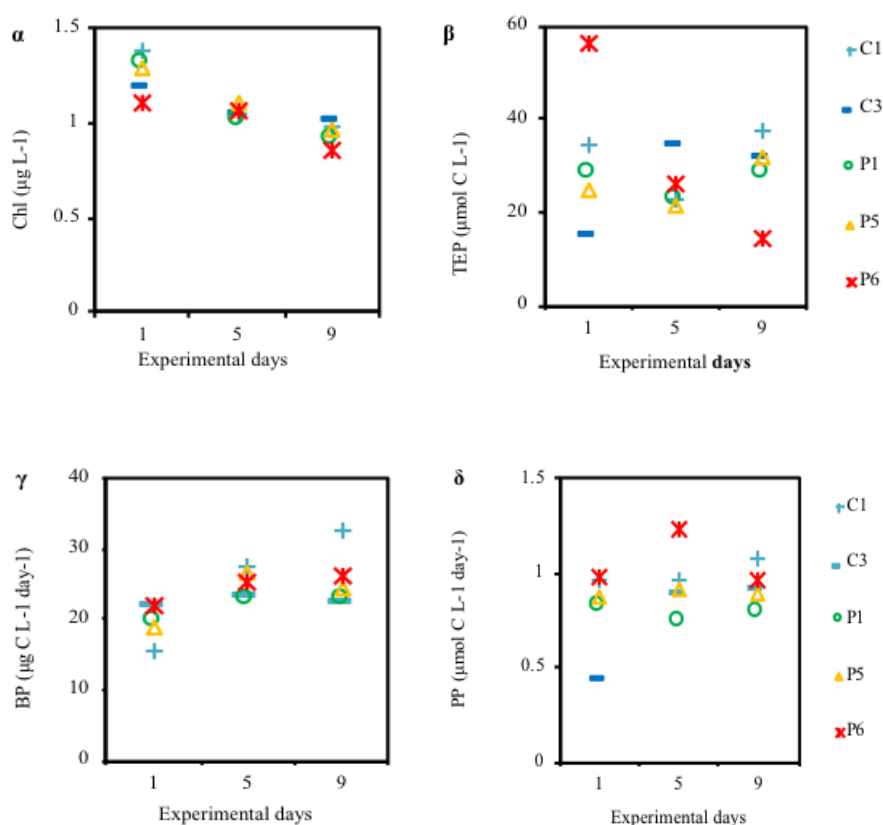
Εικόνα 3. 3. Συχνότητα λυσιγονικών κυττάρων (frequency of lysogenic cells, %FLC) και λυτικά μολυσμένων κυττάρων (frequency of lytically infected cells, %FLIC) τις ημέρες 1, 5 και 9. Τα C1 και C3 αναφέρονται στους μεσοκόσμους μάρτυρες και τα P1, P5 και P6 αναφέρονται στους μεσοκόσμους με αυξανόμενη μερική πίεση CO₂ (αρχικές τιμές 595, 1174 και 1327 μatm αντίστοιχα).

Στους P1 και P5 η FLC επίσης μειώθηκε μέχρι την ημέρα 5 σε πολύ χαμηλές τιμές και στη συνέχεια ακολούθησε μια αύξηση προς την ημέρα 9. Μόνο στον P6, η FLC αυξήθηκε από την ημέρα 1 έως την ημέρα 5 και στη συνέχεια μειώθηκε περίπου σε 7% την ημέρα 9 (Εικόνα 3. 3). Ομοίως, η συχνότητα των λυτικά μολυσμένων κυττάρων (frequency of lytically infected cells, FLIC) δεν συσχετίστηκε με το CO₂ (συσχέτιση Pearson, $p>0.05$) και κυμαινόταν σε όλους τους μεσοκόσμους μεταξύ 1-40% την ημέρα 1, 6-24% την ημέρα 5, και 2-15% την ημέρα 9, Εικόνα 3. 3). Δεν παρατηρήθηκε σταθερό πρότυπο μεταξύ των μεσοκόσμων και των χρονικών στιγμών, ενώ το 33% των μετρήσεων ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης (μηδενικές τιμές).

3.3.4. Συσχέτιση ιικών κύκλων ζωής και βιοτικών παραμέτρων

Στην Εικόνα 3. 4 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της χλωροφύλλης *a* (Chl) και των διαφανών εξωπολυμερικών σωματιδίων (transparent exopolymer particles, TEP), καθώς και οι ρυθμοί παραγωγής των ετερότροφων βακτηρίων και των πρωτογενών παραγωγών (heterotrophic bacterial production, BP και primary production, PP, αντίστοιχα). Μία

σταθερή πτώση της συγκέντρωσης Chl στο χρόνο ήταν εμφανής σε όλους τους μεσοκόσμους. Την ημέρα 1 μετρήθηκε η χαμηλότερη συγκέντρωση Chl στον P6 (Εικόνα 3. 4). Η συγκέντρωση των συνολικών TEP παρέμεινε σταθερή σε όλους τους μεσοκόσμους κατά τη διάρκεια του πειράματος, εκτός από τον P6 (Εικόνα 3. 4) όπου η αρχική συγκέντρωση των TEP ήταν διπλάσια σε σχέση με τους άλλους μεσοκόσμους. Μία μεγάλη πτώση των συνολικών TEP καταγράφηκε από την ημέρα 1 έως την ημέρα 9. Η επί τοις εκατό συνεισφορά των δύο κλάσεων μεγέθους TEP (0.05-0.4 μm και $>0.4 \mu\text{m}$) επί της συνολικής συγκέντρωσης TEP στους διάφορους μεσοκόσμους έδειξε πως το $>0.4 \mu\text{m}$ TEP μειώθηκε ελαφρώς από την ημέρα 1 έως την ημέρα 9 στους C3, P1 και P5, αλλά αυξήθηκε απότομα μόνο στον P6 την ημέρα 5 και επέστρεψε στα αρχικά επίπεδα την ημέρα 9 (Πίνακας 3. 2). Η απόκριση της BP διέφερε μεταξύ των μεσοκόσμων: αυξανόταν συνεχώς στους C και P6, παρέμεινε σταθερή στον P1 και μειώθηκε στον P5 την ημέρα 9 (Εικόνα 3. 4). Η PP παρέμεινε σταθερή ή ελαφρώς αυξημένη σε όλους τους μεσοκόσμους, εκτός από τον P6 που αυξήθηκε πολύ την ημέρα 5 και στη συνέχεια μειώθηκε την ημέρα 9 (Εικόνα 3. 4).



Εικόνα 3. 4. Συγκεντρώσεις της χλωροφύλλης (α, Chl), των συνολικών διαφανών πολυμερικών σωματιδίων (β, TEP) και παραγωγή των ετερότροφων βακτηρίων (γ, BP) και των πρωτογενών παραγωγών (δ, PP) τις ημέρες 1, 5 και 9. Τα C1 και C3 αναφέρονται στους μεσοκόσμους μάρτυρες και τα P1, P5 και P6 αναφέρονται στους μεσοκόσμους με αυξανόμενη μερική πίεση CO_2 (αρχικές τιμές 595, 1174 και 1327 μatm αντίστοιχα).

Προκειμένου να ελεγχθούν οι σχέσεις μεταξύ FLIC, FLC και βιοτικών και αβιοτικών παραμέτρων (pH, αφθονίες ετερότροφων και αυτότροφων βακτηρίων και ιών, συγκεντρώσεις Chl και TEP, BP και PP) έγινε ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης (multiple regression). Η ανάλυση έδειξε ότι η FLIC δεν συσχετίστηκε με καμία από τις μετρούμενες βιοτικές και αβιοτικές παραμέτρους. Από την άλλη πλευρά, η FLC συσχετίστηκε σημαντικά με διάφορες παραμέτρους: αρνητικά με την BP (συσχέτιση Pearson, $r=-0.578$, $p<0.05$) και την αφθονία των ετερότροφων βακτηρίων (συσχέτιση Pearson, $r=-0.552$, $p<0.05$) και θετικά με τις συγκεντρώσεις της Chl (συσχέτιση Pearson, $r=0.622$, $p<0.05$) και των TEP μεγέθους $>0.4 \mu\text{m}$ (συσχέτιση Pearson, $r=0.548$, $p<0.05$).

3.3.5. Επισκόπηση των περιβαλλοντικών συνθηκών του δεύτερου πειράματος

Την χρονική στιγμή T-1 η θερμοκρασία στους μεσοκόσμους W και GH ήταν 27.06 και 27.04 °C, αντίστοιχα και ως το τέλος του πειράματος είχε ελάχιστη διακύμανση (συνυπολογίζοντας όλες τις μετρήσεις στους δύο μεσοκόσμους ήταν 27.79 ± 0.53 °C). Στους μεσοκόσμους C και OA η θερμοκρασία ήταν 25.11 ± 0.09 °C καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Το pH είχε επίσης μικρή διακύμανση στο χρόνο και στις δύο συνθήκες. Στους μεσοκόσμους C και W ήταν 8.07 ± 0.03 και στους μεσοκόσμους OA και GH ήταν 7.91 ± 0.12 μονάδες.

Από τις αβιοτικές παραμέτρους που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, η συγκέντρωση των φωσφορικών ιόντων έδειξε διαφορετικά πρότυπα ανάμεσα στους μεσοκόσμους (RM ANOVA, $p<0.05$). Συγκεκριμένα, την T-1 η αρχική συγκέντρωση ήταν 3.39 ± 2.51 nM σε όλους τους μεσοκόσμους και την T0 αυξήθηκε στους C, W και OA, αλλά όχι στους GH (Πίνακας 3. 3). Το μετέπειτα πρότυπο ήταν παρόμοιο μεταξύ των μεσοκόσμων και βρέθηκε μείωση της συγκέντρωσης PO_4^{-3} ως την T6 (2.31 ± 0.18 nM) και μικρή αύξηση ως την T10 (3.50 ± 0.82 nM). Σε αντίθεση με τα φωσφορικά ιόντα, τα νιτρώδη, αμμωνιακά και πυριτικά είχαν παρόμοια πρότυπα συγκέντρωσης σε όλους τους μεσοκόσμους. Πιο συγκεκριμένα, η συγκέντρωση των NO_3^- είχε πτωτική τάση από την T-1 ως την T10, με εξαίρεση το διάστημα T-1 ως T0 όπου ήταν ελάχιστα αυξημένη (Πίνακας 3. 3). Η συγκέντρωση των NH_4^+ είχε επίσης πτωτική τάση από την T-1 ως την T10, ενώ είναι αξιοσημείωτο πως την T-1 υπήρχαν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση μεταξύ C-OA και W-GH (RM ANOVA, $p<0.05$): στους δύο πρώτους μεσοκόσμους ήταν κατά μέσο όρο 0.07 ± 0.01 nM, ενώ στους δύο τελευταίους ήταν κατά μέσο όρο 0.18 ± 0.11 nM. Εκτός από αυτή τη χρονική στιγμή, η εξέλιξη της συγκέντρωσης των NH_4^+ ήταν παρόμοια μεταξύ των μεσοκόσμων και οι διαφορές εξομαλύνθηκαν μετά την T0. Η συγκέντρωση των SiO_4^{-4} είχε ελαφρά διακύμανση μεταξύ 0.74 και 1.36 nM, με υψηλότερη τιμή στους GH μεσοκόσμους την T-1.

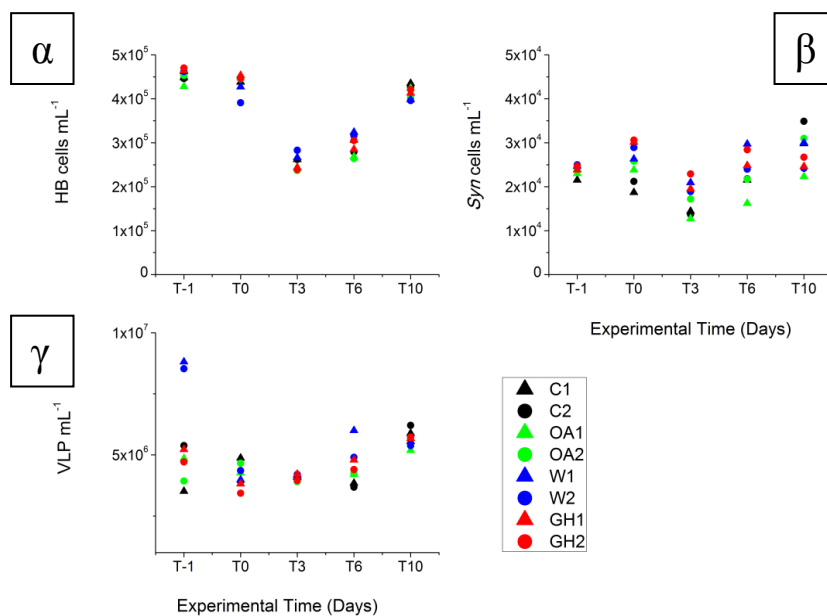
Πίνακας 3. 3. Αλατότητα, θερμοκρασία, pH και συγκεντρώσεις των νιτροδών (NO_3^-), αμμονιακών (NH_4^+), φωσφορικών (PO_4^{3-}) και πυριτικών (SiO_4^{4-}) ιόντων στους μεσοκόσμους τις χρονικές στιγμές T-1, T0, T3, T6 και T10. C: μεσόκοσμοι με επώαση νερού σε θερμοκρασία και pH περιβάλλοντος. W: μεσόκοσμοι με επώαση νερού σε +2 °C θερμοκρασία περιβάλλοντος και pH περιβάλλοντος. OA: μεσόκοσμοι με επώαση νερού σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και pH -0.3 μονάδες περιβάλλοντος. GH: μεσόκοσμοι με επώαση νερού σε +2 °C θερμοκρασία περιβάλλοντος και pH -0.3 μονάδες περιβάλλοντος.

Χρονική στιγμή και Μεσόκοσμος	Αλατότητα	Θερμοκρασία °C	pH	NO_3^- (nM)	NH_4^+ (nM)	PO_4^{3-} (nM)	SiO_4^{4-} (nM)
T-1 C1	39.08	25.10	8.11	0.127	0.101	1.867	0.855
T-1 C2	39.08	25.10	8.11	0.118	0.048	1.644	0.855
T-1 W1	39.08	27.06	8.11	0.058	0.281	3.089	1.089
T-1 W2	39.08	25.12	8.11	0.054	0.037	1.089	1.080
T-1 OA1							
T-1 OA2	39.08	25.12	8.11	0.081	0.080	1.644	1.098
T-1 GH1	39.08	27.04	8.11	0.079	0.164	7.533	1.233
T-1 GH2	39.08	27.04	8.11	0.477	0.154	6.200	1.494
T0 C1	39.09	25.0	8.07	0.132	0.021	4.978	0.873
T0 C2	39.09	25.0	8.08	0.136	0.032	9.867	0.909
T0 W1							
T0 W2	39.07	27.4	8.06	0.111	0.021	5.311	0.882
T0 OA1	39.09	25.02	7.97	0.033	0.011	3.867	1.044
T0 OA2	39.09	25.02	7.98	0.125	0.058	3.756	1.116
T0 GH1	39.09	27.35	7.93	0.074	0.037	4.867	1.188
T0 GH2	39.09	27.34	7.93	0.185	0.053	7.311	1.179
T3 C1	39.08	25.04	8.07	0.014	0.080	1.756	0.792
T3 C2	39.09	25.01	8.07	0.126	0.064	3.089	0.828
T3 W1	39.09	28.27	8.08	0.097	0.027	4.089	0.873
T3 W2	39.09	28.25	8.07	0.033	0.037	3.533	0.837
T3 OA1	39.09	25.05	7.84	0.069	0.064	3.089	0.882
T3 OA2							
T3 GH1	39.10	28.24	7.83	0.053	0.000	5.644	1.053
T3 GH2	39.14	28.25	7.80	0.058	0.000	5.533	1.071
T6 C1	39.02	25.16	8.04	0.023	0.032	2.644	0.738
T6 C2	39.04	25.09	8.04	0.018	0.032	1.756	0.756
T6 W1							
T6 W2	39.03	28.32	8.02	0.058	0.000	2.089	0.756
T6 OA1	39.01	25.27	7.83	0.021	0.005	2.978	0.738
T6 OA2	39.09	28.26	7.80	0.046	0.000	1.644	0.882
T6 GH1							
T6 GH2	39.04	28.41	7.80	0.044	0.000	2.422	0.882
T10 C1	39.12	25.26	8.05	0.016	0.000	4.422	0.855
T10 C2	39.14	25.23	8.05	0.058	0.000	2.644	0.846
T10 W1	39.21	27.86	8.05	0.051	0.000	3.644	0.855
T10 W2	39.16	27.92	8.04	0.000	0.000	3.867	0.837
T10 OA1	39.14	25.29	7.84	0.023	0.000	3.422	0.837
T10 OA2							
T10 GH1	39.16	27.9	7.83	0.035	0.000	5.533	0.999
T10 GH2	39.25	27.96	7.83	0.053	0.000	4.422	0.819

3.3.6. Βακτηριακή και ιική αφθονία

Την T-1 η αφθονία των ετερότροφων βακτηρίων ήταν $4.54 \times 10^5 \pm 1.31 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ και παρέμεινε σταθερή ως την T0 (Εικόνα 3. 5). Δεν υπήρχαν διαφορές στην αφθονία των HB ανάμεσα στους μεσοκόσμους και παρατηρήθηκε μια χαρακτηριστική κοινή μείωση ως την T3 και αντίστοιχη κοινή αύξηση ως την T10. Τα αυτότροφα βακτήρια αποτελούνταν κυρίως από *Synechococcus* (*Syn*) και την T-1 η αφθονία τους ήταν $2.38 \times 10^4 \pm 1.13 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$ (Εικόνα 3. 5). Παρόμοια με τα HB, τα *Syn* μειώθηκαν ελαφρώς στους C και OA ως την T3,

ενώ αυξήθηκαν στους W και GH ως την T0 (Εικόνα 3. 5). Τις στιγμές T0, T3 και T6 οι αφθονίες των *Syn* ήταν υψηλότερες στους W και GH από ότι στους C και OA (RM ANOVA, $p < 0.05$).

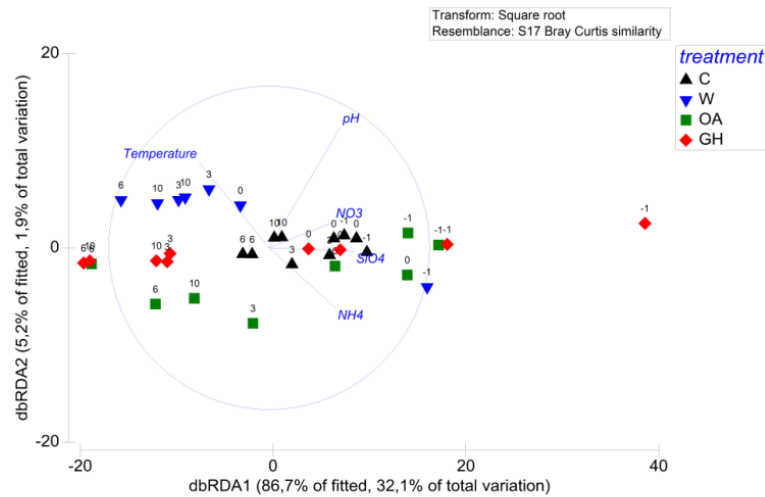


Εικόνα 3. 5. Αφθονία ετερότροφων βακτηρίων (heterotrophic bacteria, HB, α), *Synechococcus* (*Syn*, β) και ικών σωματιδίων (virus-like particles, VLP, γ) στους μεσοκόσμους τις χρονικές στιγμές T-1, T0, T3, T6 και T10. C: μεσόκοσμοι με επώαση νερού σε θερμοκρασία και pH περιβάλλοντος. W: μεσόκοσμοι με επώαση νερού σε +2 °C θερμοκρασία περιβάλλοντος και pH περιβάλλοντος. OA: μεσόκοσμοι με επώαση νερού σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και pH -0.3 μονάδες περιβάλλοντος. GH: μεσόκοσμοι με επώαση νερού σε +2 °C θερμοκρασία περιβάλλοντος και pH -0.3 μονάδες περιβάλλοντος.

Τέλος, η αφθονία των ικών σωματιδίων δεν διέφερε μεταξύ των μεσοκόσμων, εκτός από την T-1 όπου παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη αφθονία στους W (~8.5 x10⁶ VLP mL⁻¹) από ό, τι στους άλλους μεσοκόσμους (4.60 x10⁶ ±7.35 x10⁵ VLP mL⁻¹). Παρομοίως, τις στιγμές T3 και T10 οι αφθονία των VLPs δεν διέφερε μεταξύ των μεσοκόσμων (Εικόνα 3. 5).

3.3.7. Σύσταση της βακτηριακής κοινότητας

Η σύσταση της βακτηριακής κοινότητας στο επίπεδο του γένους διέφερε με βάση την συνδυαστική δράση των παραμέτρων του «χρόνου» και της «πειραματικής συνθήκης» (PERMANOVA, Pseudo-F=1.74, $p < 0.05$). Σύμφωνα με την ανάλυση τύπου distance-based redundancy analysis, η θερμοκρασία, το pH, και οι συγκεντρώσεις των νιτρικών, αμμωνιακών και πυριτικών ιόντων καθόρισαν την βακτηριακή κοινότητα κατά το 25.77% (Εικόνα 3. 6).

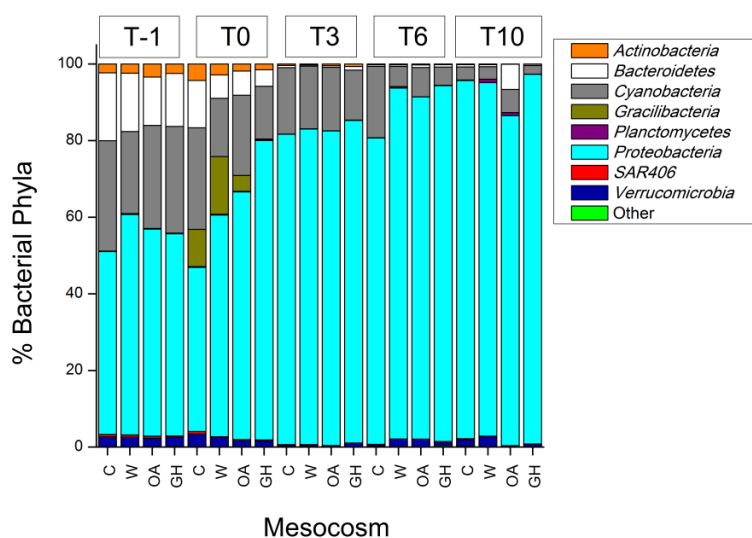


Εικόνα 3. 6. Ανάλυση τύπου distance-based redundancy analysis (dbRDA) για τις βακτηριακές κοινότητες στο επίπεδο του γένους βάσει των παραμέτρων «χρόνος» και «πειραματική συνθήκη». Μόνο οι στατιστικά σημαντικές αβιοτικές παράμετροι χρησιμοποιούνται στο μοντέλο (δηλαδή, θερμοκρασία, pH και οι συγκεντρώσεις: νιτρωδών $[\text{NO}_3^-]$, αμμωνιακών $[\text{NH}_4^+]$ και πυριτικών $[\text{SiO}_4^{4-}]$ ιόντων). Το μήκος των γραμμών δηλώνουν τη σχετική ένταση της συσχέτισης. Η ομοιότητα των κοινοτήτων βασίστηκε στον υπολογισμό του δείκτη Bray Curtis μετά από μετασχηματισμό των 16S rRNA γονιδίων (τετραγωνική ρίζα).

Πράγματι, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3. 7, παρατηρήθηκε μια αλλαγή στην κοινότητα αμέσως μετά την μετατροπή του pH και της θερμοκρασίας (δηλαδή μεταξύ T-1 και T0). Ιδιαίτερα χαρακτηριστική ήταν 1) η μείωση της ποσοστιαίας συνεισφοράς των *Cyanobacteria* σε όλους τους μεσοκόσμους και περισσότερο στους W και GH και 2) η αύξηση της ποσοστιαίας συνεισφοράς των *Proteobacteria* σε όλους τους μεσοκόσμους και περισσότερο στους W και GH. Επίσης, ήταν χαρακτηριστικό πως στο ίδιο διάστημα το ποσοστό των *Gracilibacteria* αυξήθηκε από ~0.05% σε 10 και 15% στους C και W, αντίστοιχα, λιγότερο στους OA (4%) και καθόλου στους GH (Εικόνα 3. 7). Μεταξύ T-1 και T0 στους μεσοκόσμους C παρατηρήθηκε επίσης αύξηση του ποσοστού των *Actinobacteria* (από 2.3 στο 4.3% των συνολικών 16S rRNA γονιδίων).

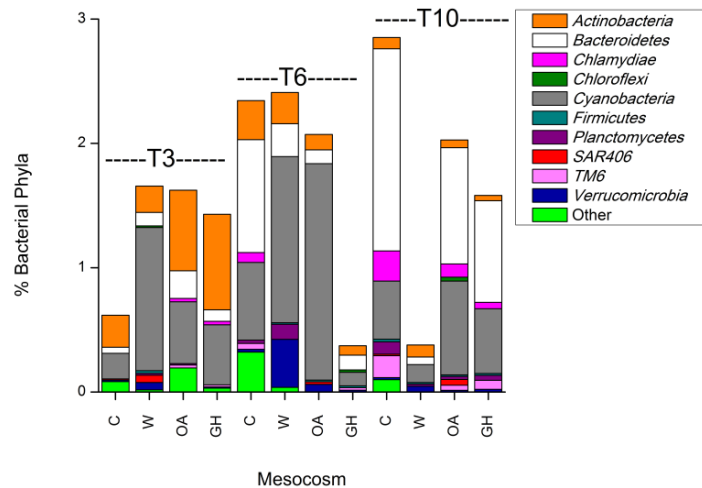
Τα *Proteobacteria* παρουσίασαν ένα ιδιαίτερο πρότυπο σταδιακής αύξησης με τον χρόνο σε όλους τους μεσοκόσμους (Εικόνα 3. 7). Στην αρχή αποτελούσαν $53 \pm 4\%$, την T0 αποτελούσαν 61 ± 15 , την T3 82 ± 1 , την T6 88 ± 6 και την T10 $92 \pm 4\%$ της κοινότητας. Εντός των *Proteobacteria*, η κλάση *Alphaproteobacteria* ήταν επικρατής σε όλα τα δείγματα και αυξήθηκε περισσότερο στους GH από ό, τι στους άλλους μεσοκόσμους από την T-1 ως την T10 (από 42 σε 87%, ενώ στους άλλους μεσοκόσμους το ποσοστό την T10 δεν ξεπέρασε το 80%). Επίσης, τα *Gamma*proteobacteria ήταν περισσότερο άφθονα στους OA τις στιγμές T6

και T10 (20 και 29%, αντίστοιχα) από ό, τι στους άλλους μεσοκόσμους (7-14% και τις δύο ημέρες).



Εικόνα 3. 7. Ποσοστιαία συνεισφορά των βακτηριακών φύλων (% Bacterial Phyla) στους μεσοκόσμους τις χρονικές στιγμές T-1, T0, T3, T6 και T10 στο κλάσμα 0.2-3.0 μm. Το σύνολο των σπάνιων φύλων αναφέρεται ως «Other» και περιέχει τα φύλα *Acidobacteria*, *Armatimonadetes*, *BHI80-139*, *Caldithrix*, *Chlamydiae*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Elusimicrobia*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *NC10*, *Nitrospirae*, *OD1*, *OP3*, *SBR1093*, *Spirochaetes*, *TM6*, *TM7*, *WPS-2*, *WS3*, *WWE1* και *ZB3*.

Εντός των *Alphaproteobacteria*, η μεγαλύτερη διαφορά βρέθηκε στην οικογένεια *Pelagibacteraceae*, η οποία ήταν πιο άφθονη στους GH τις T3, T6 και T10. Επιπλέον, τρία στελέχη της οικογένειας *Hypnomonadaceae* (*Maricaulis*, *Oceanicaulis* και ένα άγνωστο) και ένα στέλεχος της οικογένειας *Rhodobacteraceae* ήταν πιο άφθονα στους OA από ό, τι στους άλλους μεσοκόσμους την T10. Ιδιαίτερο πρότυπο βρέθηκε επίσης για τα *Bacteroidetes* που αρχικά συνιστούσαν $15 \pm 2\%$ της κοινότητας, μειώθηκαν μέσα σε μια ημέρα στο μισό ποσοστό σε όλους τους μεσοκόσμους εκτός των C και τελικά επανήλθαν σε επίπεδα παρόμοια με τα αρχικά μόνο στους OA την χρονική στιγμή T10 (7% των συνολικών 16S) (Εικόνα 3. 7).



Εικόνα 3. 8. Ποσοστιαία συνεισφορά των βακτηριακών φύλων (% Bacterial Phyla) στους μεσοκόσμους τις χρονικές στιγμές T3, T6 και T10 στο κλάσμα 0.1-0.2 μm . Το σύνολο των σπάνιων φύλων αναφέρεται ως «Other» και περιέχει τα φύλα *Acidobacteria*, *Armatimonadetes*, *BHI80-139*, *Caldithrix*, *Chlorobi*, *Elusimicrobia*, *Fusobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaera*, *NC10*, *Nitrospirae*, *OD1*, *OP3*, *SBR1093*, *Spirochaetes*, *TM7*, *WPS-2*, *WS3*, *WWE1* και *ZB3*. Το φύλο *Proteobacteria* δεν παρουσιάζεται και αποτελεί το υπόλοιπο ποσοστό της βακτηριακής κοινότητας στο στο κλάσμα 0.1-0.2 μm .

Στο μικρότερο κλάσμα μεγέθους (0.1-0.2 μm), ήταν εντυπωσιακή η επικράτηση των *Proteobacteria* σε όλους τους μεσοκόσμους κατά 98-99% των 16S rRNA γονιδίων. Στο υπόλοιπο ποσοστό (Εικόνα 3. 8), παρατηρήθηκαν 1) περισσότερα *Cyanobacteria* στους OA τις T6 και T10, 2) περισσότερα *Bacteroidetes*, *Chlamydiae* και *TM6* στους C την T10 και 3) περισσότερα *Verrucomicrobia* τις T3, T6 και T10 στους W. Για τα *Cyanobacteria* στους OA τις T6 και T10 βρέθηκε πως απαρτίζονταν κατά κύριο λόγο από το γένος *Synechococcus*, ενώ για τα *Verrucomicrobia* στους W βρέθηκε πως απαρτίζονταν κατά κύριο από την οικογένεια *Puniceicoccaceae*.

3.4. Συζήτηση

3.4.1. Οι κύκλοι ζωής των ιών στο μεσοτροφικό σύστημα του κόλπου της Villefranche

Στο πρώτο σκέλος της εργασίας μελετήθηκε η επίδραση της αυξημένης συγκέντρωσης $p\text{CO}_2$ στους ιούς και τα βακτήρια και έγινε μια πρώτη προσέγγιση των δύο ικών αναπαραγωγικών στρατηγικών σε σχέση με την οξίνιση του περιβάλλοντος. Η λύση και η λυσιγονία δεν επηρεάστηκαν άμεσα από τις αλλαγές του pH. Είναι χαρακτηριστικό πως συχνά δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ λυσιγονίας και περιβαλλοντικών παραμέτρων σε υδατικά συστήματα (Williamson et al. 2002; Maurice et al. 2013). Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες που επικεντρώνονται στους κύκλους ζωής των ιών περιγράφουν μια ισχυρή αρνητική συσχέτιση

μεταξύ της συνολικής παραγωγικότητας του συστήματος και της λυσιγονίας (Weinbauer *et al.*, 2003; McDaniel and Paul, 2005; Long *et al.*, 2008). Παρομοίως, στην παρούσα μελέτη βρέθηκε αρνητική σχέση μεταξύ FLC και της βακτηριακής αφθονίας και παραγωγικότητας. Συνεπώς, επιβεβαιώθηκε και εδώ ότι η λυσιγονία είναι ένας επικρατής κύκλος ζωής σε συνθήκες χαμηλής αφθονίας και παραγωγικότητας του ξενιστή που εξασφαλίζει την επιβίωση τόσο των ξενιστών όσο και των ιών (McDaniel and Paul, 2005) και πιθανόν ελέγχεται από τη ρύθμιση των «δαπανηρών» μεταβολικών οδών των ξενιστών (Paul 2008). Επιπλέον, παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ της λυσιγονίας και του φυτοπλαγκτού. Φαινομενικά, η θετική συσχέτιση μεταξύ FLC και των συγκεντρώσεων της Chl καθώς και της κλάσης μεγέθους TEP >0.4 μm φάνηκε να αντικρούει το αποτέλεσμα της αρνητικής σχέσης μεταξύ FLC και βακτηριακής αφθονίας/παραγωγικότητας. Παρόλα αυτά, η σχέση της λυσιγονίας και του φυτοπλαγκτού επιβεβαιώνει το γεγονός ότι η έκκριση οργανικού υλικού ελέγχει τη δυναμική των ετερότροφων βακτηρίων και επιπλέον επηρεάζει τους τρόπους αναπαραγωγής των ιών (Lasternas and Agustí 2013). Η παραγωγή συνολικών TEP μειώθηκε προς τα μέσα του πειράματος σε όλους τους μεσοκόσμους, πιθανώς λόγω διεργασιών καθίζησης ή/και διάλυσης σε μικρότερα TEP (Bourdin *et al.* 2017), ενώ η συγκέντρωση της Chl μειώθηκε επίσης με το χρόνο λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης θρεπτικών στοιχείων και άρα τον περιορισμό της πλαγκτονικής ανάπτυξης από τα θρεπτικά στοιχεία, το φως και τη θερμοκρασία (Maugendre *et al.* 2017). Στους μεσοκόσμους του παρόντος πειράματος, η συγκέντρωση της Chl φάνηκε να εξηγεί ένα υψηλό ποσοστό μεταβλητότητας της FLC, υποδηλώνοντας ότι το φυτοπλαγκτόν αλληλεπιδράσε με τα βακτήρια και τελικά επηρέασε έμμεσα την παραγωγικότητά τους.

Η έλλειψη συσχέτισης μεταξύ της FLIC και οποιασδήποτε περιβαλλοντικής παραμέτρου ήταν αξιοσημείωτη. Η λύση των κυττάρων είναι μια συνεχόμενη διαδικασία με περιόδους έντονης αύξησης, όταν το επιτρέπουν οι συνθήκες. Έτσι, είναι πιθανό πως κυτταρική λύση συνέβη πριν από τη δειγματοληψία και αυτό ίσως εμπόδισε την ανίχνευση των λυτικών κυττάρων στους μεσοκόσμους. Οι Bettarel *et al.* (2002) και Winter *et al.* (2004) παρατήρησαν μέγιστη παρουσία λυτικά μολυσμένων κυττάρων κατά τη διάρκεια της νύχτας στο φυσικό πεδίο. Αν υποθεθεί ότι στο σύστημα των μεσοκόσμων κυριαρχούν παρόμοια ημερήσια πρότυπα, δεδομένου του ότι η δειγματοληψία γινόταν νωρίς το ξημέρωμα, τα κύτταρα ίσως είχαν πρόσφατα λυθεί. Επιπλέον, υπάρχει η πιθανότητα η λύση να συγχρονίστηκε με άλλες μικροβιακές διεργασίες (Boras *et al.* 2009) που δεν μελετήθηκαν σε αυτό το πείραμα.

3.4.2. Η επίδραση της οξίνισης των ωκεανών στη λυσιγονία

Ο πρωταρχικός στόχος του πειράματος ήταν να αξιολογηθεί η επίπτωση της πιθανής μελλοντικής μείωσης του pH στους κύκλους ζωής των ιών. Η λυσιγονία δεν μεταβλήθηκε σε σχέση με το CO₂ και οι περισσότερες βιοτικές και αβιοτικές παράμετροι δεν διέφεραν μεταξύ των C και P μεσοκόσμων. Παρόλα αυτά, παρατηρήθηκε ένα σημαντικό διαφορετικό πρότυπο στις υποομάδες βακτηρίων και ιών μεταξύ των μεσοκόσμων. Ειδικότερα, στους C, P1 και P5, τα HDNA βακτήρια παρέμειναν σταθερά στο χρόνο και οι LVLP μειώθηκαν την ημέρα 5 και ανακτήθηκαν την ημέρα 9 στα αρχικά επίπεδα. Αντίθετα, στον P6, παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό των HDNA βακτηρίων μειώθηκε, ενώ ταυτόχρονα το ποσοστό των LVLP αυξήθηκε την ημέρα 9 (έως 75%), υποδηλώνοντας ότι τα πρώτα μολύνθηκαν από τους δεύτερους. Η αύξηση των LVLP πιθανόν αντανάκλα τους υψηλότερους ρυθμούς παραγωγής ή/και τους χαμηλότερους ρυθμούς αποδόμησής τους (Alonso et al. 2002). Από την άλλη πλευρά, τα HDNA βακτήρια συχνά αντιπροσωπεύουν ενεργά κύτταρα (Morán et al. 2007) τα οποία είναι συνήθως επιρρεπή στην ιική μόλυνση (Winter et al. 2004). Πράγματι, τα HDNA βακτήρια έχουν βρεθεί στο παρελθόν να υφίστανται υψηλότερους ρυθμούς λύσης σε σύγκριση με LDNA βακτήρια, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια του χειμώνα (Thomas et al. 2011). Η μείωση των HDNA βακτηρίων στον P6 με το πέρασμα του χρόνου ενδεχομένως να υποδηλώνει πως αυτά τα κύτταρα ήταν πιο επιρρεπή στη λύση και οδήγησαν τελικά σε μια κοινότητα που κυριαρχείται από λιγότερο δραστικά κύτταρα (σε σύγκριση με την έναρξη του πειράματος). Στο ίδιο πείραμα, οι Celussi *et al.* (2017) μέτρησαν σημαντικά χαμηλότερη αφθονία προκαρυωτικών κυττάρων με ενεργή αναπνοή στους P μεσοκόσμους, γεγονός που υποστηρίζει τα ευρήματα της παρούσας εργασίας.

Η λυσιγονία παρόλα αυτά φάνηκε να είναι ανεξάρτητη από τη μείωση του pH, εκτός από μια χρονική στιγμή: στον P6 μεσόκοσμο παρατηρήθηκε μια βραχυπρόθεσμη επίδραση στην FLC. Τα βιοτικά και αβιοτικά δεδομένα ομαδοποιήθηκαν με βάση τον πειραματικό χρόνο, ενώ όταν συνυπολογίστηκαν οι παράμετροι FLC και FLIC ο μεσόκοσμος P6 ήταν σημαντικά διαφορετικός από τους άλλους τις ημέρες 1 και 5. Πιο συγκεκριμένα, ο P6 χαρακτηρίστηκε από τις ακόλουθες διαφοροποιήσεις: συγκέντρωση PP ~1.5 φορά υψηλότερη (ημέρες 1 και 5), συγκέντρωση >0.4 μm TEP ~2 φορές χαμηλότερη και ~1.5 φορά υψηλότερη (ημέρα 1 και 5, αντίστοιχα), ενώ η FLC ήταν ~3 φορές χαμηλότερη και ~4 φορές υψηλότερη (ημέρα 1 και 5, αντίστοιχα).

Οι Grossart *et al.* (2006) και Paulino *et al.* (2007) παρατήρησαν ότι τα ετερότροφα βακτήρια δεν επηρεάστηκαν από τη μείωση του pH στο πείραμα μεσοκόσμων τους. Παρόλα

αυτά, προέκυψαν δευτερογενείς επιδράσεις από την λύση των αυτότροφων νανοευκαρυωτικών κυττάρων και την επακόλουθη απελευθέρωση διαλελυμένου οργανικού υλικού που επηρέασαν τη μη μολυσμένη βακτηριακή κοινότητα. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια ενός άλλου πειράματος μεσοκόσμων, οι Rochelle-Newall *et al.* (2004) δεν διαπίστωσαν διαφορά στην ική αφθονία μεταξύ των αντίστοιχων μεσοκόσμων «C» και «P» και επεσήμαναν ότι τα ποσοστά λύσης θα έπρεπε να είχαν μετρηθεί για να προκύψει ένα συμπέρασμα. Τέλος, οι Larsen *et al.* (2008) σε μια παρόμοια πειραματική διάταξη πρότειναν ότι κάτω από υψηλές συγκεντρώσεις $p\text{CO}_2$ η δυναμική ιού-ξενιστή και η ική αναπαραγωγή αλλάζουν. Επίσης, οι ίδιοι συγγραφείς παρατήρησαν επιπτώσεις σε συγκεκριμένους ιούς που μολύνουν είδη φυτοπλαγκτού.

Οι ιοί, το φυτοπλαγκτόν και τα ετερότροφα βακτήρια συνδέονται στενά μεταξύ τους και οι αλλοιώσεις στο φυτοπλαγκτόν επηρεάζουν έντονα τους ρυθμούς ανάπτυξης των ετερότροφων βακτηρίων (Brussaard *et al.* 2008). Οι παρατηρήσεις της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι οι μικρές διαφορές στην παραγωγικότητα του φυτοπλαγκτού (Gazeau *et al.*, 2017) και στην έκκριση TEP (Bourdin *et al.* 2017) που συνέβησαν στον περισσότερο «όξινο» μεσόκοσμο μπορεί να δικαιολογούν την υψηλότερη FLC στον P6 την ημέρα 5. Επιπλέον, η πτωτική τάση των δραστικότερων HDNA βακτηρίων μπορεί να είναι ένδειξη χαμηλότερης μεταβολικής δραστηριότητας και συνεπώς ένδειξη μετατόπισης προς τον λυσιγονικό κύκλο ζωής.

Η έκκριση των TEP μπορεί να σχετίζεται με την εξέλιξη της λυσιγονίας δεδομένου του ότι τα δύο φαινόμενα αλληλοεξαρτώνται. Μια αύξηση των TEP θεωρητικά μπορεί να οδηγήσει: (α) είτε σε προσκόλληση βακτηρίων στα κολλοειδή σωματίδια (Mari *et al.* 2007) με αποτέλεσμα άμεσες «απώλειες» ιών από το περιβάλλον (β) είτε σε ανταγωνισμό μεταξύ αυτότροφων και ετερότροφων (Tanaka *et al.* 2003) και διαφυγή των ετερότροφων στον λυσιγονικό κύκλο και άρα έμμεσες «απώλειες» ιών από το περιβάλλον (Bongiorni *et al.*, 2005). Και οι δύο διαδικασίες φαίνεται να συμφωνούν με την αυξημένη FLC στον P6 την ημέρα 5. Οι Allgaier *et al.* (2008) αξιολόγησαν την ποικιλομορφία τόσο των ελεύθερων όσο και των προσκολλημένων βακτηρίων σε σωματίδια και ανέφεραν πως τα πρώτα άλλαξαν στην αυξημένη $p\text{CO}_2$, ενώ τα δεύτερα όχι. Είναι πιθανό πως ο σχηματισμός TEP $>0.4 \mu\text{m}$ ευνόησε κυρίως τα βακτήρια που είναι προσκολλημένα σε σωματίδια και είναι πιο ενεργά, ενώ τα ελεύθερα βακτήρια που είναι λιγότερο δραστικά ήταν υπεύθυνα για την υψηλή FLC. Ωστόσο, αυτά τα ευρήματα προέρχονται από έναν μεσόκοσμο και άρα αποτελούν μια πρώτη ένδειξη της επίδρασης της οξίνισης στον κύκλο ζωής των ιών.

