



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΕΡΕΎΝΩΝ

Διιδουματικό Ποόγοαμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

Περιβαλλοντική Βιολογία – Διαχείριση Χερσαίων και Θαλάσσιων Βιολογικών Πόρων

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



Συγκοιτική ανάλυση γεωχημικών μεταβλητών και μακοοπανιδικών και μικοοβιακών κοινοτήτων σε λιμνοθαλάσσια οικοσυστήματα

Χριστίνα Παυλούδη

Εξεταστική επιτροπή:	Δϱ. Ιωάννης Καρακάσης (Καθηγητής)
	Δο. Χοήστος Αοβανιτίδης (Ερευνητής Β΄)
	Δο. Γεώογιος Κωτούλας (Εοευνητής Α')

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2012





UNIVERSITY OF CRETE FACULTY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY DEPARTMENT OF BIOLOGY HELLENIC CENTRE FOR MARINE RESEARCH

Joint Postgraduate Program Environmental Biology – Management of Terrestrial and Marine Resources

MASTER OF SCIENCE THESIS



Comparative analysis of geochemical variables, macrofaunal and microbial communities in lagoonal ecosystems

Christina Pavloudi

Board of examination:	Dr. Ioannis Karakassis (Professor)
	Dr. Christos Arvanitidis (Senior Researcher)
	Dr. Georgios Kotoulas (Head of Research)

HERAKLION 2012

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας δε θα ήταν δυνατή χωρίς τη βοήθεια πολλών ανθρώπων.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη διδακτορική φοιτήτρια Κατερίνα Βασιλειάδου για την υποδοχή της στο εργαστήριο και για τη βοήθειά της αυτά τα χρόνια, που ήταν τόσο πρακτικής όσο και συναισθηματικής φύσης. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη διδάκτορα Ναυσικά Παπαγεωργίου για τη βοήθεια, την υποστήριξη και τις χρήσιμες συμβουλές της.

Θα ήθελα να ευχαφιστήσω τη διδακτοφική φοιτήτφια Ιωάννα Καλαντζή για την καθοδήγησή της για την εκτίμηση των συγκεντφώσεων των βαφέων μετάλλων και στοιχείων και τον καθηγητή Σπύφο Πεφγαντή από το τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κφήτης που επέτφεψε τη χφήση του ICP-MS για τη συγκεκφιμένη μέτφηση. Επίσης, θα ήθελα να ευχαφιστήσω τη διδακτοφική φοιτήτφια Κατεφίνα Σκαφάκη για τη βοήθεια και τις συμβουλές της σχετικά με τις μοφιακές μεθόδους ανάλυσης μικφοβιακών κοινοτήτων.

Ένα μεγάλο ευχαφιστώ στο διδάκτοφα Γιώφγο Κουβαφάκη για τη βοήθειά του, ήταν ο άνθφωπος κλειδί στο τμήμα Χημείας, πάντα πφόθυμος να βοηθήσει και να με συστήσει στους ανθφώπους που χφειαζόμουν.

Ευχαριστώ πολύ τα μέλη του εργαστήριου για το οικογενειακό κλίμα που έχουμε δημιουργήσει και κάνει την καθημερινότητά μας να κυλάει τόσο ευχάριστα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής και ειδικότερα τον καθηγητή Ιωάννη Καρακάση για τις συμβουλές και τις υποδείξεις του, τον ερευνητή Γεώργιο Κωτούλα για την εμπιστοσύνη του, την εφευνήτφια Έλενα Σαφφοπούλου που με εισήγαγε στις μεθόδους αλληλούχισης νέας γενιάς και φυσικά τον εφευνητή Χφήστο Αφβανιτίδη, γιατί χωφίς αυτόν τίποτα από τα παφακάτω δε θα είχε πφαγματοποιηθεί.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την αμέριστη ηθική και υλική συμπαράστασή τους που ήταν ιδιαίτερα χρήσιμη και απαραίτητη όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ПЕРІЛНѰН	1
ABSTRACT	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	14
1. Επισκόπηση πεδίου και επιλογή	
των σταθμών δειγματοληψίας	14
2. Μέθοδοι δειγματοληψίας	16
3. Επεξεργασία δειγμάτων για προσδιορισμό	
της συγκέντρωσης του ολικού ανηγμένου ανόργανου θείου	18
4. Επεξεργασία δειγμάτων για προσδιορισμό σωματιδιακού	
οργανικού άνθρακα (POC), συγκέντρωσης χλωροπλαστικών	
χοωστικών (χλωοοφύλλη-α και φαιοχοωστικές) και για την	
ανάλυση της κοκκομετοικής σύστασης του ιζήματος	19
5. Επεξεργασία δειγμάτων για προσδιορισμό συγκέντρωσης	
θρεπτικών αλάτων (NH4, PO4, NO3, NO2, SiO2)	20
6. Επεξεργασία δειγμάτων για προσδιορισμό της	
συγκέντρωσης των βαρέων μετάλλων	21
7. Επεξεργασία δειγμάτων μακροπανίδας	23
8. Επεξεργασία δειγμάτων για εξαγωγή και	
πολλαπλασιασμό μικοοβιακού γενετικού υλικού	24
9. Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων	25
ΑΠΟΤΈΛΕΣΜΑΤΑ	30
1. Αβιοτικές παράμετροι	30
1.1 Φυσικοχημικές παράμετροι	30

1.2 Βαθέα μέταλλα και στοιχεία	32
1.2.1 Τοξικότητα των μετάλλων –	
Εφαρμογή των Κριτηρίων Ποιότητας Ιζήματος	36
1.2.2 Βιοδιαθεσιμότητα των μετάλλων	40
1.3 Πρότυπο διανομής αβιοτικών παραμέτρων	42
2. Βιοτικές παράμετροι	48
2.1 Μακοοπανίδα	48
2.2. Μικοοβιακή ποικιλότητα	49
3. Συσχετίσεις παραμέτρων	61
3.1 Συσχετίσεις αβιοτικών – βιοτικών παραμέτρων	61
3.2 Αλληλοσυσχετίσεις βιοτικών παραμέτρων	69
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	71
1. Περιβάλλον	71
2. Βαρέα μέταλλα και στοιχεία	72
3. Συνευρέσεις πολυχαίτων	77
4. Μικοοβιακές συνευρέσεις	80
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	88
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	90
ПАРАРТНМА	110

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι λιμνοθάλασσες είναι γενικά εμπλουτισμένα ενδιαιτήματα με πολύ ασταθείς πεφιβαλλοντικές συνθήκες, εξαιτίας του πεφιοφισμού τους από την ανοιχτή θάλασσα και του μικφού βάθους τους. Οι συχνές διακυμάνσεις των αβιοτικών παφαμέτφων πφοκαλούν σημαντικές μεταβολές στην αφθονία και την κατανομή των οφγανισμών. Αυτή η σχέση έχει μελετηθεί εκτενώς όσον αφοφά τους μακφοπανιδικούς οφγανισμούς, αλλά όχι επαφκώς για τους μικφοοφγανισμούς των λιμνοθαλασσών.

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση των προτύπων κατανομής της βιοποικιλότητας των μικροβιακών κοινοτήτων, η συσχέτισή τους με περιβαλλοντικές μεταβλητές περιλαμβανομένων των βαρέων μετάλλων και συναφών χημικών στοιχείων, και η αλληλοσυσχέτισή τους με τα αντίστοιχα μακροπανιδικά.

Για το σκοπό αυτό, συλλέχθηκαν δείγματα ιζήματος από τέσσερις λιμνοθάλασσες του Αμβρακικού κόλπου (Ιόνιο Πέλαγος). Σε κάθε λιμνοθάλασσα επιλέχθηκαν δύο σταθμοί δειγματοληψίας, με διαφορετικό βαθμό επικοινωνίας με τη θάλασσας. Εκτιμήθηκε πληθώρα αβιοτικών παραμέτρων κάθε σταθμό, συμπεριλαμβανομένων για των συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων και στοιχείων. Συλλέχθηκαν δείγματα πολυχαίτων για τα οποία ακολούθησε ταξινομικός προσδιορισμός στο επίπεδο του είδους. Ακολούθησε η εξαγωγή μικροβιακού γενετικού υλικού από το ανώτερο στρώμα του ιζήματος, από το οποίο, με αλληλούχιση νέας γενιάς, εκτιμήθηκε η αφθονία και η ποικιλότητα των προκαρυωτών, βάσει της περιοχής V5-V6 του γονιδίου 16S rRNA.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι στο συγκεκριμένο λιμνοθαλάσσιο οικοσύστημα, οι μακροπανιδικές

συνευρέσεις δε φαίνεται να επηρεάζονται από τις ίδιες περιβαλλοντικές παραμέτρους που επηρεάζουν την κατανομή των μικροβιακών κοινοτήτων και επιπλέον, τα πρότυπα κατανομής των προκαρυωτών και πολυχαίτων δεν εμφάνισαν σημαντική συσχέτιση. Τόσο οι των μικροβιακές κοινότητες όσο και οι συνευρέσεις των πολυχαίτων επηρεάζονται από τη συνεργιστική δράση πολλαπλών αβιοτικών παραμέτρων, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση της περιβαλλοντικής πολλαπλών αιτιών (multicausal environmental severity δοιμύτητας hypothesis). Τέλος, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συνηγορούν στην άποψη της χρησιμοποίησης των μικροβιακών κοινοτήτων ως βιοδεικτών για την εκτίμηση της οικολογικής κατάστασης των λιμνοθαλάσσιων οικοσυστημάτων, κυρίως εξαιτίας της μεγάλης οργανισμικής και λειτουργικής ποικιλότητάς τους.

ABSTRACT

Lagoons are enriched habitats, with unstable environmental conditions caused by their confinement from the sea and their shallow depth. The frequent fluctuations of the abiotic parameters cause severe changes in the abundance and distribution of organisms. This relationship has been studied extensively for macrofaunal species, but not sufficiently for the lagoonal microbial diversity.

The aim of the present study was to explore the biodiversity patterns of microorganismic assemblages and to examine whether these patterns are associated with those of the contextual environmental parameters and the macrofaunal ones.

For this purpose, sediment samples were collected from four lagoons, located in Amvrakikos Gulf (Ionian Sea, Western Greece). In each lagoon, two sampling stations were chosen, with different connectivity degree with the sea. A number of abiotic parameters were measured for every station, including the sediment concentrations of heavy metals and elements. Polychaete samples were collected and identified at the species level. Microbial DNA was extracted from the sediment upper layer (0-2cm) and was further processed through deep sequencing of the V5-V6 region of the 16S rRNA gene by next generation sequencing.

The results of this study suggest that, in the studied lagoonal ecosystem, the macrofaunal assemblages do not seem to be affected by the sane environmental parameters the affect the distribution of the microbial community, and that the distribution patterns of the prokaryotes and the polychaetes are not correlated. Both the microbial communities and the polychaete assemblages are affected by the synergistic action of multiple abiotic parameters, denoting the importance of the «multicausal

environmental severity hypothesis» for these ephemeral ecosystems. Finally, the findings of this study provide support to the aspect of the use of the microbial communities as bioindicators of the ecological status of the lagoonal ecosystems; their advantage is largely owed to their larger organismic and functional diversity.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Μικροβιακή Οικολογία έχει ως αντικείμενο τις αλληλεπιδράσεις των μικροοργανισμών μεταξύ τους αλλά και με το περιβάλλον. Οι παραδοσιακές πρακτικές για την απομόνωση και το χαρακτηρισμό διάφορα μέσα περιλαμβάνουν μικοοοογανισμών από τις υγρές καλλιέργειες μικροοργανισμών εμπλουτισμού με θρεπτικό μέσο. Ένα από τα θεμελιώδη προβλήματα αυτής της προσέγγισης είναι ότι πολλοί μικοοοργανισμοί από το περιβάλλον δεν μπορούν να απομονωθούν ή/και να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο και έτσι δεν υπάρχουν τόσες ταξινομικές περιγραφές ειδών όσες θα ήταν επιθυμητό. Οι τεχνικές αυτές σήμερα θεωρούνται ξεπερασμένες διότι πολλές φορές η ανάπτυξη συγκεκοιμένων οργανισμών στο θρεπτικό μέσο είναι τυχαία (enrichment και επιπλέον είναι αδύνατον κάποιοι μικροοργανισμοί να bias) αναπτυχθούν κάτω από εργαστηριακές συνθήκες. Επίσης με τις μεθόδους αυτές δεν μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με ακρίβεια η παρουσία συγκεκοιμένων μικοοοργανισμών στο αρχικό δείγμα.

Τα τελευταία χρόνια, γίνονται προσπάθειες για ανάπτυξη και εφαρμογή νέων, πρωτοποριακών μεθόδων καλλιέργειας (Glöckner et al., 2012), αλλά υπάρχουν ακόμα αρκετά εμπόδια στην ανάπτυξη αυτού του τομέα. Ένας τρόπος για να ξεπεραστεί το στάδιο της καλλιέργειας, είναι να χρησιμοποιηθεί μία από τις τεχνικές που μπορούν να εφαρμοστούν χωρίς την καλλιέργεια του δείγματος, όπως είναι για παράδειγμα οι μικροσυστοιχίες (microarrays), η κλωνοποίηση γονιδιωμάτων από το περιβάλλον (clone libraries) και η πυροαλληλούχιση (pyrosequencing) (van Straalen & Roelofs, 2006).

Η συχνότερα χρησιμοποιούμενη μεθοδολογία ταξινόμησης των μικροοργανισμών, όταν αυτοί προσεγγίζονται γενετικά, βασίζεται στο

γονίδιο που κωδικοποιεί τη μικρή υπομονάδα του ριβοσωμικού RNA (Small SubUnit of Ribosomal RNA: SSU rRNA) και συγκεκριμένα στο 16S rDNA (Woese, 1987; van Straalen & Roelofs, 2006). Οι μικροβιολόγοι συμφωνούν ότι μία διαφορά της τάξης του 3% στο σύνολο της αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί το 16S rRNA, θεωρείται το όριο για τον καθορισμό του είδους. Αυτό τεκμηριώνεται από το γεγονός ότι εάν το γενωμικό DNA δύο βακτηρίων υβριδίζεται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 70%, το αντίστοιχο του 16S πάντα διαφέρει λιγότερο από 3% (Madigan et al., 2003). Εφόσον το «κατώφλι» του γενωμικού υβοιδισμού θεωρείται έγκυρο όριο για τον καθορισμό του είδους, συνεπάγεται ότι δύο οργανισμοί που διαφέρουν στην αλληλουχία του 165 για περισσότερο από 3% μπορούν να θεωρούνται πάντα διαφορετικά είδη. Ωστόσο, το αντίθετο δεν ισχύει, καθώς υπάρχουν πολλά έγκυρα είδη που διαφέρουν λιγότερο από 3% στην αλληλουχία του 16S. Για παράδειγμα, στο γένος Bacillus υπάρχει μεγάλο ποσοστό ομοιότητας μεταξύ των ειδών και μάλιστα ορισμένα είδη (Bacillus cereus και Bacillus anthracis) έχουν πανομοιότυπες αλληλουχίες 16S (van Straalen & Roelofs, 2006). Εξαιτίας της ταξινομικής διαγνωστικής αξίας του γονιδίου που κωδικοποιεί το 16S rRNA, ένας υπερβολικά μεγάλος αριθμός αλληλουχιών έχει αποθηκευτεί σε διεθνείς βάσεις νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (λ.χ. GenBank, EMBL).

Είναι γνωστό ότι οι μικροοργανισμοί υποβοηθούν αλλά και διεξάγουν, σε μεγάλο βαθμό, πολύπλοκες αλλά και χρήσιμες βιογεωχημικές διεργασίες, όπως είναι λ.χ. η πρωτογενής παραγωγή και οι κύκλοι των θρεπτικών, που είναι βασικές για τη διατήρηση του πλανήτη σε βιώσιμη κατάσταση (Falkowski et al., 2008; Glöckner et al., 2012). Μολονότι ο βασικός ρόλος των μικροοργανισμών στους βιογεωχημικούς κύκλους είναι γνωστός εδώ και καιρό, μόλις πρόσφατα αποκτήθηκε μία πληρέστερη εικόνα της αρχιτεκτονικής και της ποικιλότητας των γενετικών συστημάτων που είναι υπεύθυνα για την κωδικοποίηση των

υπεύθυνων γονιδίων για τη διεξαγωγή τους. Αυτό επιτεύχθηκε με τη χρήση τεχνικών μεταγονιδιωματικής και επακόλουθων μελετών για τη λειτουργία των μικροοργανισμών. Έτσι, έχουν αρχίσει να περιγράφονται οικοσυστήματα και έχει αποκαλυφθεί η ολόκληρα έκταση της μικοοβιακής ποικιλότητας ορισμένες από και τις μεταβολικές δυνατότητες των μικοοβιακών κοινοτήτων (λ.χ. Global Ocean Survey: Rusch et al., 2007). Η αλληλούχιση των γονιδίων που κωδικοποιούν το 16S rRNA από περιβαλλοντικά δείγματα έχει βοηθήσει στην εκτίμηση της απόστασης που πρέπει να διανυθεί ώστε να περιγραφεί η απέραντη ποικιλότητα των μικοοοργανισμών στον πλανήτη Γη (Lozupone & Knight, 2007). Με κάθε ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων νέες αλληλουχίες ανιχνεύονται, αλλά το πλατώ της καμπύλης παρατηρούμενων ειδών δεν έχει προς το παρόν προσεγγιστεί, ακόμα και για μικροοργανισμούς από κοινά ενδιαιτήματα όπως τα ιζήματα των λιμνών και τα εδάφη των δασών (van Straalen & Roelofs, 2006).

Ανάμεσα στις ερευνητικές προτεραιότητες των επόμενων χρόνων, περίοπτη θέση καταλαμβάνει η ανάπτυξη νέων τεχνικών και ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων τους με ποικίλα δεδομένα από αβιοτικά και βιοτικά επίπεδα. Ο καθορισμός των περιβαλλοντικών παραγόντων που ελέγχουν και καθοδηγούν το μικροβιακό μεταβολισμό και τις οικολογικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών, θα αποκαλύψει την επίδρασή τους στη λειτουργία των οικοσυστημάτων (Glöckner et al., 2012), καθιστώντας δυνατό το χειρισμό τους και την πρόβλεψη της οικολογικής κατάστασης δυναμικών οικοσυστημάτων υψηλής μικοοβιακής ποικιλότητας, όπως είναι για παράδειγμα οι παράκτιες λιμνοθάλασσες.

Οι παράκτιες λιμνοθάλασσες είναι σημαντικά υδάτινα περιβάλλοντα, τα οποία εξαιτίας της γειτνίασής τους με την ξηρά και τη θάλασσα, είναι ιδιαίτερα ευάλωτα σε ανθρωπογενείς επιδράσεις και

κυρίως στη ρύπανση (Bellan, 1972; Stora & Arnoux, 1983; Benlloch et al., 1995). η λειτουργικότητα Η δομή και των λιμνοθαλάσσιων οικοσυστημάτων καθορίζονται από σύμπλεγμα αλληλεπιδράσεων μεταξύ παραγόντων περιβαλλοντικής πίεσης (stress) και φυσικής διατάραξης (disturbance) κυρίως από τη ροή υλικών από το χερσαίο και το θαλάσσιο περιβάλλον αλλά και την ατμόσφαιρα (Reizopoulou et al., 1996; Arvanitidis et al., 1999; Viaroli et al., 2007). Αρκετές λιμνοθάλασσες τελούν εκμετάλλευση ψυχαγωγικούς σκοπούς, υπό για αλιεία ή υδατοκαλλιέργειες και επομένως η οικολογική τους κατάσταση έχει σημαντικές οικονομικές συνέπειες. Σε περιπτώσεις έντονης ρύπανσης, οι λιμνοθάλασσες μπορεί να οδηγηθούν σε ανοξικές (δυστροφικές) κρίσεις, κατά τις οποίες στα ιζήματα αλλά και στη στήλη του νερού επικρατούν αναερόβιες συνθήκες και υψηλές συγκεντρώσεις υδρόθειου (αναγωγικές συνθήκες), οδηγώντας σε καταστροφικές οικολογικές και αισθητικές συνέπειες. Σε αυτά τα οικοσυστήματα, κύριοι αποικοδομητές της οργανικής ύλης θεωρούνται τα βακτήρια (Nowicki & Nixon, 1985; Benlloch et al., 1995).

Τα βασικότερα χαρακτηριστικά των λιμνοθαλασσών της Μεσογείου είναι το μικρό βάθος, το μαλακό υπόστρωμα και η έντονη επίδραση από τις ανθρωπογενείς δραστηριότητες. Η εισροή θρεπτικών από τα ποτάμια και ο οργανικός εμπλουτισμός εξαιτίας των ανθρώπινων δραστηριοτήτων τις καθιστούν συνήθως πλούσιες σε θρεπτικά, ενώ το μικρό τους βάθος ευνοεί την καλή ανάμιξη της στήλης του νερού κι επομένως την κατανομή των θρεπτικών, λόγω της επίδρασης του κυματισμού (Guelorget & παραπάνω χαρακτηριστικά Perthuisot, 1983). Τα καθιστούν τις λιμνοθάλασσες ως δυναμικά και απρόβλεπτα συστήματα στα οποία επικρατούν ευμετάβλητες περιβαλλοντικές συνθήκες που επηρεάζουν τη σύνθεση και την κατανομή των βιοκοινοτήτων τους (Arvanitidis et al., 2005).

Η εκτίμηση της χημικής ούπανσης είναι πολύ σημαντική για τα λιμνοθαλάσσια οικοσυστήματα (Accornero et al., 2008). Οι ουπαντές σε αυτά τα συστήματα μεταφέρονται κυρίως μέσω των ποταμών ή/και μέσω άμεσων εκροών από γειτονικά εκβολικά συστήματα (Fabiano et al., 1994; Chapman & Wang, 2001), και το ίζημα καθίσταται ως η πιο συμπυκνωμένη φυσική «δεξαμενή» μετάλλων στα υδάτινα περιβάλλοντα (Daskalakis & O'Connor, 1995; Ehrlich, 1997; Köster & Meyer-Reil, 2001). Καίτοι τα βαρέα μέταλλα και τα υπόλοιπα χημικά στοιχεία απαντώνται στο φλοιό της Γης και είναι παρόντα σε όλα τα οικοσυστήματα, οι συγκεντρώσεις τους έχουν αυξηθεί δραματικά εξαιτίας των ανθρωπογενών δραστηριοτήτων (Bethoux et al., 1990; Szefer et al., 1999; Accornero et al., 2008) και έχουν κατά συσχετιστεί επιδράσεις κανόνα με αρνητικές στους ζωντανούς οργανισμούς (Gadd, 2010).

Τα χημικά στοιχεία που πεφιγφάφονται ως «βαφέα μέταλλα» είναι μία ομάδα χωφίς ακφιβή οφισμό (Sterritt & Lester, 1980). Δεκατφία μέταλλα και μεταλλοειδή (Ag, As, Be, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Sb, Se, Tl, Zn) θεωφούνται ως πφωταφχικοί φυπαντές (Sparks, 2005) και μποφεί να πφοέφχονται τόσο από φυσικές πηγές (λ.χ. πετφώματα και οφυκτά) όσο και ανθφωπογενείς εισφοές (λ.χ. γεωφγία, μεταλλουφγία, παφαγωγή ενέφγειας, οφυχεία) (Landa, 2005; Gilmour & Riedel, 2009).

Είναι γνωστό ότι τα βακτήρια αντιδρούν με μέταλλα και ορυκτά σε φυσικά και τεχνητά περιβάλλοντα, και καθορίζουν τη μορφή και την κατανομή των μετάλλων στο περιβάλλον, έχοντας κυρίαρχο ρόλο στη μετατροπή, την ενεργοποίηση και την ελάττωση της τοξικότητάς τους (Sterritt & Lester, 1980; Macalady & Banfield, 2003; Gadd, 2004, 2007, 2010; Violante et al., 2008; Ehrlich & Newman, 2009). Όμως, τα βακτήρια υπόκεινται στην τοξικότητα των μετάλλων, τα οποία δύνανται να επηρεάζουν την αύξηση, τη δραστηριότητα και την επιβίωσή τους (Leland et al., 1974; Dulka & Risby, 1976; Gadd & Griffiths, 1977; Kennish, 1998). Η

τοξικότητα των βαφέων μετάλλων στα φυτά (Mishra & Kar, 1974) και τα ζώα (Lee, 1972; Schroeder & Darrow, 1973) είναι αποδεδειγμένη όσον αφοφά τα βακτήφια, οι αποκφίσεις τους είναι διαφοφετικές ανάλογα με το είδος (Doyle et al., 1975) αλλά έχουν παφατηφηθεί κάποια συγκεκφιμένα πφότυπα απόκφισης. Για παφάδειγμα έχει βφεθεί ότι τα κατά Gram αφνητικά bacteria είναι πιο ανθεκτικά από τα κατά Gram θετικά (Babich & Stotzky, 1977).

Σε ένα τόσο δυναμικό περιβάλλον, όπως αυτό των λιμνοθαλασσών, εκτός από τη διερεύνηση της επίδρασης των βαρέων μετάλλων στους μικροοργανισμούς, έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον ο καθορισμός των φυσικών, χημικών και βιολογικών παραγόντων που συσχετίζονται με τις μικοοβιακές συνευρέσεις και η απόκρισή τους στις αλλαγές των παραγόντων αυτών (Lozupone & Knight, 2007). Εξίσου ενδιαφέρουσα είναι η κατανόηση των χωρικών και χρονικών προτύπων κατανομής της βιοποικιλότητας των μικοοοργανισμών (Logue & Lindström, 2008; Lundin et al., 2012). Το ενδιαφέρον για τα χωρικά πρότυπα κατανομής των προκαρυωτών έχει τις ρίζες του στις αρχές του εικοστού αιώνα (Baas-Becking, 1934), διότι η κατανόηση των διεργασιών που καθοδηγούν τη κατανομή των μικοοοογανισμών παρέχει σημαντικές χωοική πληροφορίες σχετικά με τους πιθανούς μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την πολυπλοκότητα και τη διατήρηση της συνολικής βιοποικιλότητας, θέτοντας έτσι τη βάση για την καλύτερη διαχείριση του οικοσυστήματος (Rosenzweig, 1995; Ramette & Tiedje, 2007).

Μέχοι ποόσφατα, οι μελέτες για τα χωοικά ποότυπα κατανομής των ειδών για κύοιο αντικείμενο μελέτης τους μακοοοργανισμούς, σχεδόν αγνοώντας τους μικοοοργανισμούς (Martiny et al., 2006), παρόλο που αποτελούν το πλέον άφθονο, ποικίλο αλλά και λειτουργικό οικολογικό συστατικό του πλανήτη (Whitman et al., 1998; Torsvik et al., 2002). Αν και έχει τεκμηριωθεί η ύπαρξη βιογεωγραφικών προτύπων για ζώα και φυτά,

είναι ακόμα υπό διεφεύνηση το κατά πόσο ισχύουν ανάλογα πφότυπα και για τα βακτήφια και τα αφχαία (Hedlund & Staley, 2004). Μέχρι πφόσφατα, μόνο ένας μικφός αφιθμός μελετών είχε διεφευνήσει την πιθανή επίδφαση της πεφιβαλλοντικής ετεφογένειας, της γεωγφαφικής απόστασης και των αλληλεπιδφάσεών τους στα πφότυπα κατανομής των μικφοοφγανισμών (Green & Bohannan, 2006; Martiny et al., 2006). Επιπλέον, δεν έχει μελετηθεί η ύπαφξη βιογεωγφαφικών πφοτύπων για τους μικφοοφγανισμούς σε μεγάλο εύφος οικοσυστημάτων ή πεφιοχών και ως εκ τούτου η διαθέσιμη πληφοφοφία βασίζεται κυφίως σε βακτηφιακούς πληθυσμούς από χεφσαία ενδιαιτήματα (Martiny et al., 2006). Πφόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι χωφικές πτυχές και τα γεωγφαφικά φφάγματα είναι πιο σημαντικά για τη σύνθεση της μικφοβιακής κοινότητας από ότι θεωφούνταν μέχφι σήμεφα (Whitaker et al., 2003), αλλά απαιτείται πεφαιτέφω σχετική έφευνα.

Ως περιοχή μελέτης της παρούσας εργασίας επιλέχθηκε το σύμπλεγμα λιμνοθαλασσών του Αμβρακικού κόλπου (Ιόνιο Πέλαγος). Ο Αμβρακικός κόλπος είναι ο μεγαλύτερος κόλπος της Δυτικής Ελλάδας και σύμφωνα με την Κ.Υ.Α. 16.611/93 έχει υπαχθεί σε καθεστώς προστασίας, σε εφαρμογή της διεθνούς σύμβασης Ramsar που αφορά την προστασία και διατήρηση των υδρόβιων και παρυδάτιων οργανισμών, ενώ έχει ενταχθεί και στο δίκτυο «Φύση 2000» (Natura 2000).

Στόχοι της παρούσας εργασίας ήταν οι εξής:

- Η διεφεύνηση των προτύπων κατανομής των βαφέων μετάλλων και στοιχείων και η συσχέτισή τους με πεφιβαλλοντικές μεταβλητές.
- Η διεφεύνηση των προτύπων κατανομής των μακροπανιδικών συνευρέσεων και η συσχέτισή τους με πεφιβαλλοντικές μεταβλητές.
- 3. Η διεφεύνηση των προτύπων κατανομής των μικροβιακών κοινοτήτων, η συσχέτισή τους με πεφιβαλλοντικές μεταβλητές

πεφιλαμβανομένων των βαφέων μετάλλων και συναφών χημικών στοιχείων, και η αλληλοσυσχέτισή τους με τα αντίστοιχα μακφοπανιδικά.

Οι υποθέσεις που ελέγχθηκαν ήταν οι ακόλουθες:

 Η₀₁: Η μη ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ βιοτικών και αβιοτικών παραμέτρων.

Η11: Ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ βιοτικών και αβιοτικών παραμέτρων.

Προσέγγιση: Στατιστική συσχέτιση των μητρών ομοιότητας μεταξύ των χωρικών προτύπων των παραπάνω μεταβλητών (αβιοτικές, βιοτικές) (Λογισμικό PRIMER, αλγόριθμοι non-metric MDS, BIOENV, RELATE).

 Η₀₂: Η μη ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ μικρο- και μακροοργανισμικών συνευρέσεων.

H12: Υπαρξη συσχέτισης μεταξύ μικρο- και μακροοργανισμικών συνευρέσεων.

Προσέγγιση: Στατιστική συνάφεια μεταξύ των χωρικών προτύπων που λαμβάνονται από τις παραπάνω παραμέτρους με τη σύγκριση των αντίστοιχων μητρών ομοιότητας (Λογισμικό PRIMER, αλγόριθμος second-stage MDS).

3. Η₀₃: Η βέλτιστη οδός για την εκτίμηση της οικολογικής κατάστασης των λιμνοθαλασσών, όπως αυτή αποτυπώνεται με τα χωρικά πρότυπα των αβιοτικών παραμέτρων, επιτυγχάνεται με τη συνάφεια των προτύπων αυτών με τα αντίστοιχα των μακροβενθικών συνευρέσεων και όχι των μικροβιακών.

Η₁₃: Η βέλτιστη οδός για την εκτίμηση της οικολογικής κατάστασης των λιμνοθαλασσών, όπως αυτή αποτυπώνεται με τα χωρικά πρότυπα των αβιοτικών παραμέτρων, επιτυγχάνεται

με τη συνάφεια των προτύπων αυτών με τα αντίστοιχα των μικροβιακών συνευρέσεων.

Ποοσέγγιση: Στατιστική συνάφεια μεταξύ των χωοικών που λαμβάνονται από τις τοεις παραπάνω παραμέτρους με *a priori* ορισμό των παραγόντων: λιμνοθάλασσα, τοποθεσία, και μη-παραμετοική ανάλυση διασποράς (Λογισμικό PRIMER, αλγόριθμος PERMANOVA).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Επισκόπηση πεδίου και επιλογή των σταθμών δειγματοληψίας

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, επιλέχθηκε ως σύστημα μελέτης το σύμπλεγμα των λιμνοθαλασσών βορειοδυτικά του Αμβρακικού κόλπου (Ιόνιο πέλαγος, Δυτική Ελλάδα). Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε το Φεβρουάριο του 2011.

Ως περιοχές μελέτης επιλέχθηκαν τέσσερις λιμνοθάλασσες: Λογαρού, Τσουκαλιό, Μάζωμα, Τσοπέλι. Σε κάθε λιμνοθάλασσα, επιλέχθηκαν δύο σταθμοί δειγματοληψίας με διαφορετικό βαθμό επικοινωνίας με τη θάλασσα: ο ένας κοντά στο κανάλι επικοινωνίας με τον Αμβρακικό κόλπο και ο άλλος σε γειτνίαση με τη χέρσο (εικόνα 1).



Εικόνα 1: Οι σταθμοί δειγματοληψίας.

Το σύμπλεγμα των λιμνοθαλασσών βορειοδυτικά του κόλπου του Αμβρακικού σχηματίζεται στο δέλτα των ποταμών Άραχθου και Λούρου (Poulos et al., 1993, 1995; Reizopoulou & Nicolaidou, 2004; Βασιλειάδου,

2008). Τα δύο συστήματα (ποτάμι, θάλασσα) διαχωρίζονται από μια λεπτή λωρίδα ξηράς.

Το Τσουκαλιό και η Λογαφού διαχωφίζονται από τη θάλασσα με φφάγματα άμμου που έχουν στενά ανοίγματα-κανάλια, επιτφέποντας έτσι πεφιοφισμένη αλλά ικανή ανταλλαγή υδάτινων μαζών. Τα βάθη των λιμνοθαλασσών Τσουκαλιό και Λογαφού είναι 0,6-1,8 μέτφα και 0,85-1,5 μέτφα αντίστοιχα (Kormas et al., 2001; Reizopoulou & Nicolaidou, 2004). Το υπόστφωμα είναι ιλυώδες σε όλες τις λιμνοθάλασσες με διάφοφες πφοσμίξεις άμμου.

Το Τσοπέλι είναι μία μικοή λιμνοθάλασσα στις εκβολές του ποταμού Λούρου, χωρίς εκτεταμένες εμφανείς πηγές ούπανσης. είχε χαρακτηριστεί ως λιμνοθάλασσα καλής οικολογικής ποιότητας (Reizopoulou & Nicolaidou, 2007) και έτσι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως περιοχή αναφοράς. Σε κοντινή απόσταση από το Τσοπέλι, στο δυτικό τμήμα του Αμβρακικού κόλπου, εκτείνεται το Μάζωμα.

Η είσοδος γλυκού νεφού στις λιμνοθάλασσες είναι εποχιακή, ενώ δεν έχει παφατηφηθεί σοβαφή πηγή πεφιβαλλοντικής πίεσης (stress), σύμφωνα με αναφοφές των Reizopoulou και Nicolaidou (Reizopoulou & Nicolaidou, 2004). Εκτεταμένες και ημι-εντατικού τύπου υδατοκαλλιέφγειες, αλιεία και γεωφγία είναι μεφικές από τις ανθφωπογενείς επιδφάσεις που δέχονται μόνιμα αυτές οι λιμνοθάλασσες (Reizopoulou & Nicolaidou, 2004).

Οι λιμνοθάλασσες του Αμβρακικού εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία θερμοκρασιών και αλατότητας, που σχετίζονται με το βαθμό περιορισμού (confinement) τους από τη θάλασσα. Η αλατότητα και η θερμοκρασία παρουσιάζουν εποχιακό πρότυπο (Reizopoulou & Nicolaidou, 2004).

2. Μέθοδοι δειγματοληψίας

Η συλλογή των δειγμάτων μακοοπανίδας έγινε με τη χρήση δειγματολήπτη τύπου πυρήνα (box corer), επιφάνειας 0,03 τ.μ. και βάθους εισχώρησης στο ίζημα τουλάχιστον 25 εκ., από το ειδικό για τις λιμνοθάλασσες αλιευτικό σκάφος (γαΐτα). Συνολικά, συλλέχθηκαν πέντε επαναληπτικά δείγματα (replicate units) για τον καθορισμό της μεταβλητότητας τόσο της σύνθεσης όσο και της κατανομής της βενθικής πανίδας μεταξύ των σταθμών. Από το σύνολο των μακοοπανιδικών ειδών, απομονώθηκαν πολύχαιτοι ζωντανοί αμέσως οι και τοποθετήθηκαν σε αιθανόλη 98%.

Επιπλέον, συλλέχθηκαν δείγματα ιζήματος με το δειγματολήπτη που προαναφέρθηκε και στη συνέχεια από τον πυρήνα λήφθηκαν υποδείγματα ιζήματος με μικρούς πυρηνολήπτες (εσωτερικής διαμέτρου 4,5 εκ.). Από το ανώτερο στρώμα ιζήματος των πυρηνοληπτών (0-2 εκ.), συλλέχθηκαν δείγματα για την εξαγωγή του μικροβιακού DNA (τρία επαναληπτικά δείγματα). Τα συγκεκριμένα δείγματα, μεγέθους περίπου 15 κ.εκ. το κάθε ένα, τοποθετήθηκαν σε σωλήνες τύπου falcon (falcon tubes) των 50 ml (Sarstedt, D-51588 Nümbrecht, Germany) και αποθηκεύτηκαν αμέσως στους -20°C, μέχρι την ανάλυσή τους.

Ακόμα, από τους πυφηνολήπτες συλλέχθηκαν δείγματα ιζήματος (τρία επαναληπτικά δείγματα) για προσδιορισμό του σωματιδιακού οργανικού άνθρακα (0-2 εκ.), της συγκέντρωσης των βαρέων μετάλλων και στοιχείων (0-2 εκ.) και της συγκέντρωσης των χλωροπλαστικών χρωστικών (χλωροφύλλη-α και φαιοχρωστικές) (0-2 εκ.), καθώς και για την ανάλυση της κοκκομετρικής σύστασης του ιζήματος (0-5 εκ.).

Επιπρόσθετα, λήφθηκαν δείγματα ιζήματος από τους πυρηνολήπτες για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ολικού ανηγμένου ανόργανου θείου. Δείγματα μεγέθους περίπου 8 κ.εκ. συλλέχθηκαν από

το ανώτερο στρώμα του ιζήματος και αμέσως τοποθετήθηκαν σε σωλήνες τύπου falcon (falcon tubes), κωνικού πάτου, των 50 ml (Sarstedt, D-51588 Nümbrecht, Germany) που περιείχαν 10 ml από διάλυμα 20% (w/v) Zinc Acetate. Τα δείγματα αναμείχθηκαν έτσι ώστε η συνολική επιφάνεια του ιζήματος να έρθει σε επαφή με το διάλυμα και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C, μέχρι την μετέπειτα επεξεργασία τους.

Δείγματα νερού συλλέχθηκαν από το ειδικό αλιευτικό σκάφος με φιαλών τύπου Niskin (5 lt) τα οποία στη συνέχεια χρήση χοησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση φυσικοχημικών παραμέτρων (προσδιορισμός σωματιδιακού οργανικού άνθρακα, του των χλωροπλαστικών χρωστικών καθώς και της συγκέντρωσης θρεπτικών αναλύσεις αλάτων). Για τις των *χλω*ροπλαστικών χρωστικών (χλωροφύλλη-α και φαιοχρωστικές) και του σωματιδιακού οργανικού άνθρακα της στήλης του νερού, 1 λίτρο νερού φιλτραρίστηκε με χρήση φίλτρων Whatman GF / F, διαμέτρου 2.5 εκ. Στη συνέχεια τα φίλτρα τυλίχτηκαν με αλουμινόχαρτο και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C μέχρι την περαιτέρω ανάλυσή τους στο εργαστήριο. Ακόμα, 200 ml φιλτραρισμένου νερού αποθηκεύτηκαν για κάθε ανάλυση των θρεπτικών αλάτων (NH4, PO₄, NO₃, NO₂, SiO₂) στους -20 °C.

Σε κάθε σταθμό δειγματοληψίας γίνονταν απευθείας μετοήσεις της θεομοκοασίας και του οξυγόνου, της αλατότητας και του pH στο υπεοκείμενο των ιζημάτων νεοό (με τη χοήση φοοητού πολυμέτοου WTW Multi 3420 SET G.). Ακόμα, γινόταν μέτοηση και του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του ιζήματος μέσω ενός ηλεκτοοδίου WTW που είχε πορηγουμένως εμβαπτιστεί σε διάλυμα Zobell (Zobell, 1946).

Ο χειοισμός των δειγμάτων ήταν ενδελεχής για την αποφυγή επιμολύνσεων.

3. Επεξεργασία δειγμάτων για προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ολικού ανηγμένου ανόργανου θείου

Τα δείγματα ιζήματος που είχαν τοποθετηθεί σε διάλυμα 20% (w/v) Zinc Acetate επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο θερμής απόσταξης (Kallmeyer et al., 2004).

Πιο συγκεκοιμένα, κάθε δείγμα, που πεοιείχε διάλυμα ιζήματος και zinc acetate (ZnAc), αοχικά αποψύχονταν στους 4 °C. Στη συνέχεια, ακολουθούσε η φυγοκέντοηση του δείγματος για 5 λεπτά στις 4500 rpm και η απομάκουνση του υπεοκείμενου. Δύο με τοία γοαμμάοια ιζήματος αναμειγνύονταν με 20 ml διαλύματος 50% (v/v) αιθανόλης και τοποθετούνταν σε τοίλαιμη στοογγυλή φιάλη. Στην κεντοική είσοδο της φιάλης συνδεόταν ένας ψυκτήρας, ο οποίος με ένα σωληνάκι συνδεόταν σε μία «παγίδα» που πεοιείχε 7 ml διαλύματος 5% (w/v) ZnAc. Έπειτα, από την αριστερή είσοδο της φιάλης, εισαγόταν άζωτο για 10 λεπτά, για την απομάκουνση του οξυγόνου από τη φιάλη. Μετά από τον αεοισμό με άζωτο, εισάγονταν 8 ml HCl (6 N) και 16 ml CrCl₂ (1 M) από την άλλη είσοδο της φιάλης (δεξιά) και ακολουθούσε βρασμός της φιάλης για 40 λεπτά. Το παραγόμενο από τον βορασμό υδοόθειο (H₂S) εξαγόταν στο διάλυμα της «παγίδας» όπου και «παγιδεύονταν» εκ νέου από το ZnAc.

Αφού είχε ολοκληρωθεί η επεξεργασία όλων των δειγμάτων, ακολούθησε ο προσδιορισμός του παγιδευμένου υδρόθειου για κάθε δείγμα, σύμφωνα με τη μέθοδο του Cline (1969).

Το ολικό ανηγμένο ανόργανο θείο (Total Reduced Inorganic Sulfur: TRIS) αποτελεί το άθροισμα των πτητικών θειούχων οξέων (Acid Volatile Sulfides: AVS), δηλαδή του υδρόθειου (H₂S) και των σιδηρούχων σουλφιδίων (FeS), και του υπολειπόμενου αναγώγιμου θείου από το χρώμιο (Chromium Reducible Sulfur: CRS), δηλαδή του στοιχειακού θείου (S°) και του σιδηροπυρίτη (FeS₂).

Η μέτρηση της συγκέντρωσης του ολικού ανηγμένου ανόργανου θείου έγινε στο Εργαστήριο Θαλάσσιας Οικολογίας (Τμήμα Βιολογίας) του Πανεπιστημίου Κρήτης.

4. Επεξεργασία δειγμάτων για προσδιορισμό σωματιδιακού οργανικού άνθρακα (POC), συγκέντρωσης χλωροπλαστικών χρωστικών (χλωροφύλλη-α και φαιοχρωστικές) και για την ανάλυση της κοκκομετρικής σύστασης του ιζήματος

Όλα τα δείγματα ιζήματος αποξηράνθηκαν και έπειτα ακολούθησε η ομογενοποίηση αυτών που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του σωματιδιακού οργανικού άνθρακα και των χλωροπλαστικών χρωστικών.

Ο πφοσδιοφισμός της χλωφοφύλλης-α και των φαιοχφωστικών έγινε με την φθοφομετφική μέθοδο των Yentsch και Menzel (1963): υποδείγματα του ομογενοποιημένου ιζήματος και τα φίλτφα (στήλη νεφού) επεξεφγάστηκαν με 90% ακετόνη και οι φαιοχφωστικές πφοσδιοφίστηκαν κατόπιν επεξεφγασίας με διάλυμα HCl (0,1 N), χφησιμοποιώντας φθοφόμετφο τύπου Turner 112. Από τη διαδικασία αυτή υπολογίζονται οι συγκεντφώσεις της χλωφοφύλλης-α και των φαιοχφωστικών σε μg ανά g ιζήματος ή σε μg ανά lt νεφού. Επιπλέον, το άθφοισμα των δυο παφαπάνω τιμών εκφφάζει το ισοδύναμο χλωφοπλαστικών χφωστικών (Chloroplastic Pigments Equivalent: CPE), τιμή που δίνει μια ένδειξη της συνολικής ποσότητας πφόσφατης και παλαιότεφης φυτικής βιομάζας (Basford & Eleftheriou, 1988).

Ο προσδιορισμός του σωματιδιακού οργανικού άνθρακα (POC) έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο τιτλοδότησης των Hedges και Stern (1984) χρησιμοποιώντας αναλυτή τύπου Perkin Elmer CHN 2400. Η μέτρηση του σωματιδιακού οργανικού άνθρακα δίνει μια συνολική εκτίμηση της

οργανικής ύλης τόσο της ζωντανής (βιομάζα) όσο και της νεκρής (τριπτόν).

Για την κοκκομετοική ανάλυση ιζήματος, χοησιμοποιήθηκε η τεχνική που πεοιγοάφεται από τους Gray και Elliott (2009). Αν και η σύσταση του ιζήματος είναι μία πολυδιάστατη μεταβλητή, τα κύοια χαοακτηριστικά του ιζήματος μποοούν να αποδοθούν με αοκετή ακοίβεια χοησιμοποιώντας τη μέση διάμετοο των κόκκων (MD), το συντελεστή διαλογής ή ταξινόμησης (σ1), τη λοξότητα (Sk1) και το ποσοστό ιλύοςαογίλου. Η μέση διάμετος των κόκκων δείχνει το βαθμό αδοότητας ή λεπτότητας του ιζήματος ενώ ο συντελεστής διαλογής ή ταξινόμησης αποτελεί μέτοο του βαθμού διασποράς του μεγέθους των κόκκων του ιζήματος.

Οι εργαστηριακές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Χημείας του Ινστιτούτου Θαλάσσιας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. Κρήτης.

5. Επεξεργασία δειγμάτων για προσδιορισμό συγκέντρωσης θρεπτικών αλάτων (NH4, PO4, NO3, NO2, SiO2)

Οι συγκεντοώσεις των ιόντων αμμωνίου, των νιτοικών, νιτοωδών, φωσφοοικών και πυοιτικών αλάτων ποοσδιοοίστηκαν σύμφωνα με τις διεογασίες που ακολούθησαν οι Strickland και Parsons (1972), Grashoff και συνεογάτες (1983) και Parsons και συνεογάτες (1984), χοησιμοποιώντας φασματοφωτόμετοο τύπου Beckmann DU 65.

Οι εργαστηριακές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Χημείας του Ινστιτούτου Θαλάσσιας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. Κρήτης.

6. Επεξεργασία δειγμάτων για προσδιορισμό της συγκέντρωσης των βαρέων μετάλλων

Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων και στοιχείων έγινε βάσει μίας τροποποίησης της US EPA 3052 μεθόδου (1996) σχετικά με την υποβοηθούμενη από μικροκύματα όξινη χώνευση πυριτικών και βασισμένων σε οργανικά υποστρώματα.

Όλα τα δείγματα ιζήματος αποξηφάνθηκαν και έπειτα ακολούθησε η ομογενοποίηση και η αποθήκευσή τους σε ξηφή ατμόσφαιφα μέχφι τη χώνευση. Αφχικά, ζυγίστηκε 0,1 ± 0,01 γφαμμαφίου ιζήματος από κάθε δείγμα και τοποθετήθηκε σε σωλήνες από τεφλόν που ήταν πλυμένοι με οξύ. Ακολούθησε η πφοσθήκη πυκνών οξέων (trace metal grade) στους σωλήνες και η χώνευσή τους σε ένα κλειστό υψηλής πίεσης σύστημα μικφοκυμάτων (Multiwave 3000, Anton Paar, Austria).

Αναλυτικότερα, τα οξέα που προστέθηκαν στους σωλήνες με τα προζυγισμένα δείγματα ήταν 2 ml H₂O₂ (Fluka), 6 ml HNO₃ (Fisher Scientific) και 2 ml HF (Fisher Scientific). Οι σωλήνες σφραγίστηκαν και μεταφέρθηκαν στο σύστημα μικροκυμάτων όπου παρέμειναν σε θερμοκρασία ανώτερη των 180 °C για περισσότερο από 10 λεπτά. Η συνολική διάρκεια της χώνευσης στα μικροκύματα ήταν 55 λεπτά.

Μετά τη χώνευση, οι σωλήνες από τεφλόν τοποθετήθηκαν σε ένα αμμόλουτοο στους 125 °C και ακολούθησε η εξάτμιση των δειγμάτων σε ένα κλειστό σύστημα εξάτμισης. Έπειτα, μία μικοή ποσότητα από 5% HNO₃ προστέθηκε στους σωλήνες για την ψύξη των δειγμάτων. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν με 5% HNO₃ σε ογκομετοικές φιάλες των 50 ml και αποθηκεύτηκαν σε μπουκάλια από πολυπροπυλένιο.

Για τη μέτρηση των συγκεντρώσεων βαφέων μετάλλων και στοιχείων στις χωνεύσεις των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ένας φασματογράφος μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (Inductively Coupled Plasma –

Mass Spectrometer (ICP-MS, Thermo Fischer Scientific, Winsford, United Kingdom; Plasma lab software)) σύμφωνα με τη μέθοδο US EPA 6020A (2007). Επιλέχθηκε ως βέλτιστη αραίωση των δειγμάτων η αραίωση x2000. Κάθε δείγμα αναλύθηκε τριπλά και υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές των μετρήσεων (counts) ανά δευτερόλεπτο και οι τυπικές τους αποκλίσεις. Σε κάθε δείγμα και σε κάθε πρότυπο διάλυμα προστέθηκε εσωτερικό πρότυπο (internal standard) που περιείχε Ίνδιο και Βισμούθιο (10 ppb) για υπολογισμό φασματοσκοπικών τον των μη επιδράσεων του υποστρώματος και της ολίσθησης του οργάνου κατά τη διάρκεια πολλαπλών αναλύσεων. Ένα πρότυπο διάλυμα (standard) αναλυόταν για κάθε 10 δείγματα, για ποιοτικό έλεγχο της ανάλυσης των δειγμάτων. Πρότυπα διαλύματα για την έξι σημείων καμπύλη βαθμονόμησης είχαν αραιώνοντας πιστοποιημένα προετοιμαστεί πρωταρχικά πρότυπα διαλύματα (CPI International) με νερό και 2% ΗΝΟ3 υψηλής καθαρότητας.

Οι συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων και στοιχείων εκφράστηκαν σε mg/kg (parts per million, ppm) ξηρού βάρους. Όλος ο εργαστηριακός εξοπλισμός ήταν πλυμένος σε 10% ΗΝΟ₃.

Αντιδραστήρια αναλυτικού βαθμού (analytical grade reagents) χρησιμοποιήθηκαν τόσο για τη χώνευση του ιζήματος όσο και για τα τυφλά δείγματα (δεν περιείχαν ίζημα) και για τα πρότυπα διαλύματα της καμπύλης βαθμονόμησης.

Η οφθότητα και η ακοίβεια των μετοήσεων εκτιμήθηκε χοησιμοποιώντας ένα τυφλό δείγμα και ένα από τα ακόλουθα διεθνώς πιστοποιημένα υλικά αναφοράς, για κάθε έξι χωνευμένα δείγματα: υπεράκτιο θαλάσσιο ίζημα (NCS DC 75301) και θαλάσσιο ίζημα (NCS DC 75305) από το Εθνικό Κέντρο Ανάλυσης Σιδήρου και Χάλυβα της Κίνας (China National Analysis Centre for Iron and Steel, Beijing, China).

Η ορθότητα των μετρήσεων αξιολογήθηκε συγκρίνοντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τα πιστοποιημένα υλικά αναφοράς με

τις πιστοποιημένες τιμές τους. Η μέση τιμή της ανάκτησης όλων των βαρέων μετάλλων και στοιχείων από το NCS DC75305 ήταν 92,5 ± 8,8 % (n=33) ενώ από το NCS DC75301 ήταν 88 ± 17,2 % (n=31).

Η ακρίβεια των μετρήσεων αξιολογήθηκε μέσω της πολλαπλής ανάλυσης των δειγμάτων. Τρία διαφορετικά δείγματα ιζήματος αναλύθηκαν τρεις επιπλέον φορές το κάθε ένα και το RSD ήταν κάτω από 10% για όλα τα στοιχεία εκτός από το Cd που είχε RSD ~ 13.5%.