3.4.3. Η ταυτόχρονη επίδραση της οξίνισης και της υπερθέρμανσης των ωκεανών στη βακτηριακή ποικιλότητα στο ολιγοτροφικό σύστημα του κόλπου του Ηρακλείου

Στο δεύτερο σκέλος της εργασίας μελετήθηκε η ταυτόχρονη επίδραση της αυξημένης συγκέντρωσης $p\text{CO}_2$ και αυξημένης θερμοκρασίας στα βακτήρια. Όπως και στο πρώτο πείραμα, τα ετερότροφα βακτήρια στον κόλπο του Ηρακλείου δεν επηρεάστηκαν από τη μείωση του pH σε επίπεδο συνολικής αφθονίας, συμφωνώντας με τους Grossart *et al.* (2006) και Paulino *et al.* (2007). Παρόλα αυτά, η ταξινομική ανάλυση έδειξε πως σημαντικές διαφορές προέκυψαν από την πειραματική συνθήκη. Κάποια στελέχη ευνοήθηκαν και άλλα εξαλείφθηκαν ανάλογα με τη συνθήκη και τη χρονική στιγμή, εν τέλει όμως, 10 ημέρες μετά την μείωση του pH και την αύξηση της θερμοκρασίας οι κοινότητες είχαν αρκετές ομοιότητες μεταξύ τους. Παρόμοια με άλλες μελέτες που ανέφεραν πως οι βακτηριακές κοινότητες μπορούν να ανταπεξέλθουν στις αλλαγές του pH (Zhang *et al.* 2013; Wang *et al.* 2016; Lin *et al.* 2018), στην παρούσα μελέτη η κοινότητα των βακτηρίων υπέστη αλλαγές στην ποσοστιαία συνεισφορά άφθονων στελεχών τις πρώτες στιγμές μετά την πειραματική τροποποίηση που όμως δεν ήταν έντονες αργότερα. Επιπλέον, οι παραπάνω και άλλες έρευνες έχουν δείξει πως η θερμοκρασία παίζει κυρίαρχο ρόλο στη σύσταση των βακτηρίων, γεγονός που αποδείχτηκε και εδώ μιας και οι W και GH είχαν τα πιο ιδιαίτερα βακτηριακά πρότυπα.

Πιο συγκεκριμένα, τα *Proteobacteria* φάνηκαν να επηρεάζονται θετικά από την αύξηση της θερμοκρασίας καθώς αυξήθηκαν στους W και GH. Είναι αξιοσημείωτο πως τα *Proteobacteria* αυξήθηκαν με το πέρασμα του χρόνου σε όλους τους μεσοκόσμους και τελικά επικράτησαν, υποδεικνύοντας πως τα πολλά ευκαιριακά στελέχη του Φύλου που αναπτύχθηκαν στο κλειστό σύστημα των μεσοκόσμων. Ακόμα μεγαλύτερη διαφορά όμως παρατηρήθηκε στους GH, μιας και μόνο σε αυτόν τον μεσόκοσμο, τα *Proteobacteria* (και μεταξύ αυτών η κλάση των *Alphaproteobacteria*) ήταν ιδιαίτερα αυξημένη σε σχέση με τους άλλους μεσοκόσμους. Οι Lindh *et al.* (2013) ανέφεραν την θετική επίδραση σε στελέχη *Betaproteobacteria*, κάτι που δε βρέθηκε στην παρούσα μελέτη, όπου μάλιστα αυτή η κλάση αποτελούσε <1% της συνολικής βακτηριακής κοινότητας. Επίσης σε αντίθεση με τους Lindh *et al.* (2013), το φύλο *Bacteroidetes* φάνηκε να επηρεάζεται αρνητικά από την επώαση γενικότερα (όλοι οι μεσόκοσμοι) αλλά και από την αύξηση της θερμοκρασίας (W και GH), μιας και εξαλείφθηκε από τους μεσοκόσμους μόλις την T0. Το φύλο επανεμφανίστηκε μόνο στους OA και ίσως σχετίζεται με την ιδιαίτερη σύσταση του οργανικού υλικού που είχε προκύψει σε αυτόν τον μεσόκοσμο.

Η οικογένεια *Pelagibacteraceae* (*SAR11*, *Alphaproteobacteria*) είναι εξαιρετικά άφθονο στα επιφανειακά νερά (Brown et al. 2012) και φαίνεται να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την σύσταση του διαλυτού οργανικού υλικού (Sharma et al., 2014), τη θερμοκρασία και την αλατότητα (Herlemann et al. 2014). Πρόσφατα, οι Hartmann et al. (2016) έδειξαν πως τα *Pelagibacteraceae* μπορούν να αντιμετωπίσουν μια απότομη και έντονη μείωση του pH καθώς στο πείραμά τους, το στέλεχος δεν επηρεάστηκε από κάτι τέτοιο. Αντιθέτως, η αφθονία του έδειξε θετική συσχέτιση με την θερμοκρασία, γεγονός που εν μέρει συμφωνεί με το αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης όπου αποκλειστικά τα *Pelagibacteraceae* έφτασαν το 81% της κοινότητας στους GH. Έχει επίσης αναφερθεί πως η επίδραση της οξίνισης είναι εντονότερη όταν συνδυάζεται ταυτόχρονα με υπερθέρμανση σε μικροβιακές κοινότητες βενθικών μικροφυκών (Roth-Schulze et al. 2018).

Σύμφωνα με την ανάλυση τύπου distance-based redundancy analysis (dbRDA), ένας συνδυασμός φυσικοχημικών αλλαγών που περιελάμβανε από την μία πλευρά τις μετατροπές του pH και της θερμοκρασίας και από την άλλη πλευρά τα θρεπτικά στοιχεία (κυρίως άζωτο) καθόρισαν τη βακτηριακή κοινότητα. Οι αλλαγές στη συγκέντρωση των θρεπτικών εμπεριέχουν την έννοια του χρόνου, καθώς οι πλαγκτονικοί μικροοργανισμοί καταναλώνουν και ανακυκλώνουν τα θρεπτικά στο κλειστό κύκλωμα των μεσοκόσμων και αυτό φάνηκε να έχει μεγάλη επίδραση στη δομή των βακτηρίων. Πράγματι, και η μελέτη των Paul et al. (2015) τόνισε πως ο χρόνος έπαιξε σημαντικό ρόλο στις αλλαγές της κοινότητας, και οι Lin et al. (2018) εντόπισαν μεμονωμένες αλλαγές σε άφθονα στελέχη σε αντίστοιχα πειράματα με το παρόν πείραμα. Ανάμεσα σε αυτά τα στελέχη, προκαλεί ενδιαφέρον ότι συνολικά τα *Proteobacteria* και ειδικότερα τα *Alphaproteobacteria* είχαν το αντίθετο πρότυπο στους Lin et al. (2018) και Paul et al. (2015). Ένας πιθανός λόγος για την διαφορά είναι η συγκέντρωση των θρεπτικών στοιχείων που στην παραπάνω περίπτωση ήταν πολύ υψηλή (ευτροφικό σύστημα).

Σε επίπεδο συνολικής αφθονίας, οι αλλαγές στο pH και τη θερμοκρασία επηρέασαν μόνο τα *Synechococcus*. Συγκεκριμένα, τα *Synechococcus* επηρεάστηκαν θετικά στους W και GH υποδηλώνοντας πως η αυξημένη θερμοκρασία τα ευνόησε, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τους Fu et al. (2007). Η θετική επίδραση παρατηρήθηκε νωρίς μετά την αλλαγή της θερμοκρασίας και του pH, ενώ 10 ημέρες αργότερα δεν βρέθηκε διαφορά μεταξύ των μεσοκόσμων. Από την άλλη πλευρά, στους OA μεσοκόσμους ήταν άφθονα δύο γνωστά και ένα άγνωστο στέλεχος της οικογένειας *Hyphomonadaceae* (*Maricaulis*, *Oceanicaulis*) που συχνά σχετίζονται με ολιγοτροφικές συνθήκες (Schmitz et al. 2014), καθώς και ένα στέλεχος της οικογένειας *Rhodobacteraceae*, σε αντίθεση με τους C, W και GH που αυτά τα στελέχη

δεν βρέθηκαν. Η ήπια διαφοροποίηση των ΟΑ υποδηλώνει την επίπτωση της οξίνισης σε ορισμένα βακτηριακά στελέχη.

Οι ιοί δεν επηρεάστηκαν από την πειραματική συνθήκη και είχαν πολύ μικρή διακύμανση στο χρόνο. Οι υποκατηγορίες των ετερότροφων βακτηρίων επίσης δεν είχαν διαφορετική συμπεριφορά στους μεσοκόσμους και το αποτέλεσμα δεν ήταν αναμενόμενο καθώς έχει προταθεί ότι το μέγεθος των βακτηρίων μπορεί να μειωθεί από την τεχνητή μείωση του pH (Rasconi et al. 2015). Το μικρότερο κλάσμα μεγέθους των βακτηρίων εξετάστηκε ταυτόχρονα ώστε να εντοπιστούν πιθανές διαφορές. Ήταν αξιοσημείωτο πως σχεδόν όλη η βακτηριακή κοινότητα μεταξύ 0.1 και 0.2 μm απαρτιζόταν από *Proteobacteria*, τα οποία δεν επηρεάστηκαν από καμία πειραματική τροποποίηση στο χρόνο. Μικρές διαφορές παρατηρήθηκαν στα *Cyanobacteria* που αυξήθηκαν στους ΟΑ και στα *Verrucomicrobia* που αυξήθηκαν στους W.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες για την εργασία του Κεφαλαίου 3

Το πρώτο σκέλος της εργασίας χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα FP7 της Ευρωπαϊκής Ένωσης «Mediterranean Sea Acidification in a changing climate» (MedSeA, αριθμός επιχορήγησης 265103), το πρόγραμμα European Free Ocean Ocean Enrichment (eFOCE, Ίδρυμα BNP-Paribas) και το πρόγραμμα MISTRALS-MERMEX Sciences de l'Univers, INSU). Το έργο αποτέλεσε συνεισφορά στα έργα Surface Ocean - Lower Atmosphere Study (SOLAS) και Integrated Marine Biogeochemistry and Ecosystem Research (IMBER). Ευχαριστίες απευθύνονται στο προσωπικό του Observatoire Océanologique de Villefranche για την βοήθεια και υποστήριξη τους με τα σκάφη και την παροχή εργαστηριακού χώρου, στους C. Guieu, J.-M. Grisoni, G. Obolensky, S. Alliouane, B. Hesse, D. Luquet, D. Robin, P. Mahacek, E. Cox και A. Sallon για τη βοήθειά τους στις καταδύσεις, στην Αγγελική Κωνσταντινοπούλου για την ανάλυση ετερότροφης βακτηριακής παραγωγής, στην Justine Louis για την ανάλυση της συγκέντρωσης των θρεπτικών και στην Elisabet Laia Sà Lago από το Institut de Ciències del Mar (Ισπανία) για τις πολύτιμες συμβουλές της σχετικά με την προσέγγιση της ικής παραγωγής. Το δεύτερο σκέλος της εργασίας χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα FP7 της Ευρωπαϊκής Ένωσης «Mediterranean Sea Acidification in a changing climate» (MedSeA, αριθμός επιχορήγησης 265103). Θερμές ευχαριστίες απευθύνονται στον Καπετάνιο και το πλήρωμα του ερευνητικού σκάφους του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. «ΦΙΛΙΑ» για τη βοήθειά τους στη μεταφορά του νερού από τη θάλασσα στους μεσοκόσμους, τον Γιώργο Πιπεράκη για την τεχνική βοήθεια σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, τους Μανώλη Τσαπάκη, Ελένη Δαφνομήλλη και Snezana Zivanovic για τις αναλύσεις των θρεπτικών στοιχείων, τον Κωνσταντίνο Φραγκούλη για την καταγραφή του pH και της θερμοκρασίας, την Ευαγγελία Κρασακοπούλου για τις μετρήσεις του ανόργανου άνθρακα, την Τατιάνα Τσαγκαράκη για την καθοδήγηση στον πειραματικό σχεδιασμό και την στατιστική ανάλυση και τέλος στην Ιουλία Σαντή για την βοήθεια στην εξαγωγή του γενετικού υλικού.

Δεδομένα που παρουσιάζονται στο Κεφάλαιο 4 έχουν χρησιμοποιηθεί για την συγγραφή της ακόλουθης δημοσίευσης:

Tsiola A., Tsagaraki M. T., Giannakourou A., *et al.* (2017a). Bacterial growth and mortality after deposition of Saharan dust and mixed aerosols in the Eastern Mediterranean Sea: a mesocosm experiment. *Frontiers in Marine Science*. doi: 10.3389/fmars.2016.00281

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 - Η επίδραση της σκόνης από τη Σαχάρα και των ρυπασμένων αερολυμάτων από την Ευρώπη στους κύκλους ζωής των ιών

4.1. Συνοπτική εισαγωγή

Η Ανατολική Μεσόγειος Θάλασσα είναι ένα τυπικό παράδειγμα ολιγοτροφικού συστήματος με χαμηλή συγκέντρωση θρεπτικών στοιχείων και χλωροφύλλης (Krom *et al.* 1991). Σε αυτό το περιβάλλον, η εισροή θρεπτικών από ατμοσφαιρικές πηγές έχει φανεί πως επηρεάζει την παραγωγικότητα και κατ' επέκταση τη σύσταση της μικροβιακής πλαγκτονικής κοινότητας. Συγκεκριμένα, η ατμοσφαιρική εναπόθεση φωσφόρου έχει υπολογιστεί στα ~ 0.5 mM ανά τετραγωνικό μέτρο ανά χρόνο είτε από φυσικές πηγές (σκόνη από την έρημο της Σαχάρας) είτε από πηγές ανθρωπογενούς προέλευσης (οικιακές και βιομηχανικές δραστηριότητες). Είναι χαρακτηριστικό πως οι Κοζακ *et al.* (2010) υπολόγισαν πως η εισροή ανόργανου αζώτου και φωσφόρου στο θαλάσσιο οικοσύστημα λόγω ατμοσφαιρικής εναπόθεσης μπορεί να υπερβεί την εισροή από ποτάμια.

Η παρακολούθηση των φαινομένων ατμοσφαιρικής εναπόθεσης έχει δείξει πως τα εντονότερα επεισόδια γίνονται τους μήνες Ιανουάριο, Φεβρουάριο, Μάιο και Ιούλιο-Σεπτέμβριο (Kalivitis *et al.* 2007). Υπό το πρίσμα των πιθανών μελλοντικών αλλαγών στο κλίμα της Γης, υπάρχει ανησυχία πως περισσότερος φωσφόρος θα εισέρχεται στην Ανατολική Μεσόγειο μέσω ατμοσφαιρικής εναπόθεσης λόγω μειωμένης βροχόπτωσης και αυξημένης θερμοκρασίας (Solomon 2007), ενώ το ίδιο μπορεί να ισχύει και για το άζωτο λόγω αυξημένων ανθρωπογενών δραστηριοτήτων (Lamarque *et al.* 2013), για παράδειγμα λόγω περισσότερης εισροής NO_x λόγω βιομηχανίας και χρήσης αυτοκινήτων και NH₃ λόγω αγροτικής καλλιέργειας.

Σε αυτήν την μελέτη, ο στόχος ήταν να εξεταστεί εάν η εναπόθεση σκόνης διαφορετικής προέλευσης θα προκαλέσει αλλαγές στην βακτηριακή και ιική αφθονία και παραγωγικότητα. Το ποσοστό απώλειας βακτηριακής βιομάζας λόγω ικής λύσης εν μέσω φαινομένων εναπόθεσης σκόνης μπορεί να αποτελέσει ένδειξη για την ροή της οργανικής ύλης και των θρεπτικών στοιχείων στο μικροβιακό τροφικό πλέγμα. Ως εκ τούτου, ένα ρεαλιστικό επεισόδιο «ξηρής» ατμοσφαιρικής εναπόθεσης σκόνης στην Ανατολική Μεσόγειο προσομοιάστηκε σε

ένα πείραμα μεσοκόσμων και μελετήθηκε η συχνότητα λύσης έναντι λυσιγονίας (βλέπε Κεφάλαιο 1.1). Η υπόθεση ήταν πως η σκόνη οποιασδήποτε προέλευσης θα επιδράσει θετικά στην παραγωγικότητα και βιομάζα των βακτηρίων και συνεπώς και στην παραγωγικότητα των ιών.

4.2. Υλικά και Μέθοδοι

4.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός

Σε αυτό το πείραμα, θαλασσινό νερό συλλέχθηκε από το Κρητικό Πέλαγος και συγκεκριμένα 5 ναυτικά μίλια βόρεια του Ηρακλείου (35ο 24.975N και 25ο 14.441E). Το νερό μεταφέρθηκε στις εγκαταστάσεις μεσοκόσμων του Ελληνικού Κέντρου Θαλάσσιων Ερευνών (CRETACOSMOS) και έπειτα χρησιμοποιήθηκε για να γεμίσουν 9 σακούλες μεσοκόσμων από πολυαιθυλένιο σε τελικό όγκο 3 m³. Το θαλασσινό νερό αντλήθηκε από τη θάλασσα στις 8 και 9 Μαΐου 2012 από βάθος 10 m και τοποθετήθηκε σε δοχεία από πολυπροπυλένιο υψηλής πυκνότητας και χωρητικότητας 1 m³ που είχαν προηγουμένως πλυθεί με οξύ (10% HCl) και ξεπλυθεί με απιονισμένο νερό. Το στήσιμο των μεσοκόσμων έγινε όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.2.2. Η θερμοκρασία μετρήθηκε με αυτόματους αισθητήρες HOBO (ONSET Corporation). Προκειμένου οι συνθήκες φωτεινότητας να προσομοιάζουν το βάθος δειγματοληψίας, χρησιμοποιήθηκε δίχτυ για να καλύψει τα πλαστικά καπάκια των μεσοκόσμων.

Πριν από οποιαδήποτε προσθήκη σκόνης, έγινε δειγματοληψία (T-1) προκειμένου να προσδιοριστούν οι αρχικές συνθήκες διαφόρων βιοτικών και αβιοτικών παραμέτρων. Αμέσως μετά την στιγμή T-1, τρεις μεσόκοσμοι εμπλουτίστηκαν με σκόνη από τη Σαχάρα (συλλογή στην Κρήτη και το Ισραήλ) σε τελική συγκέντρωση 1.6 mg L⁻¹ (κωδική ονομασία: SD). Άλλοι τρεις μεσόκοσμοι εμπλουτίστηκαν με μείγμα ρυπασμένων αερολυμάτων από την Ευρώπη και σκόνης από τη Σαχάρα (συλλογή στην Κρήτη και το Ισραήλ) σε τελική συγκέντρωση 1.0 mg L⁻¹ (κωδική ονομασία: A). Οι υπόλοιποι τρεις μεσόκοσμοι χρησίμευσαν ως μάρτυρες (κωδική ονομασία: C). Η δεύτερη δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε τρεις ώρες μετά τις προσθήκες σκόνης (T0) και για τις επόμενες φορές, η δειγματοληψία διεξαγόταν καθημερινά για 8 ημέρες (T1-T8).

Στις στιγμές T-1, T1, T4 και T8 έγινε δειγματοληψία για την εκτίμηση της ιικής παραγωγής (συμπεριλαμβανομένων των λυτικών και λυσιγονικών ιών) από δύο μεσοκόσμους

C (C1 και C2), δύο μεσοκόσμους εμπλουτισμένους με σκόνη Σαχάρας (SD1 και SD2) και δύο μεσοκόσμους εμπλουτισμένους με ρυπασμένα αερολύματα (A1 και A2). Τα δείγματα από τους μεσοκόσμους SD1 και SD2 που συλλέχθηκαν κατά την T-1 δεν περιλαμβάνονται στην ανάλυση λόγω απώλειας σημαντικής ποσότητας νερού κατά τη διάρκεια της διήθησης.

Προκειμένου να εκτιμηθεί η ποσότητα θρεπτικών στοιχείων και ιχνοστοιχείων που απελευθερώθηκαν κατά την εναπόθεση της σκόνης διεξήχθησαν ειδικά πειράματα έκπλυσης. Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 4. 1 συνοπτικά. Το μίγμα αερολυμάτων από τη Σαχάρα και την Ευρώπη είχε ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση φωσφορικών ιόντων 3.0 nM και NO_x ιόντων 54 nM ανά mg σκόνης. Η προσθήκη αυτή αντιπροσωπεύει ένα σχετικά έντονο φαινόμενο εναπόθεσης σκόνης (Herut et al. 2005). Το μίγμα αερολυμάτων με καθαρή προέλευση από την έρημο της Σαχάρας είχε ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση φωσφορικών ιόντων 2.4 nM και NO_x ιόντων 23 nM ανά mg σκόνης και αντιπροσωπεύει ένα έντονο φαινόμενο εναπόθεσης σκόνης.

Πίνακας 4. 1. Πληροφορίες σχετικά με τη σκόνη που προστέθηκε στους μεσοκόσμους: προέλευση σκόνης, τελική συγκέντρωση στους μεσοκόσμους και ποσότητες των απελευθερούμενων φωσφορικών (PO₄³⁻) και ιόντων αζώτου (NO_x) ανά mg σκόνης. Οι A μεσοκόσμοι εμπλουτίστηκαν με ρυπασμένα αερολύματα και οι SD εμπλουτίστηκαν με σκόνη από τη Σαχάρα. Τα δεδομένα είναι η μέση ± τυπική απόκλιση των τριών επαναλήψεων των μεσοκόσμων.

Μεσοκόσμος	Προέλευση σκόνης	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητα PO ₄ ³⁻	Ποσότητα NO _x
A	Μείγμα αερολυμάτων από την έρημο της Σαχάρας και την Ευρώπη	1.0 mg L ⁻¹	3.0 nM ανά mg σκόνης	54 nM ανά mg σκόνης
SD	Αερολύματα από την σκόνη της Σαχάρας	1.6 mg L ⁻¹	2.4 nM ανά mg σκόνης	23 nM ανά mg σκόνης

4.2.2. Προσδιορισμός συγκέντρωσης θρεπτικών στοιχείων

Οι συγκεντρώσεις των διαλελυμένων θρεπτικών στοιχείων και του οργανικού άνθρακα παρουσιάζονται λεπτομερώς στους Tsagaraki *et al.* (2017). Η εκτίμηση της συγκέντρωσης φωσφορικών ιόντων έγινε με τη χρήση της μεθόδου MAGIC (Rimmelin and Moutin 2005). Οι συγκεντρώσεις των διαλελυμένων πυριτικών, νιτρικών και νιτροδών ιόντων εκτιμήθηκαν σύμφωνα με τους Strickland and Parsons (1972) και η συγκέντρωση του διαλελυμένου αμμωνίου σύμφωνα με τους Ivancic and Degobbis (1984). Τα όρια ανίχνευσης για τα φωσφορικά, νιτρικά και αμμωνιακά ιόντα ήταν 0.8 nM, 0.017 και 0.019 μM, αντίστοιχα.

Ο διαλελυμένος οργανικός άνθρακας μετρήθηκε σύμφωνα με τους Sohrin and Sempéré (2005). Δείγματα για αυτήν την ανάλυση μεταφέρθηκαν σε γυάλινες φιάλες και στη συνέχεια

διηθήθηκαν μέσω μεμβρανών GF/F. Το διήθημα συλλέχθηκε σε γυάλινα φιαλίδια των 15 mL και προστέθηκαν 20 μL H_3PO_4 (85%). Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στο σκοτάδι στους 4 °C εν αναμονή της εργαστηριακής ανάλυσης σε αναλυτή Shimadzu TOC 5000. Κατασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης τεσσάρων σημείων χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα, τα οποία παρασκευάστηκαν με αραιώση διαλύματος όξινου φθαλικού καλίου σε νερό Milli-Q. Για την αποφυγή τυχαίων σφαλμάτων που σχετίζονται με την καθημερινή μεταβλητότητα των οργάνων, τα δείγματα μιας δεδομένης ημέρας αναλύονταν σε μία μόνο ημέρα. Οι μετρήσεις-μάρτυρες (δηλαδή, νερό Milli-Q) κυμαίνονταν από 1-2 μM C, ενώ η αναλυτική ακρίβεια της ανάλυσης ήταν εντός ποσοστού 2.0 %. Η διακύμανση των μετρήσεων που σχετίζονταν με τη μεταφορά και αποθήκευση δειγμάτων, τη διήθηση και τους χειρισμούς ήταν 8.4 ± 2.5 μM C ($n = 7$).

4.2.3. Προσδιορισμός συγκέντρωσης χλωροφύλλης

Η συγκέντρωση της χλωροφύλλης εκτιμήθηκε όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.2.4.

4.2.4. Προσδιορισμός ρυθμού παραγωγής ετερότροφων βακτηρίων

Η παραγωγικότητα των ετερότροφων βακτηρίων εκτιμήθηκε όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.2.5.

4.2.5. Προσδιορισμός ικής και βακτηριακής αφθονίας

Η αφθονία των ικών σωματιδίων και των βακτηρίων εκτιμήθηκε όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.2.6.

4.2.6. Προσδιορισμός της συχνότητας λυτικά μολυσμένων και λυσιγονικών κυττάρων

Η συχνότητα των λυτικά μολυσμένων και λυσιγονικών κυττάρων εκτιμήθηκε όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 3.2.7.

4.2.7. Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων

Η ικκή αφθονία στα δείγματα που δεν υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με μυτομυκίνη C και σε αυτά που υποβλήθηκαν εξετάστηκε σε κάθε χρονικό σημείο ώστε να επιβεβαιωθεί η επαγωγή λύσης. Επαγωγή θεωρήθηκε ότι πράγματι έγινε όταν η αφθονία των ιών στα δείγματα με μυτομυκίνη ήταν σημαντικά υψηλότερη από τα δείγματα χωρίς μυτομυκίνη. Χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διακύμανσης τύπου επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (repeated measures ANOVA, RM ANOVA) για να ελεγχθεί αν οι διαφορές σε μια δεδομένη μεταβλητή μεταξύ των διαφορετικών μεσοκόσμων (C, SD και A) καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος ήταν σημαντικές, αφού προηγουμένως ελέγχθηκε η υπόθεση της σφαιρικότητας (τεστ Mauchly). Χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση ανάλυσης διακύμανσης με έναν παράγοντα (one way ANOVA) για να εξεταστεί αν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μιας μεταβλητής μεταξύ των μεσοκόσμων σε κάθε χρονικό σημείο ξεχωριστά (T-1, T1, T4 και T8). Η σημαντικότητα των διαφορών σε κάθε χρονικό σημείο και μεταξύ των μεσοκόσμων αξιολογήθηκε με post hoc Tukey τεστ (Tukey HSD). Η ομοιογένεια διακύμανσης για όλες τις one way ANOVAs ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας το τεστ Levene. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο λογισμικό IBM SPSS 24. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται εδώ είναι η μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση τριπλών μετρήσεων. Όταν δεν δίνεται η τυπική απόκλιση, δεν υπήρχαν επαναληπτικές μετρήσεις.

4.3. Αποτελέσματα

4.3.1. Χημική σύσταση των αερολυμάτων και του θαλασσινού νερού στην αρχή του πειράματος

Τα χαρακτηριστικά του θαλασσινού νερού της περιοχής δειγματοληψίας και του νερού των μεσοκόσμων πριν γίνει προσθήκη σκόνης παρουσιάζονται με λεπτομέρειες στους Herut *et al.* (2016) και Tsagaraki *et al.* (2017). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν και αναλύθηκαν μόνο τα δεδομένα που αφορούν τις συγκεντρώσεις διαλελυμένων ανόργανων θρεπτικών στοιχείων, διαλελυμένου οργανικού άνθρακα και χλωροφύλλης από συγκεκριμένες ημέρες: α) από το αρχικό σημείο του πεδίου δειγματοληψίας, 2) από την ημέρα T-1 πριν γίνει προσθήκη σκόνης και 3) από τις ημέρες T1, T4 και T8 (Πίνακας 4. 2).

Πίνακας 4. 2. Συγκέντρωση διαλελυμένων φωσφορικών (PO_4^{3-}), νιτρωδών (NO_2^-), νιτρικών (NO_3^-), αμμωνιακών (NH_4^+) και πυριτικών [$\text{Si}(\text{OH})_4^{-4}$] ιόντων, οργανικού άνθρακα (dissolved organic carbon, DOC) και χλωροφύλλης α (Chlorophyll *a*) την ημέρα της δειγματοληψίας (*in situ*, βάθος 10 μέτρα), πριν από την εναπόθεση σκόνης (T-1)

και στις πειραματικές ημέρες κατά τις οποίες μετρήθηκε η ική παραγωγή (T1, T4 και T8). Το C αναφέρεται στα μεσοκόσμους μάρτυρες, το A στους μεσοκόσμους που εμπλουτίστηκαν με ρυπασμένα Ευρωπαϊκά αερολύματα και το SD στους μεσοκόσμους που εμπλουτίστηκαν με σκόνη από τη Σαχάρα. Τα δεδομένα είναι η μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση των τριών επαναλήψεων των μεσοκόσμων. "<DL" σημαίνει ότι οι μετρήσεις ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου (detection limit) και "nm" σημαίνει μη μετρημένες παραμέτρους (not measured).

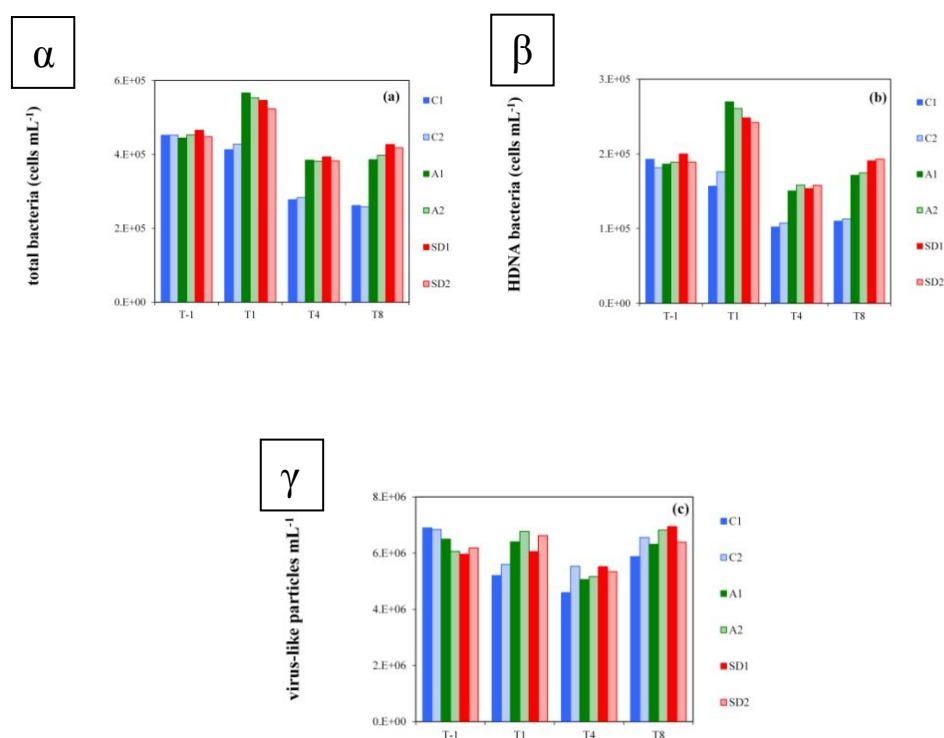
Δείγμα	PO ₄ ⁻³ (nM)	NO ₂ ⁻ (nM)	NO ₃ ⁻ (nM)	NH ₄ ⁺ (nM)	Si(OH) ₄ ⁻⁴ (nM)	DOC (μM)	Chlorophyll a (μg L ⁻¹)
<i>in situ</i> (10 m)	12.3	<DL	105	360	972	nm	nm
T-1	13.6 \pm 4.4	<DL	146 \pm 51	132 \pm 56	1234 \pm 350	153 \pm 20	0.06 \pm 0.01
T1 C	7.8 \pm 1.1	<DL	134 \pm 52	60 \pm 8	1692 \pm 122	177 \pm 54	0.07 \pm 0.00
T1 A	9.9 \pm 2.3	<DL	204 \pm 42	53 \pm 0	1191 \pm 169	174 \pm 31	0.10 \pm 0.00
T1 SD	9.1 \pm 1.1	<DL	123 \pm 21	51 \pm 19	1770 \pm 586	181 \pm 23	0.10 \pm 0.01
T4 C	5.6 \pm 0.2	<DL	89 \pm 52	32 \pm 14	909 \pm 9	121 \pm 3	0.08 \pm 0.01
T4 A	5.9 \pm 0.1	<DL	140 \pm 11	74 \pm 35	939 \pm 46	150 \pm 17	0.10 \pm 0.10
T4 SD	5.8 \pm 0.6	<DL	143 \pm 19	64 \pm 14	978 \pm 14	160 \pm 14	0.11 \pm 0.03
T8 C	4.3 \pm 0.6	<DL	58 \pm 6	14 \pm 8	927 \pm 18	96 \pm 24	0.04 \pm 0.01
T8 A	6.8 \pm 0.7	<DL	56 \pm 5	35 \pm 17	960 \pm 32	100 \pm 18	0.05 \pm 0.01
T8 SD	6.0 \pm 1.0	<DL	44 \pm 17	69 \pm 14	957 \pm 14	92 \pm 15	0.04 \pm 0.01

Οι συγκεντρώσεις των διαλελυμένων φωσφορικών και πυριτικών ιόντων στο σημείο πεδίου δειγματοληψίας ήταν 12 και 972 nM, αντίστοιχα. Σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση φωσφορικών ιόντων βρέθηκε στους A σε σύγκριση με τους υπόλοιπους μεσοκόσμους την T-1 (one way ANOVA, F(2) = 11.05, p <0.05) καθώς και στις T1 και T4 (Πίνακας 4. 2). Η συγκέντρωση των φωσφορικών ιόντων μειώθηκε με την προσθήκη σκόνης τόσο στους A όσο και στους SD, ενώ παρέμεινε σταθερή στους C μεσοκόσμους. Η συγκέντρωση του διαλελυμένου αζώτου προέκυψε από το άθροισμα αμμωνιακών, νιτρωδών και νιτρικών ιόντων και ήταν σημαντικά υψηλότερη στους C και τους A σε σχέση με τους SD πριν την προσθήκη σκόνης (one way ANOVA, F(2) = 11.05, p <0.05). Η συγκέντρωση πυριτικών ιόντων δεν ήταν διαφορετική μεταξύ των C, A και SD, εκτός από την T-1 που ήταν σημαντικά υψηλότερη στους A (one way ANOVA, F(2) = 19.08, p <0.05). Η συγκέντρωση του διαλελυμένου οργανικού άνθρακα (dissolved organic carbon, DOC) ήταν 153 (\pm 20) μM C πριν από την προσθήκη της σκόνης (Πίνακας 4. 2). Η συγκέντρωση DOC αυξήθηκε σε όλους τους μεσοκόσμους προς την στιγμή T1 και στη συνέχεια μειώθηκε μέχρι το τέλος του πειράματος. Η συγκέντρωση της ολικής χλωροφύλλης ήταν 0.06 (\pm 0.01) mg L⁻¹ την στιγμή T-1 (Πίνακας 4. 2). Η συγκέντρωση της χλωροφύλλης ήταν υψηλότερη την T1 στους A και SD από ό, τι στους C (one way ANOVA, F(2) = 153.00, p <0.05), ενώ την T8 ήταν σε επίπεδα χαμηλότερα από ό, τι τα αρχικά σε όλους τους μεσοκόσμους (Πίνακας 4. 2).

4.3.2. Αφθονία βακτηρίων και ιών

Πριν από την εναπόθεση της σκόνης (T-1) η αφθονία των συνολικών βακτηριακών κυττάρων ήταν κατά μέσο όρο $4.5 \times 10^5 \pm 6.9 \times 10^3$ κύτταρα mL⁻¹ (Εικόνα 4. 1). Παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην αφθονία των βακτηρίων μεταξύ των C και SD και μεταξύ των C και

A (RM ANOVA, $F(2,3)=151.56$, $p<0.05$). Συγκεκριμένα η βακτηριακή αφθονία ήταν υψηλότερη στους A και SD (Tukey HSD, $p<0.05$). Η συνολική αφθονία των βακτηρίων αυξήθηκε 1.2 φορές στους μεσοκόσμους A και SD από την T-1 έως την T1, σε αντίθεση με τους C που δεν διέφερε αυτήν την περίοδο (Εικόνα 4. 1). Η αφθονία των βακτηρίων μειώθηκε σε σχεδόν αρχικές τιμές την T4 και παρέμεινε σταθερή μέχρι την T8 στους A και SD. Στους C, η βακτηριακή αφθονία μειώθηκε από την T1 μέχρι το τέλος του πειράματος. Η συμβολή των βακτηρίων με υψηλή περιεκτικότητα σε DNA (High DNA, HDNA) στους μεσοκόσμους σε όλες τις ημέρες τους πειράματος παρουσιάζεται στην Εικόνα 4. 1.



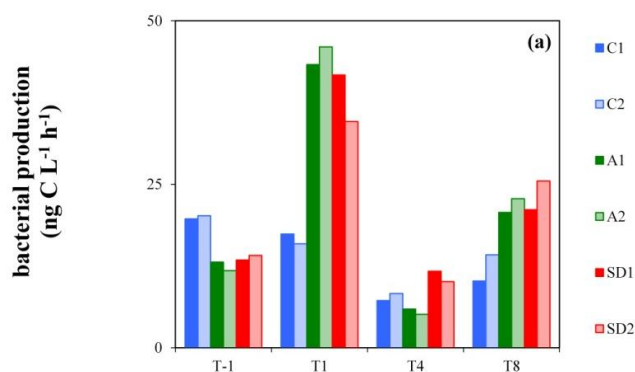
Εικόνα 4. 1. Αφθονία των συνολικών βακτηρίων (total bacteria, α), των βακτηρίων με υψηλή περιεκτικότητα DNA (high DNA content bacteria, β) και των ικών σωματιδίων (virus-like particles, γ) στους μεσοκόσμους τις χρονικές στιγμές T-1, T1, T4 and T8. C1 και C2: μεσοκόσμοι μάρτυρες, A1 και A2: μεσοκόσμοι που εμπλουτίστηκαν με ρυπασμένα Ευρωπαϊκά αερολύματα και SD1 και SD2 μεσοκόσμοι που εμπλουτίστηκαν με σκόνη από τη Σαχάρα.

Όπως και για τα συνολικά βακτήρια, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ C και A, και C και SD για τα HDNA βακτήρια (RM ANOVA, $F(2,3)=465.94$, $p<0.05$). Τα HDNA βακτήρια έφτασαν μέγιστη αφθονία την T1 (46-48% των συνολικών βακτηρίων) και στη συνέχεια την T8 (44-46% των συνολικών βακτηρίων) στους A και SD, αντίθετα με τους C όπου το ποσοστό δεν άλλαξε στο πείραμα (Εικόνα 4. 1).

Αρχικά, η αφθονία των ιικών σωματιδίων (virus-like particles, VLP) κυμαινόταν μεταξύ 5.9 και 6.9×10^6 VLP mL⁻¹. Η αφθονία των VLPs έδειξε παρόμοιο πρότυπο μεταξύ όλων των μεσοκόσμων στο χρόνο (Εικόνα 4. 1) και χαρακτηρίστηκε από μια μείωση κατά περίπου 1.2 φορές μεταξύ T1 και T4 που ακολουθήθηκε από μια ισοδύναμη αύξηση μεταξύ T4 και T8 (Εικόνα 4. 1). Η αφθονία των VLPs ήταν σημαντικά υψηλότερη στους A και SD από ό, τι στους C την T1 (one way ANOVA, F(2)=7.60, p<0.05).

4.3.3. Ρυθμός παραγωγής ετερότροφων βακτηρίων

Οι μετρήσεις της ετερότροφης βακτηριακής παραγωγής (heterotrophic bacterial production, BP) φαίνονται στην Εικόνα 4. 2. Την στιγμή T-1, η BP ήταν 13.6 ± 1.8 ng C L⁻¹ h⁻¹. Η BP εμφάνισε μια σημαντικά διαφορετική τάση με την πάροδο του χρόνου μεταξύ των C και SD και μεταξύ των C και A (RM ANOVA, F(2,3)=4.23, p<0.05). Πιο συγκεκριμένα, η BP ήταν σημαντικά υψηλότερη στους A και SD από ό, τι στους C την T1 (one way ANOVA, F(2)=42.88, p<0.05) και σημαντικά υψηλότερη στους SD από ό, τι στους C την T8 (one way ANOVA, F(2)=71.67, p<0.05). Η υψηλότερη BP μετρήθηκε την στιγμή T1 στους A (44.7 ± 1.9 ng C L⁻¹ h⁻¹) και SD (38.2 ± 5.0 ng C L⁻¹ h⁻¹).

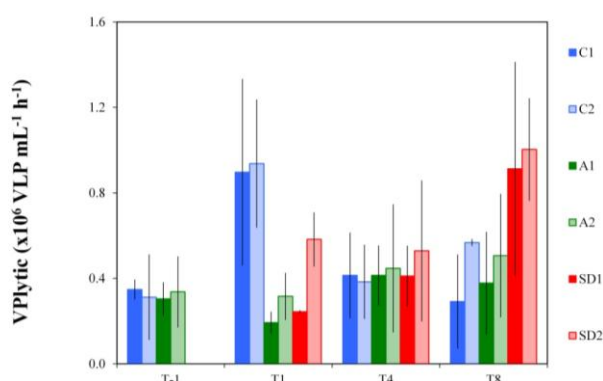


Εικόνα 4. 2. Ετερότροφη βακτηριακή παραγωγή (bacterial production) στους μεσοκόσμους τις χρονικές στιγμές T-1, T1, T4 and T8. C1 και C2: μεσόκοσμοι μάρτυρες, A1 και A2: μεσόκοσμοι που εμπλουτίστηκαν με ρυπασμένα Ευρωπαϊκά αερολύματα και SD1 και SD2 μεσόκοσμοι που εμπλουτίστηκαν με σκόνη από τη Σαχάρα.