Οι συγκεντρώσεις στα τυφλά δείγματα ήταν πολύ χαμηλές και αφαιρέθηκαν από τις τιμές των δειγμάτων ιζήματος. Τα όρια ανίχνευσης Detection: (Limits Of LOD) διαδικασίας υπολογίστηκαν της πολλαπλασιάζοντας επί τρία την τυπική απόκλιση των τυφλών δειγμάτων (n=6) και ήταν: 0,11 (Li), 0,02 (Be), ~ 0 (Na), ~ 0 (Mg), ~ 0 (Al), 17,94 (P), ~ 0 (K), ~ 0 (Ca), 0,04 (Sc), 0,02 (V), 0,3 (Cr), 0,16 (Mn), ~ 0 (Fe), 0,03 (Co), 0,35 (Ni), 0,5 (Cu), 0,76 (Zn), ~0 (Ga), 0,02 (Ge), 0,14 (As), 0,01 (Rb), 0,06 (Sr), 0,01 (Y), ~ 0 (Pd), 0,02 (Ag), 0,01 (Cd), ~ 0 (Cs), 0,01 (La), 0,01 (Ce), ~ 0 (Pr), ~ 0 (Nd), ~ 0 (Eu), ~ 0 (Sm), ~ 0 (Gd), ~ 0 (Tb), ~ 0 (Dy), ~ 0 (Ho), 0,01 (Er), ~ 0 (Tm), ~ 0 (Yb), ~ 0 (Lu), ~ 0 (Tl), 0,03 (Pb), ~ 0 (Th) και ~ 0 (U) mg/kg για τα δείγματα των ιζημάτων. Αυτές οι τιμές είναι επαρκώς χαμηλές και επιτρέπουν την ανάλυση των συγκεντρώσεων των δειγμάτων.

Οι εργαστηριακές αναλύσεις για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των βαρέων μετάλλων έγιναν στο Εργαστήριο Θαλάσσιας Οικολογίας (Τμήμα Βιολογίας) και στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

7. Επεξεργασία δειγμάτων μακροπανίδας

Με την επιστροφή στο εργαστήριο, τα δείγματα των πολυχαίτων προσδιορίστηκαν αρχικά στο επίπεδο της οικογένειας με την χρήση των εγχειριδίων του Fauchald (1977), του Fauvel (1923) και των Rouse και Pleijel

(2001). Ο πεφαιτέφω πφοσδιοφισμός των ατόμων στο επίπεδο του είδους έγινε με τη χφήση των ειδικών εγχειφιδίων και επιστημονικών εφγασιών που πεφιέχουν κλείδες πφοσδιοφισμού από τους: Day (1967), Blake και Kudenov (1978), Amaral (1980), Bianchi (1981), Gillet (1986), Holthe (1986), Lardicci (1989), Gravina και Somaschini (1990), Rainer (1991), Pleijel (1993), Barnich και Fiege (2003), Viéitez και συνεφγάτες (2004). Ακόμα, υπολογίστηκαν τα μοφφομετφικά χαφακτηφιστικά των οφγανισμών και πιο συγκεκφιμένα, μετφήθηκε το μήκος, το πλάτος, ο αφιθμός των μεταμεφών και η βιομάζα του κάθε ατόμου.

Οι ταξινομικοί ποοσδιοοισμοί των πολυχαίτων έγιναν στο Εργαστήριο Βιοποικιλότητας του Ινστιτούτου Θαλάσσιας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. Κρήτης.

8. Επεξεργασία δειγμάτων για εξαγωγή και πολλαπλασιασμό μικροβιακού γενετικού υλικού

То μικροβιακό γενετικό υλικό απομονώθηκε από το σύνολο εικοσιτεσσάρων δειγμάτων (τρία επαναληπτικά δείγματα για κάθε έναν τους οχτώ σταθμούς δειγματοληψίας) χρησιμοποιώντας από το εναλλακτικό πρωτόκολλο του UltraClean® Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) για μέγιστη απόδοση της εξαγωγής (alternative protocol for maximum yields), $\sigma \psi \phi \omega v \alpha$ me tig odyyieg tou κατασκευαστή. Περίπου 0,5 (± 0,2) γραμμάρια ιζήματος χρησιμοποιήθηκαν από κάθε δείγμα. Η ποιότητα του DNA που απομονώθηκε αξιολογήθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης.

Ακολούθησε πολλαπλασιασμός του γενετικού υλικού με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction: PCR) με εκκινητές (primers) για την V5-V6 περιοχή του γονιδίου που κωδικοποιεί το 16S rRNA. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι 802f (5' – GGA TTA

GAT ACC CBN GTA - 3') Kal ol 1027r (5' - CGA CRR CCA TGC ANC ACC T – 3') (τροποποιημένοι $\alpha \pi \dot{\alpha}$ Youssef et al., 2009). Χρησιμοποιήθηκαν έξι ζεύγη των εκκινητών 802f και 1027r, το κάθε ένα εκ των οποίων έφερε μία μοναδική αλληλουχία μήκους δέκα νουκλεοτιδίων (Multiplex Identifiers: MIDs) για το διαχωρισμό των δειγμάτων μετά το στάδιο της αλληλούχισης. Το μείγμα αντίδρασης της PCR περιείχε 6 μl 5x KAPAHiFi Fidelity buffer, 0,9 μ l KAPA dNTP Mix (10 mM), 0,9 μ l $\alpha\pi\delta$ κάθε εκκινητή (10 μM), 0,6 μl KAPAHiFi HotStart DNA πολυμεράση (1 U/μl) σε τελικό αντίδραση. Η συγκέντρωση του DNA όγκο 30 μΙ ανά που χρησιμοποιούνταν ήταν περίπου 50 ng/μl. Το πρωτόκολλο PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής: 95 °C για 5 λεπτά, 25 κύκλους στους 98 °C για 20 δευτερόλεπτα, 55 °C για 15 δευτερόλεπτα, 72 °C για 30 δευτερόλεπτα, και τέλος 72 °C για 5 λεπτά. Οι PCR πραγματοποιήθηκαν σε μηχανές BIORAD (MyCyclerTM) και MJ Research (DNA Engine DYADTM, Peltier Thermal Cycler).

Τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση νέας γενιάς στο 454 GS FLX Titanium Series (Roche), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τόσο η επεξεργασία των δειγμάτων όσο και η αλληλούχισή τους έγιναν στο Εργαστήριο Γενετικής του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. Κρήτης).

9. Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων

Οι αρχικές αλληλουχίες που λήφθηκαν από τα δείγματα επεξεργάστηκαν με τον αλγόριθμο AmpliconNoise για την αφαίρεση των σφαλμάτων αλληλούχισης του μηχανήματος, των σφαλμάτων της PCR και για την αφαίρεση των χιμαιρικών αλληλουχιών (Quince et al., 2011) και οι ομαδοποιημένες, υψηλής ποιότητας, αλληλουχίες αναλύθηκαν στη

συνέχεια με το πακέτο QIIME (Caporaso et al., 2010), ενώ κατηγοριοποιήθηκαν σύμφωνα με το Ribosomal Database Project (RDP) (Cole et al., 2008).

Στη συνέχεια, κατασκευάστηκαν μήτρες δεδομένων που περιείχαν τις τιμές αφθονίας των βακτηριακών λειτουργικά ταξινομικών μονάδων (Operational Taxonomic Unit: OTU) για τα τέσσερα διαφορετικά επίπεδα ομοιότητας των αλληλουχιών (99%, 97%, 95%, 90%)[•] οι μεταβλητές ήταν τα διαφορετικά OTUs ενώ τα δείγματα αντιπροσώπευαν τους σταθμούς δειγματοληψίας. Ακολούθησε η κανονικοποίηση (standardization) των δεδομένων και ο μετασχηματισμός τους στην τετραγωνική ρίζα. Έπειτα, κατασκευάστηκαν μήτρες ομοιότητας των δειγμάτων, με τον υπολογισμό του ποσοτικού συντελεστή ομοιότητας Bray-Curtis (Clarke & Warwick, 1994).

Αντίστοιχα, κατασκευάστηκαν μήτρες ομοιότητας όπου οι μεταβλητές ήταν: α) βαρέα μέταλλα και στοιχεία, β) οικογένειες πολυχαίτων, γ) είδη πολυχαίτων, δ) αβιοτικές παράμετροι και ε) γεωγραφικές συντεταγμένες των σταθμών δειγματοληψίας. Σε όλες τις περιπτώσεις ακολούθησε κανονικοποίηση και μετασχηματισμός των δεδομένων στην τετραγωνική ρίζα, εκτός από την περίπτωση των αβιοτικών παραμέτρων (ομαλοποίηση δεδομένων: normalization) και των γεωγραφικών συντεταγμένων των οποίων οι αντίστοιχες μήτρες ομοιότητας κατασκευάστηκαν με τις ευκλείδειες αποστάσεις μεταξύ των δειγμάτων.

Οι μήτρες ομοιότητας χρησιμοποιήθηκαν για μη μετρικές πολυδιάστατες κλιμακώσεις σε πολλαπλές διαστάσεις (nMDS - Nonmetric Multi-Dimensional Scaling) και η σημαντικότητα των διαφορών των ομάδων δειγμάτων που ικανοποιούσαν τις αρχικές υποθέσεις ελέγχθηκε με τη στατιστική δοκιμασία ANOSIM (Analysis of similarity). Η συσχέτιση μεταξύ των πολυμεταβλητών προτύπων που προέκυψαν από τις μήτρες

ομοιότητας ελέγχθηκε με την ανάλυση RELATE (Clarke & Gorley, 2006). Η ανάλυση διακύμανσης (PERMANOVA: μεταθετική μη-παραμετρική Permutational multivariate analysis of variance) (Anderson, 2001) χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της μηδενικής υπόθεσης της μη διαφοροποίησης των συνευρέσεων μεταξύ των διαφορετικών χωρικών κλιμάκων, σύμφωνα με ένα σχέδιο δύο παραγόντων (Λιμνοθάλασσα, Τοποθεσία) μετά από 999 μεταθέσεων (residuals under a reduced model).

Τα πρότυπα που προέκυψαν από τις αναλύσεις των μικροβιακών OTUs και των μακροπανιδικών ειδών συγκρίθηκαν με τη χρήση MDS δευτέρου επιπέδου (2nd stage MDS) (Somerfield & Clarke, 1995). Σύμφωνα με αυτή την προσέγγιση, υπολογίστηκε ένας συντελεστής συσχέτισης (harmonic rank correlation coefficient) μεταξύ κάθε ζεύγους μητρών ομοιότητας και κατασκευάστηκε μία τελική μήτρα ομοιότητας, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την MDS δευτέρου επιπέδου (Olsgard et al., 1997).

Για τη διεφεύνηση του πολυμεταβλητού πφοτύπου διανομής των αβιοτικών παφαμέτφων ακολουθήθηκε η ανάλυση κύφιων συνιστωσών (Principal Component Analysis: PCA). Η συσχέτιση των πεφιβαλλοντικών μεταβλητών και των τιμών (scores) που πφοέκυψαν από την ανάλυση PCA ελέγχθηκε με το μη παφαμετφικό συντελεστή συσχέτισης του Spearman.

Ο σταθμισμένος συντελεστής συσχέτισης του Spearman χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί εάν ορισμένες από τις αβιοτικές παραμέτρους εμφάνιζαν ισχυρή συσχέτιση μεταξύ τους (-0.8 > Q_w > 0.8 για p < 0.05). Οι διαφορετικοί συνδυασμοί των πολυμεταβλητών προτύπων που προέκυψαν από τις μήτρες ομοιότητας με τις περιβαλλοντικές μεταβλητές ελέγχθηκαν χρησιμοποιώντας την ανάλυση BIO-ENV (Clarke & Ainsworth, 1993) και ο έλεγχος της σημαντικότητας των τιμών του σταθμισμένου συντελεστή συσχέτισης του Spearman ελέγχθηκε με την των ανάλυση RELATE (μεταξύ μητοών ομοιότητας και $\tau\omega\nu$

πεφιβαλλοντικών μεταβλητών που πφοέκυψαν από την ανάλυση BIO-ENV σε κάθε πεφίπτωση).

Για να προσδιοριστούν τα βαρέα μέταλλα και στοιχεία που συμβάλλουν κατά το μεγαλύτερο ποσοστό στην ανομοιότητα μεταξύ των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση SIMPER (Clarke & Warwick, 1994).

Για την εκτίμηση της ποικιλότητας των ειδών, που είναι βασική βιολογική παράμετρος για την περιγραφή μίας συνεύρεσης, υπολογίστηκε ο δείκτης ποικιλότητας των Shannon-Wiener H' (Pielou, 1969): $H' = \sum_{i}^{s} Pi \log_2 Pi$, όπου Pi = η σχετική μέση αφθονία ενός είδους σε ένα συγκεκριμένο σταθμό και S = ο συνολικός αριθμός των ειδών. Η τιμή αυτού του δείκτη αυξάνεται όσο αυξάνεται ο αριθμός των ειδών σε ένα δείγμα και όσο η αντιπροσώπευση των ειδών αυτών γίνεται πιο ομοιόμορφη (Clarke & Warwick, 1994).

Επιπλέον, υπολογίστηκε ο δείκτης ποικιλότητας Margalef (αφθονίας των ειδών) (d), λαμβάνοντας υπόψη το συνολικό αφιθμό των ειδών και το συνολικό αφιθμό των ατόμων σε κάθε δείγμα, με βάση τον τύπο: $d = \frac{S-1}{\ln N}$, όπου S = ο συνολικός αφιθμός των ειδών σε κάθε σταθμό και N = ο συνολικός αφιθμός των ατόμων σε κάθε σταθμό.

Όλες οι παφαπάνω αναλύσεις πφαγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πφόγφαμμα PRIMER v. 6 (Clarke & Ainsworth, 1993). Επιπλέον, στο πακέτο QIIME (Caporaso et al., 2010) υπολογίστηκε ο δείκτης Chao1 (Chao, 1984) και έγινε και η γφαφική του απεικόνιση. Ο συγκεκφιμένος δείκτης ποικιλότητας καθιστά δυνατή τη σύγκφιση δειγμάτων για τα οποία δεν έχει αποκτηθεί ίσος αφιθμός δεδομένων.

Μέσω του διαδραστικού εργαλείου Venny (Oliveros, 2007) κατασκευάστηκαν διαγράμματα Venn βάσει των κοινών OTUs μεταξύ των λιμνοθαλασσών, βάσει των κοινών OTUs ίδιας αφθονίας μεταξύ των

λιμνοθαλασσών και βάσει των κοινών φυλογενετικών γοαμμών των λιμνοθαλασσών (Shade & Handelsman, 2011).

Για την εκτίμηση της πιθανής τοξικότητας των ιζημάτων που ποκύπτει από τα βαρέα μέταλλα και στοιχεία που μελετήθηκαν, έγινε σύγκριση των συγκεντοώσεων που μετρήθηκαν με δημοσιευμένα κριτήρια και πρότυπες τιμές (Burton 2002; Bjørgesaeter & Gray, 2008). Η σύγκριση έγινε μέσω του υπολογιστή δεικτών ποιότητας ιζήματος (Sediment Quality Index 1.0 (SeQI) calculator) (Canadian Council of Ministers of the Environment, 2002) που έχει δημιουργηθεί για το Καναδικό Συμβούλιο Υπουργών Περιβάλλοντος (Canadian Council of Ministers of the Environment: CCME).

Η εκτίμηση της βιοδιαθεσιμότητας των μετάλλων στα ιζήματα υπό μελέτη, έγινε με τη σύγκοιση των συγκεντοώσεων του ολικού ανηγμένου ανόργανου θείου με το άθοοισμα των συγκεντοώσεων των ταυτόχοονα εξαχθέντων μετάλλων (Simultaneously Extracted Metals: SEM), δηλαδή των Cd, Cu, Ni, Pb και Zn, με την παραδοχή ότι στην ποσότητα του TRIS συμμετέχουν κυρίως τα AVS και ως εκ τούτου μπορούν να θεωρηθούν ταυτόσημα για τη διευκόλυνση της ανάλυσης. Τα βαρέα μέταλλα και τα στοιχεία πιστεύεται ότι αντιδρούν με το FeS (το κυρίαρχο τμήμα των AVS) για το σχηματισμό μεταλλικών σουλφιδίων. Έτσι, εάν τα AVS είναι περισσότερα από τα SEM, τότε τα μέταλλα είναι πιθανό να προσδένονται στα σύμπλοκα των σουλφιδίων, έχοντας έτσι πολύ περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα, ενώ στην αντίθετη περίπτωση τα μέταλλα μπορεί (ή όχι) να είναι τοξικά, λόγω άλλων παραγόντων ελέγχου τοξικότητας (λ.χ. TOC) (Simpson et al., 2005).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Αβιοτικές παράμετροι

1.1 Φυσικοχημικές παράμετροι

Οι τιμές του συνόλου των φυσικοχημικών παραμέτρων δίνονται στο παράρτημα (πίνακας 1).

Στην εικόνα 2 παρουσιάζεται η ομαδοποίηση του συνόλου των φυσικοχημικών παραμέτρων των λιμνοθαλασσών με τη χρήση της μεθόδου μη μετρικής πολυδιάστατης κλιμάκωσης.

Είναι εμφανές ότι οι φυσικοχημικές παράμετροι ομαδοποιούνται ανά λιμνοθάλασσα το αποτέλεσμα αυτό προκύπτει και από τη στατιστική δοκιμασία ANOSIM, η οποία έδειξε ότι οι περιβαλλοντικές μεταβλητές διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των λιμνοθαλασσών, όταν λαμβάνονται υπόψη τόσο οι μέσες τιμές των παραμέτρων (R = 0,583 p = 0,038), όσο και οι τιμές των επαναληπτικών δειγμάτων (R = 0,729 p = 0,001). Επιπλέον, η ανάλυση PERMANOVA, για τα επαναληπτικά δείγματα των περιβαλλοντικών μεταβλητών, έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση τόσο μεταξύ των λιμνοθαλασσών όσο μεταξύ της τοποθεσίας του σταθμού δειγματοληψίας και (Παράγοντας λιμνοθάλασσα: p = 0,001, 999 μεταθέσεις; Παράγοντας τοποθεσία: p = 0,001, 999 μεταθέσεις; λιμνοθάλασσα x τοποθεσία: p =0,001, 998 μεταθέσεις). Αυτό αποδεικνύει ότι υπάρχει και ένας δεύτερος παράγοντας διαχωρισμού των δειγμάτων και αυτός είναι η θέση του σταθμού δειγματοληψίας, καθώς οι σταθμοί που βρίσκονται μέσα σε κάθε λιμνοθάλασσα διαφέρουν από αυτούς που βρίσκονται στο κανάλι επικοινωνίας της λιμνοθάλασσας με τον κόλπο.


Εικόνα 2: Απεικόνιση της ομοιότητας των αβιοτικών παραμέτρων των λιμνοθαλασσών, με χρήση της μεθόδου μη μετρικής πολυδιάστατης κλιμάκωσης. α: απεικόνιση με το μέσο όρο των συγκεντρώσεων των παραμέτρων. β: απεικόνιση με τις τιμές των επαναληπτικών δειγμάτων (replicates). Με πράσινο χρώμα συμβολίζονται οι σταθμοί δειγματοληψίας που βρίσκονται στο εσώτερο τμήμα των λιμνοθαλασσών ενώ με μπλε χρώμα συμβολίζονται οι σταθμοί δειγματοληψίας που βρίσκονται στο κανάλι επικοινωνίας της κάθε λιμνοθάλασσας με τον Αμβρακικό κόλπο. Α, Β, C: τα επαναληπτικά δείγματα.

Αξίζει να αναφερθεί ότι σύμφωνα με το συντελεστή διαλογής ή ταξινόμησης της κοκκομετρικής σύστασης των ιζημάτων των σταθμών δειγματοληψίας, προέκυψε ότι σε όλους τους σταθμούς το ίζημα μπορεί να χαρακτηριστεί ως ανεπαρκώς ταξινομημένο (1 < σ1 < 2), ενδεχομένως εξαιτίας της εναπόθεσης νέου ιζήματος μοναδική εξαίρεση ήταν ο εξωτερικός σταθμός της λιμνοθάλασσας Λογαρού (σ1 = 0,95), ο οποίος χαρακτηρίζεται από μέτρια ταξινομημένο ίζημα.

1.2 Βαρέα μέταλλα και στοιχεία

Οι τιμές του συνόλου των βαφέων μετάλλων που μετφήθηκαν δίνονται στο παφάφτημα (πίνακας 2).

Μέσω της ανάλυσης SIMPER προσδιορίστηκε η συμβολή των διαφορετικών βαρέων μετάλλων και στοιχείων στην ανομοιότητα μεταξύ των λιμνοθαλασσών και τα αποτελέσματα δίνονται στο παράρτημα (πίνακας 3). Αξίζει να αναφερθεί ότι ο μεγαλύτερος βαθμός ανομοιότητας παρατηρείται μεταξύ των λιμνοθαλασσών Μάζωμα και Τσουκαλιό (12,37%) ενώ ο μικρότερος μεταξύ των λιμνοθαλασσών Λογαρού και Τσουκαλιό (4,78%).

Στην εικόνα 3 παφουσιάζεται η ομαδοποίηση του συνόλου των βαφέων μετάλλων και στοιχείων των λιμνοθαλασσών με τη χφήση της μεθόδου μη μετφικής πολυδιάστατης κλιμάκωσης.





Εικόνα 3: Απεικόνιση της ομοιότητας των βαφέων μετάλλων και στοιχείων των λιμνοθαλασσών, με χφήση της μεθόδου μη μετφικής πολυδιάστατης κλιμάκωσης. α: απεικόνιση με το μέσο όφο των συγκεντφώσεων βαφέων μετάλλων και στοιχείων. β: απεικόνιση με τις τιμές των επαναληπτικών δειγμάτων (replicates). Με πφάσινο χφώμα συμβολίζονται οι σταθμοί δειγματοληψίας που βφίσκονται στο εσώτεφο τμήμα των λιμνοθαλασσών ενώ με μπλε χφώμα συμβολίζονται οι σταθμοί δειγματοληψίας που βφίσκονται στο κανάλι επικοινωνίας της κάθε λιμνοθάλασσας με τον Αμβφακικό κόλπο. Α, Β, C: τα επαναληπτικά δείγματα.

Οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων και στοιχείων δεν εμφανίζουν κάποια χαρακτηριστική ομαδοποίηση, σύμφωνα με την απεικόνιση της μεθόδου πολυδιάστατης κλιμάκωσης και με τη στατιστική δοκιμασία ANOSIM, τόσο όταν λαμβάνεται υπόψη ο μέσος όφος των συγκεντρώσεων (R = -0.042 p = 0.638), όσο και οι τιμές των επαναληπτικών δειγμάτων (R = 0,218 p = 0,008). Ωστόσο, η ανάλυση PERMANOVA, στις τιμές των επαναληπτικών δειγμάτων των βαρέων μετάλλων και στοιχείων, έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των λιμνοθαλασσών αλλά όχι και της τοποθεσίας του σταθμού δειγματοληψίας (Παράγοντας λιμνοθάλασσα: p = 0,001, 999 μεταθέσεις; Παράγοντας τοποθεσία: p = 0,223, 998 μεταθέσεις; λιμνοθάλασσα x τοποθεσία: p = 0,001, 998 μεταθέσεις). Διακρίνεται λοιπόν ως παράγοντας διαχωρισμού των βαρέων μετάλλων και των στοιχείων η λιμνοθάλασσα στην οποία μετρήθηκαν.

Στα διαγφάμματα που ακολουθούν, γίνεται η σύγκφιση των συγκεντφώσεων οφισμένων βαφέων μετάλλων και στοιχείων που πφοσδιοφίστηκαν στα πλαίσια της παφούσας εφγασίας με τις συγκεντφώσεις των αντίστοιχων στοιχείων πφοηγούμενης μελέτης στο σύμπλεγμα των λιμνοθαλασσών του Αμβφακικού κόλπου (Karageorgis, 2007) (Τσουκαλιό: εικόνα 4, Λογαφού: εικόνα 5, Τσοπέλι: εικόνα 6).



Εικόνα 4: Οι συγκεντρώσεις ορισμένων μετάλλων και στοιχείων (σε ppm) για τη λιμνοθάλασσα Τσουκαλιό.



Εικόνα 5: Οι συγκεντρώσεις ορισμένων μετάλλων και στοιχείων (σε ppm) για τη λιμνοθάλασσα Λογαρού.



Εικόνα 6: Οι συγκεντρώσεις ορισμένων μετάλλων και στοιχείων (σε ppm) για τη λιμνοθάλασσα Τσοπέλι.

Παρατηρούμε ότι σχεδόν για όλα τα βαρέα μέταλλα και στοιχεία που ήταν κοινά μεταξύ των δύο εργασιών, υψηλότερες συγκεντρώσεις εμφανίστηκαν το 2004. Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων και στοιχείων μεταξύ των δύο χρονολογιών είναι συγκρίσιμες όσον αφορά τη μονοτονία (Τσουκαλιό: rho = 0,983; Λογαρού: rho = 0,981; Τσοπέλι: rho = 0,983).

1.2.1 Τοξικότητα των μετάλλων – Εφαρμογή των Κριτηρίων ΠοιότηταςΙζήματος

Τα αποτελέσματα της σύγκρισης των συγκεντρώσεων ορισμένων χημικών στοιχείων με τις διαθέσιμες κατευθυντήριες για την ποιότητα του ιζήματος (Burton, 2002; Bjørgesaeter & Gray, 2008) παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες (πίνακες 1 και 2).

Πίνακας 1: Τα αποτελέσματα της σύγκοισης των χημικών στοιχείων με τα κοιτήοια ποιότητας που αναφέουνται στους Burton (2002) και Bjørgesaeter και Gray (2008), για το σύνολο των δειγμάτων. ERL: effects range low. TEL: threshold effect level. ISQG: interim sediment quality guidelines. ISQV: interim sediment quality value. SQO: sediment quality objective. LEL: lowest effect level. ERM: effect range median. PEL: probable effect level. SEL: severe effect level. NOAA: National Oceanic and Atmospheric Administration. EC: Environment Canada. ANZECC: Australian and New Zealand Environment and Conservation Council. OME-SLG: Ontario Ministry of Environmental Screening Level Guidelines. *: το σύνολο των δειγμάτων. A: Βασικό επίπεδο (threshold). B: Μέσο επίπεδο (midrange). Γ: Ακοαίες συγκεντοώσεις (extreme).

	As	Cd	Cr	Cu	Pb	Zn	Ag	Fe	Mn	
NOAA - ERL	-	-	*	24 (5)	-	-	-	N/A	N/A	
EC - TEL	24 (1)	-	*	24 (13)	24 (1)	-	-	N/A	N/A	
SQO Netherlands -	24 (21)	-	N/A	24 (4)	-	-	N/A	N/A	N/A	
Target										
Hong Kong - ISQV-low	-	-	*	-	-	-	-	N/A	N/A	Α
ANZECC - ERL	-	-	*	24 (5)	-	-	N/A	N/A	N/A	
OME-SLG - Low est	24 (3)	-	*	24 (15)	24 (1)	-	N/A	*	24 (9)	
Effect Level										
ANZECC - ISQG-low	-	-	*	-	-	-	N/A	N/A	N/A	
NOAA - ERM	-	-	-	-	-	-	-	N/A	N/A	
EC - PEL	-	-	24 (19)	-	-	-	-	N/A	N/A	
SQO Netherlands -	-	-	N/A	24 (4)	-	-	N/A	N/A	N/A	R
Limit										D
Hong Kong - ISQV-high	-	-	-	-	-	-	N/A	N/A	N/A	
Norwegian Moderate	-	-	-	-	-	-	N/A	N/A	N/A	
OME-SLG - SEL	-	-	*	-	-	-	N/A	*	-	
SQO Netherlands -	-	-	N/A	-	-	-	N/A	N/A	N/A	Г
Intervention										

Οι κατευθυντήριες οδηγίες για την ποιότητα του ιζήματος αντιπροσωπεύουν τιμές εάν ξεπεραστούν, αξιώνουν που συμπληρωματική έρευνα για την εύρεση του περιβαλλοντικού κινδύνου σχετίζεται με αυτές τις υπερβάσεις, εάν όντως υπάρχει που περιβαλλοντικός κίνδυνος (Simpson et al., 2005). Εάν οι συγκεντρώσεις των στοιχείων είναι πιο χαμηλές από τα βασικά επίπεδα (threshold values), τότε η συχνότητα δυσμενών βιολογικών επιδράσεων που οφείλονται σε αυτά τα στοιχεία, αναμένεται να είναι πολύ χαμηλή. Αντίστοιχα, εάν οι συγκεντρώσεις των στοιχείων σε ένα μελετώμενο σύστημα υπερβούν το μέσο επίπεδο συγκεντρώσεων (midrange values), αναμένονται πιο συχνά δυσμενείς βιολογικές επιδράσεις.

Σύμφωνα με τα συγκεκοιμένα κοιτήρια, έντονη ούπανση σε όλα τα δείγματα του ιζήματος ποοκαλούν τα στοιχεία χοώμιο και σίδηρος. Μέτοια επίπεδα ούπανσης χαλκού εμφανίζονται σε όλα τα δείγματα από το εσωτερικό της λιμνοθάλασσας Μάζωμα και σε ένα δείγμα από το εσωτερικό της Λογαρούς. Οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων στοιχείων κυμαίνονται στα βασικά επίπεδα.

Πίνακας 2: Τα αποτελέσματα της σύγκοισης των χημικών στοιχείων με τα κοιτήοια ποιότητας που αναφέοονται στις κατευθυντήοιες οδηγίες του Καναδά (Canadian Council of Ministers of the Environment, 2002). ISQG: interim sediment quality guidelines. PEL: probable effect level. *: το σύνολο των δειγμάτων.

	As	Cd	Cr	Cu	Pb	Zn
Freshwater (ISQG)	24 (3)	-	*	24 (4)	-	-
Freshwater (PEL)	-	-	*	-	-	-

Από τα έξι μέταλλα (Αφσενικό, Κάδμιο, Χφώμιο, Χαλκός, Μόλυβδος και Ψευδάργυφος) που χρησιμοποιήθηκαν στον υπολογιστή κριτηρίων ποιότητας του ιζήματος, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του

Καναδά, το χρώμιο ήταν αυτό που ξεπέρασε τα όρια τις περισσότερες φορές, ενώ ταυτόχρονα εμφάνισε το μεγαλύτερο βαθμό μη-συμμόρφωσης με τα συγκεκριμένα κριτήρια. Ακόμα, αποτυχίες εμφάνισαν βάσει του ISQG το αρσενικό και ο χαλκός, ενώ οι συγκεντρώσεις των τριών άλλων στοιχείων ήταν αποδεκτές.

Επιπλέον, τα δείγματα των ιζημάτων κατηγοριοποιήθηκαν ως μη ουπασμένα, μέτρια ουπασμένα και έντονα ουπασμένα, σύμφωνα με τα κοιτήρια ποιότητας ιζήματος της US EPA (Pekey et al., 2004) (πίνακας 3).

Πίνακας 3: Η κατηγοριοποίηση των ιζημάτων σε επίπεδα ρύπανσης, σύμφωνα με τις συγκεντρώσεις ορισμένων στοιχείων. *: το σύνολο των δειγμάτων.

	As	Cd	Cr	Cu	Pb	Zn	Fe	Mn
Μη ουπασμένα	*	N/A	*	*	*	*	*	*
Μέτοια ουπασμένα	24 (19)	N/A	*	24 (8)	-	24 (2)	24 (13)	24 (22)
Έντονα ουπασμένα	-	-	24 (24)	-	-	-	24 (6)	24 (8)

Σύμφωνα με τα κριτήρια της US EPA, όλα τα δείγματα ιζημάτων κατηγοριοποιούνται ως μέτρια ρυπασμένα από αρσενικό εκτός από τα δείγματα των λιμνοθαλασσών Λογαρού και Μάζωμα (σταθμοί στο κανάλι επικοινωνίας με τον κόλπο). Όσον αφορά το χρώμιο, όλοι οι σταθμοί δειγματοληψίας είναι έντονα ρυπασμένοι. Οι σταθμοί των λιμνοθαλασσών Μάζωμα, Λογαρού (σταθμοί στο εσωτερικό των λιμνοθαλασσών) και Τσοπέλι (σταθμοί στο κανάλι επικοινωνίας με τον κόλπο). Όσον αφορά το χρώμιο, όλοι οι σταθμοί δειγματοληψίας είναι έντονα ρυπασμένοι. Οι σταθμοί των λιμνοθαλασσών Μάζωμα, Λογαρού (σταθμοί στο εσωτερικό των λιμνοθαλασσών) και Τσοπέλι (σταθμοί στο κανάλι επικοινωνίας με τον κόλπο) χαρακτηρίζονται ως μέτρια ρυπασμένοι από χαλκό και σίδηρο. Το ίδιο ισχύει και για το μαγγάνιο, με την προσθήκη και ενός σταθμού από το εσωτερικό της λιμνοθάλασσας Τσοπέλι. Τέλος, το εσωτερικό της λιμνοθάλασσας Μάζωμα είναι μέτρια ρυπασμένο από ψευδάργυρο.

Πρέπει να σημειωθεί ότι παρόλο που για ορισμένα μέταλλα παρατηρούνται συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν τα κριτήρια ποιότητας

ιζήματος και ως εκ τούτου αναμένεται να προκαλέσουν δυσμενείς βιολογικές επιδράσεις, δεν είναι απαραίτητο ότι αυτές οι επιδράσεις θα προκύψουν στα ιζήματα υπό μελέτη περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για να την επιβεβαίωση ή όχι αυτού του αποτελέσματος (Simpson et al., 2005).

Στην εικόνα που ακολουθεί (εικόνα 7) απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων ανά σταθμό δειγματοληψίας.



Εικόνα 7: Διαγραμματική απεικόνιση των συγκεντρώσεων των βαρέων μετάλλων στους σταθμούς δειγματοληψίας. Fe (ppm); Cr, Mn, Ni (ppm * 10^2); Cu, Zn, Pb (ppm * 10^3); As (ppm * 10^4); Ag, Cd (ppm * 10^5).

Είναι εμφανές ότι για όλα τα στοιχεία, πλην του μαγγανίου, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις βρέθηκαν στα ιζήματα από τον εσωτερικό σταθμό του Μαζώματος. Ακόμα, υψηλές συγκεντρώσεις βρέθηκαν για τα περισσότερα στοιχεία στον εσωτερικό σταθμό της Λογαρούς και στο Τσοπέλι, στο σταθμό επικοινωνίας με τον Αμβρακικό κόλπο.

1.2.2 Βιοδιαθεσιμότητα των μετάλλων

Οι μετρήσεις των συγκεντρώσεων των AVS (mmol/kg) και η σύγκρισή τους με το άθροισμα των συγκεντρώσεων των μετάλλων που διαλύονται σε

οξέα (acid-soluble), που συχνά αναφέφονται ως SEM, είναι ένας χρήσιμος δείκτης της βιοδιαθεσιμότητας των μετάλλων στα ιζήματα.

Όπως φαίνεται από την παρακάτω εικόνα (εικόνα 8), σε κάθε σταθμό δειγματοληψίας τα SEM υπερβαίνουν τα AVS, γεγονός που σημαίνει ότι τα συγκεκριμένα μέταλλα της ομάδας των SEM έχουν εξαντλήσει τα αποθέματα του FeS και η πλεονάζουσα ποσότητά τους ενδεχομένως να είναι τοξική για τους οργανισμούς του ιζήματος.



Εικόνα 8: Διαγραμματική απεικόνιση των συγκεντρώσεων (σε mmol/kg) των AVS, των SEM και της διαφοράς τους (SEM-AVS).

Παρόλο που η διαφορά των συγκεντρώσεων SEM και AVS είναι θετική, δεν υπερβαίνει την ποσότητα των 5 mmol/kg ξηρού ιζήματος η οποία έχει προταθεί ως τιμή ελέγχου για την αναγνώριση των ιζημάτων στα οποία ενδεχομένως υπάρχουν πιθανές επιβλαβείς επιπτώσεις από τα μέταλλα (Simpson et al., 2005).

Βεβαίως, ακόμα και αν από τα αποτελέσματά μας ποοέκυπτε πλεόνασμα των AVS, αυτό δεν θα απέκλειε τη βιοδιαθεσιμότητά τους, καθώς μπορεί να είναι δυνατή μέσω της κατάποσης ιζήματος (sediment ingestion) (Lee et al., 2000a,b; Lee et al., 2001).

1.3 Πρότυπο διανομής αβιοτικών παραμέτρων

Οι αβιοτικές παράμετροι κατηγοριοποιήθηκαν σε τρεις ομάδες, για τη διευκόλυνση της ανάλυσης: α) βαρέα μέταλλα και στοιχεία, β) λοιπές αβιοτικές παράμετροι ιζήματος και γ) αβιοτικές παράμετροι στήλης νερού. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης δίνονται στις παρακάτω εικόνες (εικόνες 9-11).



Εικόνα 9: Διαγραμματική απεικόνιση της ανάλυσης των κύριων συνιστωσών για την ομάδα των βαρέων μετάλλων και στοιχείων. Με πράσινο χρώμα συμβολίζονται οι σταθμοί δειγματοληψίας που βρίσκονται στο εσώτερο τμήμα των λιμνοθαλασσών ενώ με μπλε χρώμα συμβολίζονται οι σταθμοί δειγματοληψίας που βρίσκονται στο κανάλι επικοινωνίας της κάθε λιμνοθάλασσας με τον Αμβρακικό κόλπο.

Όπως φαίνεται από την παραπάνω εικόνα (εικόνα 9), το ασβέστιο και το στρόντιο εμφανίζει θετική συσχέτιση με τον πρώτο άξονα της PCA και μάλιστα είναι τα μοναδικά στοιχεία από το σύνολο των 45 βαρέων μετάλλων και στοιχείων που εμφανίζουν συσχέτιση με αυτόν τον άξονα. Όσον αφορά το δεύτερο άξονα, παρατηρείται θετική συσχέτιση με το

σίδηφο και το μαγνήσιο, ενώ αφνητική συσχέτιση παφατηφείται με το νάτφιο και το αλουμίνιο.

Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 4), δίνονται οι τιμές του μη παραμετρικού συντελεστή συσχέτισης του Spearman μεταξύ των συγκεντρώσεων των βαρέων μετάλλων και στοιχείων και των τιμών της ανάλυσης PCA.

Πίνακας 4: Οι τιμές του μη παραμετρικού συντελεστή συσχέτισης του Spearman για τις στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των συγκεντρώσεων των βαρέων μετάλλων και στοιχείων και των τιμών της ανάλυσης PCA. Με έντονη γραφή σημειώνονται τα στοιχεία που παρατηρούνται στην αντίστοιχη απεικόνιση. *: p < 0,05. **: p < 0,01. ***: p < 0,001.

	rho		rho	
Ca – PC1	0,881 **	La – PC2	0,7143 *	
Sr – PC1	0,8095 *	Ce – PC2	0,7619 *	
Mg-PC2	0,7619 *	Pr – PC2	0,8571 **	
Sc – PC2	0,7619 *	Nd – PC2	0,881 **	
V – PC2	0,7143 *	Eu – PC2	0,7857 *	ωνθ
Mn – PC2	0,9286 ***	Sm – PC2	0,8095 *	ανίδ
Fe – PC2	0,7857 *	Gd – PC2	0,7381 *	õ.
Co – PC2	0,8571 ***	Tb – PC2	0,7143 *	
Ni – PC2	0,7381 *	Dy – PC2	0,7143 *	
Cu – PC2	0,7143 *	Ho – PC2	0,7381 *	•
Y – PC2	0,7143 *		I	I
Pd – PC2	0,9286 ***			
Cs – PC2	0,7143 *			
Th – PC2	0,7143 *			

Από τα δεδομένα του πίνακα 4, επιβεβαιώνεται η θετική συσχέτιση του ασβεστίου και του στοοντίου με τον πρώτο άξονα, ο οποίος αντιπροσωπεύει πολύ μεγάλο ποσοστό της μεταβλητότητας μεταξύ των σταθμών δειγματοληψίας. Ακόμα, φαίνεται ότι σχεδόν όλες οι Λανθανίδες (εκτός των Eu, Er, Tm, Yb, Lu) εμφάνισαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον PC2.

Η ανάλυση κύριων συνιστωσών για τις υπόλοιπες αβιοτικές παραμέτρους του ιζήματος δίνεται στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 10).



Εικόνα 10: Διαγραμματική απεικόνιση της ανάλυσης των κύριων συνιστωσών για την ομάδα των λοιπών αβιοτικών παραμέτρων του ιζήματος. Με πράσινο χρώμα συμβολίζονται οι σταθμοί δειγματοληψίας που βρίσκονται στο εσώτερο τμήμα των λιμνοθαλασσών ενώ με μπλε χρώμα συμβολίζονται οι σταθμοί δειγματοληψίας που βρίσκονται στο κανάλι επικοινωνίας της κάθε λιμνοθάλασσας με τον Αμβρακικό κόλπο.

Φαίνεται πως η θεομοκοασία του ιζήματος εμφανίζει θετική συσχέτιση με τον PC1, ενώ το οξειδοαναγωγικό δυναμικό και το ποσοστό ιλύος-αργίλου σχετίζονται θετικά με τον PC2.

Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 5) δίνονται οι τιμές του μη παραμετρικού συντελεστή συσχέτισης του Spearman για τις στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των υπόλοιπων αβιοτικών παραμέτρων του ιζήματος και των τιμών της ανάλυσης PCA.

Πίνακας 5: Οι τιμές του μη παραμετρικού συντελεστή συσχέτισης του Spearman για τις στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των υπόλοιπων αβιοτικών παραμέτρων του ιζήματος και των τιμών της ανάλυσης PCA. Με έντονη γραφή σημειώνονται τα στοιχεία που παρατηρούνται στην αντίστοιχη απεικόνιση. *: p < 0,05. **: p < 0,01.

	rho
Phaeopigments – PC1	-0,7381 *
Temperature – PC1	0,8155 *
MD – PC1	-0,7381 *
Eh – PC2	0,9048 **
σ1 – PC3	0,8571 **

Όπως φαίνεται, υπάρχει θετική συσχέτιση της θερμοκρασίας του ιζήματος με τον PC1, που εξηγεί το μεγαλύτερο ποσοστό μεταβλητότητας (39,2%) αρνητική συσχέτιση παρατηρείται μεταξύ του συγκεκριμένου άξονα και των φαιοχρωστικών και της μέσης διαμέτρου των κόκκων του ιζήματος.

Η ανάλυση κύριων συνιστωσών για τις αβιοτικές παραμέτρους της στήλης του νερού δίνεται στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 11) και οι τιμές του μη παραμετρικού συντελεστή συσχέτισης του Spearman για τις

στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των συγκεκοιμένων παραμέτρων και των τιμών της ανάλυσης PCA δίνονται στον πίνακα 6.



Εικόνα 11: Διαγραμματική απεικόνιση της ανάλυσης των κύριων συνιστωσών για την ομάδα των αβιοτικών παραμέτρων της στήλης του νερού. Με πράσινο χρώμα συμβολίζονται οι σταθμοί δειγματοληψίας που βρίσκονται στο εσώτερο τμήμα των λιμνοθαλασσών ενώ με μπλε χρώμα συμβολίζονται οι σταθμοί δειγματοληψίας που βρίσκονται στο κανάλι επικοινωνίας της κάθε λιμνοθάλασσας με τον Αμβρακικό κόλπο.

Πίνακας 6: Οι τιμές του μη παραμετρικού συντελεστή συσχέτισης του Spearman για τις στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των αβιοτικών παραμέτρων της στήλης του νερού και των τιμών της ανάλυσης PCA. Με έντονη γραφή σημειώνονται τα στοιχεία που παρατηρούνται στην αντίστοιχη απεικόνιση. *: p < 0,05. **: p < 0,01.

	rho
NH ₄ – PC1	-0,7619 *
NO ₃ – PC1	-0,7381 *
Chl-a – PC1	0,9048 **
Phaeopigments-PC1	0,8095 *
CPE – PC1	0,9048 **
POC – PC1	0,9048 **
Temperature – PC2	0,7917 *

Όπως παρατηρούμε, από τις παραμέτρους που εμφάνισαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τις τιμές της ανάλυσης PCA, σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός της θερμοκρασίας, η συσχέτιση ήταν αφορούσε τον PC1 (ποσοστό μεταβλητότητας 54,1%).

2. Βιοτικές παράμετροι

2.1 Μακροπανίδα

Τα είδη των πολυχαίτων που βρέθηκαν στις λιμνοθάλασσες παρουσιάζονται στο παράρτημα (πίνακας 4).

Στην εικόνα 12 παρουσιάζεται η ομαδοποίηση της μέσης αφθονίας των πολυχαίτων με τη χρήση της μεθόδου μη μετρικής πολυδιάστατης κλιμάκωσης και με τη βοήθεια του συντελεστή ομοιότητας των Bray-Curtis.



Εικόνα 12: Απεικόνιση της ομοιότητας των μακοοπανιδικών κοινοτήτων των λιμνοθαλασσών, με τις τιμές του μέσου όρου των αφθονιών των ειδών, με χρήση της μεθόδου μη μετοικής πολυδιάστατης κλιμάκωσης. Με πράσινο χρώμα συμβολίζονται οι σταθμοί δειγματοληψίας που βρίσκονται στο εσώτερο τμήμα των λιμνοθαλασσών ενώ με μπλε χρώμα συμβολίζονται οι σταθμοί δειγματοληψίας που βρίσκονται στο κανάλι επικοινωνίας της κάθε λιμνοθάλασσας με τον Αμβρακικό κόλπο. Όπως φαίνεται, δεν υπάρχει κάποια χαρακτηριστική ομαδοποίηση για τα είδη των πολυχαίτων (ANOSIM: R = 0,167 · p = 0,229; PERMANOVA: Παράγοντας λιμνοθάλασσα: p = 0,341, 553 μεταθέσεις; Παράγοντας τοποθεσία: p = 0,786, 367 μεταθέσεις). Το ίδιο αποτέλεσμα προκύπτει και από την μέθοδο πολυδιάστατης ανάλυσης που εφαρμόστηκε για τις οικογένειες των πολυχαίτων (ANOSIM: R = 0,333 · p = 0,076; PERMANOVA: Παράγοντας λιμνοθάλασσα: p = 0,167, 552 μεταθέσεις; Παράγοντας τοποθεσία: p = 0,667, 371 μεταθέσεις).

2.2. Μικοοβιακή ποικιλότητα

Οι περίπου 150.000 αρχικές αλληλουχίες ομαδοποιήθηκαν σε 42.660 αλληλουχίες υψηλής ποιότητας. Τα αποτελέσματα της επεξεργασίας των αλληλουχιών κατά την αφαίρεση του θορύβου παρουσιάζονται αναλυτικά στο παράρτημα (πίνακας 5). Είναι φανερό, από τις καμπύλες αραίωσης (rarefaction curves), ότι ο δείκτης Chao1 δεν έφτασε το πλατώ για όλα τα δείγματα (εικόνα 13), γεγονός που δείχνει ότι οι βιβλιοθήκες των δειγμάτων δεν μπορούν να θεωρηθούν αρκετά μεγάλες για την μη αμερόληπτη εκτίμηση της ποικιλότητας των ΟTUs.



Εικόνα 13: Διαγφαμματική απεικόνιση των τιμών του δείκτη Chao1 για το κάθε δείγμα, όπως αυτοί υπολογίστηκαν από το πακέτο QIIME. Το πφάσινο τφίγωνο συμβολίζει τους σταθμούς δειγματοληψίας στο εσώτεφο τμήμα των λιμνοθαλασσών, ενώ το μπλε τφίγωνο συμβολίζει τους σταθμούς δειγματοληψίας της κάθε δειγματοληψίας που βφίσκονται στο κανάλι επικοινωνίας της κάθε λιμνοθάλασσας με τον Αμβφακικό κόλπο. Α, Β, C: τα επαναληπτικά δείγματα.

Τα ποσοστά εμφάνισης των διαφορετικών φύλων για τα βακτήρια και τα αρχαία παρουσιάζονται στην εικόνα 14.



Εικόνα 14: Διαγραμματική απεικόνιση των ποσοστών εμφάνισης των διαφορετικών ομάδων για τα βακτήρια και τα αρχαία, σύμφωνα με το ποσοστό ομοιότητας 97% μεταξύ των λειτουργικών ταξινομικών ομάδων.

Κυρίαρχη ομάδα είναι τα Proteobacteria, με ποσοστό περίπου 35%, ενώ ακολουθούν τα μη καλλιεργημένα βακτήρια (ποσοστό 29%), τα οποία δε μπορούν να καταταγούν σε κάποιο φύλο από τα υπόλοιπα, και οι Bacteroidetes (ποσοστό 17%). Αναλυτικά, τα ποσοστά των κυρίαρχων ομάδων σε κάθε λιμνοθάλασσα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 7). Πίνακας 7: Τα ποσοστά των κυρίαρχων λειτουργικών ταξινομικών μονάδων (97% ομοιότητα) ανά σταθμό δειγματοληψίας. α: σταθμοί δειγματοληψίας στο εσώτερο τμήμα των λιμνοθαλασσών. β: σταθμοί δειγματοληψίας που βρίσκονται στο κανάλι επικοινωνίας της κάθε λιμνοθάλασσας με τον Αμβρακικό κόλπο.-:≤ 1%.

Μάζ	Μάζωμα		Λογαϱού		πέλι	Τσου	καλιό	Φυλογενετική ομάδα
α	β	α	β	α	β	α	β	- υπογενετική υμασα
1,7	2,4	2	2	3	-	4,6	6,2	Root;Archaea;Euryarchaeota
1,2	-	1,4	-	1,7	-	3,2	3,2	Root;Archaea; Other
1,8	1,4	1,6	3	2,4	2,8	2,2	2	Root;Bacteria;Acidobacteria;Acidobacteria
10,2	10,3	9,1	8,1	8	9	1,8	4,1	Root;Bacteria;Bacteroidetes;Flavobacteria
2,3	1,3	3,4	1,5	2,8	2,8	1,7	2,4	Root;Bacteria;Bacteroidetes;Sphingobacteria
12,1	7,4	5,8	3,7	7,4	7,9	4,4	5,2	Root;Bacteria;Bacteroidetes; Other
1,5	6,4	7,6	8,7	1,4	1,3	5,9	4,9	Root;Bacteria;Cyanobacteria;Cyanobacteria
4,8	1,9	1,1	-	1,6	-	-	-	Root;Bacteria;Firmicutes;"Clostridia"
1,4	-	-	-	-	-	-	-	Root;Bacteria;Firmicutes; Other
-	1,3	1,8	2,7	1,5	2,6	1,8	2,2	Root;Bacteria;Planctomycetes;Planctomycetacia
1,5	2,1	2,2	1,7	1,9	2	2,5	2,1	Root;Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria
14,8	13,3	16,2	17,2	18,2	17,7	12,8	13,6	Root;Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria
11,1	11,6	8,7	9	9,3	10,3	10,7	7	Root;Bacteria;Proteobacteria;Deltaproteobacteria
3,5	3,7	5,5	5,4	5,5	5,6	4,9	5,2	Root;Bacteria;Proteobacteria; Other
-	-	1,4	-	2,1	3	1,1	1,4	Root;Bacteria;Verrucomicrobia;Verrucomicrobiae
23,8	29,2	26,8	30,0	27,5	25,7	35,6	34,4	Root;Bacteria; Other
93,8	94,9	94,8	95,6	94,5	93,3	94,0	94,4	Σύνολο

Παρατηρούμε ότι δεν υπάρχουν μεγάλες διαφορές στα ποσοστά συμμετοχής των ταξινομικών ομάδων στους σταθμούς δειγματοληψίας. Ωστόσο, βλέπουμε πως σε μερικές περιπτώσεις, το ποσοστό κάποιας ομάδας είναι αρκετά μεγαλύτερο σε κάποιο σταθμό δειγματοληψίας, όπως για παράδειγμα συμβαίνει για τον εσωτερικό σταθμό της λιμνοθάλασσας Μάζωμα και για τα Clostridia και τους Bacteroidetes. Αναλόγως, στη λιμνοθάλασσα Τσουκαλιό, και για τους δύο σταθμούς δειγματοληψίας, παφατηφείται μειωμένο το ποσοστό των Flavobacteria. Επιπλέον, το μεγαλύτεφο ποσοστό των αφχαίων και των μη καλλιεφγημένων βακτηφίων βφέθηκε στη λιμνοθάλασσα Τσουκαλιό.

Στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 15) παρουσιάζονται τα διαγραμματικά τα δεδομένα του πίνακα 7.



Εικόνα 15: Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής των ποσοστών των κυρίαρχων ομάδων στους σταθμούς δειγματοληψίας.

Στην εικόνα 16 παρουσιάζεται η ομαδοποίηση των μικροβιακών OTUs των λιμνοθαλασσών με τη χρήση της μεθόδου μη μετρικής πολυδιάστατης κλιμάκωσης και με τη βοήθεια του συντελεστή ομοιότητας των Bray-Curtis.



Tsoukalio A

β

Tsoukalio C

Εικόνα 16: Απεικόνιση της ομοιότητας των βακτηριακών κοινοτήτων των λιμνοθαλασσών, σύμφωνα με το ποσοστό ομοιότητας 97% μεταξύ των λειτουργικών ταξινομικών μονάδων, με χρήση της μεθόδου μη μετρικής πολυδιάστατης κλιμάκωσης. α: απεικόνιση με το μέσο όρο των αφθονιών των OTUs. β: απεικόνιση με τις τιμές των αφθονιών των επαναληπτικών δειγμάτων (replicates). Με πράσινο χρώμα συμβολίζονται οι σταθμοί δειγματοληψίας που βρίσκονται στο εσώτερο τμήμα των λιμνοθαλασσών ενώ με μπλε χρώμα συμβολίζονται οι σταθμοί δειγματοληψίας που βρίσκονται στο κανάλι επικοινωνίας της κάθε λιμνοθάλασσας με τον Αμβρακικό κόλπο. Α, Β, C: τα επαναληπτικά δείγματα.