4.3.4. Λυτικός και λυσιγονικός κύκλος ζωής

Ο ρυθμός παραγωγής λυτικών ιών (lytic viral production, VP_{lytic}) παρουσιάζεται στην Εικόνα 4. 3 και ο ρυθμός λύσης βακτηρίων στον Πίνακα 4. 3. Πριν από την προσθήκη σκόνης, ο

VP_{lytic} ήταν $0.33 \pm 0.02 \times 10^6$ κύτταρα $mL^{-1} h^{-1}$ και ο ρυθμός λύσης βακτηρίων ήταν $0.01 \pm 0.0008 \times 10^6$ κύτταρα $mL^{-1} h^{-1}$.



Εικόνα 4. 3. Ρυθμός παραγωγής λυτικών ιών (lytic viral production, VP_{lytic}) στους μεσοκόσμους τις χρονικές στιγμές T-1, T1, T4 and T8. C1 και C2: μεσοκόσμοι μάρτυρες, A1 και A2: μεσοκόσμοι που εμπλουτίστηκαν με ρυπασμένα Ευρωπαϊκά αερολύματα και SD1 και SD2 μεσοκόσμοι που εμπλουτίστηκαν με σκόνη από τη Σαχάρα.

Σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν στον VP_{lytic} και τον ρυθμό λύσης βακτηρίων μεταξύ των μεσοκόσμων C και SD και μεταξύ των C και A στον χρόνο (RM ANOVA, $F(2,15)=4.35$, $p<0.05$). Την στιγμή T1, τόσο ο VP_{lytic} όσο και ο ρυθμός λύσης βακτηρίων ήταν σημαντικά υψηλότεροι στους C από ό, τι στους A και SD (one way ANOVA, $F(2)=27.14$, $p<0.05$), ενώ την T8 βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα και των δύο ποσοστών στους SD σε σύγκριση με τους C (one way ANOVA, $F(2)=14.92$, $p<0.001$). Την στιγμή T1 μετρήθηκαν οι υψηλότερες τιμές για τον VP_{lytic} και τον ρυθμό λύσης βακτηρίων στους C ($0.92 \pm 0.34 \times 10^6$ κύτταρα $mL^{-1} h^{-1}$ και 0.04 ± 0.001 κύτταρα $mL^{-1} h^{-1}$, αντίστοιχα).

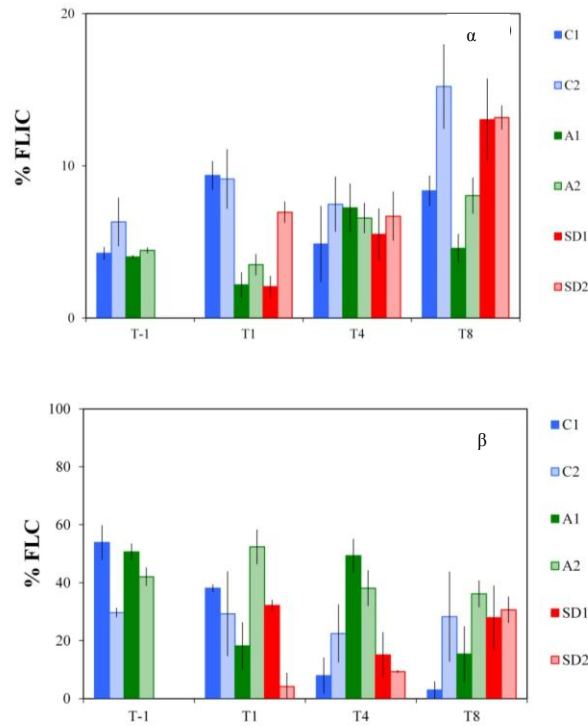
Πίνακας 4. 3. Μετρήσεις σχετικές με την προσέγγιση της ιικής παραγωγής [B0 που αναφέρεται στην αφθονία των βακτηρίων στην αρχή της επώασης (μέση \pm τυπική απόκλιση 6 επαναλήψεων) και ρυθμός λύσης των βακτηρίων (μέση \pm τυπική απόκλιση τριπλών επαναλήψεων)] στους μεσοκόσμους τις χρονικές στιγμές T-1, T1, T4 and T8. C1 και C2: μεσοκόσμοι μάρτυρες, A1 και A2: μεσοκόσμοι που εμπλουτίστηκαν με ρυπασμένα Ευρωπαϊκά αερολύματα και SD1 και SD2 μεσοκόσμοι που εμπλουτίστηκαν με σκόνη από τη Σαχάρα.

Ημέρα	Μεσοκόσμος	B0 ($\times 10^6$ κύτταρα mL^{-1})	Ρυθμός λύσης βακτηρίων ($\times 10^6$ κύτταρα $mL^{-1} h^{-1}$)
T-1	C1	0.31 ± 0.005	0.01 ± 0.002
	C2	0.19 ± 0.01	0.01 ± 0.01
	A1	0.25 ± 0.01	0.01 ± 0.01
	A2	0.29 ± 0.01	0.01 ± 0.01
	SD1		
	SD2		
T1	C1	0.37 ± 0.004	0.03 ± 0.02
	C2	0.39 ± 0.004	0.04 ± 0.02
	A1	0.34 ± 0.02	0.01 ± 0.002
	A2	0.35 ± 0.09	0.01 ± 0.002
	SD1	0.46 ± 0.04	0.01 ± 0.001
	SD2	0.32 ± 0.004	0.02 ± 0.003
T4	C1	0.33 ± 0.01	0.02 ± 0.01

	C2	0.20 ± 0.01	0.02 ± 0.01
	A1	0.22 ± 0.01	0.02 ± 0.005
	A2	0.26 ± 0.005	0.02 ± 0.01
	SD1	0.29 ± 0.02	0.02 ± 0.01
	SD2	0.30 ± 0.01	0.02 ± 0.01
T8	C1	0.13 ± 0.005	0.01 ± 0.01
	C2	0.14 ± 0.003	0.02 ± 0.001
	A1	0.32 ± 0.02	0.02 ± 0.01
	A2	0.24 ± 0.02	0.02 ± 0.01
	SD1	0.27 ± 0.01	0.04 ± 0.02
	SD2	0.29 ± 0.01	0.04 ± 0.01

Η συχνότητα των λυτικά μολυσμένων κυττάρων (frequency of lytically infected cells, FLIC) δεν εμφάνισε σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεσοκόσμων στον χρόνο. Μόνο την στιγμή T1 μετρήθηκαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα FLIC στους A και SD από ό, τι στους C (one way ANOVA, $F(2)=26.36$, $p<0.05$). Την T-1, η τιμή FLIC ήταν $5 \pm 1\%$ και κυμάνθηκε μεταξύ 2 και 15% τις επόμενες ημέρες (Εικόνα 4. 4).

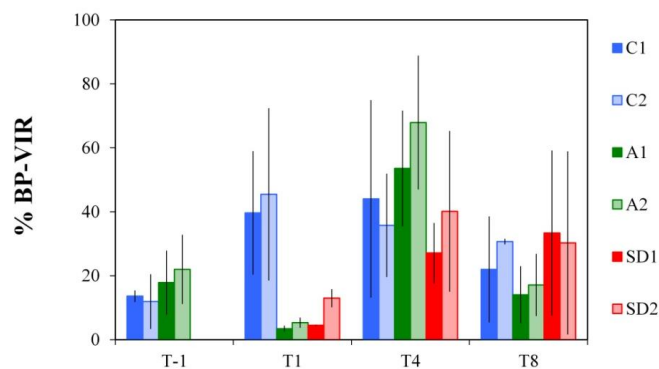
Η συχνότητα των λυσιγονικών κυττάρων (frequency of lysogenic cells FLC) αντιπροσωπεύει τα βακτηριακά κύτταρα που περιέχουν λυσιγονικούς ιούς (Εικόνα 4. 4). Τα επίπεδα FLC εμφάνισαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεσοκόσμων (RM ANOVA, $F(2,15)=6.72$, $p<0.05$). Σε σύγκριση με τους C ($15 \pm 11\%$), παρατηρήθηκαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα FLC την T4 στους μεσοκόσμους A ($44 \pm 8\%$) (one way ANOVA, $F(2)=24.70$, $p<0.01$) και SD ($12 \pm 6\%$) (one way ANOVA, $F(2)=24.70$, $p <0.05$).



Εικόνα 4. 4. Συχνότητα των λυτικά μολυσμένων κυττάρων (α, frequency of lytically infected cells, FLIC) και των λυσιγονικών κυττάρων (β, frequency of lysogenic cells, FLC) τις χρονικές στιγμές T-1, T1, T4 and T8. C1 και C2: μεσόκοσμοι μάρτυρες, A1 και A2: μεσόκοσμοι που εμπλουτίστηκαν με ρυπασμένα Ευρωπαϊκά αερολύματα και SD1 και SD2 μεσόκοσμοι που εμπλουτίστηκαν με σκόνη από τη Σαχάρα.

4.3.5. Απώλεια βακτηριακής παραγωγής λόγω ιικής λύσης

Το κλάσμα %BP-VIR στην αρχή του πειράματος ήταν $16 \pm 4\%$ (Εικόνα 4. 5) και ήταν σημαντικά χαμηλότερο την T1 στους A και SD σε σύγκριση με τους C (one way ANOVA, $F(2)=26.82$, $p<0.05$). Μεταξύ των στιγμών T-1 και T1 το %BP-VIR μειώθηκε σε πολύ χαμηλά επίπεδα στους A και SD ($6 \pm 4\%$), ενώ αυξήθηκε στους C (έως 45%) και παρέμεινε σε παρόμοια επίπεδα μέχρι την T4. Το %BP-VIR στους A μεσοκόσμους ξεπέρασε τα επίπεδα των C την T4, αλλά η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική.



Εικόνα 4. 5. Ποσοστό βακτηριακής παραγωγής που λύεται από ιούς (%BP-VIR) τις χρονικές στιγμές T-1, T1, T4 and T8. C1 και C2: μεσόκοσμοι μάρτυρες, A1 και A2: μεσόκοσμοι που εμπλουτίστηκαν με ρυπασμένα Ευρωπαϊκά αερολύματα και SD1 και SD2 μεσόκοσμοι που εμπλουτίστηκαν με σκόνη από τη Σαχάρα.

4.4. Συζήτηση

Κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης, εκτιμήθηκε η απόκριση των βακτηρίων και ιών μετά από μια αιφνίδια (τεχνητή) εναπόθεση σκόνης στην Ανατολική Μεσόγειο Θάλασσα με προέλευση από την έρημο της Σαχάρας έναντι ρυπασμένης σκόνης με Ευρωπαϊκή προέλευση. Μελετήθηκε η επίδραση της ιικής λύσης και λυσιγονίας στη βακτηριακή θνησιμότητα κατά τη διάρκεια ενός τέτοιου φαινομένου. Το επιφανειακό θαλασσινό νερό που συλλέχθηκε στην Ανατολική Μεσόγειο είχε τυπικά oligοτροφικά χαρακτηριστικά: συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις φωσφορικών ιόντων και χλωροφύλλης ήταν 12.3 nM και 0.06 $\mu\text{g L}^{-1}$. Οι βιολογικοί δείκτες [π.χ. οι ρυθμοί βακτηριακής παραγωγής (ετερότροφης και πρωτογενούς) και ο ρυθμός χρήσης των φωσφορικών ιόντων] ήταν εντός των δημοσιευμένων επιπέδων για τα oligοτροφικά συστήματα και ιδιαίτερα για την Ανατολική Μεσόγειο (Herut et al. 2016). Η προσθήκη σκόνης έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε να αντιπροσωπεύει ένα έντονο (SD) και ένα σχετικά έντονο (A) φαινόμενο εναπόθεσης σκόνης. Η προσθήκη προκάλεσε την απελευθέρωση φωσφόρου (25-50% πρόσθετη ποσότητα σε σύγκριση με τα επίπεδα περιβάλλοντος) και αζώτου (υψηλότερη ποσότητα στους μεσοκόσμους A από ό, τι στους SD) και είχε άμεσο αντίκτυπο στην ανάπτυξη των βακτηρίων.

Πιο συγκεκριμένα, αμέσως μετά την εναπόθεση και των δύο τύπων σκόνης, μετρήθηκαν αυξημένες τιμές παραγωγικότητας, αφθονίας και βιομάζας ετερότροφων βακτηρίων. Επίσης, παρατηρήθηκε θετική επίδραση στην συνολική και στην HDNA βακτηριακή αφθονία, υποδηλώνοντας ότι μια κοινότητα πιο ενεργών κυττάρων (Lebaron et al. 2001; Morán et al. 2007) κυριάρχησε στους μεσοκόσμους SD και A σε σύγκριση με τους C. Αντίστοιχα

αποτελέσματα, όπου ο ρυθμός ανάπτυξης των βακτηρίων αυξήθηκε με την προσθήκη σκόνης από τη Σαχάρα, βρέθηκαν και σε άλλα πειράματα (Pulido-Villena et al. 2008, 2010, 2014; Marañón et al. 2010).

Κατά τη διάρκεια της αυξημένης βακτηριακής παραγωγικότητας, μετρήθηκαν χαμηλά ποσοστά %BP-VIR στους A και SD. Συγκεκριμένα, τα αρχικά επίπεδα VP_{lytic} και %BP-VIR ήταν παρόμοια με προηγούμενα δεδομένα για τη Μεσόγειο Θάλασσα (Bettarel et al. 2002; Boras et al. 2009) και άλλα παράκτια συστήματα (Winget and Wommack 2009). Στη συνέχεια όμως, την στιγμή T1, ο VP_{lytic} ήταν ιδιαίτερα χαμηλός στους A και SD σε σχέση με την αναμενόμενη τιμή και πολύ χαμηλότερος από ό, τι στους C. Σύμφωνα με την θεώρηση ότι η ιική παραγωγή εξαρτάται και αντιδρά θετικά στην παραγωγικότητα των ξενιστών και τη συχνότητα επαφής ξενιστών-ιών, η υπόθεση ήταν πως η βακτηριακή ανάπτυξη στους A και SD θα οδηγούσε σε αυξημένη παραγωγή ιών (Motegi et al. 2009). Η ίδια υπόθεση έγινε και από τους Pulido-Villena *et al.* (2014) που πρότειναν ότι οι ιοί «καθόρισαν» την βακτηριακή βιομάζα μετά την προσθήκη σκόνης, αν και δεν μέτρησαν την ιική παραγωγή. Στην παρούσα μελέτη, το γεγονός ότι ο VP_{lytic} ήταν τόσο χαμηλός στους A και SD οδήγησε στα ακόλουθα σενάρια για τους εν λόγω μεσοκόσμους: 1) η δυναμική της σχέσης ιών-βακτηρίων χαρακτηρίστηκε από χρονική υστέρηση, 2) συνεχής και έντονη λύση κυττάρων παρεμπόδισε την ανίχνευση των λυτικά μολυσμένων κυττάρων και 3) τα λυτικά μολυσμένα κύτταρα θηρεύτηκαν κατά προτίμηση λόγω ιδιαίτερου μεγέθους και χημικής σύστασης.

Σύμφωνα με το πρώτο σενάριο, γεγονότα που έλαβαν χώρα πολύ σύντομα μετά την προσθήκη σκόνης μπορεί να είχαν ως αποτέλεσμα μια χρονική υστέρηση στη σχέση βακτηρίων και ιών (Needham et al. 2013). Επίσης, οι ιοί μπορεί να μην ήταν αρκετοί ή «κατάλληλοι» (ταξινομικά) για να επηρεάσουν τα συγκεκριμένα βακτήρια που επωφελήθηκαν από την ξαφνική προσθήκη σκόνης (Guo *et al.*, 2016), οδηγώντας τελικά στις χαμηλές μετρήσεις VP_{lytic} . Τέλος, ανθεκτικότητα στους ιούς που έχει βρεθεί σε πειραματικές και φυσικές συνθήκες (Boras et al. 2009) πιθανόν «ευνόησε» τον βακτηριακό πληθυσμό.

Παρόλα αυτά, έχει αναφερθεί πολλές φορές πως τα βακτήρια με υψηλή παραγωγικότητα υποστηρίζουν αντίστοιχα υψηλά ποσοστά ιικής μόλυνσης και λύσης, ενώ και η αυξημένη συγκέντρωση θρεπτικών στοιχείων ευνοεί τον λυτικό κύκλο (Williamson et al. 2002). Επιπλέον, η λύση στο φυσικό περιβάλλον είναι μια χρονικά μεταβλητή διαδικασία και μάλιστα είναι ιδιαίτερα μεταβλητή σε δυναμικές κοινότητες (Bettarel et al. 2002; Winter et al. 2004). Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, συνεχή συμβάντα λύσης ίσως εμπόδισαν την ανίχνευση των λυτικά μολυσμένων κυττάρων. Έτσι, τα χαμηλά επίπεδα VP_{lytic} μπορεί να

αποδίδονται σε αυτή καθεαυτή την πειραματική προσέγγιση της μελέτης, η οποία μπορεί να προκάλεσε εσφαλμένη μέτρηση. Οι Zhang *et al.* (2014) πρότειναν πως η λύση συμβαίνει συνεχώς σε καλλιέργειες και για αυτό το λόγο δεν μπόρεσαν να μετρήσουν λυτικά μολυσμένα κύτταρα, ενώ άλλοι πρότειναν πως η λύση δεν μπορεί πάντοτε να ανιχνευθεί λόγω των μειονεκτημάτων της τεχνικής προσέγγισης (Winter *et al.* 2004; Kimmance *et al.* 2007). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι πως η συνολική διάρκεια και τα επιμέρους χρονικά διαστήματα της επώασης μπορεί να καταλήξουν σε παραπλανητικές εκτιμήσεις. Αυτό συμβαίνει γιατί δεν έχουν όλοι οι ιοί την ίδια λανθάνουσα περίοδο και δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα ότι η λύση δεν θα συμβεί κατά τη διάρκεια της επώασης ή θα εμφανιστεί πολλές ώρες αργότερα.

Η σημαντικά υψηλότερη αφθονία των ιών στους A και SD από ό, τι στους C την T1 μπορεί να υποδηλώνει ότι η λύση έλαβε χώρα πριν τη δειγματοληψία. Ομοίως με αυτό το αποτέλεσμα, οι Bonilla-Findji *et al.* (2009) μέτρησαν επίσης υψηλότερη LVLP αφθονία και πρότειναν ότι αυτοί οι ιοί ήταν υπεύθυνοι για τη λύση των πιο «ενεργών» βακτηρίων. Είναι επίσης σημαντική η πιθανότητα ότι υψηλότερος VP_{lytic} πιθανόν συνέβη ακόμα νωρίτερα, για παράδειγμα, λίγες ώρες μετά τον εμπλουτισμό με σκόνη, δεδομένου ότι το μικροβιακό πλαγκτόν είχε έλλειψη από φωσφόρο και αποκρίθηκε εξαιρετικά γρήγορα όταν αυτός προστέθηκε (Herut *et al.* 2016). Μιας και δεν υπάρχει μέτρηση της ικής παραγωγής μεταξύ T-1 και T1 παραμένει άγνωστο εάν ο VP_{lytic} ήταν υψηλότερος αμέσως μετά τον εμπλουτισμό.

Για την ερμηνεία του χαμηλού VP_{lytic} συνυπολογίστηκε επίσης η θήρευση: τα ετερότροφα μαστιγωτά και άλλοι μεγαλύτεροι θηρευτές πιθανόν προτίμησαν να θηρεύσουν λυτικά μολυσμένα βακτηριακά κύτταρα. Στο φυσικό περιβάλλον, έχει φανεί πως η χημική σύσταση και παραγωγικότητα των ξενιστών επηρεάζει την ική μόλυνση/λύση (del Giorgio *et al.* 1996; Vaqué *et al.* 2001; Corzo *et al.* 2005), ενώ η επιλεκτική θήρευση των «ενεργών» βακτηρίων έχει επίσης παρατηρηθεί σε ένα πρόσφατο πείραμα μεσοκόσμων (Baltar *et al.*, 2016). Στη παρούσα μελέτη, τα πιο «ανταγωνιστικά» βακτήρια που αφομοίωσαν τα θρεπτικά της σκόνης μπορεί να είχαν υψηλότερες πιθανότητες ικής μόλυνσης και θήρευσης. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται από τη γρήγορη αύξηση της αφθονίας των δινομαστιγωτών αμέσως μετά την προσθήκη της σκόνης (Tsagaraki *et al.* 2017) και το γεγονός πως πολλά δινομαστιγωτά θηρεύουν αποτελεσματικά βακτήρια (Jeong *et al.* 2008).

Όσον αφορά το κυριότερο σκέλος της μελέτης που είναι η λυσιγονία εξετάστηκε η στοιχειομετρία των θρεπτικών στοιχείων της εκάστοτε σκόνης που παίζει σημαντικό ρόλο στον βαθμό αφομοίωσης της ξαφνικής προσθήκης από τους μικροοργανισμούς στις τάξεις

μεγέθους πικο- και νανο- πλαγκτού. Έχει αναφερθεί στο παρελθόν πως η προσθήκη σκόνης με υψηλή περιεκτικότητα σε άζωτο οδηγεί σε ταχύτερο περιορισμό από φωσφόρο για την ανάπτυξη μικροβίων (Christodoulaki et al. 2013; Ridame et al. 2014). Πιθανότατα αυτό συνέβη και στην περίπτωση των μεσοκόσμων A που έλαβαν μεγαλύτερη ποσότητα αζώτου από ό, τι οι SD. Μια έμμεση επιβεβαίωση ότι τα βακτήρια στους A την στιγμή T4 ήταν περισσότερο περιορισμένα από φωσφόρο σε σύγκριση με τους SD είναι η υψηλότερη συχνότητα των λυσιγονικών κυττάρων, ταυτόχρονα με την ιδιαίτερα χαμηλή παραγωγικότητα. Αρνητική συσχέτιση μεταξύ της βακτηριακής παραγωγικότητας και των λυσιγονικών κυττάρων έχει βρεθεί σε φυσικές και πειραματικές συνθήκες (Jiang and Paul 1996; Long et al. 2008) και στο παρόν πείραμα μετρήθηκαν περισσότερα λυσιγόνα κύτταρα στους A από ό, τι στους SD και C τέσσερις ημέρες μετά την εναπόθεση σκόνης, υποδηλώνοντας ότι οι συνθήκες ήταν λιγότερο ευνοϊκές για την ανάπτυξη των ξενιστών εκείνη την χρονική στιγμή στους A.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες για την εργασία του Κεφαλαίου 4

Η παρούσα μελέτη συγχρηματοδοτήθηκε από το FP7 της Ευρωπαϊκής Ένωσης (2007-2013) βάσει της συμφωνίας επιχορήγησης με αριθμό 228224 «MESOAQUA: Network of leading MESOCosm facilities to advance the studies of future AQUATIC ecosystems from the Arctic to the Mediterranean» και από το έργο «ADAMANT: Atmospheric deposition and Mediterranean sea water productivity» (κωδικός αριθμός / MIS: 383551) από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΣΠΑ) στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (Πρόγραμμα Χρηματοδότησης της Έρευνας: THALES).

Θερμές ευχαριστίες απευθύνονται στον Καπετάνιο και το πλήρωμα του ερευνητικού σκάφους του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. «ΦΙΛΙΑ» για τη βοήθειά τους στη μεταφορά του νερού από τη θάλασσα στους μεσοκόσμους, τον Γιώργο Πιπεράκη για την τεχνική βοήθεια σε όλη τη διάρκεια του πειράματος και στους Ναυτικά Παπαγεωργίου για τη μέτρηση της συγκέντρωσης χλωροφύλλης, Μανώλη Τσαπάκη για τη μέτρηση της διαλελυμένης συγκέντρωσης θρεπτικών, Χρήστο Παναγιωτόπουλο και Καλλιόπη Βιολακή για τη μέτρηση της συγκέντρωσης διαλελυμένου οργανικού άνθρακα και Elisabet Laia Sá Lago για τις πολύτιμες συμβουλές σχετικά με την μέτρηση της ικής παραγωγής. Τα πειράματα έκπλυσης των θρεπτικών στοιχείων διεξήχθησαν στο Israel Oceanographic and Limnological Research (Haifa, Ισραήλ) και στο Πανεπιστήμιο του Λιντς (Ηνωμένο Βασίλειο).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 - Οι επιπτώσεις ανθρωπογενών μορφών πίεσης σε πλαγκτονικές κοινότητες ιών και βακτηρίων κατά μήκος της Ελληνικής ακτογραμμής

5.1. Συνοπτική εισαγωγή

Στις μέρες μας, το 97.7% των ωκεανών επηρεάζεται από ανθρώπινες δραστηριότητες και το 5% των ωκεανών είναι έντονα επηρεασμένο από πιέσεις που συνεχώς αυξάνονται (Halpern et al. 2015). Συγκεκριμένα, το θαλάσσιο περιβάλλον δέχεται μια σειρά επιβλαβών ουσιών σε ανόργανη και οργανική μορφή, συνήθως σε συνεχόμενη βάση, και τελικά οι αλλαγές που επιφέρουν οι ανθρώπινες δραστηριότητες έχουν σημαντικές επιπτώσεις στη λειτουργία του οικοσυστήματος.

Κατά μήκος της Ελληνικής ακτογραμμής, οι ανθρώπινες δραστηριότητες περιλαμβάνουν κυρίως την ανάπτυξη της βιομηχανίας, γεωργίας, υδατοκαλλιέργειας, του τουρισμού, άλλων θαλάσσιων δράσεων, ενώ και η αστικοποίηση είναι έντονο φαινόμενο στην παράκτια ζώνη (Pavlidou et al. 2015). Αυτές οι δραστηριότητες είναι γνωστό πως μπορούν να επηρεάσουν τη δομή και λειτουργία των θαλάσσιων πλαγκτονικών κοινοτήτων. Ένας άμεσος και συχνός τρόπος επιρροής είναι η απελευθέρωση θρεπτικών στοιχείων (π.χ. μέσω λιπασμάτων που περιέχουν άζωτο και φωσφόρο και προκαλούν ευτροφικά φαινόμενα) και ρυπογόνων ουσιών (π.χ. μέσω αστικών λυμάτων, βαρέων μετάλλων, αντιβιοτικών).

Στόχος αυτής της εργασίας ήταν να παρουσιαστεί για πρώτη φορά ένα στιγμιότυπο της σύνθεσης των βακτηριακών και ιικών κοινοτήτων σε παράκτια περιβάλλοντα στον Ελλαδικό χώρο. Οι σταθμοί δειγματοληψίας περιλαμβάνουν συστήματα με ποικίλες δραστηριότητες και εντάσεις πίεσης, από χαμηλή έως πολύ έντονη. Παρότι η μελέτη φαίνεται να περιορίζεται στον Ελλαδικό χώρο, αποτελεί ένα βήμα προς την ευρύτερη χρήση της μετα-γονιδιωματικής ανάλυσης ιών και βακτηρίων για την οικολογική παρακολούθηση ρυπασμένων περιοχών. Πιο συγκεκριμένα, η στόχευση ιικών γονιδίων που σχετίζονται με 1) τον κύκλο ζωής της λυσιγονίας και 2) ποικίλες μεταβολικές διαδικασίες των ξενιστών μπορούν να προσφέρουν στοιχεία-ενδείξεις για την οικολογική ποιότητα των υδάτων (βλέπε Κεφάλαιο 1.1). Πριν αναλυθούν τα ιικά γονίδια, ελέγχθηκε η συσχέτιση ενός «δείκτη πίεσης» και της βακτηριακής και ιικής κοινότητας (σε επίπεδο γένους και οικογένειας). Ακολούθως, αξιολογήθηκαν οι βασικές αβιοτικές μεταβλητές που καθόρισαν τις κοινότητες και ειδικότερα ο ρόλος των βαρέων μετάλλων. Τέλος, μελετήθηκε η αφθονία της ιικής ενσωμάτωσης και η σύσταση σε

67 ικά βοηθητικά μεταβολικά γονίδια για να δοθεί μια εκτίμηση των μεταβολικών μονοπατιών που υποβοηθούνται από τη δράση των ιών στο εκάστοτε οικοσύστημα.

5.2. Υλικά και Μέθοδοι

5.2.1. Δειγματοληψία πεδίου

Επιφανειακό θαλασσινό νερό (2 m) συλλέχθηκε από 26 παράκτιους σταθμούς στο Ιόνιο και το Νότιο Αιγαίο πελάγη (Πίνακας 5. 1) στο πλαίσιο του έργου περιβαλλοντικής παρακολούθησης για την Ευρωπαϊκή Οδηγία-Πλαίσιο για τα Νερά (WFD, «European Water Framework Directive») τον Μάρτιο 2014 και 2015. Η συλλογή έγινε με φιάλες Niskin με το ερευνητικό σκάφος του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. «ΦΙΛΙΑ». Τα χαρακτηριστικά των σταθμών δειγματοληψίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 5. 1.

Πίνακας 5. 1. Όνομα, κωδική ονομασία, ημερομηνία δειγματοληψίας, συντεταγμένες (γεωγραφικό μήκος και πλάτος), υδατικό διαμέρισμα, μέγιστο βάθος στήλης νερού, θερμοκρασία, αγωγιμότητα, αλατότητα, πυκνότητα και δείκτης πίεσης των σταθμών δειγματοληψίας. Οι σταθμοί που είναι σκιασμένοι με γκρι αποτελούν τους «κύριους» σταθμούς δειγματοληψίας.

Σταθμός	Κωδική ονομασία	Ημερομηνία δειγματοληψίας	Γεωγραφικό μήκος	Γεωγραφικό πλάτος	Υδατικό διαμέρισμα	Μέγιστο βάθος στήλης (m)	Θερμοκρασία (°C)	Αγωγιμότητα (mS cm ⁻¹)	Αλατότητα (psu)	Πυκνότητα (kg m ⁻³)	Δείκτης πίεσης
Γύθειο	ST1	12/03/2014	22,5692	36,7667	Λακωνικός κόλπος	17	15.7	47.2	38.3	28.4	Μέτριος
Μεσσηνιακός	ST2	12/03/2014	22,090999	36,997398	Κόλπος της Καλαμάτας	167	16.4	48.1	38.4	28.3	Μέτριος
Κυπαρισσιακός	ST3	13/03/2014	21,695199	37,322799	Κυπαρισσιακός κόλπος	25	16.1	47.8	38.5	28.4	Χαμηλός
Λαγανάς	ST4	13/03/2014	20,903999	37,6996	Κόλπος του Λαγανά	23	16.3	48.3	38.7	28.5	Χαμηλός

Αργοστόλι Control α	ST5	14/03/2014	20,4517	38,241699	Κόλπος του Αργοστολίου	17	15.7	46.7	37.8	28.0	Μέτριος
Αργοστόλι (Impact)	ST6	14/03/2014			Κόλπος του Αργοστολίου						
Καλαμίτσι	ST7	15/03/2014	20,704394	38,969242	Παραλία Νικοπόλεως	37	15.6	45.2	36.6	27.1	Χαμηλός
Αμβρακικός- Νότιος α	ST8	15/03/2014	21,094499	38,921501	Νότιος Αμβρακικός κόλπος	45	14.5	34.7	27.6	20.7	Υψηλός
Αμβρακικός- Άραχθος α	ST9	15/03/2014	21,0942	39,039199	Βόρειος Αμβρακικός κόλπος	14	14.8	36.3	27.8	21.6	Υψηλός
Καλαμάς	ST10	18/03/2013	20,143899	39,577499	Ανατολική Κερκυραϊκή Θάλασσα	11	15.5	46.2	37.6	27.8	Μέτριος
Εχινάδες	ST11	19/03/2014	21,081199	38,4593	Εσωτερικό Ιόνιο πέλαγος	20	16.7	48.1	38.1	28.0	Χαμηλός
Αμβρακικός- Λούρος α	ST12	19/03/2014	20,804631	39,030245	Βόρειος Αμβρακικός κόλπος	15	15.3	33.8	24.8	19.6	Υψηλός
Πατραϊκός	ST13	21/03/2013	21,678899	38,236198	Πατραϊκός κόλπος	87	16.1	47.5	38.1	28.1	Έντονος
Σαρωνικός 1 α	ST14	26/03/2014	23,5575	38,0181	Κόλπος της Ελευσίνας	22	15.6	46.9	38.1	28.2	Έντονος

IG2-α	ST15	12/04/2014	25,104799	35,3717	Κόλπος του Ηρακλείου	79	17.49	49.91	38.9		Μέτριος
IG2-β	ST16	03/03/2015	25,104799	35,3717	Κόλπος του Ηρακλείου	79	16.0	48.4	39.0	28.8	Μέτριος
Σαρωνικός 25	ST17	05/03/2015	23,255599	37,647201	Δυτικός Σαρωνικός κόλπος	404	14.7	46.5	38.6	28.8	Μέτριος
Νότιος Πατραϊκός	ST18	06/03/2015	21,5711	38,1814	Νότιος Πατραϊκός κόλπος	62	14.8	46.1	38.1	28.5	Μέτριος
Δυτικός Πατραϊκός	ST19	07/03/2015	21,51000	38,25000	Δυτικός Πατραϊκός κόλπος	76	14.2	45.8	38.4	28.8	Μέτριος
Μεσολόγγι	ST20	07/03/2015	21,410999	38,302101	Θάλασσα του Μεσολογγίου	42	14.1	45.1	37.9	28.4	Χαμηλός
Ηγουμενίτσα	ST21	08/03/2015	20,228099	39,499999	Κόλπος της Ηγουμενίτσας	18	13.8	44.2	37.3	28.0	Μέτριος
Αμβρακικός-Αραχθός β	ST22	08/03/2015	21,0942	39,039199	Βόρειος Αμβρακικός κόλπος	19	13.7	30.0	22.3	18.0	Υψηλός
Αμβρακικός-Νότιος β	ST23	08/03/2015	21,094499	38,921501	Νότιος Αμβρακικός κόλπος	42	13.8	34.9	28.0	21.3	Υψηλός
Αργοστόλι Control β	ST24	09/03/2015	20,4517	38,241699	Κόλπος του Αργοστολίου	19	14.2	45.3	38.0	28.5	Μέτριος

Αμβρακικός- Λούρος β	ST25	09/03/2015	20,804631	39,030245	Βόρειος Αμβρακικός κόλπος	9	13.2	29.8	24.5	18.2	Υψηλός
Σαρωνικός 1 β	ST26	24/03/2015	23,5575	38,0181	Κόλπος της Ελευσίνας	14	12.7	43.4	37.7	28.5	Έντονος

Είκοσι λίτρα τοποθετήθηκαν σε δοχεία πολυαιθυλενίου χαμηλής πυκνότητας που είχαν πλυθεί με υδροχλωρικό οξύ και ξεπλυθεί με απιονισμένο νερό πριν τη χρήση. Το νερό διηθήθηκε μέσω νάυλον πλέγματος με πόρο 5 μm για να αφαιρεθούν τα μεγάλα σωματίδια και στη συνέχεια μέσω πολυανθρακικών μεμβρανών με πόρο 0.2 μm για τη συλλογή βακτηριακών κυττάρων. Χρησιμοποιήθηκε περισταλτική αντλία (Masterflex) υπό χαμηλό κενό (<150 mmHg). Το διήθημα από τον πόρο 0.2 μm συλλέχθηκε σε νέο δοχείο ίδιου τύπου, υποβλήθηκε σε χημική επεξεργασία με 1 mg L⁻¹ FeCl₃ για να επιτευχθεί συσσωμάτωση των ικών σωματιδίων εντός των επόμενων 6-12 ωρών (John *et al.*, 2011). Τα ακόλουθα βήματα για την αποθήκευση και επεξεργασία όλων των μεμβρανών περιγράφονται στο Κεφάλαιο 2.2.9. Χρησιμοποιήθηκε καταγραφέας CTD (Sea-Bird SBE19) για τη μέτρηση της θερμοκρασίας, αγωγιμότητας, αλατότητας και πυκνότητας (Πίνακας 5. 1).

5.2.2. Υπολογισμός του δείκτη πίεσης

Οι σταθμοί δειγματοληψίας χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία περιλαμβάνονται οι σταθμοί όπου συλλέχθηκαν δείγματα για την ανάλυση των βακτηριακών και ικών μετα-γονιδιωμάτων και βαρέων μετάλλων. Αυτοί οι σταθμοί λέγονται «κύριοι» και παρουσιάζονται στα Κεφάλαια των Αποτελεσμάτων 5.3.1 και 5.3.2 (ST1-3, ST7, ST9-14, ST21-22, ST24). Στην δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνονται 9 επιπλέον σταθμοί όπου συλλέχθηκαν δείγματα για ικά μετα-γονιδιώματα αλλά δεν έγινε ανάλυση βαρέων μετάλλων, και αυτοί συζητούνται μόνο στο Κεφάλαιο 5.3.3 (ST4, ST8, ST15, ST17-20, ST25-26). Σε κάθε σταθμό αντιστοιχεί ένας δείκτης πίεσης (pressure index) με τέσσερα επίπεδα (Simboura *et al.* 2016). Για τον υπολογισμό του δείκτη πίεσης εξετάστηκε η μέση ένταση όλων των τύπων πίεσης που προκαλούνται από τον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένων των αστικών, οργανικών και γεωργικών αποβλήτων, του ευτροφισμού, της βυθοκόρησης και των εξορυκτικών αποβλήτων, των υδατοκαλλιεργειών, των λιμενικών και άλλων θαλάσσιων δραστηριοτήτων (Simboura *et al.* 2016). Εξετάστηκαν επίσης τύποι φυσικής πίεσης, δηλαδή υδρομορφολογικές αλλαγές, αλλαγή ακτογραμμής και φυσικές αλλοιώσεις, που επίσης

κρίθηκαν για την έντασή τους από εμπειρογνώμονες. Ο Πίνακας 5. 1 παρουσιάζει τις τιμές του δείκτη πίεσης όλων των σταθμών δειγματοληψίας.

5.2.3. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης χλωροφύλλης, θρεπτικών στοιχείων και βαρέων μετάλλων

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης συλλέχθηκαν δείγματα (1-2 L) και διηθήθηκαν σε μεμβράνες με πόρο 0.47 mm. Οι μεμβράνες αποθηκεύτηκαν στους -20 °C μέχρι να γίνει ανάλυση σε φθοριόμετρο TURNER 00-AU-10 (Holm-Hansen et al. 1965). Επίσης, συλλέχθηκαν δείγματα για τον προσδιορισμό του διαλελυμένου οξυγόνου (dissolved oxygen, D.O.). Τα δείγματα συλλέχθηκαν με ιδιαίτερη προσοχή ώστε να διακοπεί οποιαδήποτε βιολογική διαδικασία και να μην υπάρξει ανταλλαγή αερίων με την ατμόσφαιρα (Strickland and Parsons, 1972). Η μέτρηση έγινε εν πλω χρησιμοποιώντας την Winkler μέθοδο του Carpenter (1965). Για τις συγκεντρώσεις των ανόργανων θρεπτικών στοιχείων έγινε διήθηση νερού σε μεμβράνες 0.45 μm αμέσως μετά τη συλλογή του νερού. Το διήθημα αποθηκεύτηκε στους -20 °C έως την ανάλυση στο εργαστήριο. Για τα νιτρικά και νιτρώδη ιόντα ακολουθήθηκαν το πρωτόκολλο των Strickland and Parsons (1972), για τα πυριτικά των Mullin and Riley (1955), για τα φωσφορικά των Murphy and Riley (1962) και για τα αμμωνιακά του Koroleff (1970). Χρησιμοποιήθηκε αναλυτής BRAN+LUEBBE III Autoanalyzer για όλες τις αναλύσεις, εκτός από τα φωσφορικά που χρησιμοποιήθηκε αναλυτής PERKIN ELMER Vis/UV.

Μετρήθηκε η συγκέντρωση των βαρέων μετάλλων καδμίου (Cd), κοβαλτίου (Co), χαλκού (Cu), νικελίου (Ni), μολύβδου (Pb) και ψευδαργύρου (Zn) (Milne et al. 2010). Ο προσδιορισμός μετάλλων έγινε με ICP-MS Thermo Xseries-II. Η ακρίβεια των μετρήσεων ελέγχθηκε με πρότυπο υλικού (CASS πιστοποίηση) από το National Research Council of Canada. Τα όρια ανίχνευσης για το Co ήταν 0.01, για το Ni 0.06, για τον Cu 0.14, για τον Zn 0.42, για το Cd 0.001 και για τον Pb 0.03 $\mu\text{g L}^{-1}$.

5.2.4. Προσδιορισμός της ικής και βακτηριακής αφθονίας

Η αφθονία των ικών σωματιδίων και των βακτηρίων εκτιμήθηκε όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.2.6.

5.2.5. Εξαγωγή γενετικού υλικού, πολλαπλασιασμός και αλληλούχηση

Η εξαγωγή του γενετικού υλικού των ιών και βακτηρίων, ο πολλαπλασιασμός και η επακόλουθη αλληλούχηση έγινε όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.2.9.

5.2.6. Επεξεργασία των προϊόντων αλληλούχησης

Η επεξεργασία των προϊόντων αλληλούχησης τόσο των βακτηριακών όσο και των ιικών μετα-γονιδιωμάτων έγινε όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.2.10.

5.2.7. Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων

Έγινε ανάλυση κύριων συνιστωσών για την ομαδοποίηση των δεδομένων και προσδιορισμός των πιθανών συσχετίσεων μεταξύ βιοτικών και αβιοτικών μεταβλητών με την ανάλυση BIO-ENV (Clarke and Ainsworth 1993). Η ύπαρξη σημαντικών διαφορών στις ικές και βακτηριακές κοινότητες ανάμεσα στους σταθμούς δειγματοληψίας ελέγχθηκε εφαρμόζοντας πολυπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης χρησιμοποιώντας τον διαχωριστικό παράγοντα «δείκτης πίεσης». Η μηδενική υπόθεση ήταν ότι δεν υπάρχουν διαφορές. Τα πλέγματα ανομοιότητας τύπου Bray-Curtis υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας μετασχηματισμένα βιολογικά δεδομένα (τετραγωνική ρίζα) και οι Ευκλείδειες αποστάσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας κανονικοποιημένα αβιοτικά δεδομένα (Clarke and Warwick 1994). Ο έλεγχος υποθέσεων έγινε με 999 μεταθέσεις και για τις δοκιμές ανά ζεύγη χρησιμοποιήθηκε το επίπεδο σημαντικότητας 0.05. Οι αναλύσεις έγιναν με το λογισμικό πακέτο PRIMER v6 (PRIMER-E Ltd, Plymouth Marine Laboratory, Natural Environmental Research Council, UK) με πρόσθετο λογισμικό PERMANOVA + (Anderson et al. 2008; Somerfield 2008). Επιπλέον, έγινε ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης για τον εντοπισμό των αβιοτικών μεταβλητών που εξήγησαν καλύτερα τη μεταβλητότητα των αφθονιών των ιών και βακτηρίων χρησιμοποιώντας το λογισμικό IBM SPSS (v.22).