Tsopeli A

Tsopeli A

Tsopeli C

Tsopeli B

Mazoma

🔺 Tsopeli B

Tsopeli C

Όπως φαίνεται από τις απεικονίσεις, η μικροβιακή ποικιλότητα ομαδοποιείται ανά λιμνοθάλασσα, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τη στατιστική διαδικασία ANOSIM όταν λαμβάνονται υπόψη τόσο οι μέσες τιμές των αφθονιών (R = 0,979' p = 0,001), όσο και οι τιμές των αφθονιών των επαναληπτικών δειγμάτων (R = 0,868' p = 0,001). Λεπτομερέστερα είναι και τα αποτελέσματα της ανάλυσης PERMANOVA, για τις αφθονίες των επαναληπτικών δειγμάτων (Παράγοντας λιμνοθάλασσα: p = 0,001, 993 μεταθέσεις; Παράγοντας τοποθεσία: p = 0,004, 999 μεταθέσεις; λιμνοθάλασσα x τοποθεσία: p = 0,002, 997 μεταθέσεις).

Εάν η μικοοβιακή ποικιλότητα μελετηθεί σύμφωνα με άλλο βαθμό ομοιότητας μεταξύ των λειτουογικών ταξινομικών ομάδων (OTUs), ποοκύπτει κάθε φορά η ίδια ομαδοποίηση. Με άλλα λόγια, η μικοοβιακή ποικιλότητα κάθε λιμνοθάλασσας είναι διαφορετική από αυτή των υπολοίπων ανεξάρτητα από το εάν αναφερόμαστε σε βακτηριακά στελέχη (≥99% ομοιότητα) ή σε ταξινομικές ομάδες αντίστοιχες με είδη (≥97% ομοιότητα), γένη (≥95% ομοιότητα) και οικογένειες (≥90% ομοιότητα) (πίνακας 8).

Πίνακας 8: Τα αποτελέσματα των στατιστικών δοκιμασιών ΑΝΟSIM (α και β) και PERMANOVA (β) για τα διαφορετικά ποσοστά ομοιότητας των αλληλουχιών των μικροβίων. α: οι τιμές μέσου όρου της αφθονίας των δειγμάτων. β: οι τιμές της αφθονίας των επαναληπτικών δειγμάτων. Λ: λιμνοθάλασσα. Τ: τοποθεσία. perm: μεταθέσεις (permutations).

	≥99% ομοιότητα		≥97% ομοιότητα		≥95% ομοιότητα		≥90% ομοιότητα		
ANOSIM	α β		α β		α β		α	β	
	R=1	R=0,909	R=0,979	R=0,868	R= 0,958	R=0,823	R=0,979 R=0,757		
	p=0,001	p=0,001	p=0,001	p=0,001	p=0,001	p=0,001	p=0,001	p=0,001	
PERMANOVA	Λ: p=0,001,	998 perm.	Λ: p=0,001, 993 perm.		Λ: p=0,001, 995 perm.		Λ: p=0,001, 998 perm.		
	T: p=0,002, 998 perm		T: p=0,004	T: p=0,004, 999 perm		1, 996 perm	T: p=0,009, 999 perm		
	ΛxT: p=0,001	1,996 perm	ΛхТ: p=0,0	ΛxT: p=0,002, 997 perm		ΛxT: p=0,001, 995 perm		ΛxT: p=0,007, 997 perm	

Οι μήτρες ομοιότητας που βασίστηκαν στα δεδομένα αφθονίας, καθώς και αυτές που βασίστηκαν σε δεδομένα παρουσίας/απουσίας βακτηριακών OTUs, για όλα τα ποσοστά ομοιότητας των μικροβίων, χρησιμοποιήθηκαν για μη μετρική πολυδιάστατη κλιμάκωση δευτέρου επιπέδου (εικόνα 17).



Εικόνα 17: Απεικόνιση της για πολυδιάστατης ανάλυσης δευτέφου επιπέδου των μικφοβιακών κοινοτήτων για τα διαφοφετικά επίπεδα ομοιότητας και για διαφοφετικούς τύπους δεδομένων.

Φαίνεται πως υπάρχει μία ομαδοποίηση σύμφωνα με τα ευρύτερα επίπεδα ομοιότητας η μία ομάδα αποτελείται από τα δεδομένα αφθονίας και παρουσία/απουσίας των επιπέδων ομοιότητας 90 και 95% ενώ η δεύτερη αποτελείται από τα αντίστοιχα δεδομένα για τα άλλα δύο επίπεδα ομοιότητας (97 και 99%) (ANOSIM: R: 0,583 p = 0,029). Αυτό σημαίνει ότι διαφορετικά επίπεδα ομοιότητας μπορούν να δώσουν παρόμοια πληροφορία σχετικά με τις μικροβιακές κοινότητες των υπό μελέτη λιμνοθαλασσών.

Από τη σύγκριση των μικροβιακών κοινοτήτων των λιμνοθαλασσών προκύπτει ότι οι λιμνοθάλασσες μοιράζονται σημαντικό αριθμό βακτηριακών OTUs με 97% ομοιότητα (εικόνα 18). Παρόλα αυτά, τα OTUs που είναι μοναδικά σε κάθε λιμνοθάλασσα, αν και αποτελούν τη μειοψηφία σε σχέση με το σύνολο των OTUs της (Μάζωμα: περίπου 36%

(σύνολο 5771 OTUs), Λογαφού: πεφίπου 38% (σύνολο 6059 OTUs), Τσοπέλι: πεφίπου 35% (σύνολο 5080 OTUs), Τσουκαλιό: πεφίπου 40% (σύνολο 5213 OTUs)), επηφεάζουν την υπόλοιπη κοινότητα της κάθε λιμνοθάλασσας και την κατηγοφιοποιούν με βάση αυτόν τον παφάγοντα, όπως έχει πφοαναφεφθεί. Τα κοινά OTUs μεταξύ όλων των λιμνοθαλασσών εμφανίζονται με αφκετά χαμηλό ποσοστό, πεφίπου 8% (1057 OTUs επί του συνόλου των 13414).



Εικόνα 18: Συνολικοί αφιθμοί και τα κοινά OTUs (97% ομοιότητα) μεταξύ των λιμνοθαλασσών.

Διαφορετικά αποτελέσματα προκύπτουν αν ληφθεί υπόψη και η αφθονία των ΟTUs στις διαφορετικές κοινότητες (εικόνα 19).



Εικόνα 19: Συνολικοί αριθμοί και τα κοινά OTUs (97% ομοιότητα) ίδιας αφθονίας μεταξύ των λιμνοθαλασσών.

Όπως είναι αναμενόμενο, τα κοινά OTUs είναι λιγότερα σε αυτή την περίπτωση, ενώ αυξάνονται τα μοναδικά OTUs κάθε λιμνοθάλασσας. Παρατηρούμε ότι όλες οι λιμνοθάλασσες έχουν μόλις 20 κοινά OTUs (0,1% επί του συνόλου των 19214 κοινών OTUs με κοινές αφθονίες). Φαίνεται λοιπόν, πως η συμμετοχή του κάθε βακτηριακού OTU στη συνεύρεση έχει ουσιαστική σημασία για τη σύνθεση και τη λειτουργία της.

Επιπλέον, σύμφωνα με την προηγούμενη εικόνα (εικόνα 18), η λιμνοθάλασσα με τα περισσότερα μοναδικά OTUs ήταν η Λογαρού και ακολουθούσαν το Τσουκαλιό, το Μάζωμα και το Τσοπέλι. Αυτή η σειρά όμως έχει μεταβληθεί, δεδομένης της συμπερίληψης των αφθονιών των OTUs (εικόνα 19), σε Λογαρού, Μάζωμα, Τσουκαλιό και Τσοπέλι.

Στην προσπάθεια εύρεσης του κοινού πυρήνα των μικροβιακών λειτουργικών ταξινομικών μονάδων, μπορούν να μελετηθούν διαγράμματα παρόμοια με τα δύο προηγούμενα, που να περιέχουν όμως πληροφορία για την κοινή φυλογενετική ιστορία των OTUs στις λιμνοθάλασσες (εικόνα 20).



Εικόνα 20: Οι κοινές φυλογενετικές γραμμές μεταξύ των λιμνοθαλασσών, με βάση τα φυλογενετικά συγγενικά OTUs (97% ομοιότητα), κοινά των διαφορετικών συνευρέσεων.

Όπως φαίνεται, οι λιμνοθάλασσες μοιράζονται 144 φυλογενετικές γραμμές σε ποσοστό 42% περίπου επί του συνόλου (345). Σε αυτή την περίπτωση, η λιμνοθάλασσα με τις περισσότερες μοναδικές φυλογενετικές γραμμές είναι το Μάζωμα (10% επί των 250 της λιμνοθάλασσας) και ακολουθούν το Τσοπέλι (περίπου 10% - 237), η Λογαρού (περίπου 9% - 234) και το Τσουκαλιό (περίπου 8% - 227). Φαίνεται λοιπόν ότι υπάρχει ένας φυλογενετικός πλεονασμός όσον αφορά τον κοινό πυρήνα όλων των λιμνοθαλασσών, δηλαδή οι λιμνοθάλασσες έχουν κοινά πολλά φυλογενετικά συγγενικά ΟTUs.

3. Συσχετίσεις παραμέτρων

3.1 Συσχετίσεις αβιοτικών – βιοτικών παραμέτρων

Για την ανάλυση BIOENV επιλέχθηκαν οι περιβαλλοντικές μεταβλητές που δεν εμφάνισαν ισχυρή συσχέτιση μεταξύ τους και ήταν οι εξής: συγκέντρωση φωσφορικών αλάτων (PO4), συγκέντρωση διοξειδίου του αζώτου (NO2), συγκέντρωση ολικού ανηγμένου ανόργανου θείου (TRIS), χλωροφύλλης-α ίζημα (Chl-a), συγκέντρωση στο συγκέντρωση φαιοχρωστικών στο ίζημα (Phaeopigments), συγκέντρωση σωματιδιακού οργανικού άνθρακα στο ίζημα (POC), θερμοκρασία στήλης νερού, ιζήματος, αλατότητα, αγωγιμότητα, θερμοκρασία οξειδοαναγωγικό δυναμικό (Eh), μέση διάμετρος κόκκων (MD), συντελεστής ταξινόμησης (σ1), συντελεστής λοξότητας (Sk1) και ποσοστό ιλύος-αργίλου (silt & clay). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (πίνακας 9).

Πίνακας 9: Οι πεφιβαλλοντικές μεταβλητές που εμφανίζουν τη μεγαλύτεφη δυνατή συσχέτιση με τα πφότυπα ομοιότητας: α: της μέσης αφθονίας της μικφοβιακής συνεύφεσης (97% ομοιότητα των OTUs), β: της μέσης αφθονίας της μακφοπανιδικής συνεύφεσης (είδη πολυχαίτων), γ: των συγκεντφώσεων των βαφέων μετάλλων και στοιχείων. φ.: αφμονικός συντελεστής συσχέτισης. p = 0,001.

	Α	βιοτικές πα	χ ράμετρο	οι νεφού	Αβιοτικ	Qw		
	PO ₄	NO ₂	Salinity	Conductivity	TRIS	Phaeopigments	silt &	
	(uM)	(uM)	(psu)	(mS/cm)	(uM/gr)	(ug/g)	clay (%)	
α		+	+	+				0,683
β	+				+		+	0,552
γ		+			+	+	+	0,746

Όπως φαίνεται από τον παφαπάνω πίνακα, η μικφοβιακή συνεύφεση εμφανίζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με αβιοτικές παφαμέτφους του νεφού και όχι του ιζήματος. Η μακφοπανιδική, και ειδικότεφα η συνεύφεση των πολυχαίτων, σχετίζεται τόσο με παφάγοντες του ιζήματος όσο και του νεφού. Επιπλέον, δεν πφοκαλεί έκπληξη η συσχέτιση των βαφέων μετάλλων με παφάγοντες όπως το ποσοστό ιλύος/αφγίλου στο ίζημα και η συγκέντφωση του ολικού ανηγμένου ανόφγανου θείου (λ.χ. Simpson et al., 1998; Ianni et al., 2000; Zhang et al., 2002).

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης BIOENV για τα διαφορετικά επίπεδα ομοιότητας των μικροβιακών OTUs δίνονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 10).

Πίνακας 10: Οι πεφιβαλλοντικές μεταβλητές που εμφανίζουν τη μεγαλύτεφη δυνατή συσχέτιση με τα πφότυπα ομοιότητας των μικφοβιακών συνευφέσεων. α: οι τιμές του μέσου όφου της αφθονίας των δειγμάτων. β: οι τιμές της αφθονίας των επαναληπτικών δειγμάτων. **: p < 0,01.

		Αβιοτι	κές παφά	μετοοι νεοού	Αβιοτικ	Qw			
		NO ₂	Salinity	Conductivity	TRIS	Chl-a	silt & clay	Sk1	
		(uM)	(psu)	(mS/cm)	(uM/gr)	(ug/g)	(%)		
≥99%	α	+	+	+					0,704 **
ομοιότητα	β		+						0,677 **
≥97%	α	+	+	+					0,683 **
ομοιότητα	β		+						0,650 **
≥95%	α	+	+	+		+	+		0,646 **
ομοιότητα	β		+						0,650 **
≥90%	α	+	+	+		+	+		0,630 **
ομοιότητα	β	+	+	+	+			+	0,535 **

Είναι εμφανές ότι η αλατότητα είναι ο περιβαλλοντικός παράγοντας που εμφανίζει τη μεγαλύτερη δυνατή συσχέτιση σε όλες τις περιπτώσεις, και μάλιστα είναι και ο μοναδικός παφάγοντας σε πολλές από αυτές. Επιπλέον, παφατηφούμε ότι όσο μειώνεται το ποσοστό ομοιότητας των OTUs, δηλαδή όσο μεγαλώνει το φυλογενετικό επίπεδο, εμφανίζεται συσχέτιση της αφθονίας των μικφοβίων με παφάγοντες του ιζήματος (συγκέντφωση χλωφοφύλλης-α, ποσοστό ιλύος και αφγίλου, συγκέντφωση ολικού ανηγμένου ανόφγανου θείου, συντελεστή λοξότητας για την ασυμμετφία της κατανομής του μεγέθους των κόκκων του ιζήματος), κάτι που δε συμβαίνει στα OTUs με υψηλό επίπεδο ομοιότητας (99%, 97%).

Οι μικοοβιακές συνευρέσεις δεν εμφάνισαν σημαντική συσχέτιση σε καμία περίπτωση με τις αβιοτικές παραμέτρους ή/και τη γεωγραφική απόσταση μεταξύ σταθμών δειγματοληψίας των (δεδομένα παρουσίας/απουσίας OTUs και δεδομένα αφθονίας, σε διαφορετικά επίπεδα ομοιότητας). Επομένως, δε φαίνεται να υπάρχει επίδραση του αβιοτικού περιβάλλοντος και των προηγούμενων ιστορικών γεγονότων στην κατανομή τους. Αυτό σημαίνει ότι όλα τα δείγματα πάρθηκαν εντός ενός μικροβιακού ενδιαιτήματος (habitat) και μίας «περιοχής» (province) και κατά συνέπεια αυτό υποδηλώνει έλλειψη βιογεωγραφικού προτύπου. Ωστόσο, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι τα συγκεκριμένα αποτελέσματα προέρχονται από μία δειγματοληψία και επομένως δεν είναι και τα πλέον αντιπροσωπευτικά στο χρόνο.

Εάν από το σύνολο των αβιοτικών παραμέτρων επιλεχθούν εκείνες του πίνακα 10, δηλαδή οι παράμετροι που έχει δειχθεί ότι έχουν συνάφεια με τα πρότυπα των μικροβιακών συνευρέσεων, προκύπτει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτισή τους με τα πρότυπα της αφθονίας των μικροβίων, για τα OTUs με επίπεδα ομοιότητας 99% και 95% (RELATE: $ρ_w$ = 0,507' p = 0,002 και p = 0,001 αντίστοιχα). Το ίδιο παρατηρείται και με το πρότυπο παρουσίας/απουσίας OTUs για το επίπεδο ομοιότητας 95% (RELATE: $ρ_w$ = 0,503' p = 0,001). Αυτό δείχνει ότι στις περιπτώσεις αυτές, οι συνευρέσεις των μικροβίων μπορεί να επηρεάζονται από το περιβάλλον

και πιθανότατα ποοκύπτει και βιογεωγοαφικό ποότυπο (πολλαπλά ενδιαιτήματα εντός μίας «πεοιοχής») αυτό το ποότυπο χαοακτηοιστικά οοίζεται ως «τα πάντα είναι παντού αλλά επιλέγει το πεοιβάλλον» (environmental filtering) (Baas-Becking, 1934; de Wit & Bouvier, 2006).

Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων και στοιχείων, δεν εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των μητρών ομοιότητάς τους και των μητρών ομοιότητας της αφθονίας των μικροβιακών ΟΤUs. Ωστόσο, αν και το σύνολο των βαρέων μετάλλων και στοιχείων δε φάνηκε να επηρεάζει τις μικροβιακές συνευρέσεις των λιμνοθαλασσών, το χρώμιο εμφάνισε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον αριθμό των μικροβιακών ΟTUs (S) και το δείκτη ποικιλότητας Margalef (d) ενώ το κάλιο συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με τις τιμές του δείκτη ποικιλότητας Shannon-Wiener (H')[•] οι τιμές του μη παραμετρικού συντελεστή συσχέτισης του Spearman και του συντελεστή συσχέτισης του Pearson δίνονται στον πίνακα 11. **Πίνακας 11:** Οι τιμές των συντελεστών συσχέτισης Spearman (rho) και Pearson (r) που προέκυψαν από τη συσχέτιση βαρέων μετάλλων και δεικτών ποικιλότητας. *: p < 0.05.

	Cr (pp	om)	К (рр	om)
	rho	r	rho	r
d (99%)	-0,786 *	-0,833 *		I
d (97%)	-0,714 *	-0,815 *		
d (95%)	-0,69	-0,817 *		
d (90%)	-0,695	-0,743 *		
S (99%)	-0,643	-0,788 *		
S (97%)	-0,738 *	-0,766 *		
S (95%)	-0,69	-0,764 *		
S (90%)	-0,595	-0,685		
H' (99%)		·	-0,786 *	-0,709
H' (97%)			-0,786 *	-0,74 *
H' (95%)			-0,714 *	-0,675
H' (90%)			-0,714 *	-0,61

Στις εικόνες που ακολουθούν (εικόνες 21-23) απεικονίζεται η παλινδρόμηση των δεικτών ποικιλότητας με τις συγκεντρώσεις των μετάλλων που προαναφέρθηκαν (χρώμιο και κάλιο).



Εικόνα 21: Διαγραμματική απεικόνιση της παλινδρόμησης της συγκέντρωσης του χρωμίου και των τιμών του δείκτη Margalef (d), για κάθε επίπεδο ομοιότητας OTUs.

Όπως παφατηφούμε, η γφαμμική παλινδφόμηση d – Cr ήταν στατιστικά σημαντική για όλα τα επίπεδα ομοιότητας OTUs. Δεν παφατηφήθηκε το ίδιο όμως για τη γφαμμική παλινδφόμηση της συγκέντφωσης του χφωμίου με τον αφιθμό των μικφοβιακών OTUs (S), καθώς στην πεφίπτωση του 90% ποσοστού ομοιότητας δεν ήταν στατιστικά σημαντική (εικόνα 22).


Εικόνα 22: Διαγραμματική απεικόνιση της παλινδρόμησης της συγκέντρωσης του χρωμίου και του αριθμού των OTUs (S), για κάθε επίπεδο ομοιότητας.

Αντίστοιχα, η γοαμμική παλινδοόμηση των συγκεντοώσεων του καλίου με τις τιμές του δείκτη ποικιλότητας Shannon-Wiener ήταν στατιστικά σημαντική μόνο για δύο επίπεδα ομοιότητας OTUs (εικόνα 23).



Εικόνα 23: Διαγραμματική απεικόνιση της παλινδρόμησης της συγκέντρωσης του καλίου και του δείκτη ποικιλότητας Shannon-Wiener (Η'), για τα 97 και 99% επίπεδα ομοιότητας OTUs.

Σε όλες τις προαναφερθείσες περιπτώσεις γραμμικής παλινδρόμησης και συσχέτισης των μετάλλων με δείκτες ποικιλότητας των μικροβιακών συνευρέσεων, η συσχέτιση ήταν αρνητική για όλα τα επίπεδα ομοιότητας ΟTUs που ελέγχθηκαν.

Τα παφαπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέφασμα ότι τελικά οι αβιοτικοί παφάγοντες πιθανότατα επηφεάζουν τη σύνθεση και αφθονία των βακτηφιακών συνευφέσεων. Επίσης, η έλλειψη συσχέτισης μεταξύ των πολυμεταβλητών χωφικών πφοτύπων πιθανότατα να οφείλεται στο γεγονός ότι στα πλαίσια της μελέτης αυτής τα αποτελέσματα πφοέφχονται από μία μόνο δειγματοληψία.

3.2 Αλληλοσυσχετίσεις βιοτικών παραμέτρων

Οι μήτρες ομοιότητας των ειδών και των οικογενειών των πολυχαίτων δεν εμφάνισαν κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση, κατά την ανάλυση RELATE, με αυτές των μικροβίων για τα OTUs με επίπεδο ομοιότητας 97% (RELATE: $\rho_w = 0,065^\circ p = 0,291$) και 90% (RELATE: $\rho_w = 0,251^\circ p = 0,053$).

Οι μήτρες ομοιότητας που προαναφέρθηκαν, καθώς και οι μήτρες ομοιότητας για τα υπόλοιπα ποσοστά ομοιότητας των μικροβίων (99% και 95%) χρησιμοποιήθηκαν για μη μετρική πολυδιάστατη κλιμάκωση δευτέρου επιπέδου (εικόνα 24).



Εικόνα 24: Απεικόνιση της μη μετρικής πολυδιάστατης κλιμάκωσης δευτέρου επιπέδου για τις συνευρέσεις πολυχαίτων και μικροβίων.

Όπως φαίνεται και από την παραπάνω εικόνα, δημιουργούνται δύο χαρακτηριστικές ομάδες, τα πολυμεταβλητά πρότυπα των βακτηρίων από τη μία πλευρά του σχεδιαγράμματος και τα αντίστοιχα των πολυχαίτων από την άλλη. Είναι προφανές ότι δεν υπάρχει κάποια χαρακτηριστική συσχέτιση των μακροπανιδικών και των μικροβιακών κοινοτήτων στις συγκεκριμένες λιμνοθάλασσες.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Περιβάλλον

Τόσο η συλλογή δειγμάτων για τη μέτρηση αβιοτικών παραμέτρων όσο και η μέτρηση παραμέτρων στο πεδίο, αποσκοπούν στην πληρέστερη περιγραφή του υπό μελέτη συστήματος. Σύμφωνα με τα δεδομένα της παρούσας εργασίας, προκύπτει ότι κάθε λιμνοθάλασσα έχει διαφορετικά περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά από τις υπόλοιπες, όπως έχει παρατηρηθεί και από προηγούμενη μελέτη (Βασιλειάδου, 2008), και επιπλέον παρατηρείται μια διαβάθμιση των αβιοτικών παραμέτρων από το κανάλι επικοινωνίας κάθε λιμνοθάλασσας με τον Αμβρακικό κόλπο έως τον εσωτερικό σταθμό δειγματοληψίας.

Οι υψηλότεφες τιμές αλατότητας παφατηφήθηκαν στη Λογαφού και ενδεχομένως οφείλονται στο μικφό βάθος της λιμνοθάλασσας και στην καλύτεφη επικοινωνία της με τη θάλασσα (Kormas et al., 2001; Βασιλειάδου, 2008).

Ορισμένες από τις αβιοτικές παραμέτρους συσχετίζονται ισχυρά με τα πολυμεταβλητά χωρικά πρότυπα κατανομής των μικροβίων, των πολυχαίτων και των βαρέων μετάλλων και στοιχείων στις συγκεκριμένες λιμνοθάλασσες, αποτέλεσμα που οδηγεί στην απόρριψη της αρχικής υπόθεσης H₀₁. Κοινές παράμετροι μεταξύ των παραπάνω προτύπων (εάν για το μικροβιακό πρότυπο ληφθεί υπόψη το επίπεδο ομοιότητας 90%), είναι η συγκέντρωση του ολικού ανηγμένου ανόργανου θείου και το ποσοστό ιλύος-αργίλου. Οι παράμετροι που εμφάνισαν συσχέτιση με τα πολυμεταβλητά πρότυπα κατανομής των βιοτικών παραμέτρων, δεν είναι μεταξύ των κυρίαρχων περιβαλλοντικών μεταβλητών στο λιμνοθαλάσσιο περιβάλλον υπό μελέτη, σύμφωνα με την ανάλυση κύριων συνιστωσών.

Γενικά, οι λιμνοθάλασσες είναι πολύ περίπλοκα συστήματα που δέχονται ποικίλες επιδράσεις λόγω υδρολογικών, ιζηματολογικών και ανθρωπογενών δραστηριοτήτων (λ.χ. επιδράσεις στα ανοίγματα των καναλιών, υδατοκαλλιέργειες, γεωργία), οι οποίες ασκούν συνεργιστική δράση στη βιοποικιλότητα των λιμνοθαλασσών. Κατά συνέπεια, είναι δύσκολος ο διαχωρισμός των φυσικών από τις ανθρωπογενείς επιδράσεις και ακόμα δυσκολότερη είναι η αξιολόγηση της οικολογικής κατάστασης των λιμνοθαλασσών (Reizopoulou & Nicolaidou, 2004).

2. Βαφέα μέταλλα και στοιχεία

Οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων και στοιχείων, σύμφωνα με τις μεθόδους μη-παραμετρικής ανάλυσης διακύμανσης που χρησιμοποιήθηκαν, διαφοροποιούνται σημαντικά μεταξύ των υπό μελέτη λιμνοθαλασσών. Έχει τεκμηριωθεί ότι οι διαφορετικές συγκεντρώσεις των μετάλλων μεταξύ των σταθμών δειγματοληψίας ενδεχομένως να αντανακλούν διαφορές στην κοκκομετρική σύσταση παρά διαφορές στο βαθμό ούπανσης. Για το λόγο αυτό, έχουν προταθεί αρκετές μέθοδοι για διόρθωση των συγκεντρώσεων των μετάλλων λαμβάνοντας υπόψη τυχόν επιδράσεις του μεγέθους των κόκκων του ιζήματος (Ackermann, 1980; Mayer & Fink, 1980; Ackermann et al., 1983; Schropp & Windom, 1988; Loring, 1991; Morse et al., 1993; Grant & Middleton, 1998; Queralt et al., 1999). διαφορά της Για τη συγκεκοιμένη εογασία, θεωρήθηκε ότι η κοκκομετοικής σύστασης του ιζήματος μεταξύ των διαφορετικών σταθμών δειγματοληψίας δεν ήταν αρκετή ώστε να μεταβάλει τις συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων και στοιχείων, οπότε δεν εφαρμόστηκε κάποια μέθοδος διόρθωσης.