5.3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

5.3.1. Φυσικο-χημικός χαρακτηρισμός των κύριων σταθμών δειγματοληψίας

Με βάση τον δείκτη πίεσης (Bojja *et al.*, 2011; Bojja *et al.*, 2011) η υψηλότερη συνολική πίεση παρατηρήθηκε στον Πατραϊκό (ST13) και Σαρωνικό κόλπο (ST14) όπου οι σημαντικότερες κοινές πιέσεις είναι οι απορρίψεις αστικών και βιομηχανικών αποβλήτων και οι λιμενικές δραστηριότητες (Πίνακας 5. 1). Επιπλέον, ο Σαρωνικός κόλπος επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από γεωργικά/οργανικά απόβλητα. Παρόμοια τιμή δείκτη πίεσης με τον ST13 παρατηρήθηκε σε όλους τους σταθμούς του Αμβρακικού κόλπου (ST8-9, ST12, ST22), ο οποίος όμως χαρακτηρίζεται από διαφορετικούς τύπους δραστηριοτήτων και ιδιαίτερα έντονες είναι οι επιπτώσεις των υδατοκαλλιεργειών και του ευτροφισμού. Πράγματι, η πρόσφατη ταχεία και εκτεταμένη ανάπτυξη των δραστηριοτήτων υδατοκαλλιεργειών φαίνεται να επηρεάζει τις ελληνικές ακτές περισσότερο από άλλες ενέργειες (Simboura *et al.* 2015), γεγονός που οδηγεί σε σημαντικές αλλαγές στη σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας λόγω εμπλουτισμού με θρεπτικά στοιχεία (Pitta *et al.* 2009; Tsagaraki *et al.* 2013). Στον Αμβρακικό κόλπο, όπου η εισροή αγροτοκτηνοτροφικών αποβλήτων και λιπασμάτων λόγω απόπλυσης γεωργικών εδαφών είναι έντονη, καθώς και η υδρογραφία της περιοχής ταυτόχρονα με την πρόσφατη ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών συχνά δημιουργούν τοπικές ανοξικές συνθήκες, μετρήθηκε η μέγιστη συγκέντρωση D.O. ιδιαίτερα το 2015 (ST22, 7.27 mg L⁻¹, Πίνακας 5. 2). Κατά μέσο όρο, η συγκέντρωση D.O. ήταν 5.94 ± 0.59 mg L⁻¹ στους κύριους σταθμούς (Πίνακας 5. 2), πολύ πάνω από το όριο «υποξίας» των 2 mg L⁻¹ (Vaquer-Sunyer and Duarte 2008). Η έντονη εισροή γλυκού νερού κυρίως από τους ποταμούς του Αράχθου και Λούρου στον Αμβρακικό κόλπο οδήγησε σε πολύ χαμηλά επίπεδα αλατότητας στην περιοχή (ST8-9, ST12, ST22, 27.07 ± 2.10) και υψηλή συγκέντρωση SiO₄⁻⁴ (ST8-9 και ST12, 23.26 ± 1.62 μM και ST22, 36.79 μM). Τα SiO₄⁻⁴ ιόντα ήταν επίσης υψηλότερα στο λιμνοθαλάσσιο σύστημα σε σύγκριση με την ανοιχτή θάλασσα στους Queiro *et al.* (2017). Στους ST12 και ST22 του Αμβρακικού παρατηρήθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις Ni (0.85 και 0.89 μg L⁻¹, Πίνακας 5. 2), ενδεχομένως λόγω επιρροής των κοντινών ποταμών (Karageorgis 2007). Πράγματι, ο Λούρος δέχεται τα λύματα ενός μεγάλου εργοστασίου παραγωγής ηλεκτρικής ενέργειας, ενώ και ο Άραχθος δέχεται τα ίδια λύματα και ταυτόχρονα τις επιδράσεις τουριστικών, αγροτικών, υδατοκαλλιεργητικών και κτηνοτροφικών δράσεων και τέλος, οι έντονες υδρομορφολογικές πιέσεις δημιουργούν φυσικά υποξικά φαινόμενα και επηρεάζουν το φυσικό βίοτοπο της περιοχής. Στον κόλπο του Αργοστολίου (ST24) όπου η επίδραση από υδατοκαλλιεργείες είναι επίσης έντονη μετρήθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις Cu (0.86 μg L⁻¹) και η υψηλότερη συγκέντρωση Pb (0.54 μg L⁻¹). Και οι δύο συγκεντρώσεις

μετάλλων ήταν υποδιπλάσιες έως υποδεκαπλάσιες στους άλλους σταθμούς (Πίνακας 5. 2), ενώ οι χαμηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν στον ST7 στο Καλαμίτσι που επηρεάζεται ελαφρώς μόνο από αγροτικά/γεωργικά απόβλητα.

Πίνακας 5. 2. Συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου (D.O.), νιτρικών (NO_2^-), πυριτικών (SiO_4^{4-}), φωσφορικών (PO_4^{3-}) και αμμωνιακών (NH_4^+) ιόντων, χλωροφύλλης *a* (Chl *a*), καδμίου (Cd), κοβαλτίου (Co), χαλκού (Cu), νικελίου (Ni), μολύβδου (Pb) και ψευδαργύρου (Zn) και ο λόγος νιτρικών προς φωσφορικών ιόντων (N:P). Οι σταθμοί που είναι σκιασμένοι με γκρι αποτελούν τους «κύριους» σταθμούς δειγματοληψίας.

Κωδική ονομασία σταθμού	D.O.	NO_2^-	SiO_4^{4-}	PO_4^{3-}	NH_4^+	Chl <i>a</i>	Cd	Co	Cu	Ni	Pb	Zn	N:P
ST1	5.52	0.09	3.06	0.04	0.71	0.24	0.01	0.04	0.72	0.52	0.16	1.08	18.1
ST2	5.45	0.07	1.49	0.04	0.60	0.21	0.01	0.03	0.48	0.46	0.27	1.84	17.2
ST3	5.52	0.07	1.66		0.38	0.19	0.01	0.03	0.52	0.40	0.17	1.24	
ST4	5.42	0.05	0.69		1.09	0.09							
ST5	5.52	0.06	1.64	0.03		0.62							1.7
ST6													
ST7	5.62	0.07	4.11	0.01	0.17	0.15	0.01	0.02	0.20	0.36	0.04	1.50	20.2
ST8	6.68	0.05	24.87	0.03		0.17							1.3
ST9	6.65	0.05	21.62	0.04		0.12	0.00	0.05	0.33	0.63	0.06	1.72	1.1
ST10	5.61	0.09	4.24	0.03	0.25	0.52	0.01	0.03	0.25	0.48	0.09	2.20	12.4
ST11	5.57	0.08	2.31	0.03	0.27	0.27	0.01	0.02	0.31	0.40	0.19	1.05	12.6
ST12	6.79	0.07	23.28	0.08		0.06	0.01	0.05	0.70	0.85	0.17	2.08	1.0
ST13	5.53	0.26	3.04	0.03	0.35	0.21	0.01	0.02	0.34	0.51	0.20	1.94	21.7
ST14	6.17	0.09	3.30	0.02		0.57	0.01	0.03	1.04	0.78	0.25	3.55	5.1
ST15	5.30	0.00	0.99	0.03	0.30	0.24							9.9
ST16	5.54	0.08	1.40	0.04	0.14	0.35							6.4
ST17	5.98	0.05	0.56	0.03		0.40							1.7
ST18	5.88	0.19	4.87	0.14	0.89	0.43							7.7
ST19	5.88	0.17	4.97	0.09	0.18	0.33							4.0
ST20	5.79	0.17	3.69	0.02	0.17	0.33							14.5
ST21	5.73	0.06	3.02	0.02	0.46	1.10	0.01	0.07	0.47	0.96	0.27	2.89	28.9
ST22	7.27		43.81	0.02	0.15	2.70	0.01	0.06	0.39	0.89	0.24	2.02	6.4
ST23	6.02		33.58	0.04	0.17	2.75							4.2
ST24	5.78	0.03	1.56	0.02	0.18	0.94	0.01	0.05	0.86	0.64	0.54	2.21	9.1

ST25	7.30	0.04	32.99	0.04	0.79	11.34	20.2
ST26	5.98	0.16	1.79	0.06	0.93	0.64	18.8

Η μέγιστη συγκέντρωση NO_2^- μετρήθηκε στον Πατραϊκό κόλπο (ST13, 0.26 μM , Πίνακας 5. 2), όπου το φαινόμενο του ευτροφισμού και η πίεση λόγω γεωργικών/οργανικών απορρίψεων είναι μέτρια, αλλά υπάρχει έντονη εισροή γλυκού νερού από τον ποταμό Εύηνο, και οι υψηλότερες συγκεντρώσεις NH_4^+ μετρήθηκαν στους ST1-2 (0.71 και 0.60 μM , αντίστοιχα) (Πίνακας 5. 2). Οι συγκεντρώσεις NH_4^+ και PO_4^{3-} ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης των αναλυτικών μεθόδων σε ορισμένους σταθμούς. Συμφωνώντας με την oligοτροφική φύση της ανοιχτής Ανατολικής Μεσογείου και την συχνή παρατήρηση ότι τα φωσφορικά ιόντα είναι ο περιοριστικός παράγοντας της μικροβιακής ανάπτυξης (Moutin *et al.*, 2002), μετρήθηκαν συγκεντρώσεις PO_4^{3-} στο επίπεδο των nM και η μέγιστη τιμή ήταν στον ST12 (0.08 μM) που γειτνιάζει με την έξοδο του ποταμού Λούρου. Η προκύπτουσα αναλογία N:P (εξαιρουμένων των σταθμών όπου δεν ανιχνεύθηκαν PO_4^{3-} και χωρίς να λαμβάνονται υπόψη τα NO_3^-) είχε ένα ευρύ φάσμα τιμών μεταξύ 1 και 29, φθάνοντας μέγιστο στον ST21 όπου, μεταξύ άλλων, τα αστικά λύματα και οι οργανικές/γεωργικές απορρίψεις είναι έντονα φαινόμενα. Στην πλειονότητα των σταθμών όμως, ο λόγος N:P ήταν <10 (Πίνακας 5. 2). Η θερμοκρασία και αλατότητα στους κύριους σταθμούς ήταν κατά μέσο όρο 16.74 ± 0.97 °C και 38.45 ± 5.79 μονάδες, αντίστοιχα (Πίνακας 5. 1). Τα ψυχρότερα νερά ήταν στους ST21 και ST22 (<14 °C και) και η χαμηλότερη αλατότητα στον ST22 (22.33 μονάδες).

Όπως προαναφέρθηκε, η βιομηχανική δραστηριότητα και τα εξορυκτικά απόβλητα επηρέασαν έντονα τον Πατραϊκό και Σαρωνικό κόλπο, οδηγώντας πιθανόν στις χαρακτηριστικές υψηλές συγκεντρώσεις όλων των βαρέων μετάλλων της μελέτης (Πίνακας 5. 2). Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις των μετάλλων Cu και Zn μετρήθηκαν στον ST14, ενώ οι τιμές για τα μέταλλα Cd, Ni και Pb ήταν επίσης υψηλές. Οι υψηλές συγκεντρώσεις Cu και Zn σχετίζονται συχνά με την κτηνοτροφία και γεωργία, καθώς και με αστικά λύματα και κοπριά (Seiler and Berendonk 2012), άρα οι μετρήσεις των μετάλλων στον Σαρωνικό είναι αναμενόμενες δεδομένου ότι στον κόλπο απορρίπτονται λύματα της πρωτεύουσας της χώρας. Άλλοι σταθμοί που δέχονται επίσης μεγάλες ποσότητες αστικών λυμάτων είναι οι ST2, ST13 και ST21 και ανάμεσα σε αυτούς, ο ST21 (Ηγουμενίτσα) χαρακτηρίστηκε από τις υψηλότερες συγκεντρώσεις Cd, Co και Ni και ιδιαίτερα βακτηριακά και ιικά πρότυπα, πιθανόν γιατί επηρεάζεται και από γεωργικές δραστηριότητες και άλλους ήπιους τύπους πίεσης. Οι συγκεντρώσεις των Cd, Co και Ni κυμάνθηκαν μεταξύ 0.004-0.01 $\mu\text{g L}^{-1}$, 0.02-0.07 $\mu\text{g L}^{-1}$ και 0.36-0.96 $\mu\text{g L}^{-1}$, αντίστοιχα σε όλους τους σταθμούς (Πίνακας 5. 2). Στον

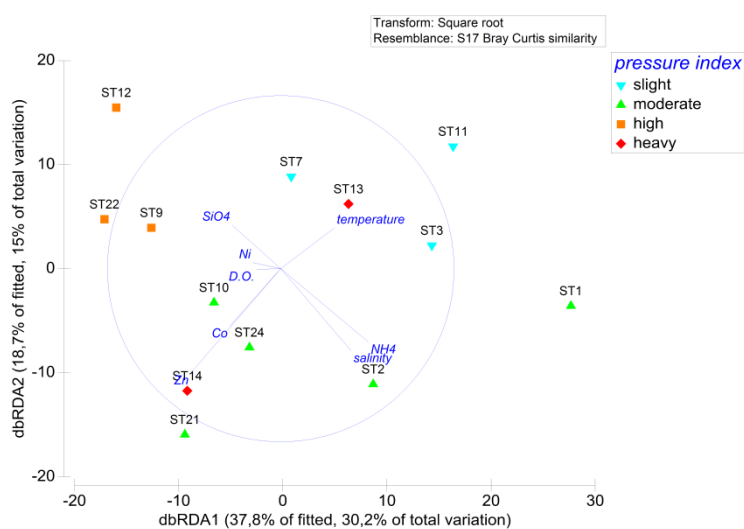
ST10 καταλήγουν τα νερά του ποταμού Καλαμά, λύματα της πόλης των Ιωαννίνων και απόβλητα του φράγματος στη Λαψίστα και υπάρχει έντονη βιομηχανική δραστηριότητα, αλλά δεν μετρήθηκαν υψηλές τιμές βαρέων μετάλλων, εκτός του Zn που ήταν $2.20 \mu\text{g L}^{-1}$.

Εμπλουτισμός με οργανικά/γεωργικά απόβλητα βρέθηκε να επηρεάζει όλους τους σταθμούς ελαφρώς έως μέτρια (Simboura et al. 2016) και εντονότερα τους ST2, ST14 και ST21. Η συγκέντρωση της Chl *a* εν μέρει παραλλήλισε τα πρότυπα οργανικών/γεωργικών αποβλήτων, καθώς τα υψηλότερα επίπεδα Chl *a* μετρήθηκαν στους ST14 και ST21 (Πίνακας 5. 2). Είναι αξιοσημείωτο ότι, σε σύγκριση με τους ST14 και ST21, μετρήθηκαν τουλάχιστον υποπενταπλάσιες συγκεντρώσεις στους ST1-3, ST7, ST9 και ST12 ($0.15 \pm 0.06 \mu\text{g L}^{-1}$) όπου οι τιμές του δείκτη πίεσης κυμαίνονται μεταξύ «χαμηλού» και «υψηλού». Ανάμεσα σε αυτούς τους σταθμούς, στους ST1 και ST3 εισέρχονται μεγάλες ποσότητες γλυκών νερών από τους ποταμούς Ευρώτα και Αλφειό, αντίστοιχα, και μάλιστα ο πρώτος μεταφέρει φερτό υλικό και τελικά η πίεση στην περιοχή (Γύθειο) είναι έντονη λόγω οργανικών λιπασμάτων, κτηνοτροφίας, υδατοκαλλιεργειών, ευτροφισμού και απορρίψεις αποβλήτων εργοστασίων. Το έντονο ρεύμα του ποταμού προκαλεί και φυσικές αλλαγές στην ακτογραμμή. Η συγκέντρωση της Chl *a* φάνηκε να μην έχει γραμμική και άμεση σχέση με την ένταση της συνολικής πίεσης, ειδικά μετά την παρατήρηση πως οι ST12 και ST25 είχαν >100πλάσια διαφορά στην Chl *a*, ενώ βρίσκονται στην ίδια θέση και διαφέρουν μόνο στη χρονιά δειγματοληψίας (2014 και 2015, αντίστοιχα). Η διαφορά της μέτρησης πιθανώς προκλήθηκε από εποχιακά γεγονότα που είχαν προηγηθεί.

5.3.2. Σύσταση της βακτηριακής κοινότητας

Οι σταθμοί δειγματοληψίας δεν ομαδοποιήθηκαν στο επίπεδο του βακτηριακού γένους με βάση την παράμετρο «δείκτης πίεσης» (PERMANOVA, $p > 0.05$), αλλά ομαδοποιήθηκαν στο επίπεδο της οικογένειας (PERMANOVA, Pseudo-F=1.68, $p < 0.05$, Εικόνα 5. 1). Εντοπίστηκαν μοναδικά ταξινομικά πρότυπα που συσχετίστηκαν με φυσικοχημικές παραμέτρους, αλλά υπήρχαν και σημαντικές ομοιότητες μεταξύ των σταθμών, γεγονός που υποδηλώνει πως υπήρχε μια βασική σύνδεση στις βακτηριακές κοινότητες και τελικά οι διαφορές τους σχετίζονταν με τη σχετική αφθονία συγκεκριμένων στελεχών. Ήταν χαρακτηριστικό πως συχνά βρέθηκαν στελέχη-δείκτες κάποιας σοβαρής μορφής περιβαλλοντικής πίεσης σε σταθμούς όπου ο δείκτης πίεσης ήταν «χαμηλός» ή «μέτριος». Αυτή η παρατήρηση ήταν ένδειξη πως η αξιολόγηση της ποιότητας των νερών θα πρέπει να βασίζεται σε έναν συνδυασμό βιολογικών και φυσικοχημικών παραμέτρων. Για την ακρίβεια, το χαμηλό ταξινομικό επίπεδο βακτηρίων και ιών που εξετάστηκε σε αυτήν την μελέτη και η

ταυτόχρονη εκτίμηση ικόν γονιδίων με μεγάλη οικολογική σημασία επέτρεψαν την πληρέστερη αξιολόγηση των σταθμών.



Εικόνα 5. 1. Ανάλυση τύπου distance-based redundancy analysis (dbRDA) για τις βακτηριακές κοινότητες των κύριων σταθμών δειγματοληψίας στο επίπεδο του γένους, βάση της παραμέτρου «δείκτης πίεσης». Μόνο οι στατιστικά σημαντικές αβιοτικές παράμετροι χρησιμοποιούνται στο μοντέλο (δηλαδή, θερμοκρασία, αλατότητα και οι συγκεντρώσεις: διαλελυμένου οξυγόνου [D.O.], πυριτικών [SiO₄⁴⁻] και αμμωνιακών [NH₄⁺] ιόντων, κοβαλτίου [Co], νικελίου [Ni] και ψευδαργύρου [Zn]). Το μήκος των γραμμών υποδηλώνουν τη σχετική ένταση της συσχέτισης. Η ομοιότητα των κοινοτήτων βασίστηκε στον υπολογισμό του δείκτη Bray Curtis μετά από μετασχηματισμό των 16S rRNA γονιδίων (τετραγωνική ρίζα).

Το κοινό κυρίαρχο φύλο ήταν τα *Proteobacteria*, ακολουθούμενο από τα *Bacteroidetes* και *Actinobacteria* (Εικόνα 5. 2). Κατά μέσο όρο τα *Proteobacteria* αντιπροσώπευσαν 80 ± 8% των 16S rRNA γονιδίων, με το υψηλότερο ποσοστό στους ST10, ST13, ST14 και ST21 (85-88%). Στον σταθμό ST14 του Σαρωνικού κόλπου μετρήθηκε η χαμηλότερη βακτηριακή ποικιλότητα (3.7, Πίνακας 5. 3) μαζί με τη μέγιστη συγκέντρωση Zn (Πίνακας 5. 2), συμφωνώντας με τους Golebiewski *et al.* (2014) που ανέφεραν μειωμένη βακτηριακή ποικιλότητα σε ρυπασμένες περιοχές με Zn. Είναι αξιοσημείωτο ότι σε αυτόν τον σταθμό εκτός από *Proteobacteria* βρέθηκαν και *Bacteroidetes* (12% των συνολικών 16S), ενώ τα υπόλοιπα φύλα συνεισέφεραν <2% (Εικόνα 5. 2). Η ποσοστιαία συνεισφορά των *Cyanobacteria* ήταν χαμηλή σε όλους τους σταθμούς (<10% των συνολικών 16S), όπως σε άλλες παράκτιες περιοχές της Μεσογείου (Thiele *et al.* 2017) καθώς και σε άλλα ρυπασμένα παράκτια συστήματα που αναφέρθηκε υψηλότερο ποσοστό ετερότροφων από ό, τι αυτότροφων βακτηρίων (Liu *et al.* 2016). Η τάξη *Synechococophyceidae* ήταν ο μοναδικός αντιπρόσωπος των *Cyanobacteria*. Εξαίρεση αποτελούν οι σταθμοί ST11 και ST22 όπου βρέθηκε μικρή συνεισφορά της κλάσης *4C0d-2*, που πιθανολογείται πως περιέχει μη φωτοσυνθετικά βακτήρια που κάνουν ζύμωση (Soo *et al.* 2014). Στους σταθμούς ST14, ST21

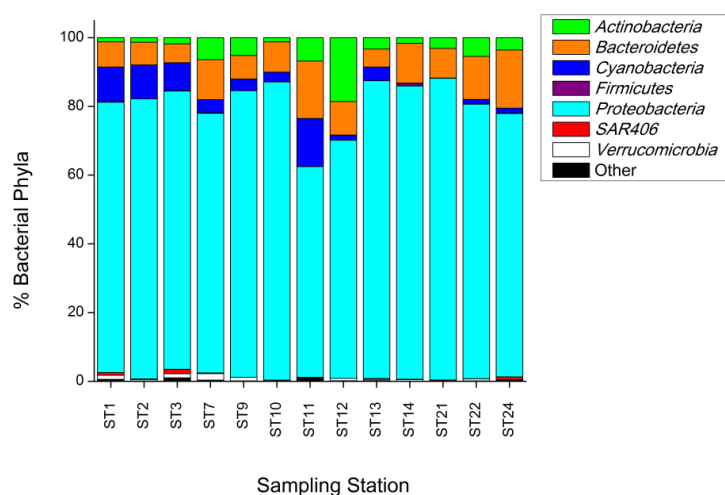
και ST22 δεν βρέθηκαν καθόλου *Cyanobacteria* και όπως συζητείται παρακάτω αυτοί οι σταθμοί παρουσίασαν και άλλες ομοιότητες. Ο ιδιαίτερος χαρακτήρας του σταθμού ST14 τονίστηκε και από την μοναδική παρουσία του φύλου *Firmicutes* σε ποσοστό που έφτανε το 1% των συνολικών 16S rRNA γονιδίων. Από τους σταθμούς του Αμβρακικού κόλπου ξεχώρισε ο ST12 που πιθανόν λόγω της εγγύτητάς του στον ποταμό Λούρο οδήγησε στην ισχυρή παρουσία του φύλου *Actinobacteria* (19% των συνολικών 16S) που περιλαμβάνει στελέχη ικανά να μεταβολίζουν σύνθετες οργανικές ενώσεις και να απομακρύνουν ξενοβιοτικά (Alvarez et al. 2017). Επιπλέον, τα *Actinobacteria* προσαρμόζονται επιλεκτικά σε συγκεκριμένες φυσικοχημικές συνθήκες (Fazi et al. 2013) και ως εκ τούτου, πιθανόν ευνοήθηκαν στην ιδιαίτερη φύση του ST12 με την υψηλή συγκέντρωση των Co και Ni. Στον ST12 βρέθηκε αρκετά υψηλή αφθονία αυτότροφων βακτηρίων (1.7×10^5 κύτταρα mL⁻¹, Εικόνα 5. 3), ενώ η ποσοστιαία συνεισφορά των *Cyanobacteria* ήταν μόλις 1% και αυτή των *Bacteroidetes* 10% (Εικόνα 5. 2). Το φύλο *Verrucomicrobia* που περιλαμβάνει στελέχη ικανά να αποικοδομούν ένα ευρύ φάσμα πολυσακχαριτών (Martinez-Garcia et al. 2012) βρέθηκε να συνεισφέρει 0-2% των συνολικών 16S και η υψηλότερη τιμή ήταν στον σταθμό ST7, όπου η μόνη πίεση είναι η ρύψη οργανικών λυμάτων (Simboura et al. 2016).

Πίνακας 5. 3. Δείκτες βακτηριακής ποικιλότητας (H' Shannon-Wiener) και ομοιογένειας (J' Pielou) στους κύριους σταθμούς δειγματοληψίας. S: συνολικός αριθμός operational taxonomic units, N: συνολική σχετική αφθονία βακτηρίων, d: Margalef's δείκτης ποικιλότητας.

Κωδική ονομασία σταθμού	S	N	d	J'	H'(log2)
ST1	194	3.42E+08	9.821	0.7932	6.028
ST2	94	1.56E+08	4.93	0.7334	4.807
ST3	165	3.3E+08	8.362	0.8095	5.963
ST7	151	2.61E+08	7.74	0.7663	5.546
ST9	95	2.26E+08	4.887	0.7676	5.043
ST10	116	2.47E+08	5.951	0.7689	5.273
ST11	194	3.56E+08	9.802	0.7868	5.98
ST12	122	2.05E+08	6.323	0.7656	5.306
ST13	144	2.01E+08	7.48	0.7184	5.151
ST14	77	93491551	4.141	0.5905	3.700
ST21	66	1.64E+08	3.437	0.7028	4.248
ST22	115	2.16E+08	5.941	0.7373	5.047
ST24	135	2.39E+08	6.946	0.7785	5.509

Τα *Alphaproteobacteria* (κατά μέσο όρο $64 \pm 9\%$) ήταν περισσότερο άφθονα από τα *Gammaproteobacteria* (κατά μέσο όρο $14 \pm 5\%$) σε όλους τους σταθμούς. Οι υψηλότερες τιμές για τα *Alphaproteobacteria* βρέθηκαν στους ST2, ST9 και ST21, εν μέρει συμφωνώντας με την γενική αντίληψη πως τα *Alphaproteobacteria* ευδοκιμούν σε νερά με υψηλή αλατότητα (del Giorgio and Bouvier 2002; Pavlouidi et al. 2016). Η παρουσία τους

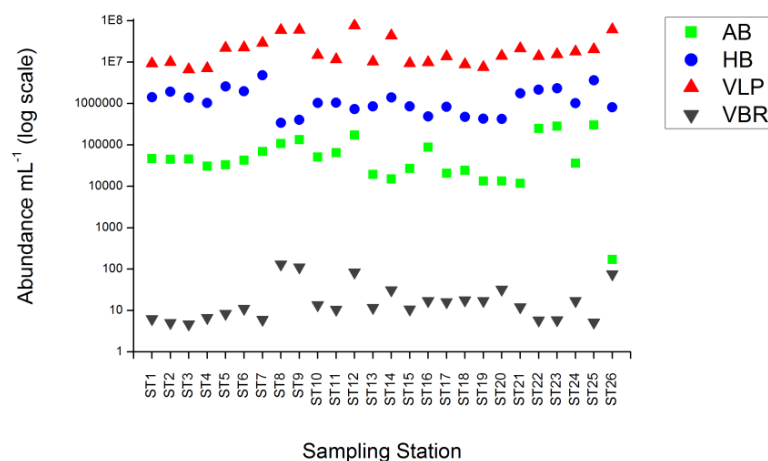
στον σταθμό ST9 του Αμβρακικού πιθανόν να σχετίζεται με την ιδιαίτερη κυκλοφορία των νερών στον κόλπο και τα βαθύτερα πολύ «αλμυρά» νερά (Ferentinos et al. 2010). Μάλιστα ο ST9 διέφερε επιπλέον, σε σχέση με τους άλλους σταθμούς, λόγω της κυρίαρχης θέσης που είχε το τυπικό «θαλάσσιο» στέλεχος *Pelagibacteraceae* (71% των συνολικών 16S).



Εικόνα 5. 2. Ποσοστιαία συνεισφορά των βακτηριακών φύλων (% Bacterial Phyla) στους κύριους σταθμούς δειγματοληψίας. Το σύνολο των σπάνιων φύλων αναφέρεται ως «Other» και περιέχει τα φύλα *Acidobacteria*, *Armatimonadetes*, *Chlamydiae*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Fusobacteria*, *Gracilibacteria*, *Gemmatimonadates*, *Kazan-3B-2b*, *Lentisphaerae*, *Nitrospirae*, *OD1*, *OP11*, *OP3*, *Planctomycetes*, *SBR1093*, *SRI*, *Spirochates*, *TM6*, *TM7*, *Tenericutes*, *WPS-2*, *WS3* και *ZB3*.

Ανάμεσα στις φυσικοχημικές μεταβλητές που αξιολογήθηκαν, η θερμοκρασία, η αλατότητα και οι συγκεντρώσεις των μετάλλων Co, Ni και Zn, των θρεπτικών NH_4^+ , SiO_4^{4-} και του διαλελυμένου οξυγόνου καθόρισαν τα πρότυπα βακτηριακής ποικιλότητας ($\text{AICc}=139.6$, $R^2=79.96\%$, Εικόνα 5. 1). Πράγματι, όπως εξηγείται και παραπάνω, η αλατότητα είχε σημαντικό ρόλο παρόμοια με άλλες μελέτες (Fortunato et al. 2012) και έτσι, τυπικά θαλάσσια στελέχη βρέθηκαν σε σταθμούς με υψηλή αλατότητα [π.χ. *AEGEAN-112* στους ST1, ST3, ST11, ST13, *Oceanospiralles* στους ST1, ST3, ST24, *Rhodobacteralles* στους ST14, ST24, *SAR202* στους ST1, ST3, *Flavobacteriia* στους ST11, ST24 [16% των συνολικών rRNA γονιδίων] και *Rhodospiralles* στους ST3, ST7]. Από την άλλη πλευρά, στους ST10-12 εντοπίστηκε το στέλεχος *Polynucleobacter* που έχει περιγραφεί έως σήμερα μόνο σε γλυκά νερά, γεγονός που πιθανόν οφείλεται στην κυκλοφορία του νερού στις περιοχές και στη μίξη με γλυκά νερά. Τα παραπάνω στελέχη βέβαια δεν περιορίστηκαν σε σταθμούς με υψηλή ή χαμηλή αλατότητα και παρατηρήθηκαν μερικά πιο διαφορούμενα ευρήματα. Για παράδειγμα, η υψηλότερη ποσοστιαία συνεισφορά των *Betaproteobacteria* που συχνά απαντώνται σε γλυκά νερά (Barberán and Casamayor 2010; Fazi et al. 2013;

Pavlouidi et al. 2016) εντοπίστηκε στους ST3 και ST11 (~2% των συνολικών 16S και αλατότητα ~38 μονάδες), ενώ υπήρχαν άλλοι σταθμοί με χαμηλότερη αλατότητα όπου το ποσοστό των *Betaproteobacteria* ήταν πολύ χαμηλότερο. Συμπερασματικά, ορισμένα στελέχη είτε είχαν ανθεκτικότητα στις διακυμάνσεις της αλατότητας είτε η γονιδιακή τους σύσταση και οι υψηλοί ρυθμοί διασποράς τα βοήθησαν να επιβιώσουν.



Εικόνα 5. 3. Αφθονία αυτότροφων (autotrophic bacteria: AB) και ετερότροφων (heterotrophic bacteria: HB) βακτηρίων και ιικών σωματιδίων (virus-like particles: VLP) και ο λόγος των συνολικών βακτηρίων προς τα ιικά σωματίδια (virus-to-bacteria ratio: VBR) σε όλους τους σταθμούς δειγματοληψίας σε λογαριθμική κλίμακα.

Σε σύγκριση με την πρόσφατη αναφορά των Meziti *et al.* (2016) για την περιοχή όπου εκβάλλει ο ποταμός Καλαμάς, στον ST10 μετρήθηκε υψηλή αφθονία *Bacteroidetes* (9% των συνολικών 16S rRNA) αλλά χαμηλή αφθονία *Actinobacteria* (1% των συνολικών 16S rRNA). Όντως, τα *Bacteroidetes* υποδεικνύουν πως η περιοχή υπόκειται στην έντονη επίδραση των γλυκών νερών του Καλαμά ειδικά κατά το τέλος του χειμώνα. Εκείνη την περίοδο (μεταξύ Φεβρουαρίου και Μαρτίου) το ρεύμα του ποταμού είναι δυνατότερο και ως αποτέλεσμα αναφέρθηκε προηγουμένως η παρουσία δύο οικογενειών σχετικών με αστικά λύματα: *Oxalobacteraceae* και *Hyphomicrobiaceae* (Meziti et al. 2016). Επίσης, στα δεδομένα που παρουσιάζονται εδώ βρέθηκε η οικογένεια *Oxalobacteraceae* σε ποσοστό 0.03%, ενώ η οικογένεια *Hyphomicrobiaceae* βρέθηκε σε άλλους σταθμούς (ST11, ST13 και ST22). Επιπροσθέτως, στον ST10 εντοπίστηκαν παθογόνα βακτήρια (*Clostridia*, *Enterobacteriaceae*), βακτήρια που σχετίζονται με επεξεργασία λυμάτων (*Microbacteriaceae*, και ειδικότερα το γένος *Candidatus Aquiluna*), μέλη της οικογένειας *Saprospirae* (*Chitinophaga*, *Sediminibacterium*) και η οικογένεια *Thiohalorhabdadales* που

συζητείται και παρακάτω σχετικά με το ρόλο της στην οξειδωση του θείου (Frank et al. 2016).

Η παρουσία της οικογένειας *Hyphomicrobiaceae* στους σταθμούς ST11, ST13 και ST22 με «χαμηλή», «έντονη» και «υψηλή» τιμή δείκτη πίεσης αντίστοιχα, υποδηλώνει κάποιας μορφής επιβάρυνση, καθώς η οικογένεια έχει μέλη που απαντώνται σε αγωγούς και βιο-αντιδραστήρες, ενώ είναι ικανά να οξειδώνουν το μαγγάνιο και άλλα μέταλλα (Schmitz et al. 2014). Συγκεκριμένα, το γένος *Pedomicrobium* βρέθηκε στον ST11 και πιθανόν σχετίζεται με συστήματα ύδρευσης νερού κακής ποιότητας (άρωμα, θολερότητα, γεύση, αφρισμός) (Schmitz et al. 2014).

Η ανάλυση dbRDA έδειξε πως φυσικές (θερμοκρασία, αλατότητα) και χημικές (ανόργανες αζωτούχες ενώσεις και πυρίτιο, κοβάλτιο, ψευδάργυρος και νικέλιο) μεταβλητές ταυτόχρονα προσδιόρισαν τη βακτηριακή κοινότητα κατά το 55% (Εικόνα 5. 1). Η θερμοκρασία επηρέασε τη σύνθεση της βακτηριακής κοινότητας σε ιζήματα και στήλη νερού στους Queiro *et al.* (2017), ενώ ήταν η μόνη κοινή μεταβλητή που εξήγησε τις αφθονίες των αυτότροφων και ετερότροφων βακτηρίων και των ιών στην παρούσα μελέτη. Επιπλέον παράγοντες που εξήγησαν την μεταβολή της αφθονίας των ετερότροφων βακτηρίων ήταν η αλατότητα και η συγκέντρωση των νιτρικών ιόντων και της χλωροφύλλης ($r=0.932$, $p<0.01$).

Στους σταθμούς ST1 και ST11 με «μέτρια» και «χαμηλή» περιβαλλοντική πίεση εντοπίστηκε η οικογένεια *Caulobacteraceae* που περιλαμβάνει στελέχη ανθεκτικά ή/και ικανά να μετριάσουν/ρυθμίσουν τη συγκέντρωση των βαρέων μετάλλων και συχνά εντοπίζονται σε συστήματα επεξεργασίας λυμάτων (Schmitz et al. 2014). Πράγματι, μέτριες-υψηλές συγκεντρώσεις όλων των βαρέων μετάλλων μετρήθηκαν σε αυτούς τους σταθμούς (κυρίως στον ST11, παρότι και ο ST1 δέχεται ένα ευρύ φάσμα ανθρωπογενών πιέσεων). Ταυτόχρονα, στους ST1 και ST11 εντοπίστηκε και η οικογένεια *Sinobacteraceae* που περιέχει στελέχη ικανά να μειώνουν την κινητικότητα του Pb σε ιζήματα (Fonti et al. 2015). Οι οικογένειες *Flavobacteriaceae* (~ 15% των συνολικών 16S) και *Oceanospirillaceae* (~ 0.05% των συνολικών 16S) ήταν επίσης άφθονες στους ST1, ST11 αλλά και ST24 που είχε την πιο υψηλή συγκέντρωση Pb (Fonti et al. 2015). Στους ST1 και ST11 βρέθηκαν και χαμηλές συγκεντρώσεις PO_4^{3-} (Πίνακας 5. 2), επιβεβαιώνοντας πως η οικογένεια *Caulobacteraceae* περιέχει έντονα ευκαιριακά στελέχη που επιβιώνουν κάτω από τον περιορισμό φωσφόρου, καθώς ορισμένα στελέχη διαθέτουν μηχανισμούς προσκόλλησης σε επιφάνειες και απορρόφησης θρεπτικών με φυσιολογικές προσαρμογές (Schmitz et al. 2014). Η οικογένεια *Caulobacteraceae* βρέθηκε επίσης στους ST3 και ST13 όπου οι συγκεντρώσεις των βαρέων

μετάλλων ήταν ίσες ή υψηλότερες από τους ST1 και ST11 και η παρουσία της είναι επιπλέον ουσιαστική γιατί, εκτός των παραπάνω, περιλαμβάνει παθογόνα στελέχη για τον άνθρωπο.

Στην πρόσφατη μελέτη των Simboura *et al.* (2016a) για την ποιότητα των νερών στην ελληνική ακτογραμμή (European Water Frame Directive) βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ «υψηλής» και «έντονης» οικολογικής κατάστασης και πρωτίστως της συγκέντρωσης του Cd. Δευτερευόντως, βρέθηκε συσχέτιση της οικολογικής κατάστασης με το Co, ενώ συγκεκριμένοι δείκτες έδειξαν σχέση και με άλλα μέταλλα. Το Cd ήταν ο μόνος «κοινός παρονομαστής» για την κακή οικολογική κατάσταση (Simboura *et al.* 2016), αλλά είναι αξιοσημείωτο πως ο «ολοκληρωμένος δείκτης οικολογικής ποιότητας» ή «integrated status index» (Borja *et al.* 2009), που συνυπολογίζει φυσικο-χημικά και βιολογικά χαρακτηριστικά της στήλης του νερού και του βένθους και τη συγκέντρωση των βαρέων μετάλλων, σχετίστηκε με το κοβάλτιο (Co). Μόνο η τελευταία παρατήρηση αντανακλάται στα δεδομένα της βακτηριακής ποικιλότητας στην παρούσα εργασία, καθώς τα μέταλλα που έπαιξαν πιο σημαντικό ρόλο ήταν τα Co, Ni και Zn (και όχι το Cd). Τα μέταλλα αυτά βρέθηκαν σε μεγάλες συγκεντρώσεις κυρίως στους ST9, ST12, ST21, ST22 και ST24, όπου οι υδατοκαλλιέργειες είναι μια κοινή έντονη ανθρωπογενής πίεση, ενώ στους ST21 και ST24 παρατηρήθηκαν επίσης και οι υψηλότερες συγκεντρώσεις Cd (Πίνακας 5.2.)

Σε αρκετούς σταθμούς και κυρίως στους ST7, ST9, ST12 και ST22 βρέθηκε ισχυρή παρουσία της οικογένειας *Microbacteriaceae*, που συχνά βρίσκεται σε σταθμούς επεξεργασίας λυμάτων και σε ρυπασμένες περιοχές με βαρέα μέταλλα (Newton *et al.* 2014; Ruiz-González *et al.* 2015; Savio *et al.* 2015; Liu *et al.* 2016; Quero *et al.* 2017).

Κοιτώντας συνολικά τους παράκτιους σταθμούς, η περιοχή του Αμβρακικού ξεχώριζε (ST9-10, ST12 και ST22) από άποψη φυσικοχημική [πολύ υψηλές συγκεντρώσεις D.O. και χαμηλή αλατότητα στα επιφανειακά νερά (Πίνακας 5. 1, Πίνακας 5. 2)] και βιολογική [υψηλότερη αφθονία HB (2.2×10^6 κύτταρα mL⁻¹) και AB (2.5×10^5 κύτταρα mL⁻¹) στον ST22 (Εικόνα 5. 3)]. Παρότι οι ST9 και ST22 βρίσκονται στο ίδιο σημείο, το βακτηριακό πρότυπο ήταν διαφορετικό τις χρονιές 2014 και 2015. Συγκεκριμένα, η τάξη *Thiohalorhabdales* βρέθηκε μόνο την πρώτη χρονιά δειγματοληψίας. Την δεύτερη χρονιά η συγκέντρωση του D.O. ήταν υψηλότερη και η τάξη απουσίαζε, συμφωνώντας με την παρατήρηση πως η τάξη δεν ευνοείται σε οξυγονωμένα νερά (Frank *et al.* 2016). Τα *Thiohalorhabdales* μπορούν να οξειδώσουν θείο (Sorokin *et al.* 2008) και να αναπτυχθούν σε θειοκυανικό άλας, που θεωρείται ρυπογόνος ουσία και απελευθερώνεται κοντά σε εργοτάξια (de Voogd *et al.* 2015).

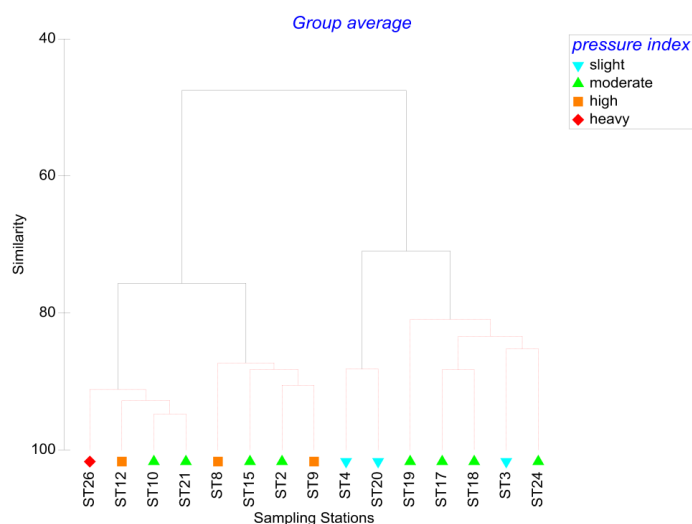
Τα *Thiohalorhabdales* εντοπίστηκαν και αλλού (π.χ. ST1, ST3, ST7, ST14, ST21) και άλλα ιδιαίτερα ευρήματα ήταν η παρουσία της οικογένειας *SAR324 (Deltaproteobacteria)* στους ST1 και ST3, που είναι μεν ικανή να δεσμεύει CO₂ αλλά επίσης ικανή να οξειδώνει θείο, θειοθειικό μονοξείδιο του άνθρακα, μεθάνιο και άλλες πηγές ενέργειας (Swan et al. 2011; Cram et al. 2015), καθώς και η παρουσία της οικογένειας *Saprospirae* στους ST7, ST11, ST12 και ST22) (Wang et al. 2018). Ως εκ τούτου, η χημειολιθοτροφία φάνηκε να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλά παράκτια οικοσυστήματα όπου πιθανόν να αναπτύσσονται ανοξικές μικροζώνες, να γίνεται παραγωγή θειούχων ενώσεων και η προσκόλληση σε σωματίδια (biofilm formation) να είναι συνήθης τρόπος ζωής.

Μόνο η συγκέντρωση των διαλελυμένων νιτρικών και αμμωνιακών ιόντων είχε αντίκτυπο στην σύνθεση της βακτηριακής κοινότητας (Εικόνα 5. 1). Η υψηλή συνεισφορά των *Marinimicrobia* στον ST3 πιθανόν σχετίζεται με τα oligοτροφικά νερά της περιοχής, παρότι εκεί εκβάλλει ο ποταμός Αλφειός (Yilmaz et al. 2017). Η παράδοση παρουσία των *SAR202* στους σταθμούς ST1, ST3 και ST7 πιθανόν σχετίζεται με ανάμιξη με βαθιά νερά, καθώς αυτή η κλάση των *Chloroflexi* απαντάται συνήθως στον βαθύ ωκεανό και εμπλέκεται στον κύκλο του θείου (Martín-Cuadrado et al. 2007; Varela et al. 2008). Παθογόνα βακτήρια βρέθηκαν στον ST24 (*Streptococcus*), ST14 (*Lactobacillus*), ST1-2, ST7, ST22, ST24, (*Campylobacteriales*), ST1, ST3, ST22 και ST24 (*HTCC2188* και *HTCC2207*), ST1 και ST10 (*Bacteroides*), ST1, ST3, ST7, ST10 και ST24 (*Clostridia*), ST1, ST7, ST10, ST22 (*Enterobacteriaceae*) και επιπλέον στον ST1 το *Dechloromonas* (Liu et al. 2016).

Ένα βακτηριακό στέλεχος με οικονομικό ενδιαφέρον βρέθηκε σε όλους τους σταθμούς εκτός από τον ST3: Η οικογένεια *Methylophilaceae* χρησιμοποιείται στην αποικοδόμηση της μεθανόλης και στην εξυγίανση ρυπασμένων περιοχών, μιας και είναι ανθεκτική σε βαρέα μέταλλα και οργανικούς ρυπαντές (Schmitz et al. 2014). Επίσης, η οικογένεια *Methylophilaceae* υποστηρίζει τη βιομηχανία ενζύμων, πεπτιδίων, βιο-πολυμερών, βιταμινών και τη βιομηχανία ζύμωσης (fermentation processes). Τέλος, η παρουσία του χαρακτηριστικού ακαλλιέργητου φύλου *ODI (Parcubacteria)* στον ST11 υποδηλώνει την ανάπτυξη ανοξικών συνθηκών (Nelson and Stegen 2015; Castelle et al. 2017) στις Εχινάδες, όπου οι υδατοκαλλιέργειες είναι ιδιαίτερα ανεπτυγμένες.

5.3.3. Σύσταση της ικής κοινότητας

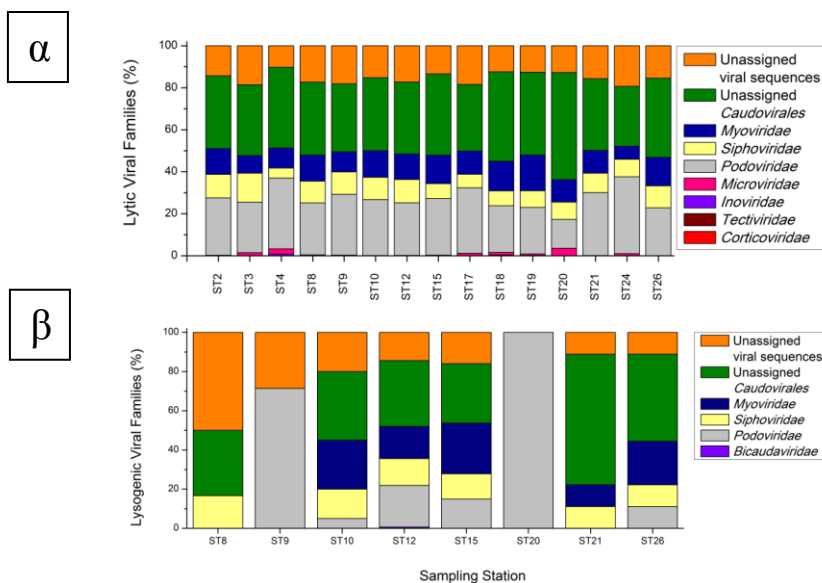
Οι σταθμοί ομαδοποιήθηκαν με βάση την παράμετρο «δείκτης πίεσης» στο επίπεδο του ικού γένους (PERMANOVA, Pseudo-F=4.29, $p=0.01$, Εικόνα 5. 4), όμως καμία από τις ελεγχθείσες φυσικοχημικές μεταβλητές δεν συνέβαλε σημαντικά στη διαφοροποίηση των κοινοτήτων.



Εικόνα 5. 4. Ομαδοποίηση των σταθμών δειγματοληψίας (ανάλυση τύπου CLUSTER) με βάση την ταξινομική ανάλυση των ικών μετα-γονιδιωμάτων. Η ομοιότητα των κοινοτήτων βασίστηκε στον υπολογισμό του δείκτη Bray Curtis μετά από μετασχηματισμό των 16S rRNA γονιδίων (τετραγωνική ρίζα).

Όσον αφορά τους λυτικούς ιούς, σε όλους τους σταθμούς η τάξη *Caudovirales* ήταν επικρατής, όπως και σε άλλες μελέτες ιών με μετα-γονιδιωματική και φαινοτυπική ανάλυση (Weinbauer 2004; Bellas et al. 2015). Η υψηλότερη συνεισφορά γνωστών *Caudovirales* ήταν στους ST15, ST18-19 και ST26 (84-86%), ενώ ένα ποσοστό που κυμαίνονταν μεταξύ 10-16% δεν μπορούσε να αποδοθεί ούτε στο επίπεδο της τάξης (Εικόνα 5. 5). Εντός των *Caudovirales*, η οικογένεια *Podoviridae* ήταν πιο άφθονη από ό, τι η *Myoviridae* και *Siphoviridae*. Μεταξύ των δύο τελευταίων, η *Myoviridae* ήταν η πιο άφθονη (Εικόνα 5. 5), σε αντίθεση με τις παρατηρήσεις στον Νότιο Ωκεανό, όπου στο λυτικό κλάσμα βρέθηκε κυρίαρχη η οικογένεια *Myoviridae* (Brum et al. 2015). Η υψηλότερη συνεισφορά των *Podoviridae* ήταν στον ST24 (37%), των *Myoviridae* στον ST19 (17%) και των *Siphoviridae* στον ST3 (14%). Παρόμοια με τα βακτήρια, οι σταθμοί χαρακτηρίστηκαν από ομοιότητες (παρόμοια φυλογενετικά ικά πρότυπα) αλλά και εντοπισμένες διαφορές στις σχετικές αφθονίες συγκεκριμένων στελεχών, όπως στους Roux et al. (2012). Οι ssDNA ιοί δεν υπερέβησαν ποτέ το 4% των αλληλουχιών, με τα υψηλότερα ποσοστά να βρίσκονται στους

ST4 και ST20 (Εικόνα 5. 5) και ταξινομήθηκαν ως επί τω πλείστον στην οικογένεια *Microviridae*. Δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της αλατότητας και της αφθονίας των *Microviridae* (Angly et al. 2006). Η μεταφορά και μετακίνηση ιών μεταξύ γλυκού και θαλασσινού νερού μπορεί να επηρεάσει την θαλάσσια βακτηριακή κοινότητα, καθώς οι ιοί γλυκών νερών μπορούν να μολύνουν θαλάσσια βακτήρια (Sano et al. 2004; Auguet et al. 2009).



Εικόνα 5. 5. Ποσοστιαία συνεισφορά των ικών αλληλουχιών στο κατώτερο δυνατό επίπεδο ταξινόμησης για το κλάσμα των λυτικών (Lytic viral families, α) και λυσιγονικών (lysogenic viral families, β) ιών στους σταθμούς δειγματοληψίας.

Σε όλους τους σταθμούς, υπήρχε ένα μικρό κλάσμα αλληλουχιών που ταξινομήθηκε ως το επίπεδο του γένους με υψηλή αξιοπιστία. Οι ιοί τύπου *T4* ήταν οι κυρίαρχοι της οικογένειας *Myoviridae* ($32 \pm 7\%$) και οι ιοί *Hrunalike* αποτέλεσαν το 6% των *Myoviridae* στον ST2, ενώ απουσίαζαν από τους υπόλοιπους σταθμούς. Στην οικογένεια των *Siphoviridae*, οι ιοί τύπου *Lambda* και *T5* συνέβαλαν κατά μέσον όρο σχεδόν ισομερώς ($7 \pm 3\%$ και $5 \pm 6\%$ αντίστοιχα), αλλά το *T5* γένος απουσίαζε στους ST3-4 και ST17-20. Οι *Yualike* ιοί ήταν εξαιρετικά άφθονοι στον ST3. Στην οικογένεια *Podoviridae* βρέθηκαν τα υψηλότερα επίπεδα αλληλουχιών χωρίς ταξινόμηση (π.χ. ST4 και ST19 έως και 100% άγνωστοι *Podoviridae* ιοί). Οι ιοί τύπου *T7* ήταν οι κυρίαρχοι της οικογένειας *Podoviridae* με το υψηλότερο ποσοστό συνεισφοράς στους ST2-3 και ST17 (7%). Τέλος, βρέθηκαν ικές αλληλουχίες που ταξινομήθηκαν στις σπάνιες οικογένειες *Inoviridae* (ST4, ST8-10, ST12, ST18-19 και ST21), *Tectiviridae* (ST9) και *Corticoviridae* (ST15) (Εικόνα 5. 5). Η κατανομή των ικών αλληλουχιών με βάση το πρόγραμμα VirSorter (κυκλικές, λυσιγονικές, λυτικές,

άγνωστες ικές, και αλληλουχίες μη ικής προέλευσης και ιικοί φάγοι) παρουσιάζεται στον Πίνακα 5. 4.

Πίνακας 5. 4. Καταμερισμός του τύπου ικών αλληλουχιών που βρέθηκαν με το λογισμικό VirSorter στους σταθμούς δειγματοληψίας. Οι αλληλουχίες περιλαμβάνουν: αλληλουχίες κυκλικές, λυσιγονικές, λυτικές, άγνωστες ικές, άγνωστε μη ικές και virophages. Η αναγνώριση έγινε με βάση την Κατηγορία 3 του προγράμματος (ύψιστη αξιοπιστία).

Κωδική ονομασία σταθμού	Κυκλικές αλληλουχίες	Λυσιγονικά γονίδια	Λυτικά γονίδια	Άγνωστες ικές αλληλουχίες	Αλληλουχίες μη ικής προέλευσης	Ιικοί φάγοι (virophages)
ST2	48	0	2852	332	2092	0
ST3	0	1	415	68	374	0
ST4	0	0	273	26	484	0
ST8	160	6	2182	275	2784	1
ST9	213	9	2965	387	2896	19
ST10	0	20	6898	823	7050	0
ST12	271	146	5456	692	5822	1
ST15	3	201	2934	347	4028	0
ST17	0	0	590	80	570	0
ST18	22	0	580	61	1017	0
ST19	68	118	1051	112	1332	0
ST20	128	6	196	20	331	0
ST21	130	9	6392	753	5740	4
ST24	52	0	708	89	671	0
ST26	209	9	7845	894	7575	17

5.3.4. Λυσιγονία και αφθονία 64 βοηθητικών μεταβολικών γονιδίων

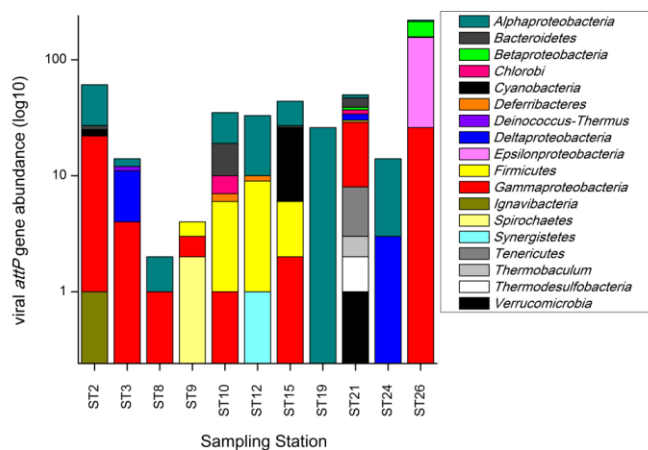
Στους σταθμούς ST2-4, ST17-19 και ST24 δεν ανιχνεύτηκαν καθόλου λυσιγονικά ιικά γονίδια, ενώ στους υπόλοιπους σταθμούς, ένα ποσοστό $19 \pm 15\%$ δεν ταξινομήθηκε στο επίπεδο της τάξης (Εικόνα 5. 5). Σε γενικές γραμμές, δεν φάνηκε να υπάρχει ένα σαφές μοτίβο στην ταξινόμηση των λυσιγονικών ιών. Σε αντίθεση με το κοινό εύρημα ότι οι λυσιγονικοί ιοί ανήκουν κυρίως στην οικογένεια *Siphoviridae* (Bench et al. 2007; Brum et al. 2015; Hurwitz et al. 2015), διαπιστώθηκε ότι $\pm 2\%$ των αλληλουχιών ήταν *Podoviridae*, εκτός από τους ST9 και ST20 όπου η οικογένεια απουσίαζε (Εικόνα 5. 5). Η οικογένεια *Myoviridae* βρέθηκε σε υψηλότερα ποσοστά ($20 \pm 6\%$), αλλά απουσίαζε στους ST8-9 και ST20. Τέλος, η οικογένεια *Podoviridae* έδειξε συνολικά τη μεγαλύτερη μεταβλητότητα μεταξύ των σταθμών και κυμαινόταν από 0 έως 100% (Εικόνα 5. 5). Η οικογένεια *Bicaudaviridae* βρέθηκε μόνο στον ST12 (1% των λυσιγονικών αλληλουχιών, Εικόνα 5. 5). Όταν συγκρίθηκε η ταξινομική των λυσιγονικών ιών μόνο στους δύο σταθμούς με πολλές αλληλουχίες (ST12, Αμβρακικός κόλπος κοντά στην έξοδο του ποταμού Λούρου και ST15, Κόλπος Ηρακλείου), βρέθηκε πως η σύσταση ήταν παρόμοια ως προς την ποσοστιαία συνεισφορά των γενών. Συγκεκριμένα, τα ποσοστά των άγνωστων *Podoviridae* ήταν υψηλότερα στον ST12 (21%) από ό, τι στον ST15 (15%), ενώ το αντίθετο ίσχυε για το

ποσοστό των άγνωστων *Myoviridae* (ST12: 11% και ST15: 20%). Ιοί τύπου *Hrvuna* και *Srouna* βρέθηκαν μόνο στον ST15, ενώ ιοί τύπου *Mu* βρέθηκαν μόνο στον ST12.

Η αφθονία των VLPs υπερέβη το $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ στην πλειονότητα των σταθμών (Εικόνα 5. 3) και η υψηλότερη μετρήθηκε στον Αμβρακικό κόλπο το 2014 (ST8-9 και ST12, $6.5 \times 10^7 \pm 9.7 \times 10^6 \text{ VLP mL}^{-1}$). Σε πολλές περιπτώσεις, πολύ χαμηλές αφθονίες HB συνοδεύονταν από μερικές από τις υψηλότερες αφθονίες VLPs, όπως συνέβη στις ST8-9 και ST12 (Εικόνα 5. 3). Εν τέλει, ο λόγος αφθονίας ιών προς βακτήρια (VBR) εξετάστηκε με τα HB και AB και κυμάνθηκε μεταξύ 4.7 και 131.3 με τις υψηλότερες τιμές στον Αμβρακικό το 2014 (ST8-9 και ST12). Στους ίδιους σταθμούς το 2015 (ST22-23 και ST25) ο λόγος VBR ήταν ~ 20 φορές χαμηλότερος από ό, τι το 2014 (Εικόνα 5. 3).

Με βάση την 100% αντιστοιχία του γονιδίου της ικής ενσωματάσης (*attP*) σε μια βάση δεδομένων tRNA γονιδίων, βρέθηκαν αντίγραφα του γονιδίου σε όλους τους σταθμούς εκτός από τους ST4, ST17-18 και ST20. Το μέσο μήκος των αντιγράφων ήταν $41 \pm 10 \text{ bp}$. Αφού τα δεδομένα κανονικοποιήθηκαν, βρέθηκε πως η υψηλότερη αφθονία της ικής ενσωματάσης ήταν στον ST26 (220 αντίγραφα) και ακολούθως στους ST2 (61), ST15 (44) και ST21 (50). Η χαμηλότερη τιμή μετρήθηκε στον ST9 (4 αντίγραφα), όπου μετρήθηκε επίσης και η υψηλότερη αφθονία λυτικών ιών με κυτταρομετρία, που πιθανόν υποδηλώνει την επικράτηση του λυτικού κύκλου ζώης σε αυτόν τον σταθμό του Αμβρακικού.

Η μετέπειτα θεωρητική ανάλυση αντιστοιχισής ξενιστή έδειξε ότι ο συνηθέστερος ξενιστής για τους λυσιγονικούς ιούς ήταν τα *Alphaproteobacteria* (Εικόνα 5. 6). Εξάιρεση αποτελεί ο σταθμός του Κυπαρισσιακού κόλπου ST3 που περιείχε περισσότερους *Gamma*- και *Deltaproteobacteria* ξενιστές, ο σταθμός στις εκβολές του Αράχθου ποταμού ST9 που είχε μόνο *Spirochates*, *Gammaproteobacteria* και *Firmicutes* ξενιστές (Εικόνα 5. 6), ο ST15 που είχε εξίσου *Cyanobacteria* και *Alphaproteobacteria* ξενιστές και ο ST21 που είχε περισσότερους *Gammaproteobacteria*. Τέλος, ακόμα πιο ιδιαίτερος ήταν ο ST26 που είχε υψηλή αφθονία *Beta*-, *Gamma*- και *Epsilonproteobacteria* (Εικόνα 5. 6). Η ανάλυση PERMANOVA έδειξε πως τα πρότυπα των ξενιστών λυσιγονικών ιών ήταν σημαντικά διαφορετικά μεταξύ των σταθμών με βάση την παράμετρο «δείκτης πίεσης» (PERMANOVA, Pseudo-F=1.7, p=0.05). Οι ST21 και ST26 ήταν περισσότερο όμοιοι μεταξύ τους, ενώ ο ST9 ήταν ο πιο διαφορετικός.

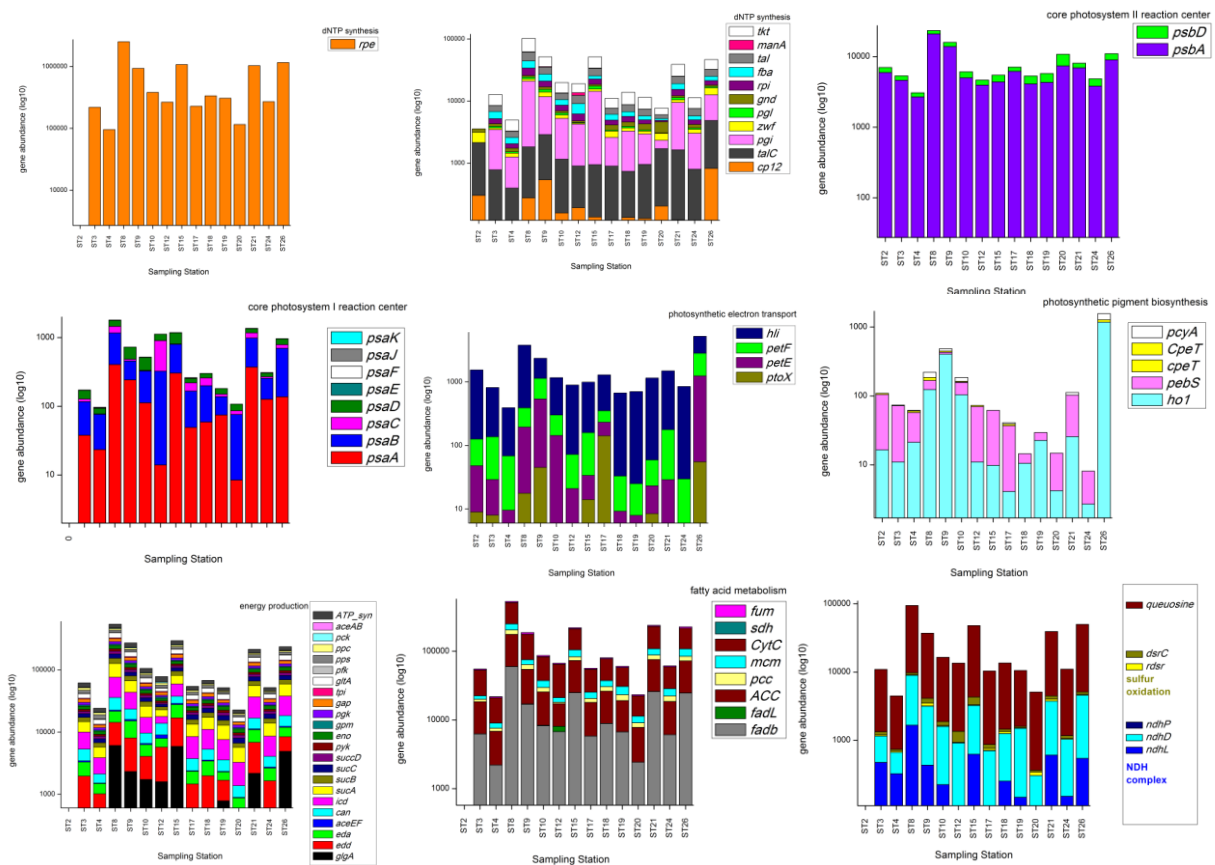


Εικόνα 5. 6. Θεωρητική αντιστοίχιση ξενιστή στους λυσιγονικούς ιούς. Παρουσιάζονται μόνο οι 100% αντιστοιχίσεις των γονιδίων με όριο e-value 10^{-5}. Δεν βρέθηκε το γονίδιο της ιικής ενσωμάτωσης στους ST4, ST17-18 και ST20.

Χαρακτηριστικά πρότυπα ξενιστών για τους λυσιγονικούς ιούς βρέθηκαν σε μερικούς από τους πιο ρυπασμένους σταθμούς. Πιο συγκεκριμένα, στον ST12 βρέθηκε ένας αναερόβιος ξενιστής (*Synergistetes*), άφθονα *Firmicutes* και τα *Deferribacteres* που έχουν ενδιαφέροντα με αλογονοφιλικές, θερμοφιλικές και πλούσιες σε θείο συνθήκες, καθώς και ρυπασμένες περιοχές. Στον ST21 βρέθηκαν ως ξενιστές τα φύλα *Thermobaculum*, *Thermodesulfobacteria* (θερμόφιλα θειικά αναγωγικά βακτήρια) και *Verrucomicrobia*, *Tenericutes*, *Chlorobi* και *Bacteroidetes*. Στον ST10 βρέθηκαν επίσης τα *Deferribacteres* και *Bacteroidetes* και στους ST3 και ST26 βρέθηκαν τα *Deinococcus-Thermus* που είναι ανθεκτικά σε ακραίες συνθήκες (Εικόνα 5. 6).

Εκτιμήθηκε η αφθονία 67 AMGs στα δείγματα. Τα γονίδια χωρίστηκαν σε κατηγορίες προκειμένου να γίνει πιο εύκολη η ανάλυσή τους και να δοθεί ένα οικολογικό νόημα στην πιθανή διαφορά τους. Συγκεκριμένα, στην πρώτη κατηγορία ήταν τα γονίδια που σχετίζονταν με την σύνθεση των dNTPs (*cp12*, *talC*, *pgi*, *zwf*, *pgl*, *gnd*, *rpe*, *rpi*, *fba*, *tal*, *manA*, *tkl*). Στην δεύτερη κατηγορία ήταν τα γονίδια που σχετίζονταν με την παραγωγή ενέργειας (*glgA*, *edd*, *eda*, *aceEF*, *acn*, *icd*, *sucA*, *sucB*, *sucC*, *succD*, *pyk*, *eno*, *gpm*, *pgk*, *gap*, *tpi*, *glgA*, *pfk*, *pps*, *ppc*, *pck*, *aceAB*, *ATP_syn*). Στην τρίτη κατηγορία ήταν τα γονίδια που σχετίζονταν με τον μεταβολισμό λιπαρών οξέων (*fadB*, *fadL*, *ACC*, *pcc*, *mcm*, *CytC*, *sdh*, *fum*). Στην τέταρτη κατηγορία ήταν τα γονίδια που σχετίζονταν με την φωτοσύνθεση (*psbA*, *psbD*, *ptoX*, *petE*, *petF*, *hli*, *hoI*, *pebS*, *cpeT*, *pcyA*, *psaA*, *psaB*, *psaC*, *psaD*, *psaE*, *psaF*, *psaJ*, *psaK*) και τέλος στην πέμπτη κατηγορία ήταν γονίδια με διάφορες άλλες λειτουργίες (*ndhD*, *ndhL*, *ndhP*, *rdsr*, *dsrC*, *queuosine*).

Οι τιμές κανονικοποιήθηκαν και τα δείγματα δεν ομαδοποιήθηκαν με βάση την παράμετρο «δείκτης πίεσης». Στατιστικά σημαντικές διαφορές βρέθηκαν μεταξύ των σταθμών ST21-ST26, ST9-ST15, ST4-ST20, ST3-ST17 και ST19-ST24. Παρακάτω αναφέρονται μερικά από τα σημαντικότερα αποτελέσματα. Ο ST12 ξεχώριζε λόγω της υψηλής αφθονίας *manA*, *glgA*, *fadL*, *psaC*, *rpe*, *fadB*, *mcm*, *ptoX*, *psbA*, *psbD* και *queuosine* και της χαμηλής αφθονίας *icd*. Ο ST15 ξεχώριζε λόγω της χαμηλής αφθονίας *acn* και της υψηλής αφθονίας *psaD*, *rpe*, *pcc* και *queuosine* (Εικόνα 5. 7). Στους ST12 και ST15 βρέθηκαν πολλά αντίγραφα *dscR*. Η ομάδα σταθμών ST8-9 ξεχώρισε καθώς είχε πολλά αντίγραφα *petE*, *rpe*, *psbA* και *psbD*, και λίγα *petF* και *queuosine*, ενώ ο ST8 ειδικότερα είχε και άλλες ιδιομορφίες, όπως πολλά *pcc*, *fadB* και *mcm*. Ως επί το πλείστον, οι ST21 και ST26 «συνόδευαν» τον ST8 σε αυτά τα πρότυπα (π.χ. *rpe*, *fadB*, *petE*, *queuosine*). Άλλα χαρακτηριστικά γονίδια με ιδιαίτερη σύσταση είναι το *ndhD* που ήταν ελάχιστο στους ST3 και ST4, και το *ptoX* που ήταν ελάχιστο στον ST18 (Εικόνα 5. 7).



Εικόνα 5. 7. Αφθονία 67 ικών βοηθητικών γονιδίων (AMGs) που ανήκουν στις κατηγορίες (από αριστερά προς τα δεξιά): σύνθεση dNTPs (2 γραφήματα), φωτοσυνθετικό κέντρο αντίδρασης II και I (photosystem II reaction center και photosystem I reaction center), μεταφορά ηλεκτρονίων, σύνθεση φωτοσυνθετικών χρωστικών, παραγωγή ενέργειας, μεταβολισμός λιπαρών οξέων και άλλες λειτουργίες (οξειδωση θείου, σύμπλοκο NDH).

5.4. *Επισκόπηση των αποτελεσμάτων και συμπεράσματα*

Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε διαφορά στη σύσταση των βακτηριακών και ιικών κοινοτήτων σε επίπεδο ταξινομικής ανάλυσης και αφθονίας. Ανάλογα με τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν για την κάθε ανάλυση (δηλαδή, την ανάλυση ταξινομικής έναντι αφθονίας), βρέθηκαν διαφορετικές «κινητήριες δυνάμεις» για τις εκάστοτε διαφορές των κοινοτήτων. Ο ιδιαίτερος χαρακτήρας των βαρέων μετάλλων, και ειδικότερα το γεγονός ότι δεν μεταβάλλονται εύκολα και έχουν αργούς χρόνους απομάκρυνσης από ένα σύστημα ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Micheli et al. 2013), τα καθιστά σημαντικούς ρύπους του θαλάσσιου οικοσυστήματος (Alvarez et al. 2017). Δεδομένης της υψηλής συγκέντρωσης οξυγόνου στους σταθμούς που ελέγχθηκαν στην παρούσα εργασία θα ήταν αναμενόμενο η διαλυτότητα (και άρα η τοξικότητα) των μετάλλων να είναι αρκετά υψηλή (Schulz-Zunkel and Krueger 2009). Πράγματι, οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων Co, Ni και Zn έπαιξαν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό των βακτηριακών κοινοτήτων μόνο σε επίπεδο ταξινομικής. Εν τέλει τα πρότυπα της βακτηριακής σύστασης διέφεραν μεταξύ των σταθμών με «χαμηλή», «μέτρια», «υψηλή» και «έντονη» επιβάρυνση, επιβεβαιώνοντας την αρχική υπόθεση της εργασίας. Παρατηρήθηκαν όμως και πολλές ομοιότητες ειδικότερα στα πολύ άφθονα βακτηριακά φύλα (π.χ. *Proteobacteria*), γεγονός που αποδεικνύει τη σημασία της συνεχούς έκθεσης σε ρυπογόνες ουσίες που οδηγεί στην προσαρμογή στις εκάστοτε συνθήκες. Πράγματι, τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται άμεσα (Misson et al. 2016), αν και δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο να υπήρξε επιρροή σε άλλο επίπεδο (π.χ. μετα-μεταγραφικό) (Thiele et al. 2017) ή ο χρόνος παραμονής των ρύπων να είναι χαμηλός. Σε αυτό το πλαίσιο, ήταν χαρακτηριστικό πως βασικοί φυσικοί παράγοντες επηρέασαν σε μεγαλύτερο βαθμό την ποικιλότητα από ό, τι τα βαρέα μέταλλα. Αυτοί οι παράγοντες ήταν η θερμοκρασία και αλατότητα. Φαινόμενα ανάβλυσης βαθύτερων νερών ή/και ανάμιξης με γλυκά νερά ειδικά στον Αμβρακικό κόλπο δημιούργησαν πιο περίπλοκη εικόνα στη βακτηριακή ποικιλότητα ως προς την αλατότητα. Η μεταφορά στελεχών βακτηρίων και ιών από γλυκά σε θαλάσσια νερά έχει σημαντικές επιπτώσεις στην λειτουργία των θαλάσσιων οικοσυστημάτων, καθώς έχει συχνά παρατηρηθεί πως τα πρώτα είναι ικανά να προσβάλλουν τα δεύτερα (Roux et al. 2012). Παθογόνα βακτήρια βρέθηκαν σε όλους τους σταθμούς, όχι μόνο γειτνιάζοντα με αστικά κέντρα και κέντρα επεξεργασίας λυμάτων, αλλά και σε λιγότερο επιβαρυσμένους σταθμούς. Επιπλέον, βακτηριακά στελέχη που δυνητικά χρησιμοποιούνται ως δείκτες απομάκρυνσης μετάλλων βρέθηκαν κυρίως σε σταθμούς με μέτρια συγκέντρωση μετάλλων. Από τους σταθμούς δειγματοληψίας, ξεχώρισαν οι σταθμοί του Αμβρακικού και Σαρωνικού κόλπου, ενώ οι υπόλοιποι μοιράστηκαν περισσότερες ομοιότητες. Ένα παράδειγμα ανεπαρκούς περιγραφής της οικολογικής κατάστασης με βάση το δείκτη πίεσης

ήταν τα άφθονα βακτηριακά στελέχη που εμπλέκονται σε ανοξικό μεταβολισμό του θείου σε σταθμούς με «χαμηλή» περιβαλλοντική πίεση, που απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

Παρόμοια με τα βακτήρια, οι ιοί διαχωρίστηκαν με βάση τον «δείκτη πίεσης» σε επίπεδο οικογένειας. Σε αυτήν την περίπτωση όμως τα δεδομένα έδωσαν λιγότερες πληροφορίες λόγω της χαμηλής ταξινομικής αναγνώρισης των ιικών αλληλουχιών. Για τους σταθμούς που δεν αναγνωρίστηκε το γονίδιο της ιικής ενσωμάτωσης, ο πιθανός λόγος είναι η ύπαρξη άλλων οδών λυσιγονίας, ενώ είναι αξιοσημείωτο πως ο σταθμός που βρισκόταν κάτω από τους κλωβούς υδατοκαλλιέργειών είχε την υψηλότερη αφθονία (και άρα την υψηλότερη συχνότητα λυσιγονίας). Η παρατήρηση αυτή έχει μεγάλο αντίκτυπο στην λειτουργία αυτού του συστήματος, καθώς λυσιγονικοί ιοί μπορεί να μεταφέρουν γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα, αντιβιοτικά και άλλες ουσίες σε αυτό το ιδιαίτερο περιβάλλον. Υψηλή συχνότητα λυσιγονίας βρέθηκε και σε άλλους σταθμούς, με πιθανές συνδυαστικές αιτίες (π.χ. ολιγοτροφισμός του ξενιστή ή/και έκθεση σε βαρέα μέταλλα). Η ταξινομική ανάλυση των λυσιγονικών ιών αποκάλυψε στοιχεία που δεν θα μπορούσαν να γίνουν ορατά με άλλο τρόπο, όπως για παράδειγμα η ύπαρξη στελεχών που εμπλέκονται στον μεταβολισμό του θείου και σχετίζονται με ακραίες ανοξικές συνθήκες σε πολλούς σταθμούς. Αντίστοιχα αποτελέσματα αποκάλυψε και η περιεκτικότητα σε AMGs, όπως για παράδειγμα η ύπαρξη γονιδίων που ευνοούν τον μεταβολισμό του θείου στον κόλπο του Ηρακλείου. Όλα τα AMGs διαφοροποιήθηκαν έντονα ανάμεσα στους σταθμούς και ξεχώρισε η υψηλή αφθονία πολλών εξ' αυτών στους σταθμούς με υδατοκαλλιέργειες, επιβεβαιώνοντας πως η οικολογική σημασία της ιικής μόλυνσης είναι μεγάλη σε αυτά τα περιβάλλοντα. Επιπλέον, AMGs που συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στην επαγωγή της λύσης βρέθηκαν στους σταθμούς του Αμβρακικού, υποδηλώνοντας πως ευνοϊκές συνθήκες επικρατούσαν στην περιοχή, με συνέπειες στην βακτηριακή θνησιμότητα, την απελευθέρωση ενδοκυτταρικού περιεχομένου, την οριζόντια μεταφορά γονιδίων και άλλες σημαντικές λειτουργίες του οικοσυστήματος.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες για την εργασία του Κεφαλαίου 5

Η παρούσα μελέτη συγχρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα 7FP της Ευρωπαϊκής Ένωσης «MicroB3» (Marine Microbial Biodiversity, Bioinformatics, Biotechnology), την Οδηγία για τα Νερά (European Water Framework Directive) και την βασική χρηματοδότηση στον Daniele Daffonchio (KAUST). Θερμές ευχαριστίες απευθύνονται στον Καπετάνιο και το πλήρωμα του ερευνητικού σκάφους του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. «ΦΙΛΙΑ» και στους Μανώλη Τσαπάκη, Ιωάννα Καλαντζή, Ελένη Ρουσελάκη και Ειρήνη Τσκοπούλου για τη βοήθειά τους στις εργασίες στη θάλασσα. Επίσης, ευχαριστούνται η Ελευθερία Παπαδοπούλου από το Πανεπιστήμιο των Ιωαννίνων και οι Μαρίνα Κουκάκη και Αναστάσιος

Οικονόμου από το Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (Ιδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, ΙΤΕ) για την ευγενική τους υποστήριξη κατά την εκχύλιση του ιικού DNA καθώς και οι Χριστίνα Παυλούδη, Κατερίνα Βασιλειάδου και Jon Bent Kristoffersen για την σημαντική καθοδήγησή τους κατά τη διάρκεια της μοριακής ανάλυσης. Τέλος, ευχαριστούνται οι Matthew Sullivan και Bonnie Poulos από το Texas University και ο Pascal Hingamp από το Aix-Marseille Université για την άμεση ανταπόκρισή τους σε ανάγκη για αναλώσιμα κατά τη διάρκεια δειγματοληψίας και οι Nigel Grimsley και Hugo Lebretonchel από το Laboratoire Oceanographie de Banyuls sur Mer για την εκμάθηση και θερμή υποστήριξη σε θέματα ιικής μετα-γονιδιωματικής ανάλυσης κατά τη διάρκεια επίσκεψης στα πλαίσια του ASSEMBLE τον Ιανουάριο-Φεβρουάριο 2014 (9th Call, FP7/2007-2013).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 – Σύνοψη

Περιβαλλοντικές αλλαγές που προκαλεί ο άνθρωπος αλλοιώνουν το ωκεάνιο σύστημα (Hutchins and Fu 2017). Διαρκείς και μη προβλέψιμες αλλοιώσεις των χημικών και φυσικών χαρακτηριστικών των ωκεανών επηρεάζουν τους θαλάσσιους μικροοργανισμούς, οι οποίοι ελέγχουν την λειτουργία του θαλάσσιου τροφικού πλέγματος και τους κύκλους των περισσότερων θρεπτικών στοιχείων. Συνεπώς, είναι αναγκαία η μελέτη της απόκρισης των μικροβιακών πλαγκτονικών κοινοτήτων στις ανθρωπογενείς περιβαλλοντικές αλλαγές, τις σημερινές αλλά και τις αναμενόμενες μελλοντικές. Σε αυτές τις μελέτες γίνεται προσπάθεια να καταγραφεί η σύσταση του μικροβιακού πλαγκτού στο θαλάσσιο περιβάλλον που διαρκώς αλλάζει, σύσταση η οποία φαίνεται να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ποικιλότητα φαινοτύπου και γενοτύπου στο εκάστοτε ενδιαίτημα. Με άλλα λόγια, τα μικροβιακά στελέχη που είναι ικανά να ανταγωνιστούν και ανταπεξέλθουν σε περιβαλλοντικές αλλαγές καθορίζουν την δομή της κοινότητας, ενώ επίσης παίζει ρόλο η φυσική και ανθρωπογενής διασπορά (Barberán and Casamayor 2010). Ειδικότερα για τους ιούς, ανεξαρτήτως των περιβαλλοντικών αλλαγών, η εύρεσή τους σε ένα σύστημα σχετίζεται με την ικανότητα διασποράς τους (φυσική μεταφορά και ανθεκτικότητα παραμονής εκτός κυττάρου-ξενιστή) και την ικανότητα επιτυχούς αντιγραφής τους σε μια νέα περιοχή (Chow and Suttle 2015). Στις περιπτώσεις όπου ένας ιός συμμεταναστεύει μαζί με τον ξενιστή του (για παράδειγμα, μέσω της λυσιγονίας και της μετέπειτα μεταφοράς των μολυσμένων κυττάρων) ευνοείται η διασπορά των ιών. Η υψηλή συχνότητα βοηθητικών μεταβολικών γονιδίων στους λυσιγονικούς ιούς (δηλαδή, συντηρημένων γονιδίων βακτηριακής προέλευσης που εντοπίζονται στο ικό γονιδίωμα και τα προϊόντα της έκφρασής τους εμπλέκονται στον μεταβολισμό του ξενιστή ενισχύοντας την ική παραγωγή) επίσης ευνοεί την διασπορά των ιών (Weinbauer et al. 2003).

Έτσι λοιπόν η λυσιγονία έχει λάβει ιδιαίτερη προσοχή τα τελευταία χρόνια, δεδομένου ότι οι λυσιγονικοί ιοί επηρεάζουν τα ωκεάνια και βιογεωγραφικά πρότυπα και, κυρίως, τροποποιούν την βιολογία των βακτηριακών ξενιστών τους, ποικιλοτρόπως· συνεπώς και το σύστημα που τους περιβάλλει (Howard-Varona et al. 2017). Πιο συγκεκριμένα, οι λυσιγονικοί ιοί ενσωματώνονται στο βακτηριακό γονιδίωμα και άρα τροποποιούν την βακτηριακή γονιδιακή έκφραση λόγω της διαδικασίας ενσωμάτωσης-αποκοπής. Επιπλέον, οι λυσιγονικοί ιοί τροποποιούν τη φυσιολογία των βακτηρίων καθώς τους προσφέρουν νέα ή αλλάζουν ήδη υπάρχοντα χαρακτηριστικά τους. Μέσω του γενετικού μετασχηματισμού, οι λυσιγονικοί ιοί εισάγουν και νέους φαινοτύπους στα βακτήρια, όπως είναι η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Επίσης, με τη λύση των ξενιστών, οι λυσιγονικοί ιοί επηρεάζουν τις κοινότητες καθώς, 1) απελευθερώνεται ενδοκυτταρικό περιεχόμενο που λειτουργεί όπως τα

θρεπτικά στοιχεία, 2) διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ των ανταγωνιστικών κυττάρων και 3) προκύπτουν νέα λυσιγονικά βακτήρια. Τέλος, τα ιικά βοηθητικά μεταβολικά γονίδια (auxiliary metabolic genes ή AMGs) παρεμβαίνουν στην εξέλιξη των λυσιγονικών βακτηρίων, καθώς αυτά τα γονίδια αποκτώνται από τους ξενιστές, εξελίσσονται ανεξάρτητα όταν βρίσκονται στους ιούς και ξανασυνδυάζονται με τον ξενιστή (Sullivan et al. 2006), βελτιώνοντας πολλές φορές τις πιθανότητες επιβίωσής του (Bragg and Chisholm 2008). Η μετάβαση από την λυσιγονία στη λύση μπορεί να επέλθει είτε τυχαία, σε σπάνιες περιπτώσεις, είτε λόγω της δράσης εξωτερικών παραγόντων, παρόμοιων με αυτούς που οδηγούν στην αποδόμηση του κυτταρικού DNA. Πιο συγκεκριμένα, αλλαγές στο επίπεδο των θρεπτικών, του pH και της θερμοκρασίας και η έκθεση σε αντιβιοτικά, υπεροξείδιο του υδρογόνου και η εισβολή ξενικού DNA μπορεί να οδηγήσουν στην επαγωγή της λύσης.