Πολλοί από τους πεφιβαλλοντικούς παφάγοντες του ιζήματος έχουν μεγάλη επίδφαση στη μοφφή και στη διαθεσιμότητα των μετάλλων. Έχει

δειχθεί ότι σε όξινο pH, τα μέταλλα εμφανίζονται με μορφή ελεύθερων κατιόντων, αλλά όταν το pH είναι αλκαλικό, τα κατιόντα καθιζάνουν ως αδιάλυτα υδοοξείδια ή οξείδια (Gadd & Griffiths, 1977). Αντίθετα με τα γλυκά ύδατα, στα οποία το pH είναι ο καθοριστικός παράγοντας, στα περιβάλλοντα εκβολών ο καθοριστικός παράγοντας για το διαμοιρασμό των ουπαντών μεταξύ του ιζήματος και του νερού και για τη βιοδιαθεσιμότητα των μετάλλων, είναι η αλατότητα (Chapman & Wang, 2001). Παρόλα αυτά, στη συγκεκριμένη εργασία δεν παρατηρήθηκε κάποια σχέση μεταξύ του προτύπου κατανομής των βαρέων μετάλλων και στοιχείων με την αλατότητα, ενδεχομένως επειδή δεν εμφάνισε διαφοροποίηση μεταξύ των σταθμών, ανάλογη της διαφοροποίησης που παρατηρείται σε ένα εκβολικό οικοσύστημα. Άλλες αβιοτικές παράμετροι, όπως το διοξείδιο του αζώτου, το ολικό ανηγμένο ανόργανο θείο, οι φαιοχρωστικές και το ποσοστό ιλύος-αργίλου, εμφάνισαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το πρότυπο κατανομής των βαρέων μετάλλων και στοιχείων των λιμνοθαλασσών υπό μελέτη.

Είναι γνωστό ότι η κατανομή των βαφέων μετάλλων στα θαλάσσια ιζήματα καθοφίζεται από το μέγεθος των κόκκων του ιζήματος (Förstner, 1989; Horowitz, 1991; Puiga et al., 1999; Ianni et al., 2000; Zhang et al., 2002) και μάλιστα έχει βφεθεί ότι για οφισμένα μέταλλα, όπως λ.χ. το χφώμιο, ο χαλκός και το κάδμιο, παφατηφείται αύξηση των συγκεντφώσεών τους με την αύξηση του ποσοστού ιλύος-αφγίλου του ιζήματος (Dell'Anno et al., 2003)[•] ανάλογη σχέση δεν παφατηφήθηκε στα πλαίσια της συγκεκφιμένης εφγασίας λόγω του χαμηλού ποσοστού ιλύος των ιζημάτων υπό μελέτη, γεγονός που δε δικαιολογεί την δέσμευση μετάλλων σε αυτό.

Στις μελετώμενες λιμνοθάλασσες γενικά παρατηρήθηκαν αυξημένες συγκεντρώσεις ορισμένων βαρέων μετάλλων, γεγονός που αποδεικνύεται και από την υπέρβαση των κριτηρίων ποιότητας του ιζήματος σε πολλούς σταθμούς δειγματοληψίας. Ωστόσο, δεδομένης της

χαμηλής αλατότητας των πεφισσότεφων λιμνοθαλασσών, οι υψηλές συγκεντφώσεις των μετάλλων δεν είναι απαφαίτητα τοξικές, καθώς σύμφωνα με τον Ferguson (1983) η παφουσία υψηλών συγκεντφώσεων μετάλλων σε πεφιοχές με χαμηλή αλατότητα και υψηλή παφαγωγικότητα είναι πολύ λιγότεφο τοξική από ότι η παφουσία αντίστοιχων συγκεντφώσεων σε πεφιοχές χαμηλής παφαγωγικότητας και υψηλής αλατότητας.

τη βιοδιαθεσιμότητα παράγοντας κλειδί Ένας για πολλών μετάλλων, είναι το περιεχόμενο ενός ιζήματος σε σουλφίδια (Di Toro et al., 1990; Ankley et al., 1996; Berry et al., 1996; Simpson et al., 1998). Ta σουλφίδια επηρεάζουν την τοξικότητα του ιζήματος με τρεις τρόπους (Wang & Chapman, 1999): είτε λόγω της εγγενούς τοξικότητάς τους, είτε μειώνοντας την τοξικότητας των μετάλλων σχηματίζοντας στερεά ή/και σύμπλοκα με αυτά, είτε τέλος επηρεάζοντας τη συμπεριφορά των οργανισμών, η οποία με τη σειρά της μπορεί να μεταβάλλει την τοξικότητα τόσο των σουλφιδίων όσο και άλλων ουπαντών του ιζήματος. Στη συγκεκριμένη μελέτη οι συγκεντρώσεις των σουλφιδίων (AVS) είναι χαμηλότερες από το άθροισμα των συγκεντρώσεων του καδμίου (Cd), του χαλκού (Cu), του νικελίου (Ni), του μολύβδου (Pb) και του ψευδαργύρου (Zn) αυτό το αποτέλεσμα σημαίνει ότι η πλεονάζουσα ποσότητα των μετάλλων που προαναφέρθηκαν ενδεχομένως να είναι βιοδιαθέσιμη στους οργανισμούς του ιζήματος, αλλά απαιτείται επιπλέον έρευνα για να εξακριβωθεί εάν αυτό όντως ισχύει.

Εκτός από τα σουλφίδια, η βιοδιαθεσιμότητα των συνενωμένων με το ίζημα ουπαντών, καθοοίζεται και από τα συστατικά του ιζήματος, τη χημεία του υπερκείμενου και του περιεχόμενου στο ίζημα νερού, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό, το οργανικό υλικό του ιζήματος καθώς και από τη συμπεριφορά των οργανισμών (Loring, 1991; Eggleton & Thomas, 2004). Έχει δειχθεί ότι σε οξικά ιζήματα, όπου το οξειδοαναγωγικό

δυναμικό έχει θετικό πρόσημο, τα μέταλλα δεσμεύονται στο ίζημα με το οργανικό υλικό και τα οξείδια του σιδήρου και του μαγγανίου ενώ στην περίπτωση, δηλαδή σε ανοξικά ιζήματα, αντίθετη επικρατεί ο σχηματισμός σουλφιδίων (Eggleton & Thomas, 2004). Παρόλο που δειγματοληψίας σταθμοί παρούσας ορισμένοι της εργασίας χαρακτηρίζονταν από οξικά ιζήματα, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης του οργανικού υλικού και των βαρέων μετάλλων σε αυτούς.

Αν και η διεφεύνηση της βιοδιαθεσιμότητας των φυπαντών του ιζήματος είναι ιδιαίτεφα σημαντική πληφοφοφία, δεν υπάφχει συμφωνία μεταξύ των ειδικών σχετικά με τις απαφαίτητες αναλυτικές μεθόδους για τον καθοφισμό της σε ένα λιμνοθαλάσσιο οικοσύστημα (Luoma, 1989). Έτσι, υπολογίζεται η ολική συγκέντφωση των φυπαντών, παφόλο που παφέχει λίγη πληφοφόφηση σχετικά με τις πιθανές βιολογικές επιδφάσεις τους.

Έχει δειχθεί ότι βαρέα μέταλλα η ούπανση από και υδρογονάνθρακες ποοκαλεί μεγάλη γενετική και μεταβολική διαφοροποίηση στις μικροβιακές κοινότητες, μειώνοντας τη μικροβιακή δραστηριότητα (Vivas et al., 2008). Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι ο αριθμός των μικροβιακών OTUs ήταν αρνητικά συσχετισμένος με τη συγκέντρωση του χρωμίου παρατηρήθηκε μείωση τόσο του αριθμού των OTUs, όσο και του δείκτη Margalef (d). Αντίστοιχη σχέση παρατηρήθηκε για το δείκτη Shannon-Wiener (H') και τη συγκέντρωση του καλίου.

Αφνητική συσχέτιση μεταξύ του βιοδιαθέσιμου χοωμίου και της μικοοβιακής δοαστηριότητας έχει παρατηρηθεί και σε παράκτια θαλάσσια ιζήματα, υποδηλώνοντας το γεγονός ότι το χοώμιο δοα ως αναστολέας της πρωτεϊνικής σύνθεσης των βακτηρίων, γεγονός που μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στους βιογεωχημικούς κύκλους των θαλάσσιων ιζημάτων (Dell'Anno et al., 2003). Άλλες μελέτες έχουν

δείξει σημαντική αφνητική επίδφαση του καδμίου στην αφθονία, τη βιομάζα και τη δφαστηφιότητα των βενθικών βακτηφίων (Sterritt & Lester, 1980; Fabiano et al., 1994), γεγονός που έχει δειχθεί και από εφγαστηφιακά πειφάματα (Babich & Stotzky, 1978; Walker & Houston, 1981; Roberts, 1983; Gauthier et al., 1986). Εξαιτίας της μεγάλης ευαισθησίας των μικφοβιακών λειτουφγιών στη φύπανση από τα βαφέα μέταλλα, έχει πφοταθεί ότι οι λειτουφγικές παφάμετφοι των μικφοβιακών κοινοτήτων και ο αφιθμός των ειδών που τις αποτελούν θα μποφούσαν να χφησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για τις συνθήκες που επικφατούν στα παφάκτια ιζήματα (Fabiano et al., 1994; Dell'Anno et al., 2003).

Από τη σύγκριση των συγκεντρώσεων ορισμένων βαρέων μετάλλων προηγούμενης και στοιχείων δεδομένα μελέτης που Jμ είχε πραγματοποιηθεί τον Οκτώβριο του 2004 στις λιμνοθάλασσες του Αμβοακικού κόλπου (Karageorgis, 2007), προέκυψε ότι μεταξύ των δύο χρονολογιών οι συγκεντρώσεις ήταν συγκρίσιμες όσον αφορά τη μονοτονία αλλά σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις ήταν μειωμένες το 2011. Εξαιρέσεις αποτελούν το νάτριο και το ασβέστιο και για τις τρεις λιμνοθάλασσες (Τσουκαλιό, Τσοπέλι, Λογαρού) καθώς και το στρόντιο για τη Λογαφού. Το ασβέστιο σχετίζεται με βιογενή στοιχεία και οι μειωμένες συγκεντρώσεις του στη Λογαρού και στο Τσοπέλι, είχαν αποδοθεί στην καλύτερη επικοινωνία αυτών των λιμνοθαλασσών με τον Αμβρακικό κόλπο, η οποία είχε αρνητικό αντίκτυπο στην αφθονία των βενθικών ασβεστολιθικών οργανισμών (Karageorgis, 2007). Ενδεχομένως η διαφορά ανάμεσα στα αποτελέσματα της προηγούμενης και της οφείλεται παρούσας μελέτης να στη διαφορετική διαδικασία προσδιορισμού των μετάλλων (Karageorgis, 2007: αναλυτής διασποράς ακτίνων Χ; παρούσα μελέτη: φασματογράφος φθορισμού μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος) ή στην ύπαρξη λιγότερων σταθμών δειγματοληψίας το 2011.

Ακόμα, σύμφωνα με τον Karageorgis (2007), οι αυξημένες συγκεντρώσεις χρωμίου και νικελίου είναι πιο πιθανό να σχετίζονται με τους υπερβασικούς οφιολιθικούς σχηματισμούς (ultrabasic ophiolite formations) του ποταμού Άραχθου παρά με κάποια ανθρωπογενή προέλευση.

3. Συνευρέσεις πολυχαίτων

Τα είδη με τη μεγαλύτεφη αφθονία ήταν τα Heteromastus filiformis (43% επί του συνόλου των ειδών), Nephtys hombergii (16%) και Naineris laevigata (15%)⁻ τα υπόλοιπα είδη βφέθηκαν σε πολύ μικφότεφες αφθονίες. Τόσο το Nephtys hombergii όσο και το Naineris laevigata ήταν οι μοναδικοί αντιπφόσωποι των οικογενειών Nephtyidae και Orbiniidae αντίστοιχα⁻ δε συμβαίνει το ίδιο για το Heteromastus filiformis, καθώς ήταν μεν ο κυφίαφχος αντιπφόσωπος της οικογένειας Capitellidae αλλά βφέθηκαν τφία ακόμα είδη από αυτή την οικογένεια. Η μικφή ποικιλότητα, ο μικφός αφιθμός ειδών και η κυφιαφχία οφισμένων ειδών έχουν παφατηφηθεί συχνά σε λιμνοθαλάσσια οικοσυστήματα (Guelorget & Michel, 1979; Nicolaidou et al., 1985; Arias & Drake, 1994; Reizopoulou et al., 1996) και υπό μελέτη λιμνοθάλασσες δε φαίνεται να αποτελούν εξαίφεση.

Σχετικά με τις βιολογικές κοινότητες των υφάλμυφων υδάτων επικφατούν αντικφουόμενες απόψεις οφισμένοι θεωφούν ότι τα υφάλμυφα ύδατα είναι μία ξεχωφιστή βιολογική συνεύφεση, με μοναδική σύνθεση ειδών (Remane, 1934; Cognetti & Maltagliati, 2000), ενώ άλλοι (λ.χ. Barnes, 1989) διαφωνούν και υποστηφίζουν ότι η πανίδα ενός υφάλμυφου οικοσυστήματος αποτελείται από μία μικφή ομάδα θαλάσσιων ειδών και άλλη μία, ακόμη μικφότεφη, από είδη γλυκών νεφών. Σε κάθε πεφίπτωση, τα πεφισσότεφα βενθικά είδη εμφανίζουν γενικά μικφή ποικιλότητα, μικφό

μέγεθος σώματος, σύντομο κύκλο ζωής και άλλα χαρακτηριστικά της rστρατηγικής (Jones & Wolff, 1981).

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι η συνεύρεση των πολυχαίτων συσχετίζεται τόσο με παράγοντες του ιζήματος (συγκέντρωση ολικού ανηγμένου ανόργανου θείου, ποσοστό ιλύος και αργίλου) όσο και του νερού (συγκέντρωση φωσφορικών αλάτων). Η συγκέντρωση των φωσφορικών αλάτων, μεταξύ άλλων παραμέτρων (θερμοκρασία, αλατότητα, οξειδοαναγωγικό δυναμικό, συγκέντρωση συγκέντρωση σωματιδιακού οργανικού διαλυμένου οξυγόνου, pH, άνθρακα, συγκέντρωση αμμωνιακών και νιτρικών ιόντων) έχει βρεθεί ότι εμφανίζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τις συνευρέσεις των πολυχαίτων και σε άλλες περιπτώσεις (Λιμνοθάλασσα Γιάλοβας: Arvanitidis et al., 1999). Αντίστοιχα, έχει βρεθεί ότι στον Αμβρακικό κόλπο (Nicolaidou & Papadopoulou, 1989) οι δύο πιο σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την κατανομή των πολυχαίτων είναι το βάθος και το μέγεθος των κόκκων του ιζήματος, δηλαδή η δομή του ιζήματος, γεγονός που είναι καλά τεκμηριωμένο στη βιβλιογραφία (Gray, 1974). Παραδόξως, στις λιμνοθάλασσες του κόλπου του Μεσολογγίου (Nicolaidou et al., 1988) αλλά και στη λιμνοθάλασσα Orbetello (Lardicci et al., 1997) η κατανομή των πολυχαίτων είναι ανεξάρτητη των παραμέτρων που χαρακτηρίζουν το ίζημα.

Αν και δεν πορέκυψε από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η αλατότητα θεωρείται ο πιο σημαντικός παράγοντας στη διανομή των οργανισμών (τόσο των βενθικών όσο και της στήλης του νερού) σε υφάλμυρα οικοσυστήματα (Kinne, 1966; Remane & Schlieper, 1971; Boesch, 1977; Kennish, 1990; Chapman & Wang, 2001). Ωστόσο, έχει δειχθεί ότι οι οργανισμοί που βρίσκονται θαμμένοι σε λασπώδες ίζημα, όπως είναι και οι πολύχαιτοι, δεν επηρεάζονται άμεσα από την αλατότητα του υπερκείμενου νερού αλλά από τη διάμεση αλατότητα, η οποία

μεταβάλλεται πολύ πιο αφγά στα λασπώδη από ότι στα αμμώδη ιζήματα (Chapman, 1981). Ενδεχομένως αυτός να είναι και ο λόγος που δεν παφατηφήθηκε συσχέτιση της αλατότητας και της αφθονίας των πολυχαίτων στις συγκεκφιμένες λιμνοθάλασσες, καθώς μετφήθηκε η αλατότητα στο υπεφκείμενο νεφό, η οποία διαφέφει από τη διάμεση αλατότητα των πόφων του ιζήματος (Chapman & Wang, 2001). Επιπλέον, κάθε είδος έχει διαφοφετική ανοχή στην αλατότητα και αν αυτή υπεφβεί ένα οφισμένο επίπεδο, γίνεται τοξική για αυτό.

Η συνεύρεση των πολυχαίτων στις συγκεκριμένες λιμνοθάλασσες δεν εμφανίζει κάποια χαρακτηριστική ομαδοποίηση, λ.χ. ανά λιμνοθάλασσα, όπως έχει δειχθεί σε προηγούμενη μελέτη (Βασιλειάδου, 2008). Είναι σαφές ότι η διανομή των πολυχαίτων δεν μπορεί να εξηγηθεί ως το αποτέλεσμα ενός μόνο κατευθυντήριου παράγοντα, παρόλο που το συγκεκοιμένο οικοσύστημα θεωφείται σχετικά απλό από μία συνοικολογική άποψη (Lardicci et al., 1997) τόσο η συνεργιστική δράση μεταξύ των διαφόρων αβιοτικών παραμέτρων όσο και οι βιοτικές αλληλεπιδράσεις πρέπει να λαμβάνονται υπόψη (Lardicci et al., 1997).

Στην παφούσα μελέτη ως αντιπφοσωπευτική μακφοπανιδική βενθική ομάδα, με την έννοια της πλέον άφθονης, επιλέχθηκαν τα πολύχαιτα. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι οφισμένα είδη πολυχαίτων (deposit feeders), λόγω των τφοφικών τους απαιτήσεων, εξαφτώνται από τα βακτήφια και την οφγανική ύλη καθώς αποτελούν πηγή τφοφής για αυτά (Tsutsumi et al., 1990), οπότε έχουν άμεση λειτουργική συσχέτιση.

Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε στην ενότητα των αποτελεσμάτων, δεν παρατηρείται χαρακτηριστική συσχέτιση των συνευρέσεων των πολυχαίτων και των μικροβίων στις συγκεκριμένες λιμνοθάλασσες και συνεπώς δε μπορεί να απορριφθεί η αρχική υπόθεση H₀₂. Με άλλα λόγια, τα πρότυπα διανομής πολυχαίτων και μικροβίων εμφανίζονται τυχαία, γεγονός που είναι σε αντίθεση με άλλες έρευνες που δείχνουν ότι η μη

τυχαία συνάθροιση των συνευρέσεων μπορεί να είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό μεταξύ όλων των συστατικών του οικοσυστήματος (λ.χ. Horner-Devine et al., 2007). Ακόμα, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα χωρικά πρότυπα της μικροβιακής ποικιλότητας είναι παρόμοια ποιοτικά με αυτά των ανώτερων φυτών και ζώων και ότι οι ποσοτικές διαφορές τους ενδεχομένως να οφείλονται στις διαφορετικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται για τον ορισμό των ειδών στους μικρο- και στους μακροοργανισμούς (Green & Bohannan, 2006). Ενδεχομένως εάν συνυπολογιστεί και η συνεισφορά των υπόλοιπων μακροπανιδικών τάξων στις βενθικές συνευρέσεις, να προκύψει συσχέτιση των χωρικών προτύπων μικρο- και μακροοργανισμών.

4. Μικοοβιακές συνευρέσεις

Κυρίαρχο βακτηριακό φύλο των λιμνοθαλασσών είναι τα πρωτεοβακτήρια και από αυτά επικρατούν τα γάμμα και τα δέλτα πρωτεοβακτήρια (16 και 10% αντίστοιχα), όπως έχει βρεθεί και σε προηγούμενη μελέτη για δύο από τις λιμνοθάλασσες του Αμβρακικού κόλπου (Σκαράκη, 2006). Αυτό συμφωνεί με αποτελέσματα άλλων ερευνών σε περιβάλλοντα λιμνοθαλασσών, όπως για παράδειγμα στη Βενετία (Borin et al., 2009). στη συγκεκριμένη μελέτη βρέθηκε κυριαρχία πρωτεοβακτηρίων σε όλους τους κλώνους 16S rRNA και των παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά του φύλου Bacteroidetes, όπως συνέβη και στα δείγματα τις παρούσας μελέτης. Ωστόσο, η σχετική αφθονία ενός είδους δεν αντανακλά πάντοτε τη σημασία του στο οικοσυστημικό επίπεδο, καθώς τα σπάνια είδη μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά τις διαδικασίες μεταφοράς ενέργειας και ύλης (Hooper et al., 2005; Sogin et al., 2006).

Ενδεικτικό της μεγάλης ποικιλότητας των μικροβιακών συνευρέσεων των λιμνοθαλασσών είναι η εύρεση αλληλουχιών που δεν εμφανίζουν υψηλά ποσοστά ομοιότητας με είδη που έχουν ήδη περιγραφεί⁻ τουναντίον, είναι συγγενικές με αλληλουχίες βακτηρίων που δεν έχουν καλλιεργηθεί και περιγραφεί, γεγονός που έχει παρατηρηθεί και από προηγούμενη μελέτη για τις λιμνοθάλασσες του Αμβρακικού κόλπου (Σκαράκη, 2006).

Είναι γνωστό ότι η βακτηριακή ποικιλότητα των ιζημάτων των παράκτιων λιμνοθαλασσών της Μεσογείου είναι συγκρίσιμη με αυτή των θαλάσσιων παράκτιων ιζημάτων και μπορεί να είναι μεγαλύτερη ακόμα και από αυτή που έχει παρατηρηθεί στα ιζήματα των κοραλλιογενών υφάλων (Danovaro & Pusceddu, 2007). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η βακτηριακή ποικιλότητα της στήλης του νερού είναι μεγαλύτερη στις λιμνοθάλασσες της Μεσογείου από ότι στις λιμνοθάλασσες του Ατλαντικού Ωκεανού (Benlloch et al., 1995). Η ποικιλότητα, τέλος, των μικροοργανισμών μπορεί να είναι πολύ υψηλότερη από αυτή των μακροοργανισμών σε μία μεσογειακή λιμνοθάλασσα, γεγονός που επιβεβαιώνεται από την παρούσα εργασία⁻ το σύνολο των μικροβιακών ΟTUs (97% ομοιότητα) είναι 13.414 ενώ αυτό των πολυχαίτων, που είναι η κυρίαρχη ομάδα ασπόνδυλων στο συγκεκριμένο ενδιαίτημα, είναι μόλις 27 είδη.

Στη συγκεκοιμένη εργασία πορέκυψε ότι κάθε λιμνοθάλασσα έχει διαφορετική μικορβιακή συνεύρεση από τις άλλες, τόσο σε αριθμό OTUs όσο και σε σύνθεση. Αυτό δεν προκαλεί έκπληξη δεδομένου του ευρήματος των Danovaro και Pusceddu (2007) που υποστηρίζουν ότι κάθε λιμνοθάλασσα χαρακτηρίζεται από βακτηριακές συνευρέσεις που διαφέρουν από τις άλλες, δεδομένης της ύπαρξης διαφορετικών περιβαλλοντικών συνθηκών και τροφικών συνθηκών. Επιπλέον, από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι η μικροβιακή κοινότητα

επηφεάζεται και από τη θέση του σταθμού δειγματοληψίας (εικόνα 16), εύφημα που κατά πάσα πιθανότητα σχετίζεται με τη διαφοφετική αλατότητα μεταξύ των σταθμών, παφάγοντας που βφέθηκε μεταξύ αυτών που εμφάνισαν συσχέτιση με τις μικφοβιακές συνευφέσεις των λιμνοθαλασσών.

Έχει δειχθεί ότι η βακτηριακή ποικιλότητα είναι χαμηλή στη μεταβατική ζώνη μεταξύ γλυκών και θαλάσσιων υδάτων (Campbell & Kirchman, 2012). Επιπλέον, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η δομή των μικροβιακών κοινοτήτων μεταβάλλεται με τις αλλαγές της αλατότητας (Nübel et al., 2000; Kirchman et al., 2005; Herlemann et al., 2011; Fortunato et al., 2012) και ακόμα, ότι είναι ένας παράγοντας με μεγάλη συνεισφορά στη λειτουργία των μικροβιακών κοινοτήτων κοινοτήτων (Lozupone & Knight, 2007; Nemergut et al., 2011) που δρα είτε άμεσα (del Giorgio & Bouvier, 2002) είτε έμμεσα, προκαλώντας για παράδειγμα αλλαγές στη σύσταση του διαλυμένου οργανικού άνθρακα (de Haan et al., 1987).

Εκτός από την αλατότητα, πολλές μελέτες έχουν εντοπίσει ως παφάγοντες επιφοής της σύνθεσης της βακτηφιακής κοινότητας τη χημεία της στήλης του νεφού (λ.χ. Lindström et al., 2005; Schauer et al., 2005; Yannarell & Triplett, 2005; Wu et al., 2006), τη θεφμοκφασία (λ.χ. Muylaert et al., 2002; Crump & Hobbie, 2005; Wu & Hahn, 2006), την ποιότητα και την ποσότητα της διαλυμένης οφγανικής ύλης (Crump et al., 2003; Eiler et al., 2003; Kirchman et al., 2004; Kritzberg et al., 2006), την πφωτογενή παφαγωγικότητα (Horner-Devine et al., 2003), τη φύπανση (Müller et al., 2001) και άλλους που δεν άπτονται στο υπό μελέτη ενδιαίτημα. Στην παφατηφήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των μικφοβιακών συνευφέσεων με το διοξείδιο του αζώτου, την αγωγιμότητα στη στήλη του νεφού, τη συγκέντφωση του ολικού ανηγμένου ανόφγανου θείου, της

συγκέντρωσης της χλωροφύλλης-α στο ίζημα, καθώς και με παραμέτρους της κοκκομετρικής σύστασης του ιζήματος.