Είναι γεγονός πως σε γενετικό επίπεδο οι λυσιγονικοί ιοί έχουν παρατηρηθεί σε 40-50% των μικροβιακών γονιδιωμάτων στην πλειονότητα των φύλων (Howard-Varona et al. 2017), ενώ η σημασία του λυσιγονικού κύκλου ζωής, στη γενικότερη λειτουργία του θαλάσσιου οικοσυστήματος και στην ποσότητα οργανικής ύλης που είναι διαθέσιμη στα βαθύτερα στρώματα των ωκεανών αποτελεί πλέον τμήμα της θαλάσσιας οικολογίας. Η λυσιγονία συνήθως συσχετίζεται αρνητικά με την πρωτογενή και δευτερογενή παραγωγικότητα και η παρουσία των AMGs έχει χρησιμοποιηθεί ως «δείκτης» περιβαλλοντικής επιβάρυνσης, μιας και ανάλογα με το πού και πότε εκφράζονται, φανερώνουν την «τάση» της λειτουργίας του οικοσυστήματος (μείωση ενεργειακής δαπάνης, αλλαγή μεταβολικών μονοπατιών κ.τ.λ.). Συνολικά, η τελική έκβαση των κύκλων ζωής των ιών στη φύση εξαρτάται από τον συνδυαστικό χαρακτήρα των ιών (βαθμός μολυσματικότητας, αριθμός ιών ανά κύτταρο που λύεται κ.τ.λ.), των βακτηρίων (ρυθμός παραγωγικότητας, αφθονία κ.τ.λ.) και του περιβάλλοντος (UV ακτινοβολία κ.τ.λ.) (Mojica and Brussaard 2014).

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν τρεις διαφορετικές ανθρωπογενείς πιέσεις που προβλέπονται για το μέλλον καθώς επίσης ένας συνδυασμός πιέσεων που είναι ήδη καταγεγραμμένος σε παράκτια οικοσυστήματα, σχετικά με την επίδρασή τους στις θαλάσσιες κοινότητες ιών. Για τη μελέτη των μελλοντικών πιέσεων χρησιμοποιήθηκαν πειράματα μεσοκόσμων και ο στόχος ήταν να μελετηθεί η επίδραση των πιέσεων στη μεταβλητότητα των ικών και βακτηριακών κοινοτήτων ως προς την αφθονία, σύσταση και έκταση λυσιγονίας κάτω από συνθήκες που προσομοιώνουν τις φυσικές. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων χρησίμευσαν ως ένα βήμα μπροστά προς την βαθύτερη κατανόηση και πρόβλεψη της μελλοντικής λειτουργίας του μικροβιακού πλαγκτού και άρα του πλανητικού συστήματος γενικότερα. Στις μέρες μας, η μελέτη των ιών στο φυσικό περιβάλλον

εξελίσσεται με ραγδαίο ρυθμό, ενώ οι έρευνες σε κλειστά συστήματα (π.χ. μικρόκοσμοι, μεσόκοσμοι) είναι ελάχιστες παρότι μπορούν αδιαμφισβήτητα να δώσουν απαντήσεις σε συγκεκριμένα ερωτήματα σχετικά με τους κύκλους ζωής των ιών. Ως εκ τούτου, η χρησιμότητα των αποτελεσμάτων από αυτές τις μελέτες είναι μεγάλη, καθώς συμπληρώνουν τις μελέτες που γίνονται σε βάθος χρόνου (π.χ. παλαιο-ωκεανογραφικές μελέτες) (Hutchins and Fu 2017). Παράλληλα με την μελέτη των πιέσεων που προβλέπονται για το εγγύς μέλλον, στην τέταρτη εργασία μελετήθηκε το βιογεωγραφικό μοτίβο των ικών και βακτηριακών κοινοτήτων στα πλαίσια δύο δειγματοληψιών πεδίου σε παράκτιες περιοχές που δέχονται ήδη συνδυασμό ανθρωπογενών πιέσεων.

Σε όλες τις περιπτώσεις, η βασική θεώρηση ήταν πως η ισορροπία μεταξύ του λυσιγονικού και λυτικού κύκλου ζωής ελέγχεται κυρίως από την παραγωγικότητα και αφθονία των βακτηρίων. Επιπλέον, συνυπολογίστηκαν οι έμμεσες επιδράσεις που μπορεί να προκύψουν από την φυτο-πλαγκτονική κοινότητα και τις φυσικοχημικές μεταβλητές, ώστε τελικά να καθοριστούν τα ακόλουθα πλαίσια:

1. Στην πρώτη περίπτωση αξιολογήθηκε αν υπάρχει αρνητική επίδραση της έκθεσης σε νανοσωματίδια αργύρου (ΝΣ αργύρου) στη σύσταση της βακτηριακής κοινότητας και ειδικότερα, αν προκύπτει μειωμένη αφθονία και παραγωγικότητα αυτότροφων βακτηρίων. Συνεπώς, η υπόθεση ήταν πως τα «επιβαρυνόμενα» βακτηριακά κύτταρα-ξενιστές θα κατέφευγαν στην λυσιγονία ως προστατευτικό μηχανισμό. Πράγματι, αυξημένη λυσιγονία μέσω ενσωμάτωσης παρατηρήθηκε μετά την προσθήκη ΝΣ αργύρου, ενώ μετρήθηκαν ελάχιστα φωτοσυνθετικά AMGs εκείνο το διάστημα. Με άλλα λόγια, παρότι αυτά τα γονίδια έχουν υποστηρικτικό ρόλο στο μεταβολισμό των βακτηρίων, φάνηκε πως η ικανότητά τους να υποβοηθούν τη φωτοσύνθεση των ξενιστών τους ελαττώθηκε σε μεγάλο βαθμό μετά την έκθεση σε ΝΣ αργύρου. Η λυσιγονία αποδείχτηκε ικανός δείκτης αποτύπωσης της πίεσης, ενώ μεταβλητές που χρησιμοποιούνται εναλλακτικά (π.χ. χλωροφύλλη) δεν αποτύπωσαν την επιβάρυνση αυτή.

2. Στην δεύτερη περίπτωση αξιολογήθηκε αν υπάρχει αρνητική επίδραση της μείωσης του pH στη βακτηριακή κοινότητα. Αντίστοιχα με την πρώτη εργασία, η υπόθεση ήταν πως τα «επιβαρυνόμενα» βακτηριακά κύτταρα-ξενιστές θα κατέφευγαν στην λυσιγονία ως προστατευτικό μηχανισμό. Βρέθηκε ότι τα ετερότροφα βακτήρια δεν επηρεάστηκαν άμεσα από την οξίνιση του νερού σε επίπεδο αφθονίας ή παραγωγικότητας. Αντιθέτως, η ήπια θετική επίδραση που είχε η οξίνιση στα αυτότροφα βακτήρια συσχετίστηκε με (και πιθανόν προκάλεσε) την αύξηση της λυσιγονίας λόγω ανταγωνισμού μεταξύ αυτότροφων και ετερότροφων. Και σε αυτή τη μελέτη, η λυσιγονία λειτούργησε ως δείκτης αποτύπωσης έμμεσης επιβάρυνσης, που όμως έπρεπε να συνδυαστεί με άλλες μεταβλητές του συστήματος για να δικαιολογήσει την – εκ πρώτης όψεως αντιφατική – εξέλιξή του.

3. Στην τρίτη περίπτωση αξιολογήθηκε η αντίστροφη σχέση, δηλαδή αν υπάρχει θετική επίδραση της εισροής αερολυμάτων είτε από τη Σαχάρα είτε από την Ευρωπαϊκή Ήπειρο στη βακτηριακή κοινότητα. Ειδικότερα, αξιολογήθηκε αν η αφθονία και παραγωγικότητα των βακτηρίων διαφοροποιείται λόγω προθήκης θρεπτικών με διαφορετική χημική σύσταση από τους δύο τύπους αερολυμάτων. Σε αυτήν την περίπτωση, η υπόθεση ήταν πως η λυσιγονία θα ήταν μειωμένη σε σχέση με το ανεπηρέαστο σύστημα. Εν τέλει, παρότι η βακτηριακή παραγωγικότητα και αφθονία επηρεάστηκαν θετικά από τα αερολύματα, δεν παρατηρήθηκε μείωση της λυσιγονίας και μάλιστα οι απώλειες βακτηριακής βιομάζας λόγω ιικής λύσης ήταν μειωμένες όταν προστέθηκε σκόνη. Αυξημένη συχνότητα λυσιγονίας παρατηρήθηκε αργότερα στους μεσοκόσμους που εμπλουτίστηκαν με Ευρωπαϊκής προέλευσης σκόνη, όταν η έλλειψη θρεπτικών στοιχείων πιθανόν οδήγησε κάποια βακτήρια σε αυτόν τον προστατευτικό μηχανισμό.

4. Στην τέταρτη περίπτωση η χωρική σύσταση των ικών και βακτηριακών κοινοτήτων προσδιορίστηκε μια δεδομένη χρονική στιγμή και η υπόθεση ήταν πως η λυσιγονία συσχετίζεται θετικά με τον βαθμό επιβάρυνσης των παράκτιων περιοχών. Η υπόθεση διανεύσθηκε και δεν παρατηρήθηκε περισσότερη λυσιγονία μέσω ενσωμάτωσης στις περιοχές που δέχονταν περισσότερες πίεςεις. Παρόλα αυτά, η σύσταση και των ιών και των βακτηρίων διαφοροποιήθηκε ανάλογα με την ένταση των ανθρωπογενών πίεςσεων. Το σημαντικότερο εύρημα ήταν πως η σύσταση σε AMGs υπέδειξε ποιές είναι οι συχνότερες μεταβολικές διεργασίες που υποβοηθούνται από αυτά τα γονίδια σε κάθε ενδιαίτημα.

Συμπέρασμα 1: Σε όλα τα πειράματα μεσοκόσμων, το κοινό χαρακτηριστικό είναι πως οι βακτηριακές κοινότητες βίωσαν ήπιες αλλαγές στην αφθονία αλλά επανήλθαν σε κάποιο χρονικό διάστημα μετά την επιβάρυνση σε επίπεδα σχεδόν ίσα με τις αρχικές συνθήκες, υποδηλώνοντας πως τα πλαγκτονικά βακτήρια είναι ικανά να προσαρμοστούν γρήγορα στις νέες συνθήκες. Συγκεκριμένα, η οξίνιση σε ένα μεσοτροφικό σύστημα συνοδεύτηκε από την τάση προς μικρότερο μέγεθος στα ετερότροφα βακτήρια, γεγονός που έχει καταγραφεί σε παρόμοιες μελέτες (Krause et al. 2012; Zhang et al. 2013; Endres et al. 2014; Engel et al. 2014). Αντιθέτως, η οξίνιση σε ένα ολιγοτροφικό σύστημα δεν συνοδεύτηκε από διαφορά στο μέγεθος των βακτηρίων, πιθανόν λόγω της έλλειψης θρεπτικών και γενικότερης αδράνειας του συστήματος (Ray et al. 2012). Στο πείραμα όπου έγινε ταυτόχρονη έκθεση σε μειωμένο pH και αυξημένη θερμοκρασία βρέθηκε ότι μόνο η αυξημένη θερμοκρασία ευνόησε τα *Synechococcus*. Επιπλέον, η εισροή αερολυμάτων με προέλευση είτε από τη Σαχάρα είτε από την Ευρώπη συνοδεύτηκε από αυξημένη αφθονία βακτηρίων (κυρίως των μεγάλων), γεγονός που επίσης έχει καταγραφεί σε άλλες παρόμοιες μελέτες (Pulido-Villena et al. 2008, 2014; Marañón et al. 2010; Lekunberri et al. 2010; Guieu et al. 2014b). Τέλος, η

προσθήκη ΝΣ αργύρου επηρέασε αρνητικά την αφθονία των *Synechococcus*, γεγονός που έχει αναφερθεί σε μελέτες μικρότερης κλίμακας (Burchardt et al. 2012; Taylor et al. 2016). Βακτηριακές αλλαγές στις παραπάνω τέσσερις περιπτώσεις δεν ήταν ορατές στο σύστημα των μεσοκόσμων μετά από ένα χρονικό διάστημα, που διέφερε από πείραμα σε πείραμα, επισημαίνοντας την ταχεία προσαρμοστικότητα των βακτηρίων και τη χρησιμότητά τους ως δεικτών άμεσης επιβάρυνσης.

Συμπέρασμα 2: Η επόμενη ομοιότητα μεταξύ των πειραμάτων μεσοκόσμων είναι πως οι αλλαγές στο επίπεδο της λυσιγονίας βρέθηκαν σε μεμονωμένες χρονικές στιγμές και συγχρονίστηκαν σε μεγάλο βαθμό με τις αλλαγές της βακτηριακής κοινότητας. Στην περίπτωση της προσθήκης ΝΣ αργύρου μετρήθηκε έντονη αύξηση της λυσιγονίας πέντε ημέρες μετά την προσθήκη, στην περίπτωση της οξίνισης μετρήθηκε ήπια αύξηση πέντε ημέρες μετά την αλλαγή του pH, ενώ στην περίπτωση της εισροής αερολυμάτων μετρήθηκε μέτρια αύξηση τέσσερις ημέρες μετά την προσθήκη σκόνης Ευρωπαϊκής προέλευσης. Αλλαγές στα επίπεδα λυσιγονίας θα μπορούσαν να είχαν γίνει και σε άλλες χρονικές στιγμές που δεν έγιναν μετρήσεις. Αυτό ίσως συνέβη στην περίπτωση της σκόνης, όπου η υψηλή συγκέντρωση των προστιθέμενων θρεπτικών επηρέασε μέσα σε λίγες ώρες άλλες μεταβλητές και πιθανόν και τη λυσιγονία, ενώ δεν κατέστη δυνατό να μετρηθεί.

Συμπέρασμα 3: Χρησιμοποιώντας την πιο αξιόπιστη ποσοτική μέθοδο προσδιορισμού λυσιγονικών κυττάρων παρατηρήθηκε πως η λυσιγονία συσχετίστηκε αρνητικά με τα επίπεδα παραγωγικότητας και αφθονίας των βακτηριακών ξενιστών μόνο στο πείραμα όπου προστέθηκαν αερολύματα. Αρνητική συσχέτιση μεταξύ των δύο έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία πολλές φορές στο φυσικό πεδίο (Breitbart 2012; Howard-Varona et al. 2017), όμως σε πείραμα μεσοκόσμων δεν έχουν ποσοτικοποιηθεί λυσιγονικά κύτταρα. Από την μια πλευρά, η οξίνιση δεν ήταν «αρκετή» για να αλλάξει άμεσα το βαθμό λυσιγονίας σε αντίθεση με την προσθήκη θρεπτικών μέσω των αερολυμάτων. Πιο συγκεκριμένα, η οξίνιση είχε ήπιες επιδράσεις στο φυτοπλαγκτόν που πιθανόν με τη σειρά του προκάλεσε περαιτέρω ήπιες επιδράσεις στους κύκλους ζωής των ιών, δεδομένης της στενής σχέσης αυτών των δύο ομάδων (Brussaard et al. 2008). Πράγματι, ούτε οι λυτικοί ιοί επηρεάστηκαν από την οξίνιση, όπως προέβλεψαν οι Danovaro *et al.* (2011). Αντιθέτως, η προσθήκη φωσφόρου και αζώτου σε βιοδιαθέσιμες μορφές, που συνήθως επάγουν τη λύση, φάνηκε να παίζει πιο καθοριστικό ρόλο στην έκταση της λυσιγονίας σε σχέση με την οξίνιση. Από την άλλη πλευρά, όταν η λυσιγονία προσεγγίστηκε με την αφθονία του γονιδίου ιική ενσωμάτωση δεν παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση με την βακτηριακή παραγωγικότητα. Αυτό υποδηλώνει είτε ότι πως η ποιοτική εκτίμηση της λυσιγονίας δεν αποτυπώνει το σύνολο των λυσιγονικών κυττάρων είτε ότι σε αυτό το πείραμα δεν αναπτύχθηκε τέτοια σχέση μεταξύ ιών και ξενιστών.

Συμπέρασμα 4: Μια αξιοσημείωτη ομοιότητα μεταξύ πειραμάτων της οξίνισης και της εισροής ΝΣ αργύρου ήταν πως και στις δύο περιπτώσεις αποκρίθηκαν έντονα τα *Synechococcus*. Στο μέλλον οι ανθρωπογενείς πιέσεις είναι πιθανότερο να συμβούν συνδυαστικά (Halpern et al. 2008; Kroeker et al. 2010), άρα οι ενδείξεις της παρούσας διατριβής θα μπορούσαν να βελτιώσουν τον σχεδιασμό μελλοντικών πειραμάτων. Πιο συγκεκριμένα, η αύξηση της παραγωγικότητας των *Synechococcus* λόγω της υπερθέρμανσης των ωκεανών πιθανόν αντικρούει την μείωση της παραγωγικότητας των *Synechococcus* λόγω επιμόλυνσης με ΝΣ αργύρου ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις έκθεσης. Συνεπώς, η ταυτόχρονη δράση των δύο πιέσεων έχει ενδιαφέρον να μελετηθεί σε αυτόν τον οργανισμό.

Συμπέρασμα 5: Παρότι λοιπόν δεν βρέθηκαν έντονες αλλαγές στην αφθονία ούτε των βακτηρίων ούτε των ιών ως αποτέλεσμα των ανθρωπογενών περιβαλλοντικών πιέσεων που μελετήθηκαν, βρέθηκαν αλλαγές σε επίπεδο σύστασης της κοινότητας. Τα ευρήματα που προσέφερε η γονιδιωματική ανάλυση επιβεβαίωσαν τους λόγους εξάπλωσης αυτής της μεθοδολογικής προσέγγισης σε πολλούς επιστημονικούς κλάδους, καθώς με άλλα εργαλεία δεν θα ήταν δυνατό να παρατηρηθούν οι λεπτομερείς αποκρίσεις/αποκλίσεις της κοινότητας. Συγκεκριμένα, η γονιδιωματική ανάλυση έδειξε ότι δεν ήταν μόνο τα *Synechococcus* που επηρεάστηκαν αρνητικά από τα ΝΣ αργύρου αλλά και άλλα βακτηριακά φύλα, συμπεριλαμβανομένων των *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* και *Verrucomicrobia*. Επίσης, εκτός από την αύξηση της λυσιγονίας μετά την προσθήκη ΝΣ αργύρου, παρατηρήθηκε πως μόνο οι λυσιγονικοί ιοί της οικογένειας *Siphoviridae* ευνοήθηκαν, γεγονός που πιθανόν σχετίζεται με το ότι η οικογένεια έχει πολλά λυσιγονικά μέλη (Chow and Suttle 2015). Επιπροσθέτως, η διερεύνηση σε μοριακό επίπεδο βοήθησε στην ταυτοποίηση των πιθανών κινητήριων δυνάμεων για τις αλλαγές των ιών και βακτηρίων. Έτσι, ο διαχωρισμός δύο χρονικών πειραματικών περιόδων (η βακτηριακή και ιική ποικιλότητα στην πρώτη περίοδο αυξήθηκε και στην δεύτερη μειώθηκε) εξήγησε αυτό που δεν θα ήταν δυνατό να εξηγηθεί με συμβατικές μεθόδους. Με άλλα λόγια, τα πρότυπα της βακτηριακής και ιικής ποικιλότητας συγχρονίστηκαν με δύο σημαντικές ποσοτικές και ποιοτικές αλλαγές στα ΝΣ αργύρου (αυξημένη συγκέντρωση ιόντων αργύρου και τάση για μικρότερα νανοσωματιδιακά μεγέθη), αλλά και με τις συγκεντρώσεις των θρεπτικών. Αυτό το εύρημα τόνισε τη σημασία των μετασχηματισμών των νανοσωματιδίων και των θρεπτικών στο χρόνο στο φυσικό περιβάλλον, κάτι που δεν είχε παρατηρηθεί με παρόμοια προσέγγιση στο παρελθόν.

Συμπέρασμα 6: Πέραν της μελέτης της επίδρασης των μελλοντικών περιβαλλοντικών πιέσεων στη λυσιγονία, μια άλλη καινοτόμος πτυχή αυτής της διδακτορικής διατριβής είναι η μελέτη ενός μεγάλου εύρους AMGs σε φυσικές συνθήκες προκειμένου να αξιολογηθεί η ικανότητά τους να αποτυπώνουν 1) περιβαλλοντική επιβάρυνση και 2) τα διαφορετικά

επικρατή μεταβολικά μονοπάτια που εμπλέκονται τα AMGs στο εκάστοτε περιβάλλον. Πιλοτική αξιολόγηση ήταν η εκτίμηση των AMGs που σχετίζονται με την φωτοσύνθεση στο πείραμα της προσθήκης ΝΣ αργύρου. Εδώ καταγράφηκε για πρώτη φορά η υποβάθμιση του ρόλου των AMGs μετά από έκθεση σε ΝΣ αργύρου, αφού τα φωτοσυνθετικά AMGs μειώθηκαν και πιθανόν δεν ευνόησαν τα *Synechococcus*-ξενιστές να αντιμετωπίσουν την πίεση από τα ΝΣ αργύρου ή/και τα ιόντα αργύρου. Η μεταφορά ηλεκτρονίων φάνηκε να είναι ο στόχος των τοξικών ΝΣ αργύρου ή/και ιόντων αργύρου, ενώ ακόμα και εναλλακτικές οδοί μεταφοράς ηλεκτρονίων παρεμποδίστηκαν.

Συμπέρασμα 7: Στην ακόλουθη εκτενέστερη αξιολόγηση μελετήθηκαν 67 AMGs στο φυσικό περιβάλλον σε σχέση με έναν συνδυασμό παράκτιων ανθρωπογενών δραστηριοτήτων. Η πλειονότητα των σταθμών δέχεται διάφορες πιέσεις (κυρίως βιομηχανικές και λιμενικές δραστηριότητες, υδατοκαλλιέργειες και το φαινόμενο του ευτροφισμού), όμως οι επιπτώσεις τους πολλές φορές απομονώθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε πως οι έντονες λιμενικές δραστηριότητες και η ρίψη εξορυκτικών αποβλήτων στον Σαρωνικό κόλπο ευνόησαν τον λυτικό κύκλο, καθώς ήταν εξαιρετικά άφθονα: 1) AMGs που καθοδηγούν την σύνθεση dNTPs αμέσως μετά την ιική μόλυνση, 2) AMGs που καθοδηγούν την παραγωγή ενέργειας και 3) AMGs που ευνοούν τον μεταβολισμό του άνθρακα και τη φωτοσύνθεση στα κυανοβακτήρια. Ταυτόχρονα, αυτά τα κύτταρα ήταν σχεδόν ανύπαρκτα στον Σαρωνικό, υποδηλώνοντας την έντονη λύση των κυττάρων σε αυτά τα περιβάλλοντα. Παρόμοια στοιχεία βρέθηκαν και σε σταθμούς του Αμβρακικού κόλπου όπου η ιική αφθονία ξεπέρασε κατά πολύ τα $\times 10^6$ σωματίδια mL^{-1} , επίσης υποδηλώνοντας την έντονη λύση των κυττάρων σε αυτό το περιβάλλον (Wommack and Colwell 2000).

Επιπλέον, στους σταθμούς όπου υπήρχε έντονη δραστηριότητα υδατοκαλλιεργειών παρατηρήθηκαν 3 έως 45 φορές υψηλότερες αφθονίες όλων των AMGs. Ειδικότερα τα γονίδια *pcyA*, *manA*, *pck*, *aceAB*, *hoI* και *psaK* ήταν πολύ πιο άφθονα, υποδηλώνοντας την μεγάλη οικολογική σημασία της μεταφοράς γονιδίων ανάμεσα σε ιούς και ξενιστές και άρα την απόκτηση νέων φαινοτύπων σε περιβάλλοντα όπου η βιωσιμότητά τους είναι κρίσιμη. Τα AMGs πιθανόν εμπλέκονται στην απόκτηση ανθεκτικότητας σε μέταλλα και αντιβιοτικά σε περιοχές με υδατοκαλλιέργειες, γεγονός που πρέπει να μελετηθεί σε μεγαλύτερο βάθος.

Επίσης, συγκρίνοντας τα διαφορετικά συστήματα του Νότιου Αμβρακικού κόλπου (χαμηλή αλατότητα και θερμοκρασία και ευτροφισμός) και του κόλπου του Ηρακλείου (υψηλή αλατότητα και θερμοκρασία και ολιγοτροφισμός) παρατηρήθηκε πως όλα τα AMGs που καθοδηγούν την σύνθεση dNTPs, λιπαρών οξέων και αμινοξέων μέσω του κύκλου PPP (pentose phosphate pathway) ήταν περισσότερο άφθονα στην πρώτη περίπτωση, ενώ όλα τα AMGs που οδηγούν στην παραγωγή ενέργειας μέσω του κύκλου TCA (tricarboxylic acid

cycle, διάσπαση οργανικής ύλης για παραγωγή ενέργειας) ήταν περισσότερο άφθονα στην δεύτερη περίπτωση (Thompson et al. 2011). Η υψηλή αφθονία του γονιδίου *sdh* φάνηκε να ενισχύει τον κύκλο TCA στο Ηράκλειο (Hurwitz and U'Ren 2016), γεγονός που υπέδειξε την τάση για ετερότροφο μεταβολισμό στις πιο ολιγοτροφικές συνθήκες. Αντιθέτως, όλα τα φωτοσυνθετικά AMGs βρέθηκαν σε εξαιρετικά υψηλά επίπεδα στον Αμβρακικό κόλπο, πιθανόν εκμεταλλευόμενα τα υψηλά επίπεδα θρεπτικών.

Αξίζει να αναφερθεί πως παρότι τα AMGs φανέρωσαν αναμενόμενες ανθρωπογενείς επιβαρύνσεις σε πολλές περιπτώσεις, μερικές φορές η ερμηνεία των αποτελεσμάτων ήταν δύσκολη πιθανόν διότι ο δείκτης πίεσης δεν ήταν πάντα αντιπροσωπευτικός των συνθηκών. Συγκεκριμένα, πολλοί σταθμοί ήταν μέτρια επιβαρυσμένοι, αλλά υπήρχαν ενδείξεις σοβαρότερης επιβάρυνσης από τη σύσταση των AMGs. Για παράδειγμα, στον κόλπο του Ηρακλείου – όπου οι πιέσεις φαίνεται να είναι μέτριες – βρέθηκαν πολλά αντίγραφα του γονιδίου *dsrC* που υποδηλώνει την παραγωγή ενέργειας μέσω του μεταβολισμού του θείου. Το ίδιο αποτέλεσμα βρέθηκε και σε σταθμούς του Αμβρακικού, όπου ήταν περισσότερο αναμενόμενο λόγω της συχνής επικράτησης ανοξικών συνθηκών στον κόλπο, ενώ οξειδωση θείου μέσω *rdsr* παρατηρήθηκε στον Αμβρακικό και την Ηγουμενίτσα (επίσης μέτρια επιβάρυνση). Η έντονη δράση των λυτικών ιών στους κόλπους του Αμβρακικού και Ηρακλείου φάνηκε και από την υψηλή παρουσία *quiescine* που είναι γνωστό πως ενισχύει με γρήγορο ρυθμό την παραγωγή πρωτεϊνών.

Συμπέρασμα 8: Η χρήση του δείκτη πίεσης φάνηκε εν μέρει προβληματική, καθώς αντίστοιχα με τα AMGs, διαφορούμενα αποτελέσματα προέκυψαν και από την ταξινόμηση των λυσιγονικών βακτηρίων. Θερμόφιλα θεϊκά αναγωγικά βακτήρια βρέθηκαν σε μέτρια επιβαρυσμένους σταθμούς, η λυσιγονία μέσω ενσωμάτωσης βρέθηκε υψηλή σε ελαφρώς επιβαρυσμένους σταθμούς, ενώ μόνο η σύσταση των ιών και βακτηρίων διαφοροποιήθηκε με βάση το ενδιαίτημα όπως και στους Barberán and Casamayor (2010), Hurwitz and Sullivan (2013) και Hurwitz et al. (2015).

Οι πρώτες μελέτες της επιστήμης της Ιολογίας ήταν εστιασμένες σε ιούς που προσβάλλουν τον άνθρωπο, ενώ η πρόσφατη επέκταση της γονιδιωματικής ανάλυσης αποκάλυψε πως οι ιοί βρίσκονται σε όλα τα ενδιαίτηματα της Γης, ουσιαστικά «όπου υπάρχει ζωή». Στα υδατικά οικοσυστήματα ο αριθμός των ιών είναι 10-100 φορές μεγαλύτερος από τον αριθμό των υπόλοιπων κυττάρων (Chow and Suttle 2015) και είναι εντυπωσιακό πως η βιομάζα τους αντιστοιχεί στην βιομάζα 75 εκατομμυρίων γαλάζιων φαλαινών (Suttle 2005)! Θα ήταν λοιπόν αδύνατο να εκτιμήσει κανείς τις αποκρίσεις του θαλάσσιου οικοσυστήματος στις πιθανές μελλοντικές περιβαλλοντικές αλλαγές χωρίς να συνυπολογίσει τους ιούς.

Ολοκληρώνοντας την διδακτορική διατριβή είναι φανερό πως οι βακτηριακές και ιικές κοινότητες διαθέτουν ικανότητες προσαρμογής σε περιβαλλοντικές αλλαγές ακόμα και όταν αυτές γίνονται ταχύτατα. Υπό ρεαλιστικές συνθήκες τριών μελλοντικών σεναρίων χημικών αλλαγών του θαλάσσιου περιβάλλοντος (οξίνιση, προσθήκη ΝΣ αργύρου, προσθήκη θρεπτικών στοιχείων μέσω αερολυμάτων), οι ιοί και τα βακτήρια υπέστησαν ήπια διατάραξη και γρήγορη επαναφορά στις αρχικές συνθήκες. Σε όλες τις περιπτώσεις, η λυσιγονία διαταράχτηκε επίσης ήπια και συσχετίστηκε κατά κύριο λόγο με τη σύσταση των θρεπτικών στοιχείων. Ανεξάρτητα από τις ανθρωπογενείς πιέσεις, η λυσιγονία σχετίστηκε αρνητικά με την βακτηριακή παραγωγή (ακόμα και με χρονική υστέρηση) ή δεν σχετίστηκε με καμία μεταβλητή, επιβεβαιώνοντας την πολυπλοκότητα του θαλάσσιου οικοσυστήματος που μεταβάλλεται από στιγμή σε στιγμή χωρίς να είναι πάντα ορατοί οι παράγοντες των μεταβολών αυτών. Η αξία της μετα-γονιδιωματικής προσέγγισης επιβεβαιώθηκε από την πληθώρα αποτελεσμάτων που προέκυψαν· Εντοπίστηκαν σημαντικά βακτηριακά στελέχη που χρησιμεύουν είτε ως βιο-δείκτες επιβάρυνσης είτε ως εργαλεία σε βιο-τεχνολογικές εφαρμογές και τεχνικές εξυγίανσης. Επίσης, η προσέγγιση αυτή αποκάλυψε τις σημαντικότερες μεταβλητές που επηρέασαν την ιική και βακτηριακή μεταβλητότητα, γεγονός που δεν θα ήταν δυνατό με άλλα εργαλεία.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή τόνισε επίσης τη σημασία της συνδυαστικής ερευνητικής σκέψης και δράσης σε σχέση με τις μελλοντικές περιβαλλοντικές πιέσεις, καθώς στη φύση οι αλλαγές συνήθως δεν συμβαίνουν μεμονωμένες. Για παράδειγμα, στο μέλλον, η οξίνιση πιθανόν θα αυξήσει την δέσμευση άνθρακα από αυτότροφους μικροοργανισμούς, ενώ η έντονη θερμική στρωμάτωση και η επακόλουθη έλλειψη θρεπτικών πιθανόν θα οδηγήσει σε μείωση δέσμευσης άνθρακα και άρα σε μειωμένη απόδοση του πελαγικού τροφικού πλέγματος. Η προσθήκη αερολυμάτων και άρα θρεπτικών θα παίζει τότε σπουδαίο ρόλο διεγείροντας τη βακτηριακή παραγωγή, ενώ η χημική ρύπανση θα επηρεάσει βακτηριακά στελέχη είτε αρνητικά είτε θετικά. Οι ιοί παρεμβαίνουν σε αυτές τις διαδικασίες απελευθερώνοντας στο περιβάλλον ενδοκυτταρικό περιεχόμενο με τον λυτικό κύκλο και άρα ευνοούν την βακτηριακή παραγωγή, ενώ μεταβάλλουν περαιτέρω την τελική βακτηριακή απόκριση μέσω της λυσιγονίας και της κρίσιμης μεταφοράς νέων λειτουργιών μέσω AMGs με σχετικά αδιευκρίνιστους τρόπους.

Ίσως το σημαντικότερο εύρημα της παρούσας διατριβής είναι το γεγονός ότι τα ιικά βοηθητικά μεταβολικά γονίδια μπορούν να φωτίσουν διαφορές στα μεταβολικά μονοπάτια που ενισχύουν ανάμεσα σε περιβάλλοντα που φαινομενικά είναι «ίδια». Αυτή η παρατήρηση έχει μοναδική αξία αν σκεφτεί κανείς πως η σύσταση των AMGs είναι η δυναμική ενός συστήματος και για αυτό, δικαιολογημένα θεωρείται πως «αναπρογραμματίζει» τη λειτουργία των ωκεανών (*viral reprogramming of the oceans*). Μπορεί λοιπόν η αφθονία και

σύσταση των ιικών και βακτηριακών κοινοτήτων να μην διαφέρουν ανάμεσα σε επιβαρυμένα συστήματα και μάλιστα να είναι ανθεκτικές στις περιβαλλοντικές πιέσεις, όμως πλέον είναι γνωστό πως η μεταφορά αυτών των γονιδίων «προσθέτει» ή «αφαιρεί» πλεονεκτήματα επιβίωσης και τελικά συντελεί στην εξέλιξη των κοινοτήτων. Γνώση των AMGs σημαίνει γνώση της δυναμικής των κοινοτήτων, ποιοό μονοπάτι φαίνεται να ευνοείται και ποιο υποβαθμίζεται, και συμπερασματικά μπορεί να σημαίνει πρόβλεψη των αντιδράσεων των κοινοτήτων, ένα βήμα πριν αυτές συμβούν. Μέχρι σήμερα είναι κοινώς αποδεκτό πως μια σειρά χημικών, φυσικών και βιολογικών παραγόντων καθορίζουν την ωκεάνια λειτουργία: η θήρευση, τα βιο-διαθέσιμα θρεπτικά στοιχεία, η φυσική διασπορά, η ηλιακή ακτινοβολία, ο χημικός χαρακτήρας του νερού και άλλα, ενώ σε μοριακό επίπεδο οι αλλαγές που γίνονται στη ρύθμιση της μεταγραφής και μετάφρασης των γονιδίων είναι καθοριστικές. Φαίνεται λοιπόν ότι πλέον πρέπει να επανεξεταστεί ο ρόλος των ιικών γονιδίων ως κινητήρια δύναμη του μικροβιακού πλαγκτού, καθώς η έκφραση αυτών των γονιδίων καθορίζει την έκβαση της λειτουργίας του οικοσυστήματος.