Είναι σαφές ότι δεν υπάρχει μόνο μία περιβαλλοντική μεταβλητή με επίδραση στη διαμόρφωση του πολυμεταβλητού χωρικού πιθανή προτύπου κατανομής των μικροβιακών συνευρέσεων φαίνεται πως αυτό επηρεάζεται από τη συνεργιστική δράση πολλών αβιοτικών παραμέτρων, δεδομένου ότι OTUs με διαφορετικά χαρακτηριστικά υπόκεινται σε διαφορετικούς περιοριστικούς αβιοτικούς παράγοντες, υποστηρίζοντας έτσι την υπόθεση της περιβαλλοντικής δριμύτητας πολλαπλών αιτίων (multicausal environmental severity hypothesis) (λ . χ . Wildish, 1977; Brazeiro, 2001; Papageorgiou et al., 2006). Αυτό το αποτέλεσμα συνάδει με τα ευρήματα άλλων μελετών για τις μακροπανιδικές συνευρέσεις των λιμνοθαλασσών (λ.χ. Arvanitidis et al., 2009). Κατά συνέπεια, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συνηγορούν στη χρήση των βακτηρίων ως οργανισμών-μοντέλα, συμπληρωματικά με την παραδοσιακή χρήση των μακροπανιδικών οργανισμών, για την εκτίμηση της περιβαλλοντικής κατάστασης του λιμνοθαλάσσιου οικοσυστήματος (Jessup et al., 2004; Logue & Lindström, 2008). Autó το $\alpha \pi$ οτέλεσμα οδηγεί σε αποδοχή της εναλλακτικής υπόθεσης Η13, η οποία υποστηρίζει ότι η βέλτιστη οδός για την εκτίμηση της οικολογικής κατάστασης των λιμνοθαλασσών, όπως αυτή αποτυπώνεται με τα χωρικά πρότυπα των αβιοτικών παραμέτρων, επιτυγχάνεται με τη συνάφεια των προτύπων αυτών με τα αντίστοιχα των μικροβιακών συνευρέσεων.

Κατά την προσπάθεια εύρεσης του βιογεωγραφικού προτύπου των μικροβιακών συνευρέσεων, σε αντίθεση με άλλες μελέτες (Cho & Tiedje, 2000; Papke et al., 2003; Hanson et al., 2012), φάνηκε ότι δεν υπάρχει κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο, εκτός από δύο περιπτώσεις (επίπεδα ομοιότητας 99% και 95%) στις οποίες διακρίθηκε η ύπαρξη του προτύπου πολλαπλών ενδιαιτημάτων εντός μίας «περιοχής» (Martiny et al., 2006), δηλαδή

επιβεβαιώθηκε η υπόθεση της περιβαλλοντικής διήθησης (environmental filtering: «τα πάντα είναι παντού αλλά το περιβάλλον επιλέγει»). Αυτό υποδηλώνει ότι οι μικροοργανισμοί έχουν κοσμοπολιτική διανομή, εξαιτίας του μεγέθους, της αφθονίας, της φυλογενετικής ιστορίας και της βιολογίας τους, που τους καθιστούν ικανούς να υπερνικούν ενδεχόμενους περιορισμούς διασποράς (Green & Bohannan, 2006), αλλά οι περιβαλλοντικές συνθήκες κάθε περιοχής δομούν ξεχωριστές κοινότητες & Tiedje, 2007). Αυτό, σε συνδυασμό με προηγούμενα (Ramette αποτελέσματα (ανάλυση BIOENV), υποδηλώνει ότι το συγκεκοιμένο πρότυπο ενδεχομένως να ισχύει και για τα υπόλοιπα επίπεδα ομοιότητας, αλλά δεν είναι διακριτό στην παρούσα μελέτη εξαιτίας της προσέγγισης των μικοοβιακών κοινοτήτων σε μικοή χωρική κλίμακα.

Η συγκεκριμένη υπόθεση της περιβαλλοντικής διήθησης έχει επιβεβαιωθεί για διάφορους τύπους μικροοργανισμών (Finlay & Clarke, 1999; Finlay, 2002). Ωστόσο, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι μικροβιακές σχετίζονται εμφανίζουν πρότυπα διανομής κοινότητες που με παρατηρηθεί γεωγραφικές αποστάσεις, όπως έχει και για τους μακοοοργανισμούς (Papke et al., 2003; Whitaker et al., 2003; Bell et al., 2005), ενώ άλλες μελέτες επιβεβαιώνουν την υπόθεση ότι η σύνθεση των κοινοτήτων σχετίζεται τόσο μικροβιακών με περιβαλλοντικούς παράγοντες όσο και με τις γεωγραφικές αποστάσεις (Horner-Devine et al., 2004a,b; Dolan, 2006; Martiny et al., 2006) συσχέτιση με περιβαλλοντικούς παράγοντες προέκυψε και στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.

Σύμφωνα με τον ορισμό του, ο μικροβιακός πυρήνας αποτελείται από τα κοινά μέλη δύο ή περισσοτέρων μικροβιακών κοινοτήτων που σχετίζονται με ένα ενδιαίτημα (Turnbaugh et al., 2007; Hamady & Knight, 2009). Η αναγνώριση του κοινού πυρήνα των OTUs είναι ένα σημαντικό βήμα στη διαλεύκανση της οικολογίας των μικροβιακών συνευρέσεων, καθώς έχει προταθεί ότι οι οργανισμοί που παρατηρούνται σε όλες τις

συνευξέσεις που σχετίζονται με ένα συγκεκοιμένο τύπο ενδιαιτήματος είναι πιθανό ότι έχουν βασικό ζόλο στη λειτουργία αυτού του ενδιαιτήματος (Shade & Handelsman, 2011). Κατά συνέπεια, εάν γνωρίζουμε τα OTUs αυτού του πυρήνα, είναι δυνατό να προβλεφθεί η απόκοιση της μικοοβιακής κοινότητας μετά από κάποια διατάραξη και ακόμα, είναι δυνατός ο χειρισμός των κοινοτήτων για την επίτευξη των επιθυμητών στόχων (Shade & Handelsman, 2011). Σύμφωνα με τους Hamady και Knight (2009), ο πυρήνας μπορεί να είναι σημαντικός, ελάχιστος, ανύπαρκτος ή να παρατηρείται κατά μήκος κάποιου περιβαλλοντικού συνεχούς.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, βρέθηκε ότι ο πυρήνας των OTUs (97% ομοιότητα) όλων των λιμνοθαλασσών είναι ελάχιστος, καθώς αντιστοιχεί στο 8% περίπου του συνόλου. Αυτό το ποσοστό είναι ακόμα μικρότερο εάν ληφθεί υπόψη και η αφθονία των OTUs στις διαφορετικές λιμνοθάλασσες. Ωστόσο, όταν προστίθεται ένα επιπλέον επίπεδο πολυπλοκότητας και κατά την ανάλυση λαμβάνονται υπόψη οι κοινές φυλογενετικές ομάδες των λιμνοθαλασσών, ο πυρήνας αποτελείται από το 42% του συνόλου των ομάδων αυτών, δηλαδή σε αυτή την περίπτωση μπορεί να χαρακτηριστεί ως σημαντικός. Εάν τώρα θεωρηθεί ότι ο φυλογενετικός διαχωρισμός των βακτηριακών τάξων εκφράζει και το λειτουργικό τους διαχωρισμό, γεγονός όμως που είναι μόνο μερικώς αληθές, αποκαλύπτεται ότι υπάρχει πλεόνασμα λειτουργιών στον κοινό πυρήνα του ενδιαιτήματος υπό μελέτη. Ο συνδυασμός όλων των σχετικών αποτελεσμάτων υποδηλώνει ότι παρόλο που οι λιμνοθάλασσες μοιράζονται πολλές φυλογενετικές ομάδες, μοιράζονται λίγα OTUs και επιπλέον, αυτά αντιπροσωπεύονται με διαφορετικά ποσοστά αφθονίας μεταξύ των λιμνοθαλασσών.

Διαφορετικά αποτελέσματα ενδεχομένως να προκύψουν για τις συγκεκριμένες περιοχές μελέτης εάν ληφθεί υπόψη η «παραμονή»

(persistence) των OTUs στις λιμνοθάλασσες και η «συνδεσιμότητά» (connectivity) τους, αλλά για αυτές τις προσεγγίσεις είναι απαραίτητη η ύπαοξη εποχιακών δεδομένων. Ακόμα, έχει προταθεί ότι ο ορισμός του ΟΤU για αναλύσεις τέτοιου τύπου είναι παράγοντας που ενδεχομένως να προκαλέσει διαφορετικές ερμηνείες του ίδιου αποτελέσματος (Shade & Handelsman, 2011). Για το λόγο, στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, ελέγχθηκε εάν τα διαφορετικά επίπεδα ομοιότητας κατέληγαν στο ίδιο αποτέλεσμα σχετικά με το μικροβιακό πυρήνα των λιμνοθαλασσών και προέκυψε ότι υπάρχει κάποια διαφοροποίηση μεταξύ τους όταν ο πυρήνας βασίζεται σε δεδομένα παρουσίας/απουσίας, παρατηρείται μία πτώση του ποσοστού των OTUs που τον αποτελούν σε σχέση με το σύνολό τους, καθώς μετακινούμαστε από το μικρότερο επίπεδο (90%) μεγαλύτερο (99%). Αντίστοιχα ομοιότητας στο είναι τα αποτελέσματα και για το φυλογενετικό πυρήνα, αλλά δεν παρατηρείται ουσιαστική διαφοροποίηση στην περιπτώση που τα δεδομένα αφθονίας των OTUs λαμβάνονται υπόψη.

Ενδεχομένως αυτός ο «φυλογενετικός πλεονασμός», σε συνδυασμό με τη μεγάλη μικοοβιακή ποικιλότητα στα ιζήματα των υπό μελέτη λιμνοθαλασσών, να παρατηρείται γιατί τα «πλεονάζοντα OTUs» μπορεί να καταλαμβάνουν κουφές οικοθέσεις ή απλά να είναι στην ουσία ανενεργά οι αμοιβαίες αλληλεπιδράσεις μεταξύ βιοτικών και αβιοτικών προάγουν τη δημιουργία μεγάλου αριθμού πιθανών παραγόντων οικοθέσεων, στο χώρο και στο χρόνο, οι οποίες σε συνδυασμό με το μικρό χρόνο γενεάς των μικροβίων, μπορούν να υποστηρίξουν την υψηλή τους ποικιλότητα (Finlay et al., 1997; Green et al., 2008). Για το λόγο αυτό έχει προταθεί ότι στην ουσία τόσο η μικροβιακή δραστηριότητα όσο και η μικοοβιακή ποικιλότητα αποτελούν αναπόσπαστο τμήμα των οικοσυστημικών λειτουgγιών (Finlay et al., 1997; Danovaro & Pusceddu, 2007).

Η χωρική και χρονική περιβαλλοντική μεταβλητότητα του συστήματος υπό μελέτη δημιουργούν τις κατάλληλες συνθήκες για παρατήρηση του «φυλογενετικού πλεονασμού» σε μικρές χωρικές και χρονικές κλίμακες (Loreau, 2004). Ο παρατηρούμενος «φυλογενετικός πλεονασμός» λοιπόν, λειτουργεί ως «δεξαμενή» ΟTUs και κατά συνέπεια, ως «δεξαμενή» λειτουργιών, οι οποίες γίνονται αντιληπτές μόνο όταν λόγω περιβαλλοντικών μεταβολών τα ΟTUs που επικρατούν μειωθούν ή παρεμποδιστεί η λειτουργία τους εξαιτίας κάποιου περιοριστικού

Τα πορηγούμενα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι στο σύστημα υπό μελέτη, όσον αφορά τα μικορβιακά OTUs, παρατηρείται το φαινόμενο της συμπληρωματικότητας των λειτουργικών οικοθέσεων (functional niche complementarity ή complementarity effect) (Loreau & Hector, 2001). Σύμφωνα με αυτό το φαινόμενο, ορισμένα είδη έχουν συμπληρωματικά πρότυπα χρήσης πόρων, με συνέπεια οι διαφορετικές λειτουργίες ή οι θετικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους να οδηγούν σε συνολικά αποτελεσματικότερη χρήση των διαθέσιμων πόρων, ολοκληρώνοντας έτσι τις οικοσυστημικές λειτουργίες (Loreau, 2000; Loreau & Hector, 2001; Hooper et al., 2005; Fargione et al., 2007).

Εάν την εκτίμηση των μικροβιακών βιογεωγραφικών κατά προτύπων ληφθούν υπόψη τα χαρακτηριστικά λειτουργικά γνωρίσματα (π.χ. ενζυμικές λειτουργίες) των μικροβιακών OTUs, ενδεχομένως να είναι πιο εφικτή η πρόβλεψη των αποκρίσεών των μικοοβίων στις περιβαλλοντικές ενδεχομένως αλλαγές και να μπορέσουν να θεμελιωθούν νέες οικολογικές θεωρίες (Green et al., 2008).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι στο συγκεκριμένο λιμνοθαλάσσιο οικοσύστημα, οι μακροπανιδικές συνευρέσεις δεν περιβαλλοντικές επηρεάζονται από τις ίδιες παραμέτρους που επηρεάζουν την κατανομή των μικροβιακών και επιπλέον, τα πρότυπα κατανομής των προκαρυωτών και των πολυχαίτων, ως των πλέον άφθονων αντιπροσώπων της μακροπανίδας, δεν εμφάνισαν σημαντική συσχέτιση.

Τόσο οι μικροβιακές κοινότητες όσο και οι συνευρέσεις των πολυχαίτων επηρεάζονται από τη συνεργιστική δράση πολλαπλών αβιοτικών παραμέτρων, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση της περιβαλλοντικής δοιμύτητας πολλαπλών αιτίων (multicausal environmental severity hypothesis) πληθώρα παραγόντων, τόσο φυσικής όσο και ανθρωπογενούς προέλευσης, φαίνεται να επιδρά ταυτόχρονα στα οικοσυστήματα, καθιστώντας λιμνοθαλάσσια πολύ δύσκολο το διαχωρισμό τους και την εκτίμηση της οικολογικής κατάστασης του συγκεκριμένου τύπου ενδιαιτήματος.

Η παφούσα εφγασία ενισχύει την άποψη της χφησιμοποίησης των μικφοβιακών κοινοτήτων ως βιοδεικτών για την εκτίμηση της οικολογικής κατάστασης των λιμνοθαλάσσιων οικοσυστημάτων, εξαιτίας της μεγάλης οφγανισμικής και λειτουφγικής ποικιλότητάς τους αλλά και εξαιτίας της συνάφειας των πολυμεταβλητών χωφικών πφοτύπων τους με τα αντίστοιχα των αβιοτικών. Επόμενες μελέτες θα πφέπει να στοχεύουν στη μέτφηση της έκφφασης λειτουφγικών γονιδίων των μικφοοφγανισμών, καθώς έτσι θα αποκαλυφθεί σε μεγάλο βαθμό το λειτουφγικό δυναμικό των άγνωστων OTUs και θα διεφευνηθεί σε βάθος η συμμετοχή της

μικοοβιακής κοινότητας στην ανακύκλωση των θρεπτικών και την αδρανοποίηση των βαρέων μετάλλων και στοιχείων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Accornero A, Gnerre R, Manfra L (2008). Sediment concentrations of trace metals in the Berre lagoon (France): an assessment of contamination. Archives of environmental contamination and toxicology, 54: 372-385
- Ackermann F (1980). A procedure for correcting the grain size effect in heavy metal analyses of estuarine and coastal sediments. Environmental Technology Letters, 1: 518-527
- Ackermann F, Bergmann H, Schleichert U (1983). Monitoring of heavy metals in coastal and estuarine sediments - a question of grain-size: <20 μm versus <60 μm. Environmental Technology Letters, 4: 317-328
- Amaral ACZ (1980). Breve caracterização dos gêneros da família Capitellidae Grube (Annelida, Polychaeta) e descrição de Nonatus longilineus Gen. sp. nov. Boletim do Instituto Oceanográfico, 29(1): 99-106
- Anderson MJ (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. Austral. Ecol., 26: 32-46
- Ankley GT, Di Toro DM, Hansen DJ, Berry WJ (1996). Assessing the ecological risk of metals in sediments. Environmental Toxicology and Chemistry, 15: 2053-2055
- Arias AM & Drake P (1994). Structure and production of the benthic macroinvertebrate community in a shallow lagoon in the Bay of Cadiz. Mar. Ecol. Prog. Ser., 115: 151-167
- Arvanitidis C, Chatzigeorgiou G, Koutsoubas D, Kevrekidis T, Dounas C, Eleftheriou A, Koulouri P, Mogias A (2005). Estimating lagoonal biodiversity in Greece: comparison of rapid assessment techniques. Helgol Mar Res, 59: 177-186
- Arvanitidis C, Koutsoubas D, Dounas C, Eleftheriou A (1999). Annelid fauna of a Mediterranean lagoon (Gialova lagoon, south-west Greece):

community structure in a severely fluctuating environment. J. Mar. Biol. Ass., 79: 849-856

- Arvanitidis C, Somerfield PJ, Chatzigeorgiou G, Reizopoulou S, Kevrekidis, Eleftheriou A (2009). Do multivariate analyses incorporate changes in pattern across taxonomic levels reveal anthropogenic stress in Mediterranean lagoons? Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 369 (2): 100-109
- Baas Becking, LGM (1934). Geobiologie of inleiding tot de milieukunde. The Hague, the Netherlands: W.P. Van Stockum & Zoon (in Dutch).
- Babich H & Stotzky G (1977). Sensitivity of Various Bacteria, Including Actinomycetes, and Fungi to Cadmium and the Influence of pH on Sensitivity. Appl. Envir. Microbiol., 33: 681-695
- Babich H & Stotzky G (1978). Effects of Cadmium on the Biota: Influence of Environmental Factors. In: ADVANCES IN APPLIED MICROBIOLOGY. Volume 23. Academic Press, Inc.
- Barnes RSK (1989). What, if anything, is a brackish-water fauna? Transactions of the Royal Society of Edinburgh: Earth Sciences, 80: 235-240
- Barnich R & Fiege D (2003). The Aphroditoidea (Annelida: Polychaeta) of the
 Mediterranean Sea. Abhandlungen der Senckenbergischen
 Naturforschenden Gesellschaft, 559: 1-167
- Basford D & Eleftheriou A (1988). The benthic environment of the North Sea (56° to 61°N). Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 68: 125-141
- Bell G (2005). The co-distribution of species in relation to the neutral theory of community ecology. Ecology, 86: 1757-1770
- Bellan G (1972). Effects of an artificial stream on marine communities. Marine Pollution Bulletin, 3: 74-78

- Benlloch S, Rodriguez-Valera F, Martinez-Murcia AJ (1995). Bacterial diversity in two coastal lagoons deduced from 16S rDNA PCR amplification and partial sequencing. FEMS Microbiology Ecology, 18: 267-280
- Berry WJ, Hansen DJ, Boothman WS, Mahony JD, Robson DL, Di Toro DM, et al. (1996). Predicting the toxicity of metal-spiked laboratory sediments using acid-volatile sulfide and interstitial water normalizations. Environmental Toxicology and Chemistry, 15: 2067-2079
- Bethoux J-P, Courau P, Nicolas E, Ruiz-Pino D (1990). Trace metal pollution in the Mediterranean Sea. Oceanologica acta, 13: 481-488
- Bianchi CN (1981). Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque lagunari e costiere italiane. 5. Policheti Serpulidei. Consiglio Nazionale delle Ricerche
- Bjørgesaeter A & Gray JS (2008). Setting sediment quality guidelines: a simple yet effective method. Marine pollution bulletin, 57: 221-35
- Blake JA & Kudenov D (1978). The Spionidae (Polychaeta) from Southeastern Australia and adjacent areas with a revision of the genera. Mem. Nat. Mus. Vic., 39: 171-280
- Boesch DF (1977). A new look at zonation of benthos along the estuarine gradient. In: Ecology of Marine Benthos, ed. BC Coull, pp. 245–66. Columbia, SC: Univ. S. C. Press
- Borin S, Brusetti L, Daffonchio D, Delaney E, Baldi F (2009). Biodiversity of prokaryotic communities in sediments of different sub-basins of the Venice lagoon. Research in microbiology 160: 307-14
- Brazeiro A (2001). Relationship between species richness and morphodynamics in sandy beaches: what are the underlying factors? Marine Ecology Progress Series, 224: 35-44
- Burton GAJ (2002). Sediment quality criteria in use around the world. Limnology, 3: 65-76

- Campbell BJ & Kirchman DL (2012). Bacterial diversity, community structure and potential growth rates along an estuarine salinity gradient. The ISME journal, 1–11
- Canadian Council of Ministers of the Environment (2002). Canadian sediment quality guidelines for the protection of aquatic life: Summary tables. Updated. In: Canadian environmental quality guidelines (1999), Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK et al. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nat. Methods, 7: 335-336
- Chao A (1984). Non-parametric estimation of the number of classes in a population. Scand. J. Statist., 11: 265-270
- Chapman PM (1981). Measurements of the short-term stability of interstitial salinities in subtidal estuarine sediments. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 12: 67-81
- Chapman PM & Wang F (2001). Assessing sediment contamination in estuaries. Environmental toxicology and chemistry, 20 (1): 3-22
- Cho JCh & Tiedje JM (2000). Biogeography and degree of endemicity of fluorescent Pseudomonas strains in soil. Appl. Environ. Microbiol., 66: 5448-5456
- Clarke KR & Ainsworth M (1993). A method of linking multivariate community structure to environmental variables. Marine Ecology Progress Series, 92: 205-219
- Clarke KR & Gorley RN (2006). Primer v6: User Manual/Tutorial. Primer-E Ltd.
- Clarke KR & Warwick RM (1994). Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. Natural Environment Research Council, Plymouth, UK.

- Cline JD (1969). Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. Limnology and Oceanography, 14: 454-458
- Cognetti G & Maltagliati F (2000). Biodiversity and Adaptive Mechanisms in Brackish Water Fauna. Marine pollution bulletin, 40 (1): 7-14
- Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ et al. (2008). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. Nucleic Acids Res, 37 (Database issue): D141-145
- BC Hobbie JΕ (2005). Synchrony Crump & and seasonality in bacterioplankton communities of two temperate Limnol. rivers. Oceanogr. 50: 1718-1729
- Crump BC, Kling GW, Bahr M, Hobbie JE (2003). Bacterioplankton Community Shifts in an Arctic Lake Correlate with Seasonal Changes in Organic Matter Source. Applied and Environmental Microbiology, 69: 2253-2268
- Danovaro R & Pusceddu A (2007). Biodiversity and ecosystem functioning in coastal lagoons: Does microbial diversity play any role? Estuarine, Coastal and Shelf Science, 75: 4-12
- Daskalakis KD & O' Connor TP (1995). Normalization and Elemental Sediment Contamination in the Coastal United States. Environmental science and technology, 29: 470-477
- Day JH (1967). A monograph on the Polychaeta of Southern Africa. British Museum (Nat. Hist.) Publication. British Museum, London.
- de Haan H, Jones RI, Salonen K (1987). Does ionic strength affect the configuration of aquatic humic substances, as indicated by gel filtration? Freshwater Biology, 17: 453-459
- de Wit R & Bouvier T (2006). "Everything is everywhere, but, the environment selects"; what did Baas Becking and Beijerinck really say? Environmental microbiology, 8: 755-8

- del Giorgio PA & Bouvier TC (2002). Linking the physiologic and phylogenetic successions in free-living bacterial communities along an estuarine salinity gradient. Limnology and oceanography, 47: 471-486
- Dell'Anno A, Mei M, Ianni C, Danovaro R (2003). Impact of bioavailable heavy metals on bacterial activities in coastal marine sediments. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 19: 93-100
- Di Toro DM, Paquin PR, Subburamu K, Gruber DA (1990). Sediment Oxygen Demand Model: Methane and Ammonia Oxidation. Journal of Environmental Engineering, 116: 945-986
- Dolan JR (2006). Microbial biogeography? Journal of Biogeography, 33: 199-200
- Doyle JJ, Marshall RT, Pfander WH (1975). Effects of Cadmium on the Growth and Uptake of Microorganisms. Appl. Envir. Microbiol., 29: 562–564
- Dulka JJ & Risby TH (1976). Ultratrace Metals in Some Environmental and Biological Systems. Analytical Chemistry 48:640A–641A
- Eggleton J & Thomas KV (2004). A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events. Environment international, 30: 973-80
- Ehrlich HL (1997). Microbes and metals. Applied Microbiology and Biotechnology, 48: 687-692
- Ehrlich HL & Newman DK (2009). Lithosphere as microbial habitat. Geomicrobiology (5th ed.), Taylor and Francis group (2009), pp. 37–55
- Eiler A, Langenheder S, Bertilsson S, Tranvik LJ (2003). Heterotrophic Bacterial Growth Efficiency and Community Structure at Different Natural Organic Carbon Concentrations. Applied and Environmental Microbiology, 69: 3701-3709
- Fabiano M, Danovaro R, Magi E (1994). Effects of heavy metals on benthic bacteria in coastal marine sediments: a field result. Marine pollution bulletin, 28: 18-23

- Falkowski PG, Fenchel T, Delong EF (2008). The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. Science 320: 1034-9
- Fargione J, Tilman D, Dybzinski R, Lambers JHR, Clark C, Harpole WS, et al. (2007). From selection to complementarity: shifts in the causes of biodiversity-productivity relationships in a long-term biodiversity experiment. Proceedings of The Royal Society B, 274: 871-6
- Fauchald K (1977). The Polychaete worms. Definitions and keys to the orders, families and genera. Natural History Museum of Los Angeles County, Science Series, 28: 1-188
- Fauvel P (1923). Polychètes errantes. Faune de France, 5: 1-488
- Ferguson J (1983). Concentrations and speciation of lead, zinc and cadmium in seawater-like smelter effluent and adjacent marine environments, Port Pirie, South Australia. Marine and Freshwater Research, 34: 375
- Finlay BJ (2002). Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. Science, 296: 1061-3
- Finlay BJ & Clarke KJ (1999). Ubiquitous dispersal of microbial species. Nature, 400: 828.
- Finlay BJ, Maberly SC, Cooper JI (1997). Microbial Diversity and Ecosystem Function. Oikos, 80: 209-213
- Förstner U (1989). Contaminated Sediments. Springer-Verlag, Berlin, Germany
- Fortunato CS, Herfort L, Zuber P, Baptista AM, Crump BC (2012). Spatial variability overwhelms seasonal patterns in bacterioplankton communities across a river to ocean gradient. ISME J, 6: 554-563
- Gadd GM (2004). Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. Geoderma, 122: 109-119
- Gadd GM (2007). Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. Mycological research, 111: 3-49

- Gadd GM (2010). Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. Microbiology, 156: 609–643
- Gadd GM & Griffiths AJ (1977). Microorganisms and heavy metal toxicity. Microbial Ecology, 4: 303-317
- Gauthier MJ, Clément RL, Flatau GN, Amiard JC (1986). Cadmium accumulation by Gram negative marine bacteria related to their metal sensitivity and respiratory type. Oceanol. Acta, 9 (3): 333-337
- Gillet P (1986). Variations de la distribution des paragnaths chez Nereis diversicolor dans l' estuaire du Bou Regreg (Maroc). Cah. Biol. Mar., 28: 481-490
- Gilmour C & Riedel G (2009). Biogeochemistry of Trace Metals and Mettaloids. In: Encyclopedia of Inland Waters, Academic Press, Oxford, pp. 7–15
- Glöckner FO, Stal L, Sandaa RA, Gasol JM, O'Gara F, Hernandez F, et al. (2012). Marine Microbial Diversity and its role in Ecosystem Functioning and Environmental Change. Marine Board Position Paper 17. Calewaert, J.B. and McDonough N. (Eds.)
- Grant A & Middleton R (1998). Contaminants in Sediments: Using Robust Regression for Grain-Size Normalization. Estuaries, 21: 197
- Grasshoff K, Ehrhard M, Kremmling K (1983). Methods of Seawater Analysis. Verlag Chemie, Berlin (1983) 450 pp.
- Gravina MF & Somaschini A (1990). Censimento dei policheti dei mari italiani: Capitellidae Grube, 1862. Atti della Società Toscana Scienze Naturali, Memorie Serie B, 97: 259-285
- Gray JS (1974). Animal-sediment relationships. Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev., 12:707-22
- Gray JS & Elliott M (2009). Ecology of Marine Sediments. From Science to Management. Oxford University Press.