Βιβλιογραφία

- Abe, T., H. Inokuchi, Y. Yamada, A. Muto, Y. Iwasaki, and T. Ikemura. 2014. tRNADB-CE: tRNA gene database well-timed in the era of big sequence data. *Front. Genet.* **5**: 1–7. doi:10.3389/fgene.2014.00114
- Allgaier, M., U. Riebesell, M. Vogt, R. Thyrrhaug, and H.-P. Grossart. 2008. Coupling of heterotrophic bacteria to phytoplankton bloom development at different pCO₂ levels : a mesocosm study. *Biogeosciences* **5**: 1007–1022.
- Alonso, M. C., J. Rodriguez, and J. J. Borrego. 2002. Characterization of marine bacteriophages isolated from the Alboran Sea (Western Mediterranean). *J. Plankton Res.* **24**: 1079–1087.
- Alvarez-Fernandez, S., L. T. Bach, J. Taucher, U. Riebesell, U. Sommer, N. Aberle, C. P. D. Brussaard, and M. Boersma. 2018. Plankton responses to ocean acidification: The role of nutrient limitation. *Prog. Oceanogr.* **165**: 11–18. doi:10.1016/j.pocean.2018.04.006
- Alvarez, A., J. M. Saez, J. S. Davila Costa, and others. 2017. Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. *Chemosphere* **166**: 41–62. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.09.070
- Anderson, D., P. Glibert, and J. Burkholder. 2002. Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, compositions, and consequences. *Estuaries* **25**: 704–726. doi:10.1016/j.hal.2008.08.017
- Anderson, M. J., R. N. Gorley, and K. R. Clarke. 2008. PERMANOVA + for PRIMER: Guide to software and statistical methods, PRIMER-E: Plymouth, UK.
- Angly, F. E., B. Felts, M. Breitbart, and others. 2006. The marine viromes of four oceanic regions. *PLoS Biol.* **4**: 2121–2131. doi:10.1371/journal.pbio.0040368
- Apprill, A., S. McNally, R. Parsons, and L. Weber. 2015. Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.* **75**: 129–137. doi:10.3354/ame01753
- Auguet, J. C., H. Montanié, H. J. Hartmann, P. Lebaron, E. O. Casamayor, P. Catala, and D. Delmas. 2009. Potential Effect of Freshwater Virus on the Structure and Activity of Bacterial Communities in the Marennes-Oléron Bay (France). *Microb. Ecol.* **57**: 295–306. doi:10.1007/s00248-008-9428-1
- Bach, L. T., S. Alvarez-Fernandez, T. Hornick, A. Stuhr, and U. Riebesell. 2017. Simulated ocean acidification reveals winners and losers in coastal phytoplankton. *PLoS One* **12**: 1–22. doi:10.1371/journal.pone.0188198
- El Badawy, A. M. E. L., T. P. Luxton, R. G. Silva, K. G. Scheckel, M. T. Suidan, and T. M. Tolaymat. 2010. Impact of Environmental Conditions (pH , Ionic Strength , and Electrolyte Type) on the Surface Charge and Aggregation of Silver Nanoparticles Suspensions. *Environ. Sci. Technol.* **44**: 1260–1266.
- El Badawy, A. M., R. G. Silva, B. Morris, and others. 2011. Surface Charge-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* **45**: 283–287.
- Badger, M. R., T. J. Andrews, S. M. Whitney, M. Ludwig, D. C. Yellowlees, W. Leggat, and G. D. Price. 1998. The diversity and coevolution of Rubisco, plastids, pyrenoids, and chloroplast-based CO₂-concentrating mechanisms in algae. *Can. J. Bot.* **76**: 1052–1071. doi:10.1139/cjb-76-6-1052
- Baker-Austin, C., M. S. Wright, R. Stepanauskas, and J. V. McArthur. 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* **14**: 176–182. doi:10.1016/j.tim.2006.02.006
- Balch, W. M., D. T. Drapeau, and J. J. Fritz. 2000. Monsoonal forcing of calcification in the Arabian Sea. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* **47**: 1301–1337.
- Bald, J., A. Borja, I. Muxika, J. Franco, and V. Valencia. 2005. Assessing reference conditions and physico-chemical status according to the European Water Framework Directive: A case-study from the Basque Country (Northern Spain). *Mar. Pollut. Bull.* **50**: 1508–1522. doi:10.1016/j.marpolbul.2005.06.019
- Baltar, F. 2016. Marine bacterial community structure resilience to changes in protist predation under phytoplankton bloom conditions. doi:10.1038/ismej.2015.135
- Baptista, M. S., R. J. Miller, E. R. Halewood, S. K. Hanna, C. M. R. Almeida, V. M. Vasconcelos, A. A. Keller, and H. S. Lenihan. 2015. Impacts of silver nanoparticles on a natural estuarine plankton community. *Environ. Sci. Process Impacts* **49**: 12968–12974. doi:10.1021/acs.est.5b03285

- Barberán, A., and E. O. Casamayor. 2010. Global phylogenetic community structure and β -diversity patterns in surface bacterioplankton metacommunities. *Aquat. Microb. Ecol.* **59**: 1–10. doi:10.3354/ame01389
- Beardall, J., D. Allen, J. Bragg, and others. 2009. Allometry and stoichiometry of unicellular, colonial and multicellular phytoplankton. *New Phytol.* **181**: 295–309. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02660.x
- Bellas, C. M., A. M. Anesio, and G. Barker. 2015. Analysis of virus genomes from glacial environments reveals novel virus groups with unusual host interactions. *Front. Microbiol.* **6**: 1–14. doi:10.3389/fmicb.2015.00656
- Bench, S. R., T. E. Hanson, K. E. Williamson, D. Ghosh, M. Radosovich, K. Wang, and K. E. Wommack. 2007. Metagenomic characterization of Chesapeake Bay viroplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 7629–7641. doi:10.1128/AEM.00938-07
- Bettarel, Y., R. Arfi, T. Bouvier, M. Bouvy, E. Briand, J. Colombet, D. Corbin, and T. Sime-Ngando. 2008. Viroplankton distribution and activity in a tropical eutrophicated bay. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **80**: 425–429. doi:10.1016/j.ecss.2008.08.018
- Bettarel, Y., J. R. Dolan, R. Lemée, M. Masin, M. Pedrotti, E. Rochelle-newall, K. Simek, and T. Sime-ngando. 2002. Strong , weak , and missing links in a microbial community of. *FEMS Microbiol. Ecol.* **42**: 451–462.
- Bielmyer-Fraser, G. K., T. A. Jarvis, H. S. Lenihan, and R. J. Miller. 2014. Cellular Partitioning of Nanoparticulate versus Dissolved Metals in Marine Phytoplankton. *Environ. Sci. Technol.* **48**: 11443–13450.
- Blaser, S. A., M. Scheringer, M. Macleod, and K. Hungerbühler. 2008. Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver : Contribution of nano-functionalized plastics and textiles. *Sci. Total Environ.* **390**: 396–409. doi:10.1016/j.scitotenv.2007.10.010
- Boenigk, J., D. Beisser, S. Zimmermann, and others. 2014. Effects of Silver Nitrate and Silver Nanoparticles on a Planktonic Community : General Trends after Short-Term Exposure. *PLoS One* **9**: 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0095340
- Bolduc, B., K. Youens-Clark, S. Roux, B. L. Hurwitz, and M. B. Sullivan. 2017. iVirus: Facilitating new insights in viral ecology with software and community data sets imbedded in a cyberinfrastructure. *ISME J.* **11**: 7–14. doi:10.1038/ismej.2016.89
- Bone, A. J., B. P. Colman, A. P. Gondikas, and others. 2012. Biotic and Abiotic Interactions in Aquatic Microcosms Determine Fate and Toxicity of Ag Nanoparticles: Part 2 – Toxicity and Ag Speciation. *Environ. Sci. Technol.* **46**: 6925–6933.
- Bongiorni, L., M. Magagnini, M. Armeni, R. Noble, and R. Danovaro. 2005. Viral Production , Decay Rates , and Life Strategies along a Trophic Gradient in the North Adriatic Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 6644–6650. doi:10.1128/AEM.71.11.6644
- Bonilla-Findji, O., G. J. Herndl, J. P. Gattuso, and M. G. Weinbauer. 2009. Viral and flagellate control of prokaryotic production and community structure in offshore Mediterranean waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 4801–12. doi:10.1128/AEM.01376-08
- Bonilla-Findji, O., A. Malits, D. Lefèvre, E. Rochelle-Newall, R. Lemée, M. G. Weinbauer, and J.-P. Gattuso. 2008. Viral effects on bacterial respiration, production and growth efficiency: Consistent trends in the Southern Ocean and the Mediterranean Sea. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* **55**: 790–800. doi:10.1016/j.dsr2.2007.12.004
- Bonnet, S., J. Chiaverini, J. Ras, and A. Stock. 2005. Effect of atmospheric nutrients on the autotrophic communities in a low nutrient , low chlorophyll system. *Limnol. Oceanogr.* **50**: 1810–1819.
- Boras, J. a., M. M. Sala, E. Vázquez-Domínguez, M. G. Weinbauer, and D. Vaqué. 2009. Annual changes of bacterial mortality due to viruses and protists in an oligotrophic coastal environment (NW Mediterranean). *Environ. Microbiol.* **11**: 1181–1193. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01849.x
- Borja, A., J. Bald, J. Franco, and others. 2009. Using multiple ecosystem components, in assessing ecological status in Spanish (Basque Country) Atlantic marine waters. *Mar. Pollut. Bull.* **59**: 54–64. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.11.010
- Borja, A., E. Barbone, A. Basset, and others. 2011a. Response of single benthic metrics and multi-metric methods to anthropogenic pressure gradients, in five distinct European coastal and transitional ecosystems. *Mar. Pollut. Bull.* **62**: 499–513. doi:10.1016/j.marpolbul.2010.12.009

- Borja, Á., I. Galparsoro, X. Irigoien, and others. 2011b. Implementation of the European Marine Strategy Framework Directive: A methodological approach for the assessment of environmental status, from the Basque Country (Bay of Biscay). *Mar. Pollut. Bull.* **62**: 889–904. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.03.031
- Bourdin, G., F. Gazeau, M. E. Kerros, S. Marro, and M. L. Pedrotti. 2017. Dynamics of transparent exopolymeric particles and their precursors during a mesocosm experiment: Impact of ocean acidification. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **186**: 112–124. doi:10.1016/j.ecss.2016.02.007
- Bragg, J. G., and S. W. Chisholm. 2008. Modeling the fitness consequences of a cyanophage-encoded photosynthesis gene. *PLoS One* **3**: 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0003550
- Breitbart, M. 2012. Marine Viruses: Truth or Dare. *Ann. Rev. Mar. Sci.* **4**: 425–448. doi:10.1146/annurev-marine-120709-142805
- Brown, M. V., F. M. Lauro, M. Z. Demaere, and others. 2012. Global biogeography of SAR11 marine bacteria. *Mol. Syst. Biol.* **8**: 1–13. doi:10.1038/msb.2012.28
- Brum, J. R., B. L. Hurwitz, O. Schofield, H. W. Ducklow, and M. B. Sullivan. 2015. Seasonal time bombs: dominant temperate viruses affect Southern Ocean microbial dynamics. *ISME J.* 1–13. doi:10.1038/ismej.2015.125
- Brum, J. R., B. L. Hurwitz, O. Schofield, H. W. Ducklow, and M. B. Sullivan. 2016. Seasonal time bombs: Dominant temperate viruses affect Southern Ocean microbial dynamics. *ISME J.* **10**: 437–449. doi:10.1038/ismej.2015.125
- Brum, J. R., and M. B. Sullivan. 2015. Rising to the challenge : accelerated pace of discovery transforms marine virology. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**: 147–159. doi:10.1038/nrmicro3404
- Brussaard, C. P. D., a. a. M. Noordeloos, H. Witte, M. C. J. Collenteur, K. Schulz, a. Ludwig, and U. Riebesell. 2013. Arctic microbial community dynamics influenced by elevated CO₂ levels. *Biogeosciences* **10**: 719–731. doi:10.5194/bg-10-719-2013
- Brussaard, C. P. D., K. R. Timmermans, J. Uitz, and M. J. W. Veldhuis. 2008. Virioplankton dynamics and virally induced phytoplankton lysis versus microzooplankton grazing southeast of the Kerguelen (Southern Ocean). *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* **55**: 752–765. doi:10.1016/j.dsr2.2007.12.034
- Buchfink, B., C. Xie, and D. H. Huson. 2014. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat. Methods* **12**: 59–60. doi:10.1038/nmeth.3176
- Bunse, C., D. Lundin, C. M. G. Karlsson, and others. 2016. Response of marine bacterioplankton pH homeostasis gene expression to elevated CO₂. *Nat. Clim. Chang.* **6**: 483–487. doi:10.1038/nclimate2914
- Burchardt, A. D., R. N. Carvalho, A. Valente, and others. 2012. Effects of Silver Nanoparticles in Diatom *Thalassiosira pseudonana* and Cyanobacterium *Synechococcus* sp. *Environ. Sci. Technol.* **46**: 11336–11344.
- Byappanahalli, M. N., M. B. Nevers, A. Korajkic, Z. R. Staley, and V. J. Harwood. 2012. Enterococci in the Environment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**: 685–706. doi:10.1128/MMBR.00023-12
- Carbo, P., M. D. Krom, W. B. Homoky, L. G. Benning, and B. Herut. 2005. Impact of atmospheric deposition on N and P geochemistry in the southeastern Levantine basin. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* **52**: 3041–3053. doi:10.1016/j.dsr2.2005.08.014
- Carpenter, J. H. 1965. James II. Carpenter. *Limnol. Oceanogr.* **10**: 135–140.
- Carreira, C., M. Heldal, and G. Bratbak. 2013. Effect of increased pCO₂ on phytoplankton-virus interactions. *Biogeochemistry* **114**: 391–397. doi:10.1007/s10533-011-9692-x
- Castelle, C. J., C. T. Brown, B. C. Thomas, K. H. Williams, and J. F. Banfield. 2017. Unusual respiratory capacity and nitrogen metabolism in a Parcubacterium (OD1) of the Candidate Phyla Radiation. *Sci. Rep.* **7**: 1–12. doi:10.1038/srep40101
- Cauwet, G. 1994. HTO method for dissolved organic carbon analysis in seawater: influence of catalyst on blank estimation. *Mar. Chem.* **47**: 55–64. doi:10.1016/0304-4203(94)90013-2
- Celussi, M., F. Malfatti, F. Annalisa, F. Gazeau, A. Giannakourou, P. Pitta, A. Tsiola, and P. Del Negro. 2017. Ocean acidification effect on prokaryotic metabolism tested in two diverse trophic regimes in the Mediterranean Sea. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **186**. doi:10.1016/j.ecss.2015.08.015

- Di Cesare, A., E. M. Eckert, S. D'Urso, R. Bertoni, D. C. Gillan, R. Wattiez, and G. Corno. 2016. Co-occurrence of integrase 1, antibiotic and heavy metal resistance genes in municipal wastewater treatment plants. *Water Res.* **94**: 208–214. doi:10.1016/j.watres.2016.02.049
- Choi, O., and Z. Hu. 2008. Size Dependent and Reactive Oxygen Species Related Nanosilver Toxicity to Nitrifying Bacteria. *Environ. Sci. Technol.* **42**: 4583–4588.
- Chow, C.-E. T., and C. A. Suttle. 2015. Biogeography of Viruses in the Sea. *Annu. Rev. Virol.* **2**: 41–66. doi:10.1146/annurev-virology-031413-085540
- Christodoulaki, S., G. Petihakis, M. Kanakidou, N. Mihalopoulos, K. Tsiaras, and G. Triantafyllou. 2013. Atmospheric deposition in the Eastern Mediterranean. A driving force for ecosystem dynamics. *J. Mar. Syst.* **109–110**: 78–93. doi:10.1016/j.jmarsys.2012.07.007
- Ciais, P., A. J. Dolman, A. Bombelli, and others. 2014a. Current systematic carbon-cycle observations and the need for implementing a policy-relevant carbon observing system. *Biogeosciences* **11**: 3547–3602. doi:10.5194/bg-11-3547-2014
- Ciais, P., C. Sabine, and G. Bala. 2014b. Carbon and other biogeochemical cycles. *Glob. Clim. Chang.* 2014 465–469. doi:10.1017/CBO9781107415324.015
- Clarke, K. R., and M. Ainsworth. 1993. A method of linking multivariate community structure to environmental variable. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **92**: 205–219. doi:10.3354/meps092205
- Clarke, K. R., and R. M. Warwick. 1994. Clarke and Warwick 1994.
- Cochran, P. K., and J. H. Paul. 1998. Seasonal abundance of lysogenic bacteria in a subtropical estuary. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2308–2312.
- Corzo, A., S. Rodriguez-Galvez, L. Lubian, C. Sobrino, P. Sangra, and A. Martinez. 2005. Antarctic marine bacterioplankton subpopulations discriminated by their apparent content of nucleic acids differ in their response to ecological factors. *Polar Biol.* **29**: 27–39. doi:10.1007/s00300-005-0032-2
- Crain, C. M., K. Kroeker, and B. S. Halpern. 2008. Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecol. Lett.* **11**: 1304–1315. doi:10.1111/j.1461-0248.2008.01253.x
- Cram, J. A., L. C. Xia, D. M. Needham, R. Sachdeva, F. Sun, and J. A. Fuhrman. 2015. Cross-depth analysis of marine bacterial networks suggests downward propagation of temporal changes. *ISME J.* **9**: 2573–2586. doi:10.1038/ismej.2015.76
- Cubash, U., D. Wuebbles, D. Chen, M. Facchini, D. Frame, N. Mahowald, and J.-G. Winther. 2013. Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change., *In* Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Currie, A. R., K. Tait, H. Parry, B. de Francisco-Mora, N. Hicks, A. Mark Osborn, S. Widdicombe, and H. Stahl. 2017. Marine microbial gene abundance and community composition in response to ocean acidification and elevated temperature in two contrasting coastal marine sediments. *Front. Microbiol.* **8**: 1–17. doi:10.3389/fmicb.2017.01599
- Danovaro, R., C. Corinaldesi, A. Dell'Anno, J. a. Fuhrman, J. J. Middelburg, R. T. Noble, and C. a. Suttle. 2011. Marine viruses and global climate change. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**: 993–1034. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00258.x
- Das, P., C. D. Metcalfe, and M. A. Xenopoulos. 2014. Interactive Effects of Silver Nanoparticles and Phosphorus on Phytoplankton Growth in Natural Waters. *Environ. Sci. Process Impacts* **48**: 4573–4580.
- Das, P. R. D., M. A. A. X. Xenopoulos, C. L. J. W. Williams, M. D. E. H. H. Hoque, and C. H. D. M. Metcalfe. 2012a. Effects of silver nanoparticles on bacterial activity in natural waters. *Nanomater. Environ.* **31**: 122–130. doi:10.1002/etc.716
- Das, P., C. J. Williams, R. R. Fulthorpe, E. Hoque, C. D. Metcalfe, and M. A. Xenopoulos. 2012b. Changes in Bacterial Community Structure after Exposure to Silver Nanoparticles in Natural Waters. *Environ. Sci. Technol.* **46**: 9120–9128.
- Delong, E. F. 2007. Modern microbial seascapes. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 755–757. doi:10.1038/nrmicro1762
- DeLong, E. F., and D. M. Karl. 2005. Genomic perspectives in microbial oceanography. *Nature* **437**: 336–342.

doi:10.1038/nature04157

- Deng, Y.-T., Y.-L. Wu, A.-P. Tan, and others. 2014. Analysis of Antimicrobial Resistance Genes in *Aeromonas* spp. Isolated from Cultured Freshwater Animals in China. *Microb. Drug Resist.* **20**: 350–356. doi:10.1089/mdr.2013.0068
- Diaz, R. J., and R. Rosenberg. 2008. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science* (80-.). **321**: 926–929. doi:10.1126/science.1156401
- Dickinson, A., C. Sabine, and J. Christina. 2007. Guide to Best Practices for Ocean CO₂ Measurements,.
- Dimkpa, C. O., A. Calder, P. Gajjar, and others. 2011. Interaction of silver nanoparticles with an environmentally beneficial bacterium, *Pseudomonas chlororaphis*. *J. Hazard. Mater.* **188**: 428–435. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.01.118
- Ding, C., and J. He. 2010. Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**: 925–941. doi:10.1007/s00253-010-2649-5
- Dinsdale, E. a, R. a Edwards, D. Hall, and others. 2008. Functional metagenomic profiling of nine biomes. *Nature* **452**: 629–632. doi:10.1038/nature07346
- Doiron, K., E. Pelletier, and K. Lemarchand. 2012. Impact of polymer-coated silver nanoparticles on marine microbial communities : A microcosm study. *Aquat. Toxicol.* **125**: 22–27.
- Durai, P., M. Batool, and S. Choi. 2015. Structure and Effects of Cyanobacterial Lipopolysaccharides. *Mar. Drugs* **13**: 4217–4230. doi:10.3390/md13074217
- Durán, N., M. Durán, M. B. De Jesus, A. B. Seabra, W. J. Fávaro, and G. Nakazato. 2016. Silver nanoparticles : A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **12**: 789–799. doi:10.1016/j.nano.2015.11.016
- Dutkiewicz, S., J. J. Morris, M. J. Follows, J. Scott, O. Levitan, S. T. Dyhrman, and I. Berman-Frank. 2015. Impact of ocean acidification on the structure of future phytoplankton communities. *Nat. Clim. Chang.* **5**: 1002–1006. doi:10.1038/nclimate2722
- Eduok, S., R. Ferguson, B. Jefferson, R. Villa, and F. Coulon. 2017. Aged-engineered nanoparticles effect on sludge anaerobic digestion performance and associated microbial communities. *Sci. Total Environ.* **609**: 232–241. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.07.178
- Eggers, S. L., A. M. Lewandowska, J. Barcelos e Ramos, S. Blanco-Ameijeiras, F. Gallo, and B. Matthiessen. 2014. Community composition has greater impact on the functioning of marine phytoplankton communities than ocean acidification. *Glob. Chang. Biol.* **20**: 713–723. doi:10.1111/gcb.12421
- Emmerling, M., M. Dauner, A. Ponti, and others. 2002. Metabolic Flux Responses to Pyruvate Kinase Knockout in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**: 152–164. doi:10.1128/JB.184.1.152
- Endres, S., L. Galgani, U. Riebesell, K. G. Schulz, and A. Engel. 2014. Stimulated bacterial growth under elevated pCO₂: Results from an off-shore mesocosm study. *PLoS One* **9**: 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0099228
- Engel, A. 2002. Direct relationship between CO₂ uptake and transparent exopolymer particles production in natural phytoplankton. *J. Plankton Res.* **24**: 49–53.
- Engel, A., N. Händel, J. Wohlers, M. Lunau, H. P. Grossart, U. Sommer, and U. Riebesell. 2011. Effects of sea surface warming on the production and composition of dissolved organic matter during phytoplankton blooms: Results from a mesocosm study. *J. Plankton Res.* **33**: 357–372. doi:10.1093/plankt/fbq122
- Engel, A., J. Piontek, H.-P. Grossart, U. Riebesell, K. G. Schulz, and M. Sperling. 2014. Impact of CO₂ enrichment on organic matter dynamics during nutrient induced coastal phytoplankton blooms. *J. Plankton Res.* **36**: 641–657. doi:10.1093/plankt/fbt125
- Evans, C., and C. P. D. Brussaard. 2012. Viral lysis and microzooplankton grazing of phytoplankton throughout the Southern Ocean. *Limnol. Oceanogr.* **57**: 1826–1837. doi:10.4319/lo.2012.57.6.1826
- Fabrega, J., S. N. Luoma, C. R. Tyler, T. S. Galloway, and J. R. Lead. 2011. Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. *Environ. Int.* **37**: 517–531. doi:10.1016/j.envint.2010.10.012

- Falcón, L. I., A. M. Noguez, L. Espinosa-Asuar, L. E. Eguiarte, and V. Souza. 2008. Evidence of biogeography in surface ocean bacterioplankton assemblages. *Mar. Genomics* **1**: 55–61. doi:10.1016/j.margen.2008.06.005
- Falkowski, P. G., T. Fenchel, and E. F. Delong. 2008. The microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles. *Science* (80-.). **320**: 1034–1039. doi:10.1126/science.1153213
- Fazi, S., E. Vázquez, E. O. Casamayor, S. Amalfitano, and A. Butturini. 2013. Stream Hydrological Fragmentation Drives Bacterioplankton Community Composition. *PLoS One* **8**. doi:10.1371/journal.pone.0064109
- Feng, Y., C. E. Hare, K. Leblanc, and others. 2009. Effects of increased pCO₂ and temperature on the north atlantic spring bloom. I. The phytoplankton community and biogeochemical response. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **388**: 13–25. doi:10.3354/meps08133
- Ferentinos, G., G. Papatheodorou, M. Geraga, M. Iatrou, E. Fakiris, D. Christodoulou, E. Dimitriou, and C. Koutsikopoulos. 2010. Fjord water circulation patterns and dysoxic/anoxic conditions in a Mediterranean semi-enclosed embayment in the Amvrakikos Gulf, Greece. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **88**: 473–481. doi:10.1016/j.ecss.2010.05.006
- Field, C. B., M. J. Behrenfeld, J. T. Randerson, and P. G. Falkowski. 1998. Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science* (80-.). **281**: 237–240. doi:10.1126/science.281.5374.237
- Flores, C. Y., A. G. Min, C. a. Grillo, and others. 2013. Citrate-capped silver nanoparticles showing good bactericidal effect against both planktonic and sessile bacteria and a low cytotoxicity to osteoblastic cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **5**: 3149–3159. doi:10.1021/am400044e
- Flynn, K. J., J. C. Blackford, M. E. Baird, and others. 2012. Erratum: Changes in pH at the exterior surface of plankton with ocean acidification (*Nature Climate Change* (2012) 2 (510-513)). *Nat. Clim. Chang.* **2**: 760. doi:10.1038/nclimate1696
- Fonti, V., F. Beolchini, L. Rocchetti, and A. Dell'Anno. 2015. Bioremediation of contaminated marine sediments can enhance metal mobility due to changes of bacterial diversity. *Water Res.* **68**: 637–650. doi:10.1016/j.watres.2014.10.035
- Fortunato, C. S., L. Herfort, P. Zuber, A. M. Baptista, and B. C. Crump. 2012. Spatial variability overwhelms seasonal patterns in bacterioplankton communities across a river to ocean gradient. *ISME J.* **6**: 554–563. doi:10.1038/ismej.2011.135
- Frank, A. H., J. A. L. Garcia, G. J. Herndl, and T. Reinthaler. 2016. Connectivity between surface and deep waters determines prokaryotic diversity in the North Atlantic Deep Water. *Environ. Microbiol.* **18**: 2052–2063. doi:10.1111/1462-2920.13237
- Fu, F.-X., M. E. Warner, Y. Zhang, Y. Feng, and D. A. Hutchins. 2007. Effects of increased temperature and CO₂ on photosynthesis, growth and elemental ratios in marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* (Cyanobacteria). *J. Phycol.* **43**: 485–496. doi:10.1111/j.1529-8817.2007.00355.x
- Fuhrman, J. A. 1999. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* **399**: 541–548.
- Galand, P. E., I. Salter, and D. Kalenitchenko. 2015. Ecosystem productivity is associated with bacterial phylogenetic distance in surface marine waters. *Mol. Ecol.* **24**: 5785–5795. doi:10.1111/mec.13347
- Gallissai, R., F. Peters, G. Volpe, S. Basart, and J. M. Baldasano. 2014. Saharan dust deposition may affect phytoplankton growth in the mediterranean sea at ecological time scales. *PLoS One* **9**. doi:10.1371/journal.pone.0110762
- Galloway, A. J. N., F. J. Dentener, D. G. Capone, and others. 2004. Nitrogen Cycles : Past, present, and future. *Biogeochemistry* **70**: 153–226. doi:10.1007/s10533-004-0370-0
- García, C. P., A. D. Burchardt, R. N. Carvalho, D. Gilliland, D. C. António, F. Rossi, and T. Lettieri. 2014. Detection of silver nanoparticles inside marine diatom *Thalassiosira pseudonana* by electron microscopy and focused ion beam. *PLoS One* **9**: e96078. doi:10.1371/journal.pone.0096078
- Gattuso, J. P., A. Magnan, R. Billé, and others. 2015. Contrasting futures for ocean and society from different anthropogenic CO₂ emissions scenarios. *Science* (80-.). **349**. doi:10.1126/science.aac4722
- Gazeau, F., A. Sallon, L. Maugendre, and others. 2017a. First mesocosm experiments to study the impacts of ocean acidification on plankton communities in the NW Mediterranean Sea (MedSeA project). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **186**: 11–29. doi:10.1016/j.ecss.2016.05.014

- Gazeau, F., A. Sallon, P. Pitta, and others. 2017b. Limited impact of ocean acidification on phytoplankton community structure and carbon export in an oligotrophic environment: Results from two short-term mesocosm studies in the Mediterranean Sea. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **186**: 72–88. doi:10.1016/j.ecss.2016.11.016
- Gifford, S. M., S. Sharma, M. Booth, and M. A. Moran. 2013. Expression patterns reveal niche diversification in a marine microbial assemblage. *ISME J.* **7**: 281–298. doi:10.1038/ismej.2012.96
- Ginoux, P., J. M. Prospero, T. E. Gill, N. C. Hsu, and M. Zhao. 2012. Global-scale attribution of anthropogenic and natural dust sources and their emission rates based on MODIS Deep Blue aerosol products. *Rev. Geophys.* **50**: 1–36. doi:10.1029/2012RG000388
- del Giorgio, P. a., and T. C. Bouvier. 2002. Linking the physiologic and phylogenetic successions in free-living bacterial communities along an estuarine salinity gradient. *Limnol. Oceanogr.* **47**: 471–486. doi:10.4319/lo.2002.47.2.0471
- del Giorgio, P. A., J. M. Gasol, D. Vaqub, P. Mura, S. Agustl, and C. M. Duarte. 1996. Bacterioplankton community structure : Protists control net production and the proportion of active bacteria in a coastal marine community. *Limnol. Oceanogr.* **41**: 1169–1179.
- Goff, S. A., M. Vaughn, S. McKay, and others. 2011. The iPlant Collaborative: Cyberinfrastructure for Plant Biology. *Front. Plant Sci.* **2**: 1–16. doi:10.3389/fpls.2011.00034
- Golebiewski, M., E. Deja-Sikora, M. Cichosz, A. Tretyn, and B. Wróbel. 2014. 16S rDNA Pyrosequencing Analysis of Bacterial Community in Heavy Metals Polluted Soils. *Microb. Ecol.* **67**: 635–647. doi:10.1007/s00248-013-0344-7
- Gómez-Consarnau, L., M. V. Lindh, J. M. Gasol, and J. Pinhassi. 2012. Structuring of bacterioplankton communities by specific dissolved organic carbon compounds. *Environ. Microbiol.* **14**: 2361–2378. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02804.x
- González, A. G., L. Fernández-Rojo, J. Leflaive, O. S. Pokrovsky, and J. L. Rols. 2016. Response of three biofilm-forming benthic microorganisms to Ag nanoparticles and Ag+: the diatom *Nitzschia palea*, the green alga *Uronema confervicolum* and the cyanobacteria *Leptolyngbya* sp. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23**: 22136–22150. doi:10.1007/s11356-016-7259-z
- Gottschalk, F., T. Sonderer, R. W. Scholz, and B. Nowack. 2009. Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions. *Environ. Sci. Technol.* **43**: 9216–9222.
- Grégori, G., S. Citterio, A. Ghiani, M. Labra, S. Sgorbati, S. Brown, and M. Denis. 2001. Resolution of Viable and Membrane-Compromised Bacteria in Freshwater and Marine Waters Based on Analytical Flow Cytometry and Nucleic Acid Double Staining. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4662–4670. doi:10.1128/AEM.67.10.4662-4670.2001
- Grossart, H. P., M. Allgaier, U. Passow, and U. Riebesell. 2006. Testing the effect of CO₂ concentration on the dynamics of marine heterotrophic bacterioplankton. *Limnol. Oceanogr.* **51**: 1–11. doi:10.4319/lo.2006.51.1.0001
- Guerzoni, S., R. Chester, F. Dulac, and others. 1999. The role of atmospheric deposition in the biochemistry of the Mediterranean Sea. *Prog. Oceanogr.* **44**: 147–190.
- Guieu, C., F. Dulac, C. Ridame, and P. Pondaven. 2014a. Introduction to project DUNE, a DUST experiment in a low nutrient, low chlorophyll ecosystem. *Biogeosciences* **11**: 425–442. doi:10.5194/bg-11-425-2014
- Guieu, C., M. D. Loÿe-Pilot, C. Ridame, and C. Thomas. 2002. Chemical characterization of the Saharan dust end-member: Some biogeochemical implications for the western Mediterranean Sea. *J. Geophys. Res. Atmos.* **107**. doi:10.1029/2001JD000582
- Guieu, C., C. Ridame, E. Pulido-Villena, M. Bressac, K. Desboeufs, and F. Dulac. 2014b. Impact of dust deposition on carbon budget : a tentative assessment from a mesocosm approach. *Biogeosciences* **11**: 5621–5635. doi:10.5194/bg-11-5621-2014
- Gunawan, C., C. P. Marquis, R. Amal, G. A. Sotiriou, S. A. Rice, and E. J. Harry. 2017. Widespread and Indiscriminate Nanosilver Use: Genuine Potential for Microbial Resistance. *ACS Nano* **11**: 3438–3445. doi:10.1021/acsnano.7b01166
- Guo, C., X. Xia, P. Pitta, and others. 2016a. Shifts in Microbial Community Structure and Activity in the Ultra-Oligotrophic Eastern Mediterranean Sea Driven by the Deposition of Saharan Dust and European Aerosols. *Front. Mar. Sci.* **3**: 1–13. doi:10.3389/fmars.2016.00170

- Guo, H., B. Xing, and L. He. 2016b. Development of a filter-based method for detecting silver nanoparticles and their heteroaggregation in aqueous environments by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Environ. Pollut.* **211**: 198–205. doi:10.1016/j.envpol.2015.12.049
- Halpern, B. S., M. Frazier, J. Potapenko, and others. 2015. Spatial and temporal changes in cumulative human impacts on the world's ocean. *Nat. Commun.* **6**: 1–7. doi:10.1038/ncomms8615
- Halpern, B. S., S. Walbridge, K. A. Selkoe, and others. 2008. A Global Map of Human Impact on marine ecosystems. *Science* (80-.). **319**: 948–953. doi:10.1126/science.1149345
- Hartmann, M., P. G. Hill, E. Tynan, E. P. Achterberg, R. J. G. Leakey, and M. V. Zubkov. 2016. Resilience of SAR11 bacteria to rapid acidification in the high-latitude open ocean. *FEMS Microbiol. Ecol.* **92**: 1–10. doi:10.1093/femsec/fiv161
- Hedges, J. I., and J. H. Stern. 1984. Carbon and nitrogen determinations of carbonate-containing solids. *Limnol. Oceanogr.* **29**: 657–663. doi:10.4319/lo.1984.29.3.0657
- Herlemann, D. P. R., J. Woelk, M. Labrenz, and K. Jürgens. 2014. Diversity and abundance of “Pelagibacterales” (SAR11) in the Baltic Sea salinity gradient. *Syst. Appl. Microbiol.* **37**: 601–604. doi:10.1016/j.syapm.2014.09.002
- Herut, B., E. Rahav, T. M. Tsagaraki, and others. 2016. The potential impact of Saharan dust and polluted aerosols on microbial populations in the East Mediterranean Sea, an overview of a mesocosm experimental approach. *Front. Mar. Sci.* **3**. doi:10.3389/fmars.2016.00226
- Herut, B., T. Zohary, M. D. Krom, and R. F. C. Mantoura. 2005. Response of East Mediterranean surface water to Saharan dust : On-board microcosm experiment and field observations. *Deep Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* **52**: 3024–3040. doi:10.1016/j.dsr2.2005.09.003
- Hoiczky, E., and A. Hansel. 2000. Cyanobacterial Cell Walls : News from an Unusual Prokaryotic Envelope. *J. Bacteriol.* **182**: 1191–1199.
- Holm-Hansen, O., C. Lorenzen, R. Holmes, and J. Strickland. 1965. Fluorometric determination of chlorophyll. *CIES J Mar Sci* **30**: 3–15.
- Holmer, M., M. Argyrou, T. Dalsgaard, and others. 2008. Effects of fish farm waste on *Posidonia oceanica* meadows: Synthesis and provision of monitoring and management tools. *Mar. Pollut. Bull.* **56**: 1618–1629. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.05.020
- Howard-Varona, C., K. R. Hargreaves, S. T. Abedon, and M. B. Sullivan. 2017. Lysogeny in nature: Mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *ISME J.* **11**: 1511–1520. doi:10.1038/ismej.2017.16
- Huang, J., J. Cheng, and J. Yi. 2016. Impact of silver nanoparticles on marine diatom *Skeletonema costatum*. *J. Appl. Toxicol.* **36**: 1343–1354. doi:10.1002/jat.3325
- Huang, Y., L. Zhang, L. Tiu, and H. H. Wang. 2015. Characterization of antibiotic resistance in commensal bacteria from an aquaculture ecosystem. *Front. Microbiol.* **6**: 914. doi:10.3389/fmicb.2015.00914
- Hurwitz, B. L., J. R. Brum, and M. B. Sullivan. 2015. Depth-stratified functional and taxonomic niche specialization in the “core” and “flexible” Pacific Ocean Virome. *ISME J.* **9**: 472–484. doi:10.1038/ismej.2014.143
- Hurwitz, B. L., L. Deng, B. T. Poulos, and M. B. Sullivan. 2013a. Evaluation of methods to concentrate and purify ocean virus communities through comparative, replicated metagenomics. *Environ. Microbiol.* **15**: 1428–1440. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02836.x
- Hurwitz, B. L., S. J. Hallam, and M. B. Sullivan. 2013b. Metabolic reprogramming by viruses in the sunlit and dark ocean. *Genome Biol.* **14**: R123. doi:10.1186/gb-2013-14-11-r123
- Hurwitz, B. L., and M. B. Sullivan. 2013. The Pacific Ocean Virome (POV): A Marine Viral Metagenomic Dataset and Associated Protein Clusters for Quantitative Viral Ecology. *PLoS One* **8**. doi:10.1371/journal.pone.0057355
- Hurwitz, B. L., and J. M. U'Ren. 2016. Viral metabolic reprogramming in marine ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **31**: 161–168. doi:10.1016/j.mib.2016.04.002
- Hutchins, D. A., and F. Fu. 2017. Microorganisms and ocean global change. *Nat. Microbiol.* **2**: 1–11. doi:10.1038/nmicrobiol.2017.58

- Hutchins, D., M. Mulholland, and F. Fu. 2009. Nutrient cycles and marine microbes in a CO₂-enriched ocean. *Oceanography* **22**: 128–145. doi:10.1073/pnas.1016106108
- Ivancic, I., and D. Degobbi. 1984. An optimal manual procedure for ammonia analysis in natural waters by the indophenol blue method. *Water Res.* **18**: 1143–1147. doi:10.1016/0043-1354(84)90230-6
- Ivask, A., I. Kurvet, K. Kasemets, and others. 2014. Size-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles to Bacteria, Yeast, Algae, Crustaceans and Mammalian Cells In Vitro. *PLoS One* **9**: 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0102108
- Jeong, H. J., K. A. Seong, Y. Yoo, and others. 2008. Feeding and Grazing Impact by Small Marine Heterotrophic Dinoflagellates on Heterotrophic Bacteria. *J. Eukaryot. Microbiol.* **55**: 271–288. doi:10.1111/j.1550-7408.2008.00336.x
- Jiang, S. C., and J. H. Paul. 1996. Occurrence of Lysogenic Bacteria in Marine Microbial Communities as Determined by Prophage Induction Occurrence of lysogenic bacteria in marine microbial communities as determined by prophage induction. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **142**: 27–38.
- Jiang, W., and W. Fan. 2008. Bioremediation of heavy metal-contaminated soils by sulfate-reducing bacteria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1140**: 446–454. doi:10.1196/annals.1454.050
- John, S. G., C. B. Mendez, L. Deng, and others. 2011a. Iron Chloride Precipitation of Viruses From Seawater. *Most* **3**: 4–7. doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00208.x.Purpose
- John, S. G., C. B. Mendez, L. Deng, and others. 2011b. A simple and efficient method for concentration of ocean viruses by chemical flocculation. *Environ. Microbiol. Rep.* **3**: 195–202. doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00208.x
- Joshi, N., B. T. Ngwenya, and C. E. French. 2012. Enhanced resistance to nanoparticle toxicity is conferred by overproduction of extracellular polymeric substances. *J. Hazard. Mater.* **241–242**: 363–370. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.09.057
- Kalantzi, I., and I. Karakassis. 2006. Benthic impacts of fish farming: Meta-analysis of community and geochemical data. *Mar. Pollut. Bull.* **52**: 484–493. doi:10.1016/j.marpolbul.2005.09.034
- Kalivitis, N., E. Gerasopoulos, M. Vrekoussis, G. Kouvarakis, N. Kubilay, N. Hatzianastassiou, I. Vardavas, and N. Mihalopoulos. 2007. Dust transport over the eastern mediterranean derived from total ozone mapping spectrometer, aerosol robotic network, and surface measurements. *J. Geophys. Res. Atmos.* **112**: 1–9. doi:10.1029/2006JD007510
- Kalyanaraman, B., V. Darley-Usmar, K. J. A. Davies, and others. 2012. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: Challenges and limitations. *Free Radic. Biol. Med.* **52**: 1–6. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030
- Kanehisa, M., and S. Goto. 2000. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**: 29–34. doi:10.1093/nar/27.1.29
- Karageorgis, A. P. 2007. Geochemical study of sediments from the amvrakikos gulf lagoon complex, Greece. *Transitional Waters Bull.* **1**: 3–8. doi:10.1285/i1825229Xv1n3p3
- Karl, D. M. 2007. Microbial oceanography: paradigms, processes and promise. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 759–69. doi:10.1038/nrmicro1749
- Kimance, S. A., W. H. Wilson, and S. D. Archer. 2007. Modified dilution technique to estimate viral versus grazing mortality of phytoplankton: Limitations associated with method sensitivity in natural waters. *Aquat. Microb. Ecol.* **49**: 207–222. doi:10.3354/ame01136
- Kirchman, D., E. K'nees, and R. Hodson. 1985. Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 599–607.
- Kirschner, A. K. T., G. H. Reischer, S. Jakwerth, and others. 2017. Multiparametric monitoring of microbial faecal pollution reveals the dominance of human contamination along the whole Danube River. *Water Res.* **124**: 543–555. doi:10.1016/j.watres.2017.07.052
- Kittler, S., C. Greulich, J. Diendorf, M. Koller, and M. Epple. 2010. Toxicity of Silver Nanoparticles Increases during Storage Because of Slow Dissolution under Release of Silver Ions. *Chem. Mater.* **22**: 4548–4554. doi:10.1021/cm100023p
- Knowles, B., C. B. Silveira, B. A. Bailey, and others. 2016. Lytic to temperate switching of viral communities. *Nature*

- Koçak, M., N. Kubilay, S. Tuğrul, and N. Mihalopoulos. 2010. Atmospheric nutrient inputs to the northern levantine basin from a long-term observation: Sources and comparison with riverine inputs. *Biogeosciences* **7**: 4037–4050. doi:10.5194/bg-7-4037-2010
- Koroleff, F. 1970. Revised version of “Determination of ammonia in natural waters as indophenol blue.” Interlab Rep **ICES infor**: 19–22.
- Krause, E., A. Wichels, L. Giménez, M. Lunau, M. B. Schilabel, and G. Gerdt. 2012. Small Changes in pH Have Direct Effects on Marine Bacterial Community Composition: A Microcosm Approach. *PLoS One* **7**: e47035. doi:10.1371/journal.pone.0047035
- Kroeker, K. J., R. L. Kordas, R. Crim, I. E. Hendriks, L. Ramajo, G. S. Singh, C. M. Duarte, and J. P. Gattuso. 2013. Impacts of ocean acidification on marine organisms: Quantifying sensitivities and interaction with warming. *Glob. Chang. Biol.* **19**: 1884–1896. doi:10.1111/gcb.12179
- Kroeker, K. J., R. L. Kordas, R. N. Crim, and G. G. Singh. 2010. Meta-analysis reveals negative yet variable effects of ocean acidification on marine organisms. *Ecol. Lett.* **13**: 1419–1434. doi:10.1111/j.1461-0248.2010.01518.x
- Krom, M. D., N. Kress, S. Brenner, and L. I. Gordon. 1991. Phosphorus limitation of primary productivity in the eastern Mediterranean Sea. *Limnol. Oceanogr.* **36**: 424–432.
- Laghass, M., S. Blain, M. Besseling, P. Catala, C. Guieu, and I. Obernosterer. 2011. Effects of Saharan dust on the microbial community during a large in situ mesocosm experiment in the NW Mediterranean Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* **62**: 201–213. doi:10.3354/ame01466
- Lamarque, J. F., F. Dentener, J. McConnell, and others. 2013. Multi-model mean nitrogen and sulfur deposition from the atmospheric chemistry and climate model intercomparison project (ACCMIP): Evaluation of historical and projected future changes. *Atmos. Chem. Phys.* **13**: 7997–8018. doi:10.5194/acp-13-7997-2013
- Larsen, J. B., a Larsen, R. Thyraug, G. Bratbak, and R. a Sandaa. 2008. Response of marine viral populations to a nutrient induced phytoplankton bloom at different pCO₂ levels. *Biogeosciences* **5**: 523–533. doi:10.5194/bg-5-523-2008
- Lasternas, S., and S. Agustí. 2013. Bacterial survival governed by organic carbon release from senescent oceanic phytoplankton. *Biogeosciences Discuss.* **10**: 16973–16999. doi:10.5194/bgd-10-16973-2013
- Laybourn-Parry, J., W. a. Marshall, and N. J. Madan. 2007. Viral dynamics and patterns of lysogeny in saline Antarctic lakes. *Polar Biol.* **30**: 351–358. doi:10.1007/s00300-006-0191-9
- Lebaron, P., P. Servais, H. Agogue, C. Courties, and F. Joux. 2001. Does the High Nucleic Acid Content of Individual Bacterial Cells Allow Us To Discriminate between Active Cells and Inactive Cells in Aquatic Systems ? *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1775–1782. doi:10.1128/AEM.67.4.1775
- Lekunberri, I., T. Lefort, E. Romero, and others. 2010. Effects of a dust deposition event on coastal marine microbial abundance and activity , bacterial community structure and ecosystem function. *J. Plankton Res.* **32**: 381–396. doi:10.1093/plankt/fbp137
- Lelieveld, J., H. Berresheim, S. Borrmann, and others. 2002. Global air pollution crossroads over the Mediterranean. *Science (80-.)*. **298**: 794–799. doi:10.1126/science.1075457
- Levard, C., E. M. Hotze, G. V. Lowry, and G. E. Brown. 2012. Environmental transformations of silver nanoparticles: Impact on stability and toxicity. *Environ. Sci. Technol.* **46**: 6900–6914. doi:10.1021/es2037405
- Lin, X., R. Huang, Y. Li, F. Li, Y. Wu, D. A. Hutchins, M. Dai, and K. Gao. 2018. Interactive network configuration maintains bacterioplankton community structure under elevated CO₂ in a eutrophic coastal mesocosm experiment. *Biogeosciences* **15**: 551–565. doi:10.5194/bg-15-551-2018
- Lindell, D., J. D. Jaffe, Z. I. Johnson, G. M. Church, and S. W. Chisholm. 2005. Photosynthesis genes in marine viruses yield proteins during host infection. *Nature* **438**: 86–89. doi:10.1038/nature04111
- Lindell, D., M. B. Sullivan, Z. I. Johnson, A. C. Tolonen, F. Rohwer, and S. W. Chisholm. 2004. Transfer of photosynthesis genes to and from *Prochlorococcus* viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 11013–11018. doi:10.1073/pnas.0401526101
- Lindh, M. V., L. Riemann, F. Baltar, C. Romero-Oliva, P. S. Salomon, E. Granéli, and J. Pinhassi. 2013. Consequences

- of increased temperature and acidification on bacterioplankton community composition during a mesocosm spring bloom in the Baltic Sea. *Environ. Microbiol. Rep.* **5**: 252–262. doi:10.1111/1758-2229.12009
- Liu, S. G., Y. R. Luo, and L. F. Huang. 2016. Dynamics of size-fractionated bacterial communities during the coastal dispersal of treated municipal effluents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**: 5839–5848. doi:10.1007/s00253-016-7408-9
- Liu, Y., M. Tourbin, S. Lachaize, and P. Guiraud. 2014. Nanoparticles in wastewaters : Hazards , fate and remediation. *Powder Technol.* **255**: 149–156. doi:10.1016/j.powtec.2013.08.025
- Long, A., L. D. McDaniel, J. Mobberley, and J. H. Paul. 2008. Comparison of lysogeny (prophage induction) in heterotrophic bacterial and *Synechococcus* populations in the Gulf of Mexico and Mississippi River plume. *ISME J.* **2**: 132–144. doi:10.1038/ismej.2007.102
- Louis, J., C. Guieu, and F. Gazeau. 2017. Nutrient dynamics under different ocean acidification scenarios in a low nutrient low chlorophyll system: The Northwestern Mediterranean Sea. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **186**: 30–44. doi:10.1016/j.ecss.2016.01.015
- Mahowald, N., T. D. Jickells, A. R. Baker, and others. 2008. Global distribution of atmospheric phosphorus sources, concentrations and deposition rates, and anthropogenic impacts. *Global Biogeochem. Cycles* **22**: 1–19. doi:10.1029/2008GB003240
- Marañón, E., A. Fernández, B. Mouriño-Carballido, and others. 2010. Degree of oligotrophy controls the response of microbial plankton to Saharan dust. *Limnol. Oceanogr.* **55**: 2339–2352. doi:10.4319/lo.2010.55.6.2339
- Mari, X., M. E. Kerros, and M. G. Weinbauer. 2007. Virus attachment to transparent exopolymeric particles along trophic gradients in the southwestern lagoon of New Caledonia. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 5245–5252. doi:10.1128/AEM.00762-07
- Marie, D., C. P. D. Brussaard, R. Thyrhaug, G. Bratbak, and D. Vaultot. 1999. Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 45–52.
- Markaki, Z., M. D. Loÿe-Pilot, K. Violaki, L. Benyahya, and N. Mihalopoulos. 2010. Variability of atmospheric deposition of dissolved nitrogen and phosphorus in the Mediterranean and possible link to the anomalous seawater N/P ratio. *Mar. Chem.* **120**: 187–194. doi:10.1016/j.marchem.2008.10.005
- Martín-Cuadrado, A. B., P. López-García, J. C. Alba, D. Moreira, L. Monticelli, A. Strittmatter, G. Gottschalk, and F. Rodríguez-Valera. 2007. Metagenomics of the deep Mediterranean, a warm bathypelagic habitat. *PLoS One* **2**. doi:10.1371/journal.pone.0000914
- Martinez-Garcia, M., D. M. Brazel, B. K. Swan, and others. 2012. Capturing single cell genomes of active polysaccharide degraders: An unexpected contribution of verrucomicrobia. *PLoS One* **7**: 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0035314
- Martinez, jose l. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science (80-.)*. **321**: 365–367.
- Maugendre, L., J. P. Gattuso, A. J. Poulton, W. Dellisanti, M. Gaubert, C. Guieu, and F. Gazeau. 2017. No detectable effect of ocean acidification on plankton metabolism in the NW oligotrophic Mediterranean Sea: Results from two mesocosm studies. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **186**: 89–99. doi:10.1016/j.ecss.2015.03.009
- Maurice, C. F., C. Bouvier, R. De Wit, and T. Bouvier. 2013. Linking the lytic and lysogenic bacteriophage cycles to environmental conditions, host physiology and their variability in coastal lagoons. *Environ. Microbiol.* **15**: 2463–2475. doi:10.1111/1462-2920.12120
- Mauro, C., M. Francesca, F. Annalisa, G. Frédéric, G. Antonia, P. Paraskevi, T. Anastasia, and D. N. Paola. 2015. Ocean acidification effect on prokaryotic metabolism tested in two diverse trophic regimes in the Mediterranean Sea. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **186**: 125–138. doi:10.1016/j.ecss.2015.08.015
- McDaniel, L., M. Breitbart, J. Mobberley, A. Long, M. Haynes, F. Rohwer, and J. H. Paul. 2008. Metagenomic analysis of lysogeny in Tampa Bay: Implications for prophage gene expression. *PLoS One* **3**. doi:10.1371/journal.pone.0003263
- Mcdaniel, L., and J. H. Paul. 2005. Effect of Nutrient Addition and Environmental Factors on Prophage Induction in Natural Populations of Marine *Synechococcus* Species Effect of Nutrient Addition and Environmental Factors on Prophage Induction in Natural Populations of Marine *Synechococcus* S. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 842–850. doi:10.1128/AEM.71.2.842
- McDonald, A. E., A. G. Ivanov, R. Bode, D. P. Maxwell, S. R. Rodermel, and N. P. A. Hüner. 2011. Flexibility in

- photosynthetic electron transport: The physiological role of plastoquinol terminal oxidase (PTOX). *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1807**: 954–967. doi:10.1016/j.bbabi.2010.10.024
- Mcgillicuddy, E., I. Murray, S. Kavanagh, and others. 2017. Silver nanoparticles in the environment : Sources , detection and ecotoxicology. *Sci. Total Environ.* **575**: 231–246. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.10.041
- Meziti, A., D. Tsementzi, K. Ar. Kormas, H. Karayanni, and K. T. Konstantinidis. 2016. Anthropogenic effects on bacterial diversity and function along a river-to-estuary gradient in Northwest Greece revealed by metagenomics. *Environ. Microbiol.* **18**: 4640–4652. doi:10.1111/1462-2920.13303
- Miao, A., K. A. Schwehr, C. Xu, S. Zhang, Z. Luo, A. Quigg, and P. H. Santschi. 2009. The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. *Environ. Pollut.* **157**: 3034–3041. doi:10.1016/j.envpol.2009.05.047
- Micheli, F., N. Levin, S. Giakoumi, and others. 2013. Setting Priorities for Regional Conservation Planning in the Mediterranean Sea. *PLoS One* **8**. doi:10.1371/journal.pone.0059038
- Milne, A., W. Landing, M. Bizimis, and P. Morton. 2010. Determination of Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd and Pb in seawater using high resolution magnetic sector inductively coupled mass spectrometry (HR-ICP-MS). *Anal. Chim. Acta* **665**: 200–207. doi:10.1016/j.aca.2010.03.027
- Misson, B., C. Garnier, B. Lauga, D. H. Dang, J. F. Ghiglione, J. U. Mullot, R. Duran, and O. Pringault. 2016. Chemical multi-contamination drives benthic prokaryotic diversity in the anthropized Toulon Bay. *Sci. Total Environ.* **556**: 319–329. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.02.038
- Mitrano, D. M., J. F. Ranville, A. Bednar, K. Kazor, A. S. Hering, and C. P. Higgins. 2014. Tracking dissolution of silver nanoparticles at environmentally relevant concentrations in laboratory, natural and processed waters using single particle ICP-MS (spICP-MS). *Environ. Sci. Nano* **1**: 248–259. doi:10.1039/C3EN00108C
- Mizuno, C. M., F. Rodriguez-valera, N. E. Kimes, and R. Ghai. 2013. Expanding the Marine Virosphere Using Metagenomics. *PLOS Genet.* **9**: e1003987. doi:10.1371/journal.pgen.1003987
- Mojica, K. D. A., and C. P. D. Brussaard. 2014. Factors affecting virus dynamics and microbial host-virus interactions in marine environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **89**: 495–515. doi:10.1111/1574-6941.12343
- Van Mooy, B. A. S., G. Rocap, H. F. Fredricks, C. T. Evans, and A. H. Devol. 2006. Sulfolipids dramatically decrease phosphorus demand by picocyanobacteria in oligotrophic marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 8607–8612. doi:10.1073/pnas.0600540103
- Morán, X. A. G., A. Bode, L. Á. Suárez, and E. Nogueira. 2007. Assessing the relevance of nucleic acid content as an indicator of marine bacterial activity. *Aquat. Microb. Ecol.* **46**: 141–152. doi:10.3354/ame046141
- Motegi, C., T. Nagata, T. Miki, M. G. Weinbauer, and L. Legendre. 2009. Viral control of bacterial growth efficiency in marine pelagic environments. *Limnol. Oceanogr.* **54**: 1901–1910.
- Motegi, C., T. Tanaka, J. Piontek, C. P. D. Brussaard, J. P. Gattuso, and M. G. Weinbauer. 2013. Effect of CO₂ enrichment on bacterial metabolism in an Arctic fjord. *Biogeosciences* **10**: 3285–3296. doi:10.5194/bg-10-3285-2013
- Mousing, E. A., M. Ellegaard, and K. Richardson. 2014. Global patterns in phytoplankton community size Structure-evidence for a direct temperature effect. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **497**: 25–38. doi:10.3354/meps10583
- Moutin, T., D. M. Karl, S. Duhamel, P. Rimmelin, P. Raimbault, B. a. S. Van Mooy, and H. Claustre. 2008. Phosphate availability and the ultimate control of new nitrogen input by nitrogen fixation in the tropical Pacific Ocean. *Biogeosciences Discuss.* **4**: 2407–2440. doi:10.5194/bgd-4-2407-2007
- Moutin, T., and P. Raimbault. 2002. Primary production, carbon export and nutrients availability in western and eastern Mediterranean Sea in early summer 1996 (MINOS cruise). *J. Mar. Syst.* **33–34**: 273–288. doi:10.1016/S0924-7963(02)00062-3
- Moutin, T., T. F. Thingstad, F. Van Wambeke, D. Marie, G. Slawyk, P. Raimbault, and H. Claustre. 2002. Does competition for nanomolar phosphate supply explain the predominance of the cyanobacterium *Synechococcus*? *Limnol. Oceanogr.* **47**: 1562–1567.
- Mueller, N. C., and B. Nowack. 2008. Exposure Modeling of Engineered Nanoparticles in the Environment. *Environ. Sci. Technol.* **42**: 4447–4453.

- Mullin, J. B., and J. P. Riley. 1955. The colorimetric determination of silicate with special references to sea and natural water. *Anal. chim. Acta* **12**: 162–176.
- Murphy, J., and J. P. Riley. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* **31** **27**: 31–36. doi:10.1016/S0003-2670(00)88444-5
- Navarro, E., Æ. A. Baun, Æ. R. Behra, and others. 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae , plants , and fungi. *Ecotoxicology* **17**: 372–386. doi:10.1007/s10646-008-0214-0
- Needham, D. M., C. T. Chow, J. A. Cram, R. Sachdeva, A. Parada, and J. A. Fuhrman. 2013. Short-term observations of marine bacterial and viral communities : patterns , connections and resilience. *ISME J.* **7**: 1274–1285. doi:10.1038/ismej.2013.19
- Nelson, W. C., and J. C. Stegen. 2015. The reduced genomes of Parcubacteria (OD1) contain signatures of a symbiotic lifestyle. *Front. Microbiol.* **6**: 713. doi:10.3389/fmicb.2015.00713
- Newbold, L. K., A. E. Oliver, T. Booth, and others. 2012. The response of marine picoplankton to ocean acidification. *Environ. Microbiol.* **14**: 2293–307. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02762.x
- Newton, A., J. Icelly, S. Cristina, and others. 2014. An overview of ecological status, vulnerability and future perspectives of European large shallow, semi-enclosed coastal systems, lagoons and transitional waters. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **140**: 95–122. doi:10.1016/j.ecss.2013.05.023
- Nogales, B., M. P. Lanfranconi, J. M. Pi??a-Villalonga, and R. Bosch. 2011. Anthropogenic perturbations in marine microbial communities. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**: 275–298. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00248.x
- Oukarroum, A., S. Bras, F. Perreault, and R. Popovic. 2012. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae , *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **78**: 80–85. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.11.012
- Passow, U., and A. Alldredge. 1994. Distribution, size and bacterial colonization of transparent exopolymer particles (TEP) in the ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **113**: 185–194.
- Paul, C., B. Matthiessen, and U. Sommer. 2015. Warming, but not enhanced CO₂ concentration, quantitatively and qualitatively affects phytoplankton biomass. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **528**: 39–51. doi:10.3354/meps11264
- Paul, J. H. 2008. Prophages in marine bacteria: dangerous molecular time bombs or the key to survival in the seas? *ISME J.* **2**: 579–589. doi:10.1038/ismej.2008.35
- Paulino, a. I., J. K. Egge, and a. Larsen. 2007. Effects of increased atmospheric CO₂ on small and intermediate sized osmotrophs during a nutrient induced phytoplankton bloom. *Biogeosciences Discuss.* **4**: 4173–4195. doi:10.5194/bgd-4-4173-2007
- Pavlidou, A., N. Simboura, E. Rousselaki, and others. 2015. Methods of eutrophication assessment in the context of the water framework directive: Examples from the Eastern Mediterranean coastal areas. *Cont. Shelf Res.* **108**: 156–168. doi:10.1016/j.csr.2015.05.013
- Pavlouli, C., A. Oulas, K. Vasileiadou, E. Sarropoulou, G. Kotoulas, and C. Arvanitidis. 2016. Salinity is the major factor influencing the sediment bacterial communities in a Mediterranean lagoonal complex (Amvrakikos Gulf, Ionian Sea). *Mar. Genomics* **28**: 71–81. doi:10.1016/j.margen.2016.01.005
- Payet, J., and C. a Suttle. 2013. To kill or not to kill: The balance between lytic and lysogenic viral infection is driven by trophic status. *Limnol. Oceanogr.* **58**: 465–474. doi:10.4319/lo.2013.58.2.0465
- Paytan, A., K. R. M. Mackey, Y. Chen, I. D. Lima, S. C. Doney, N. Mahowald, R. Labiosa, and A. F. Post. 2009. Toxicity of atmospheric aerosols on marine phytoplankton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 4601–4605. doi:10.1073/pnas.0811486106
- Piccinno, F., F. Gottschalk, S. Seeger, and B. Nowack. 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J. Nanoparticle Res.* **14**: 1–11. doi:10.1007/s11051-012-1109-9
- Piontek, J., C. Borchard, M. Sperling, K. G. Schulz, U. Riebesell, and A. Engel. 2013. Response of bacterioplankton activity in an Arctic fjord system to elevated pCO₂: Results from a mesocosm perturbation study. *Biogeosciences* **10**: 297–314. doi:10.5194/bg-10-297-2013
- Pitta, P., M. Tsapakis, E. Apostolaki, T. Tsagaraki, M. Holmer, and I. Karakassis. 2009. ‘Ghost nutrients’ from fish farms are transferred up the food web by phytoplankton grazers. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **374**: 1–6. doi:10.3354/meps07763

- Pletikapic, G., V. Zutic, I. V. Vrcek, V. Svetlicic, G. Pletikapić, V. Žutić, I. Vinković Vrček, and V. Svetličić. 2012. Atomic force microscopy characterization of silver nanoparticles interactions with marine diatom cells and extracellular polymeric. *J. Mol. Recognit.* **25**: 309–317. doi:10.1002/jmr.2177
- Polovina, J. J., E. A. Howell, and M. Abecassis. 2008. Ocean's least productive waters are expanding. *Geophys. Res. Lett.* **35**: 2–6. doi:10.1029/2007GL031745
- Pulido-Villena, E., A.-C. Baudoux, I. Obernosterer, and others. 2014. Microbial food web dynamics in response to a Saharan dust event: results from a mesocosm study in the oligotrophic Mediterranean Sea. *Biogeosciences Discuss.* **11**: 5607–5619. doi:10.5194/bgd-11-337-2014
- Pulido-Villena, E., V. Rrolle, and C. Guieu. 2010. Transient fertilizing effect of dust in P-deficient LNLC surface ocean. *Geophys. Res. Lett.* **37**. doi:10.1029/2009GL041415
- Pulido-Villena, E., T. Wagener, and C. Guieu. 2008. Bacterial response to dust pulses in the western Mediterranean: Implications for carbon cycling in the oligotrophic ocean. *Global Biogeochem. Cycles* **22**: 1–12. doi:10.1029/2007GB003091
- Puxty, R. J., A. D. Millard, D. J. Evans, and D. J. Scanlan. 2015. Shedding new light on viral photosynthesis. *Photosynth. Res.* **126**: 71–97. doi:10.1007/s11120-014-0057-x
- Qian, J., Q. Ding, A. Guo, D. Zhang, and K. Wang. 2017. Alteration in successional trajectories of bacterioplankton communities in response to co-exposure of cadmium and phenanthrene in coastal water microcosms. *Environ. Pollut.* **221**: 480–490. doi:10.1016/j.envpol.2016.12.020
- Quero, G. M., D. Cassin, M. Botter, L. Perini, and G. M. Luna. 2015. Patterns of benthic bacterial diversity in coastal areas contaminated by heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs). *Front. Microbiol.* **6**: 1–15. doi:10.3389/fmicb.2015.01053
- Quero, G. M., L. Perini, G. Pesole, C. Manzari, C. Lionetti, M. Bastianni, M. Marini, and G. M. Luna. 2017. Seasonal rather than spatial variability drives planktonic and benthic bacterial diversity in a microtidal lagoon and the adjacent open sea. *Mol. Ecol.* 5961–5974.
- Quik, J. T. K., J. J. M. De Klein, and A. A. Koelmans. 2015. Spatially explicit fate modelling of nanomaterials in natural waters. *Water Res.* **80**: 200–208. doi:10.1016/j.watres.2015.05.025
- Radniecki, T. S., D. P. Stankus, A. Neigh, J. a. Nason, and L. Semprini. 2011. Influence of liberated silver from silver nanoparticles on nitrification inhibition of *Nitrosomonas europaea*. *Chemosphere* **85**: 43–49. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.06.039
- Rappé, S. M., S. A. Connon, K. L. Vergin, and S. J. Giovannoni. 2002. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* **418**: 630–633.
- Ras, J., H. Claustre, and J. Uitz. 2008. Spatial variability of phytoplankton pigment distributions in the Subtropical South Pacific Ocean: comparison between in situ and predicted data. *Biogeosciences Discuss.* **4**: 3409–3451. doi:10.5194/bgd-4-3409-2007
- Rasconi, S., A. Gall, K. Winter, and M. J. Kainz. 2015. Increasing water temperature triggers dominance of small freshwater plankton. *PLoS One* **10**: 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0140449
- Raven, J. A., and J. Beardall. 2014. CO₂ concentrating mechanisms and environmental change. *Aquat. Bot.* **118**: 24–37. doi:10.1016/j.aquabot.2014.05.008
- Ray, J. L., B. Töpfer, S. An, and others. 2012. Effect of increased pCO₂ on bacterial assemblage shifts in response to glucose addition in Fram Strait seawater mesocosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **82**: 713–723. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01443.x
- Reidy, B., A. Haase, A. Luch, K. A. Dawson, and I. Lynch. 2013. Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications. *Materials (Basel)*. **6**: 2295–2350. doi:10.3390/ma6062295
- Richier, S., E. P. Achterberg, C. Dumousseaud, a. J. Poulton, D. J. Suggett, T. Tyrrell, M. V. Zubkov, and C. M. Moore. 2014. Carbon cycling and phytoplankton responses within highly-replicated shipboard carbonate chemistry manipulation experiments conducted around Northwest European Shelf Seas. *Biogeosciences Discuss.* **11**: 3489–3534. doi:10.5194/bgd-11-3489-2014
- Ridame, C., J. Dekazemacker, C. Guieu, S. Bonnet, S. L'Helguen, and F. Malien. 2014. Phytoplanktonic response to

- contrasted Saharan dust deposition events during mesocosm experiments in LNLC environment. *Biogeosciences Discuss.* **11**: 4783–4800. doi:10.5194/bgd-11-753-2014
- Ridame, C., and C. Guieu. 2002. Saharan input of phosphate to the oligotrophic water of the open western Mediterranean Sea. *Limnol. Oceanogr.* **47**: 856–869. doi:10.4319/lo.2002.47.3.0856
- Riebesell, U., R. G. J. Bellerby, H.-P. Grossart, and F. Thingstad. 2008. Mesocosm CO₂ perturbation studies: from organism to community level. *Biogeosciences* **5**: 1157–1164. doi:10.5194/bg-5-1157-2008
- Riebesell, U., and J.-P. Gattuso. 2014. Lessons learned from ocean acidification research. *Nat. Clim. Chang.* **5**: 12–14.
- Riebesell, U., J. P. P. Gattuso, T. F. F. Thingstad, and J. J. J. Middelburg. 2013. Arctic ocean acidification: pelagic ecosystem and biogeochemical responses during a mesocosm study. *Biogeosciences* **10**: 5619–5626. doi:10.1594/PANGAEA.769833
- Riebesell, U., K. G. Schulz, R. G. J. Bellerby, and others. 2007. Enhanced biological carbon consumption in a high CO₂ ocean. *Nature* **450**: 545–548. doi:10.1038/nature06267
- Rimmelin, P., and T. Moutin. 2005. Re-examination of the MAGIC method to determine low orthophosphate concentration in seawater. *Anal. Chim. Acta* **548**: 174–182. doi:10.1016/j.aca.2005.05.071
- Rochelle-Newall, E., B. Delille, M. Frankignoulle, J. P. Gattuso, S. Jacquet, U. Riebesell, A. Terbruggen, and I. Zondervan. 2004. Chromophoric dissolved organic matter in experimental mesocosms maintained under different pCO₂ levels. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **272**: 25–31. doi:10.3354/meps272025
- Rohwer, F., and R. V. Thurber. 2009. Viruses manipulate the marine environment. *Nature* **459**: 207–212. doi:10.1038/nature08060
- Roth-Schulze, A. J., T. Thomas, P. Steinberg, and others. 2018. The effects of warming and ocean acidification on growth, photosynthesis, and bacterial communities for the marine invasive macroalga *Caulerpa taxifolia*. *Limnol. Oceanogr.* **63**: 459–471. doi:10.1002/lno.10739
- Roux, S., F. Enault, A. Robin, and others. 2012. Assessing the diversity and specificity of two freshwater viral communities through metagenomics. *PLoS One* **7**. doi:10.1371/journal.pone.0033641
- Ruiz-González, C., J. P. Niño-García, and P. A. del Giorgio. 2015. Terrestrial origin of bacterial communities in complex boreal freshwater networks. *Ecol. Lett.* **18**: 1198–1206. doi:10.1111/ele.12499
- Sano, E., S. Carlson, L. Wegley, and F. Rohwer. 2004. Movement of viruses between biomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5842–5846. doi:10.1128/AEM.70.10.5842-5846.2004
- Sarà, G. 2007. Ecological effects of aquaculture on living and non-living suspended fractions of the water column: A meta-analysis. *Water Res.* **41**: 3187–3200. doi:10.1016/j.watres.2007.05.013
- Savitchcheva, O., and S. Okabe. 2006. Alternative indicators of fecal pollution: Relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. *Water Res.* **40**: 2463–2476. doi:10.1016/j.watres.2006.04.040
- Savio, D., L. Sinclair, U. Z. Ijaz, and others. 2015. Bacterial diversity along a 2600km river continuum. *Environ. Microbiol.* **17**: 4994–5007. doi:10.1111/1462-2920.12886
- Schiavo, S., N. Duroudier, E. Bilbao, M. Mikolaczyk, J. Schafer, M. P. Cajaraville, and S. Manzo. 2017. Effects of PVP/PEI coated and uncoated silver NPs and PVP/PEI coating agent on three species of marine microalgae. *Sci. Total Environ.* **577**: 45–53. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.10.051
- Schmitz, R. A., R. Daniel, U. W. E. Deppenmeier, and G. Gottschalk. 2014. The Prokaryotes. Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria,.
- Schulz-Zunkel, C., and F. Krueger. 2009. Trace Metal Dynamics in Floodplain Soils of the River Elbe: A Review. *J. Environ. Qual.* **38**: 1349. doi:10.2134/jeq2008.0299
- Schulz, K. G., R. G. J. Bellerby, C. P. D. Brussaard, and others. 2013. Temporal biomass dynamics of an Arctic plankton bloom in response to increasing levels of atmospheric carbon dioxide. *Biogeosciences* **10**: 161–180. doi:10.5194/bg-10-161-2013
- Seiler, C., and T. U. Berendonk. 2012. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies

- impacted by agriculture and aquaculture. *Front. Microbiol.* **3**: 1–10. doi:10.3389/fmicb.2012.00399
- Sharma, A. K., J. W. Becker, E. A. Ottesen, and others. 2014a. Distinct dissolved organic matter sources induce rapid transcriptional responses in coexisting populations of *Prochlorococcus*, *Pelagibacter* and the OM60 clade. *Environ. Microbiol.* **16**: 2815–2830. doi:10.1111/1462-2920.12254
- Sharma, V. K., K. M. Siskova, R. Zboril, and J. L. Gardea-torresdey. 2014b. Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: Fate, stability and toxicity. *Adv. Colloid Interface Sci.* **204**: 15–34. doi:10.1016/j.cis.2013.12.002
- Shi, Z., M. D. Krom, S. Bonneville, and L. G. Benning. 2015. Atmospheric processing outside clouds increases soluble iron in mineral dust. *Environ. Sci. Technol.* **49**: 1472–1477. doi:10.1021/es504623x
- Simboura, N., A. Pavlidou, J. Bald, M. Tsapakis, K. Pagou, C. Zeri, A. Androni, and P. Panayotidis. 2016. Response of ecological indices to nutrient and chemical contaminant stress factors in Eastern Mediterranean coastal waters. *Ecol. Indic.* **70**: 89–105. doi:10.1016/j.ecolind.2016.05.018
- Simboura, N., M. Tsapakis, A. Pavlidou, G. Assimakopoulou, and K. Pagou. 2015. Assessment of the environmental status in the Hellenic coastal waters (Eastern Mediterranean): from the Water Framework Directive to the Marine Strategy Framework Directive. *Mediterr. Mar. Sci.* **16**(1): 46–64.
- Smith, D. C., and F. Azam. 1992. A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in seawater using ³H-leucine. *Mar. Microb. food webs* **6**: 107–114.
- Sohrin, R., and R. Sempéré. 2005. Seasonal variation in total organic carbon in the northeast Atlantic in 2000–2001. *J. Geophys. Res.* **110**: C10S90. doi:10.1029/2004JC002731
- Solomon, S. 2007. *Climate Change 2007*. *Change* **20**: 12–17. doi:http://dx.doi.org/10.1017/CBO9780511546013
- Solonenko, S. a, J. C. Ignacio-Espinoza, A. Alberti, and others. 2013. Sequencing platform and library preparation choices impact viral metagenomes. *BMC Genomics* **14**: 320. doi:10.1186/1471-2164-14-320
- Somerfield, P. J. 2008. Identification of the Bray-Curtis similarity index: Comment on Yoshioka (2008). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **372**: 303–306. doi:10.3354/meps07841
- Sommer, U., C. Paul, and M. Moustaka-Gouni. 2015. Warming and ocean acidification effects on phytoplankton - From species shifts to size shifts within species in a mesocosm experiment. *PLoS One* **10**: 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0125239
- Soo, R. M., C. T. Skennerton, Y. Sekiguchi, and others. 2014. An expanded genomic representation of the phylum Cyanobacteria. *Genome Biol. Evol.* **6**: 1031–1045. doi:10.1093/gbe/evu073
- Sorokin, D. Y., T. P. Tourova, E. A. Galinski, G. Muyzer, and J. G. Kuenen. 2008. *Thiohalorhabdus denitrificans* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic, sulfur-oxidizing, deep-lineage gammaproteobacterium from hypersaline habitats. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 2890–2897. doi:10.1099/ijs.0.2008/000166-0
- Steeman, N. 1952. The use of radio-active carbon (¹⁴C) for measuring organic production in the sea. 117–140.
- Strickland, J., and T. Parsons. 1972. *A practical handbook of seawater analysis*.
- Sugimura, Y., and Y. Suzuki. 1988. A high-temperature catalytic oxidation method for the determination of non-volatile dissolved organic carbon in seawater by direct injection of a liquid sample. *Mar. Chem.* **24**: 105–131. doi:10.1016/0304-4203(88)90043-6
- Sullivan, M. B., M. L. Coleman, P. Weigle, F. Rohwer, and S. W. Chisholm. 2005. Three *Prochlorococcus* cyanophage genomes: Signature features and ecological interpretations. *PLoS Biol.* **3**: 0790–0806. doi:10.1371/journal.pbio.0030144
- Sullivan, M. B., D. Lindell, J. a. Lee, L. R. Thompson, J. P. Bielawski, and S. W. Chisholm. 2006. Prevalence and evolution of core photosystem II genes in marine cyanobacterial viruses and their hosts. *PLoS Biol.* **4**: 1344–1357. doi:10.1371/journal.pbio.0040234
- Sullivan, M. B., J. B. Waterbury, and S. W. Chisholm. 2003. Cyanophages infecting the oceanic cyanobacterium *Prochlorococcus*. *Nature* **424**: 1047–1051. doi:10.1038/nature02147
- Sun, M. Y., K. A. Dafforn, M. V. Brown, and E. L. Johnston. 2012. Bacterial communities are sensitive indicators of

- contaminant stress. *Mar. Pollut. Bull.* **64**: 1029–1038. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.01.035
- Sun, X., Z. Sheng, and Y. Liu. 2013. Effects of silver nanoparticles on microbial community structure in activated sludge. *Sci. Total Environ.* **443**: 828–835. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.11.019
- Sunagawa, S., L. P. Coelho, S. Chaffron, and others. 2015. Structure and function of the global ocean microbiome. *Science* (80-.). **348**: 1–10.
- Suttle, C. A. 2005. Viruses in the sea. *Nature* **437**: 356–361. doi:10.1038/nature04160
- Suttle, C. a. 2007. Marine viruses--major players in the global ecosystem. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 801–812. doi:10.1038/nrmicro1750
- Swan, B. K., M. Martinez-Garcia, C. M. Preston, and others. 2011. Potential for chemolithoautotrophy among ubiquitous bacteria lineages in the dark ocean. *Science* **333**: 1296–1300. doi:10.1126/science.1203690
- Tanaka, T., F. Rassoulzadegan, and T. F. Thingstad. 2003. Measurements of phosphate affinity constants and phosphorus release rates from the microbial food web in Villefranche Bay, northwestern Mediterranean. *Limnol. Oceanogr.* **48**: 1150–1160. doi:10.4319/lo.2003.48.3.1150
- Tapper, M., and R. Hicks. 1998. Temperate viruses and lysogeny in Lake Superior bacterioplankton. *Limnol. Oceanogr.* **43**: 95–103.
- Tarling, G. A., V. Peck, P. Ward, and others. 2016. Effects of acute ocean acidification on spatially-diverse polar pelagic foodwebs: Insights from on-deck microcosms. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* **127**: 75–92. doi:10.1016/j.dsr2.2016.02.008
- Taylor, C., M. Matzke, A. Kroll, D. S. Read, C. Svendsen, and A. Crossley. 2016. Toxic interactions of different silver forms with freshwater green algae and cyanobacteria and their effects on mechanistic endpoints and the production of extracellular polymeric substances. *Environ. Sci. Nano* **3**: 396–408. doi:10.1039/C5EN00183H
- Ternon, E., C. Guieu, C. Ridame, S. L'Helguen, and P. Catala. 2011. Longitudinal variability of the biogeochemical role of Mediterranean aerosols in the Mediterranean Sea. *Biogeosciences* **8**: 1067–1080. doi:10.5194/bg-8-1067-2011
- Thiele, S., M. Richter, C. Balestra, F. O. Glöckner, and R. Casotti. 2017. Taxonomic and functional diversity of a coastal planktonic bacterial community in a river-influenced marine area. *Mar. Genomics* **32**: 61–69. doi:10.1016/j.margen.2016.12.003
- Thingstad, T. F. 2000. Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems. *Limnol. Oceanogr.* **45**: 1320–1328. doi:10.4319/lo.2000.45.6.1320
- Thingstad, T. F., M. D. Krom, R. F. C. Mantoura, and others. 2005. Nature of phosphorus limitation in the ultraoligotrophic eastern Mediterranean. *Science* **309**: 1068–1071. doi:10.1126/science.1112632
- Thingstad, T. F., S. Vage, J. E. Storesund, R.-A. Sandaa, and J. Giske. 2014. A theoretical analysis of how strain-specific viruses can control microbial species diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: 7813–7818. doi:10.1073/pnas.1400909111
- Thomas, R., L. Berdjeb, T. Sime-Ngando, and S. Jacquet. 2011. Viral abundance, production, decay rates and life strategies (lysogeny versus lysis) in Lake Bourget (France). *Environ. Microbiol.* **13**: 616–630. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02364.x
- Thompson, L. R., Q. Zeng, L. Kelly, K. H. Huang, a. U. Singer, J. Stubbe, and S. W. Chisholm. 2011. Phage auxiliary metabolic genes and the redirection of cyanobacterial host carbon metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: E757–E764. doi:10.1073/pnas.1102164108
- Toncelli, C., K. Mylona, I. Kalantzi, A. Tsiola, P. Pitta, M. Tsapakis, and S. A. Pergantis. 2017. Silver nanoparticles in seawater: A dynamic mass balance at part per trillion silver concentrations. *Sci. Total Environ.* **601–602**. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.05.148
- Toncelli, C., K. Mylona, M. Tsapakis, and S. A. Pergantis. 2016. Flow injection with on-line dilution and single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry for monitoring silver nanoparticles in seawater and in marine microorganisms. *J. Anal. At. Spectrom.* **31**: 1430–1439. doi:10.1039/C6JA00011H
- Tortell, P. D. 2000. Evolutionary and ecological perspectives on carbon acquisition in phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* **45**: 744–750.

- Tortell, P. D., G. R. DiTullio, D. M. Sigman, and F. M. M. Morel. 2002. CO₂ effects on taxonomic composition and nutrient utilization in an Equatorial Pacific phytoplankton assemblage. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **236**: 37–43. doi:10.3354/meps236037
- Tortell, P. D., C. D. Payne, Y. Li, and others. 2008. CO₂ sensitivity of Southern Ocean phytoplankton. *Geophys. Res. Lett.* **35**: 1–5. doi:10.1029/2007GL032583
- Tsagaraki, T. M., B. Herut, E. Rahav, and others. 2017. Atmospheric deposition effects on plankton communities in the Eastern Mediterranean: A mesocosm experimental approach. *Front. Mar. Sci.* **4**. doi:10.3389/fmars.2017.00210
- Tsagaraki, T. M., P. Pitta, C. Frangoulis, G. Petihakis, and I. Karakassis. 2013. Plankton response to nutrient enrichment is maximized at intermediate distances from fish farms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **493**: 31–42. doi:10.3354/meps10520
- Tsiola, A., P. Pitta, S. Fodelianakis, and others. 2016. Nutrient Limitation in Surface Waters of the Oligotrophic Eastern Mediterranean Sea : an Enrichment Microcosm Experiment. *Microb. Ecol.* **71**: 575–588. doi:10.1007/s00248-015-0713-5
- Utermohl, H. 1958. Zur Vervollkommung der quantitativen phytoplankton methodik. *Mitt. - Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.* **9**: 1–38.
- Vaqué, D., E. O. Casamayor, and J. M. Gasol. 2001. Dynamics of whole community bacterial production and grazing losses in seawater incubations as related to the changes in the proportions of bacteria with different DNA content. *Aquat. Microb. Ecol.* **25**: 163–177.
- Vaquer-Sunyer, R., and C. M. Duarte. 2008. Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 15452–15457. doi:10.1073/pnas.0803833105
- Varela, M. M., H. M. Van Aken, and G. J. Herndl. 2008. Abundance and activity of Chloroflexi-type SAR202 bacterioplankton in the meso- and bathypelagic waters of the (sub)tropical Atlantic. *Environ. Microbiol.* **10**: 1903–1911. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01627.x
- Villacorte, L. O., Y. Ekowati, H. N. Calix-Ponce, J. C. Schippers, G. L. Amy, and M. D. Kennedy. 2015. Improved method for measuring transparent exopolymer particles (TEP) and their precursors in fresh and saline water. *Water Res.* **70**: 300–312. doi:10.1016/j.watres.2014.12.012
- Volpe, G., V. F. Banzon, R. H. Evans, R. Santoleri, A. J. Mariano, and R. Sciarra. 2009. Satellite observations of the impact of dust in a low-nutrient, low-chlorophyll region : Fertilization or artifact? *Glob. Biochem. Cycles* **23**: 1–14. doi:10.1029/2008GB003216
- de Voogd, N. J., D. F. R. Cleary, A. R. M. Polónia, and N. C. M. Gomes. 2015. Bacterial community composition and predicted functional ecology of sponges, sediment and seawater from the thousand islands reef complex, West Java, Indonesia. *FEMS Microbiol. Ecol.* **91**: 1–12. doi:10.1093/femsec/fiv019
- Wagener, T., C. Guieu, and N. Leblond. 2010. Effects of dust deposition on iron cycle in the surface Mediterranean Sea: Results from a mesocosm seeding experiment. *Biogeosciences* **7**: 3769–3781. doi:10.5194/bg-7-3769-2010
- Wang, J., H. Rong, and C. Zhang. 2018. Evaluation of the impact of dissolved oxygen concentration on biofilm microbial community in sequencing batch biofilm reactor. *J. Biosci. Bioeng.* **125**: 532–542. doi:10.1016/j.jbiosc.2017.11.007
- Wang, Y., R. Zhang, Q. Zheng, Y. Deng, J. van Nostrand, J. Zhou, and N. Jiao. 2016. Bacterioplankton community resilience to ocean acidification: evidence from microbial network analysis. *ICES J. Mar. Sci.* **73**: 865–875.
- Weinbauer, M. G. 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 127–181. doi:10.1016/j.femsre.2003.08.001
- Weinbauer, M. G., I. Brettar, and M. G. Höfle. 2003. Lysogeny and virus-induced mortality of bacterioplankton in surface, deep, and anoxic marine waters. *Limnol. Oceanogr.* **48**: 1457–1465. doi:10.4319/lo.2003.48.4.1457
- Weinbauer, M. G., C. Winter, and M. G. Höfle. 2002. Reconsidering transmission electron microscopy based estimates of viral infection of bacterioplankton using conversion factors derived from natural communities. *Aquat. Microb. Ecol.* **27**: 103–110. doi:10.3354/ame027103
- Wiesner, M. R., G. V. Lowry, K. L. Jones, M. F. Hochella, R. T. Di Giulio, E. Casman, and Bernhardt. 2009. Decreasing Uncertainties in Assessing Environmental Exposure, Risk, and Ecological Implications of Nanomaterials. *Environ. Pollut.* **43**: 6458–6462. doi:10.1021/es8034544

- Williamson, S. J., L. a Houchin, L. Mcdaniel, and J. H. Paul. 2002. Seasonal Variation in Lysogeny as Depicted by Prophage Induction in Tampa Bay, Florida. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4307–4314. doi:10.1128/AEM.68.9.4307
- Willner, D., and P. Hugenholtz. 2013. From deep sequencing to viral tagging: Recent advances in viral metagenomics. *BioEssays* **35**: 436–442. doi:10.1002/bies.201200174
- Winget, D. M., and K. E. Wommack. 2009. Diel and daily fluctuations in virioplankton production in coastal ecosystems. *Environ. Microbiol.* **11**: 2904–2914. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02038.x
- Winnepenninckx, B. T., T. Backeljau, and R. De Wachter. 1993. Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends Genet.* **9**: 407. doi:10.1016/0168-9525(93)90102-N
- Winter, C., T. Bouvier, M. G. Weinbauer, and T. F. Thingstad. 2010. Trade-offs between competition and defense specialists among unicellular planktonic organisms: the “killing the winner” hypothesis revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**: 42–57. doi:10.1128/MMBR.00034-09
- Winter, C., G. J. Herndl, and M. G. Weinbauer. 2004. Diel cycles in viral infection of bacterioplankton in the North Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* **35**: 207–216. doi:10.3354/ame035207
- Wommack, K. E., and R. R. Colwell. 2000. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 69–114. doi:10.1128/MMBR.64.1.69-114.2000
- Xiu, Z., Q. Zhang, H. L. Puppala, V. L. Colvin, and P. J. J. Alvarez. 2012a. Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. *Nano Lett.*
- Xiu, Z., Q. Zhang, H. L. Puppala, V. L. Colvin, and P. J. J. Alvarez. 2012b. Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. *Nano Lett.* **12**: 4271–4275.
- Yang, J. L., Y. F. Li, X. Liang, and others. 2016. Silver Nanoparticles Impact Biofilm Communities and Mussel Settlement. *Sci. Rep.* **6**: 1–9. doi:10.1038/srep37406
- Yentsch, C. S., and D. W. Menzel. 1963. A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep. Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* **10**: 221–231.
- Yilmaz, A. B., A. Yanar, and E. N. Alkan. 2017. Review of heavy metal accumulation on aquatic environment in Northern East Mediterranean Sea part I: Some essential metals. *Rev. Environ. Health* **32**: 119–163. doi:10.1515/reveh-2016-0065
- Young, J. N., and F. M. M. Morel. 2015. Biological oceanography: The CO₂ switch in diatoms. *Nat. Clim. Chang.* **5**: 722–723. doi:10.1038/nclimate2691
- Zeidner, G., J. P. Bielawski, M. Shmoish, D. J. Scanlan, G. Sabehi, and O. Béjà. 2005. Potential photosynthesis gene recombination between *Prochlorococcus* and *Synechococcus* via viral intermediates. *Environ. Microbiol.* **7**: 1505–1513. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00833.x
- Zhang, J., D. Gilbert, A. J. Gooday, and others. 2010. Natural and human-induced hypoxia and consequences for coastal areas: Synthesis and future development. *Biogeosciences* **7**: 1443–1467. doi:10.5194/bg-7-1443-2010
- Zhang, J., A. Ormala-Odegrip, J. Mappes, and J. Laakso. 2014. Top-down effects of a lytic bacteriophage and protozoa on bacteria in aqueous and biofilm phases. *Ecol. Evol.* **4**: 4444–4453. doi:10.1002/ece3.1302
- Zhang, R., X. Xia, S. C. K. Lau, C. Motegi, M. G. Weinbauer, and N. Jiao. 2013. Response of bacterioplankton community structure to an artificial gradient of pCO₂ in the Arctic Ocean. *Biogeosciences Discuss.* **10**: 3679–3689. doi:10.5194/bgd-9-10645-2012
- Zhang, W., B. Xiao, and T. Fang. 2018. Chemical transformation of silver nanoparticles in aquatic environments: Mechanism, morphology and toxicity. *Chemosphere* **191**: 324–334. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.10.016
- Zheng, X., J. Wang, Y. Chen, and Y. Wei. 2018. Comprehensive analysis of transcriptional and proteomic profiling reveals silver nanoparticles-induced toxicity to bacterial denitrification. *J. Hazard. Mater.* **344**: 291–298. doi:10.1016/j.jhazmat.2017.10.028
- Zubkov, M. V., P. H. Burkil, and J. N. Topping. 2007. Flow cytometric enumeration of DNA-stained oceanic planktonic protists. *J. Plankton Res.* **29**: 79–86. doi:10.1093/plankt/fbl059