- Green JL & Bohannan BJM (2006). Spatial scaling of microbial biodiversity. TRENDS in ecology and evolution, 21:501–507
- Green JL, Bohannan BJM, Whitaker RJ (2008). Microbial biogeography: from taxonomy to traits. Science, 320: 1039–43
- Guelorget O & Michel P (1979). Les peuplements benthiques d'un e'tang littoral languedocien, l'étang du Prévost (Hérault). 1. Etude quantitative de la macrofaune des vases. Téthys, 9: 49-64
- Guelorget O & Perthuisot JP (1983). Le domain paralique expression géologiques, biologiques et économiques du confinment. Travaux du Laboratoire de Géologie, 16: 1-136
- Hamady M & Knight R (2009). Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. Genome research 19: 1141-52
- Hanson CA, Fuhrman JA, Horner-Devine MC, Martiny JBH (2012). Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape. Nature reviews Microbiology, 10: 497-506
- Hedges JI & Stern JH (1984). Carbon and nitrogen determinations of carbonate-containing solids. Limnology and Oceanography, 29: 657-663
- Hedlund B & Staley J (2004). Microbial Endemism and Biogeography. In: Microbial Diversity and Bioprospecting. ASM Press, pp. 225 – 231
- Herlemann DP, Labrenz M, Jürgens K, Bertilsson S, Waniek JJ, Andersson AF (2011). Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. The ISME journal, 5: 1571–9
- Holthe T (1986). Polychaeta Terebellomorpha. Marine Invertebrates of Scandinavia, vol. 7. Universitetsforlaget, Oslo
- Hooper DU, Chapin FS, Ewel JJ, Hector A, Inchausti P, Lavorel S, et al. (2005).Effects of Biodiversity on Ecosystem Functioning: a consensus of current knowledge. Ecological Monographs, 75: 3-35

- Horner-Devine MC, Carney KM, Bohannan BJM (2004b). An ecological perspective on bacterial biodiversity. Proc. R. Soc. Lond. B, 271: 113-22
- Horner-Devine MC, Lage M, Hughes JB, Bohannan BJM (2004a). A taxa-area relationship for bacteria. Nature, 432: 750-3
- Horner-Devine MC, Leibold MA, Smith VH, Bohannan BJM (2003). Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. Ecology Letters, 6: 613-622
- Horner-Devine MC, Silver JM, Leibold MA, Bohannan BJM, Colwell RK et al. (2007). A Comparison of Taxon Co-occurrence Patterns for Macro- and Microorganisms. Ecology, 88 (6): 1345-1353
- Horowitz AJ (1991). The role of sediment-trace element chemistry in waterquality monitoring and the need for standard analytical methods. In: J.Hall and D.Glysson, eds., Monitoring Water in the 1990's—Meeting New Challenges. STP 1102. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, pp. 301–314
- Ianni C, Magi E, Rivaro P, Ruggieri N (2000). Trace metals in Adriatic coastal sediments: Distribution and speciation pattern. Toxicological & Environmental Chemistry, 78: 73-92
- Jessup CM, Kassen R, Forde SE, Kerr B, Buckling A, Rainey PB, Bohannan BJM (2004). Big questions, small worlds: microbial model systems in ecology. TRENDS in Ecology and Evolution, 19 (4): 189-197
- Jones NV & Wolff WJ (1981). Feeding and survival strategies of estuarine organisms. Plenum Press, New York
- Kallmeyer J, Ferdelman TG, Weber A, Fossing H, Jørgensen BB (2004). A cold chromium distillation procedure for radiolabeled sulfide applied to sulfate reduction measurements. Limnol. Oceanogr. Methods, 2: 171-180
- Karageorgis AP (2007). Geochemical study of sediments from the Amvrakikos Gulf logoon complex, Greece. Transitional Waters Bulletin, 1: 3-8

- Kennish MJ (1990). Ecology of Estuaries, Vol. II: Biological Aspects. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Kennish MJ (1998) Pollution Impacts on Marine Biotic Communities. Boca Raton, USA: CRC Press: 310 pp
- Kinne O (1966). Physiological aspects of animal life in estuaries with special reference to salinity. Neth. J. Sea Res., 3: 227–244
- Kirchman DL, Dittel AI, Findlay SEG, Fischer D (2004). Changes in bacterial activity and community structure in response to dissolved organic matter in the Hudson River, New York Aquat. Microb. Ecol., 35: 243-257
- Kirchman DL, Dittel AI, Malmstrom RR, Cottrell MT (2005). Biogeography of major bacterial groups in the Delaware estuary. Limnol. Oceanogr. 50: 1697-1706
- Kormas K, Nicolaidou A, Reizopoulou S (2001). Temporal variations of nutrients, chlorophyll a and particulate matter in three coastal lagoons of Amvrakikos Gulf (Ionian Sea, Greece). Marine Ecology, 22 (3): 201-213
- Köster M & Meyer-Reil LA (2001). Characterization of carbon and microbial biomass pools in shallow water coastal sediments of the southern Baltic Sea (Nordrügensche Bodden). Marine Ecology Progress Series, 214: 25-41
- Kritzberg ES, Langenheder S, Lindström ES (2006). Influence of dissolved organic matter source on lake bacterioplankton structure and function implications for seasonal dynamics of community composition. FEMS microbiology ecology, 56: 406-17
- Landa ER (2005). Microbial biogeochemistry of uranium mill tailings. Advances in applied microbiology, 57: 113-30
- Lardicci C (1989). Censimento dei policheti dei mari italiani: Spionidae Grube, 1850. Atti della Societá Toscana di Scienze. Naturali, Memorie, Series B, 96: 121-152

- Lardicci C, Rossi F, Castelli A (1997). Analysis of macrozoobenthic community structure after severe dystrophic crises in a Mediterranean coastal lagoon. Marine Pollution Bulletin, 34: 536-547
- Lee DHK (1972). Metallic contaminants and human health. Academic Press, Inc., New York, U.S.A., 241 pp.
- Lee BG, Griscom SB, Lee JS, Choi HJ, Koh CH, Luoma SN, et al. (2000a). Influences of Dietary Uptake and Reactive Sulfides on Metal Bioavailability from Aquatic Sediments. Science, 287: 282-284
- Lee BG, Lee JS, Luoma SN, Choi HJ, Koh CH (2000b). Influence of Acid Volatile Sulfide and Metal Concentrations on Metal Bioavailability to Marine Invertebrates in Contaminated Sediments. Environmental Science and Technology, 34: 4517-4523
- Lee JS, Lee BG, Yoo H, Koh CH, Luoma SN (2001). Influence of reactive sulfide (AVS) and supplementary food on Ag, Cd and Zn bioaccumulation in the marine polychaete Neanthes arenaceodentata. Marine Ecology Progress Series, 216: 129-140
- Leland HV, Copenhaver ED, Corrill LS (1974). Heavy Metals and Other Trace Elements. Journal Water Pollution Control Federation, 46: 1452-1476
- Lindström ES, Kamst-Van Agterveld MP, Zwart G (2005). Distribution of typical freshwater bacterial groups is associated with pH, temperature, and lake water retention time. Applied and environmental microbiology, 71: 8201-6
- Logue JB & Lindström ES (2008). Biogeography of bacterioplankton in inland waters. Freshwater Reviews, 1:99-114
- Loreau M (2000). Biodiversity and ecosystem functioning: recent theoretical advances. Oikos, 91: 3-17
- Loreau M (2004). Does functional redundancy exist? Oikos, 104: 606-611
- Loreau M & Hector A (2001). Partitioning selection and complementarity in biodiversity experiments. Nature, 412: 72-6

- Loring DH (1991). Normalization of heavy-metal data from estuarine and coastal sediments. ICES Journal of Marine Science, 48: 101-115
- Lozupone CA, Knight R (2007). Global patterns in bacterial diversity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104: 11436–40
- Lundin D, Severin I, Logue JB, Östman Ö, Andersson AF, Lindström ES (2012) Which sequencing depth is sufficient to describe patterns in bacterial α and β -diversity? Environmental Microbiology Reports, doi:10.1111/j.1758-2229.2012.00345.x
- Luoma SN (1989). Can we determine the biological availability of sedimentbound trace elements? Hydrobiologia, 176-177: 379-396
- Macalady J & Banfield JF (2003). Molecular geomicrobiology: genes and geochemical cycling. Earth and Planetary Science Letters, 209: 1-17
- Madigan M, Martinko JM, Parker J (2003). Brock biology of microorganisms 10th edition. Upper Saddle River (NJ): Prentice Hall. 991 p.
- Martiny JBH, Bohannan BJM, Brown JH, Colwell RK, Fuhrman JA, Green JL, et al. (2006). Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. Nature Reviews Microbiology, 4: 102-112
- Mayer LM & Fink KL (1980). Granulometric dependence of chromium accumulation in estuarine sediments in Maine. Estuarine and Coastal Marine Science, 11: 491-503
- Mishra D & Kar M (1974). Nickel in plant growth and metabolism. The Botanical Review, 40: 395-452
- Morse JW, Presley BJ, Taylor RJ, Benoit G, Santschi P (1993). Trace metal chemistry of Galveston Bay: water, sediments and biota. Marine Environmental Research, 36: 1-37
- Müller AK, Westergaard K, Christensen S, Sørensen SJ (2001). The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. FEMS Microbiology Ecology, 36: 11-19
- Muylaert K, Van der Gucht K, Vloemans N, Meester LD, Gillis M, Vyverman W (2002). Relationship between Bacterial Community Composition and Bottom-Up versus Top-Down Variables in Four Eutrophic Shallow Lakes. Applied and Environmental Microbiology, 68: 4740-4750
- Nemergut DR, Costello EK, Hamady M, Lozupone C, Jiang L, Schmidt SK, et al. (2011). Global patterns in the biogeography of bacterial taxa. Environmental microbiology, 13: 135-44
- Nicolaidou A, Bourgoutzani F, Zenetos A, Guelorget O, Perthuisot JP (1988). Distribution of molluscs and polychaetes in coastal lagoons in Greece. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 26: 337-350
- Nicolaidou A, Karakyre M, Trichopoulou V (1985). Seasonal changes in the fauna of a brackish-water lagoon. Rapport de la Commité International pour l' Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée, 29 (4): 125-126
- Nicolaidou A & Papadopoulou KN (1989). Factors Affecting the Distribution and Diversity of Polychaetes in Amvrakikos Bay, Greece. Marine Ecology, 10: 193-204
- Nowicki BL & Nixon SW (1985). Benthic community metabolism in a coastal lagoon ecosystem. Mar. Ecol. Prog. Ser., 22: 21-30
- Nübel U, Garcia-Pichel F, Muyzer G (2000). The halotolerance and phylogeny of cyanobacteria with tightly coiled trichomes (Spirulina Turpin) and the description of Halospirulina tapeticola gen. nov., sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50: 1265-1277
- Oliveros JC (2007). VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html
- Olsgard F, Somerfield P, Carr M (1997). Relationships between taxonomic resolution and data transformations in analyses of a macrobenthic community along an established pollution gradient. Marine Ecology Progress Series, 149: 173-181

- Papageorgiou N, Arvanitidis C, Eleftheriou A. (2006). Multicausal environmental severity: A flexible framework for microtidal sandy beaches and the role of polychaetes as an indicator taxon. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 70: 643-653
- Papke RT, Ramsing NB, Bateson MM, Ward DM (2003). Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. Environmental Microbiology, 5: 650-659
- Parsons TR, Maita Y, Lalli CM (1984). A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. 1st ed. New York, Pergamon Press
- Pekey H, Karakaş D, Ayberk S, Tolun L, Bakoğlu M (2004). Ecological risk assessment using trace elements from surface sediments of Izmit Bay (Northeastern Marmara Sea) Turkey. Marine pollution bulletin, 48: 946-53
- Pielou EC (1969). An introduction to mathematical ecology. Wiley-Interscience, 286 pp.
- Pleijel F (1993). Polychaeta Phyllodocidae. Marine invertabrates of Scandinavia, 8: 1-159
- Poulos S, Collins MB, Ke X (1993). Fluvial/wave interaction controls on delta formation for ephemeral rivers discharging into microtidal waters. Geo-Marine Letters, 13: 24-31
- Poulos SE, Collins MB, Lykousis V (1995). Late Quaternary Evolution of Amvrakikos Gulf, Western Greece. Geo-Marine Letters, 15: 9-16
- Puiga P, Palanques A, Sanchez-Cabeza JA, Masqué P (1999). Heavy metals in particulate matter and sediments in the Southern Barcelona sedimentation system (North-western Mediterranean). Marine Chemistry, 63: 311-29
- Queralt I, Barreiros MA, Carvalho ML, Costa MM (1999). Application of different techniques to assess sediment quality and point source

pollution in low-level contaminated estuarine recent sediments (Lisboa coast, Portugal). Science of The Total Environment, 241: 39-51

- Quince C, Lanzen A, Davenport RJ, Turnbaugh PJ (2011). Removing Noise From Pyrosequenced Amplicons. BMC Bioinformatics, 12:38
- Rainer SF (1991). The genus Nephtys (Polychaeta: Phyllodocida) of the Northern Europe: a review of species, including the description of Nephtys pulchra n. sp. And a key to the Nephtyidae. Helgol. Meeres., 45: 65-96
- Ramette A & Tiedje JM (2007). Biogeography: an emerging cornerstone for understanding prokaryotic diversity, ecology, and evolution. Microbial ecology, 53: 197-207
- Reizopoulou S & Nicolaidou A (2004). Benthic diversity of coastal brackishwater lagoons in western Greece. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems, 14: S93–S102
- Reizopoulou S & Nicolaidou A (2007). Index of size distribution (ISD): a method of quality assessment for coastal lagoons. Hydrobiologia 577:141–149
- Reizopoulou S, Thessalou-Legaki M, Nicolaidou A (1996). Assessment of distubance in Mediterranean lagoons: An evaluation of methods. Marine Biology, 125: 189-197
- Remane A (1934). Die Brackwasserfauna. Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, 36: 34-74
- Remane A & Schlieper C (1971). Biology of Brackish Water. John Wiley and Sons, Inc., New York. 372 p.
- Roberts PB (1983). Interactions between cadmium and radiation in the killing of Escherichia coli. Environmental Research, 31: 221-228
- Rosenzweig ML (1995). Species Diversity in Space and Time. Cambridge Univ. Press
- Rouse GW & Pleijel F (2001). Polychaetes. Oxford University Press

- Rusch DB, Halpern AL, Sutton G, Heidelberg KB, Williamson S, Yooseph S, et al. (2007). The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: northwest Atlantic through eastern tropical Pacific. Moran. PLoS biology, 5 (3): e77
- Schauer M, Kamenik C, Hahn MW (2005). Ecological differentiation within a cosmopolitan group of planktonic freshwater bacteria (SOL cluster, Saprospiraceae, Bacteroidetes). Applied and environmental microbiology, 71: 5900-7
- Schroeder HA & Darrow DK (1973). Relation of trace metals to human health effects. In: CHEMICAL ANALYSIS OF THE ENVIRONMENT AND OTHER MODERN TECHNIQUES. Plenum Press, pp 81-106
- Schropp SJ & Windom HL (1988). A guide to the interpretation of metal concentrations in estuarine sediments: Tallahassee. Florida Department of Environmental Protection, 43 p.
- Shade A & Handelsman J (2011). Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. Environmental microbiology, doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02585.x
- Simpson SL, Apte SC, Batley GE (1998). Effect of Short-Term Resuspension Events on Trace Metal Speciation in Polluted Anoxic Sediments. Environmental Science & Technology, 32: 620-625
- Simpson SL, Batley GE, Chariton AA, Stauber JL, King CK, Chapman JC, Hyne RV, Gale SA, Roach AC, Maher WA (2005). Handbook for Sediment Quality Assessment. CSIRO: Bangor, NSW
- Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Mark Welch D, Huse SM, Neal PR, et al. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103: 12115-20
- Somerfield P & Clarke KR (1995). Taxonomic levels, in marine community studies, revisited. Marine Ecology Progress Series, 127:113-119

- Sparks DL (2005). Toxic Metals in the Environment: The Role of Surfaces. Elements, 1: 193-197
- Sterritt RM & Lester JN (1980). Interactions of heavy metals with bacteria. The Science of the total environment, 14: 5-17
- Stora G & Arnoux A (1983). Effects of Large Freshwater Diversions on Benthos of a Mediterranean Lagoon. Estuaries, 6: 115
- Strickland JDH & Parsons TR (1972). Inorganic micronutrients in sea water. In: Stevenson, J. (Ed.), A Practical Handbook of Seawater Analysis. Fish Oceans, Ottawa, Canada, Fish. Res. Board Can., Canada Dept., 310 pp.
- Szefer P, Glasby GP, Stüben D, Kusak A, Geldon J, Berner Z, et al. (1999). Distribution of selected heavy metals and rare earth elements in surficial sediments from the polish sector of the Vistula Lagoon. Chemosphere, 39: 2785-2798
- Torsvik V, Øvreås L, Thingstad TF (2002). Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. Science, 296: 1064-6
- Tsutsumi H, Fukunaga S, Fujita N, Sumida M. (1990) Relationship between growth of Capitella sp. and organic enrichment of the sediment. Marine Ecology Progress Series, 63: 157-162
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI (2007). The human microbiome project. Nature, 449: 804-10
- US EPA (1996). Method 3052: Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils and oils. In: Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods - SW-846. USEPA, Washington DC.
- US EPA (2007). Method 6020A: Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. USEPA, Washington DC.
- van Straalen NM & Roelofs D (2006). An Introduction to Ecological Genomics. Oxford University Press
- Viaroli P, Lasserre P, Campostrini P (2007). Lagoons and Coastal Wetlands in the Global Change Context: Impacts and Management Issues. Selected

papers of the International Conference "CoastWetChange", Venice, 26– 28 April 2004

- Viéitez JM, Alos C, Parapar J, Besteiro C, Moreira J, Núñez J, Laborda AJ, San Martín G (2004). Annelida, Polychaeta I. In: Ramos MA (Eds.). Fauna Ibérica, vol. 25. Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, Madrid
- Violante A, Huang PM, Gadd GM (2008). Biophysico-Chemical Processes of Heavy Metals and Metalloids in Soil Environments. John Wiley & Sons
- Vivas A, Moreno B, Val C del, Macci C, Masciandaro G, Benitez E (2008). Metabolic and bacterial diversity in soils historically contaminated by heavy metals and hydrocarbons. Journal of environmental monitoring, 10: 1287-96
- Walker CW & Houston CW (1981). Toxicity of cadmium to bacteria. Biotechnology Letters, 3: 437-442
- Wang F & Chapman PM (1999). Biological implications of sulfide in sedimenta review focusing on sediment toxicity. Environmental Toxicology and Chemistry, 18: 2526-2532
- Whitaker RJ, Grogan DW, Taylor JW (2003). Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. Science, 301: 976-8
- Whitman WB (1998). Prokaryotes: The unseen majority. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95: 6578-6583
- Wildish J (1977). Factors controlling marine and estuarine sublittoral macrofauna. Helgolaender Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen, 30: 445-454
- Woese CR & Fox GE (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74 (11): 5088-90
- Wu QL & Hahn MW (2006). High predictability of the seasonal dynamics of a species-like Polynucleobacter population in a freshwater lake. Environmental microbiology, 8: 1660-6

- Wu QL, Zwart G, Schauer M, Kamst-van Agterveld MP, Hahn MW (2006).
 Bacterioplankton community composition along a salinity gradient of sixteen high-mountain lakes located on the Tibetan Plateau, China.
 Applied and environmental microbiology, 72: 5478-85
- Yannarell AC & Triplett EW (2005). Geographic and Environmental Sources of Variation in Lake Bacterial Community Composition. Applied and Environmental Microbiology, 71 (1): 227-239
- Yentsch CS & Menzel DW (1963). A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts, 10: 221-231
- Youssef N, Sheik CS, Krumholz LR, Najar FZ, Roe BA, Elshahed MS (2009). Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. Applied and environmental microbiology, 75: 5227-36
- Zhang H, Davison W, Mortimer RJG, Krom MD, Hayes PJ, Davies IM (2002). Localised remobilization of metals in a marine sediment. Science of The Total Environment, 296: 175-187
- Zobell CE (1946). Studies on Redox Potential of Marine Sediments. AAPG Bulletin, 30: 477-513
- Βασιλειάδου Κ (2008). Η Ταξο-κοινωνία των πολύχαιτων στα λιμνοθαλάσσια οικοσυστήματα: μια πρώτη οικολογική και μοριακή προσέγγιση. Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- Σκαφάκη Κ (2006). Μελέτη βενθικών μικφοβιακών πληθυσμών (Βακτήφια, Αφχαία) σε δύο ακφαία ενδιαιτήματα (παφάκτιο υδφοθεφμικό πεδίο, λιμνοθάλασσα) με Μοφιακές Μεθόδους. Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εφγασία, Καποδιστφιακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ПАРАРТНМА

Πίνακας 1: Οι μέσες τιμές (± τυπική απόκλιση) των αβιοτικών παραμέτρων των λιμνοθαλασσών του Αμβρακικού κόλπου. α: σταθμοί δειγματοληψίας στο εσώτερο τμήμα των λιμνοθαλασσών. β: σταθμοί δειγματοληψίας στο κανάλι επικοινωνίας της κάθε λιμνοθάλασσας με τον Αμβρακικό κόλπο.

	Μάζ	ωμα	Λογα	χοού	Τσο	πέλι	Τσου	καλιό
	α	β	α	β	α	β	α	β
NH4 (uM)	1,89 ± 1,39	0,19 ± 0,18	2,79 ± 0,08	5,1 ± 0,62	9,11 ± 0,81	10,69 ± 1,8	10,28 ± 0,82	6,95 ± 0,65
PO4 (uM)	$0,02 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,03$	0	$0,05 \pm 0,04$	$0,23 \pm 0,12$	$0,12 \pm 0,03$	0,01 ± 0,02	$0,42 \pm 0,08$
NO3 (uM)	4,88 ± 2,54	2,61 ± 2,62	1,52 ± 0,08	1,33 ± 0,17	5,02 ± 0,39	4,38 ± 0,14	7,96 ± 2,36	15,76 ± 2,74
NO2 (uM)	$0,35 \pm 0,21$	0,2 ± 0,29	$0,2 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,11$	1,06 ± 0,21	$0,98 \pm 0,15$	$0,69 \pm 0,32$	$0,73 \pm 0,07$
SiO2 (uM)	21,36 ±	18,06 ±	357 ± 0.21	1.08 ± 1.28	34,86 ±	21,21 ±	36,24 ±	29,82 ±
5102 (ulvi)	6,12	4,55	$5,37 \pm 0,21$	4,90 ± 1,30	0,46	5,26	9,14	16,32
$C[a] = \langle u = l \rangle$	34,1 ±	59,31 ±	0.12 + 1.22	11,35 ±	19 1 10	4.04 + 0.56	(12 + 0.7)	0.06 + 0.15
Chi a (ug/i)	22,03	8,77	9,13 ± 1,32	2,12	4,8 ± 1,19	4,04 ± 0,56	6,12 ± 0,7	0,96 ± 0,15
Phaeop. (ug/l)	7,11 ± 5,11	7,89 ± 2,55	4,93 ± 2,47	11,67 ± 2,77	0,83 ± 0,53	1,28 ± 0,54	3,84 ± 0,92	1,16 ± 0,26
CDE (no/l)	41,21 ±	(7.2 ± 9.75)	14,06 ±	23,02 ±	E () + 1 ()	E 22 + 1 04	0.06 + 0.45	2 12 + 0 4
CFE (ug/I)	26,96	07,2 ± 0,75	3,76	4,86	5,62 ± 1,66	5,52 ± 1,04	9,90 ± 0,43	2,12 ± 0,4
POC(ug/l)	4856 ±	5780 ±	2141 ±	2233 ±	1032,5 ±	862 ±	1286,5 ±	607,5 ±
1 OC (ug/1)	1059,66	371,44	294,82	291,25	55,97	72,39	243,87	206,17
TRIS (uM/gr)	208,33	180,73	149,52	165,42	177,96	173,36	161,83	174,27
Chl = (u = a)	80,27 ±	43,44 ±	85,17 ±	34,89 ±	47,62 ±	262 + 1 2	20,5 ±	62,99 ±
Cill a (ug/g)	57,14	5,36	20,81	16,24	15,3	30,3 ± 1,2	16,44	12,18
Phacon (ug/g)	115,3 ±	50,74 ±	71,63 ±	26,27 ±	50,4 ±	80,54 ±	22,16 ±	68,11 ±
Thatop. (ug/g)	54,73	20,58	11,95	13,32	16,93	8,21	1,78	17,43
CDE(ma/a)	195,57 ±	94,17 ±	156,8 ±	61,16 ±	98,02 ±	116,84 ±	42,66 ±	131,11 ±
CFE(ug/g)	109,8	25,79	32,76	27,37	30,87	9,22	15,39	25,13
POC(uq/q)	48721,71±	26092,65±	26122,93±	13646,28±	23037,69±	33568,62±	28445,72±	32908,14±
1 OC (ug/g)	4334,76	1797,24	2431,17	2178,83	3110,96	2195,63	1488,49	2495,2

Temperature (°C)	11	11,8	12,2	12,4	12,1	12,8	12,4	11,9
Sediment temperature (°C)	12	12	13	13,01	13	13	13	12,5
Salinity (psu)	14,6	15,2	16,9	22	14,6	14,9	7,2	5,7
рН	8,58	8,73	8,2	7,95	8,2	8,25	8,08	7,98
Conductivity (mS/cm)	24,6	25,5	28,1	38	24,5	25	12,72	10,3
O2 (mg/lt)	9,43	8,73	7,8	7	8,39	8,03	8	7,45
Eh (mV)	-29,5	-91,5	62,5	278,5	-86,5	51,5	-123	89,5
MD	0,73	0,66	0,54	0,67	0,41	0,41	0,36	0,51
σ1	1,11	1,07	1,52	0,96	1,61	1,45	1,42	1,26
Sk1	0,28	0,55	0,34	0,52	0,05	0,11	-0,14	0,37
silt & clay (%)	1,3	1,74	3,32	2,85	3,51	3,46	0,3	5,82
sand%	98,7	98,26	96,68	97,15	96,49	96,54	99,7	94,18

Πίνακας 2: Οι μέσες τιμές (± τυπική απόκλιση) των συγκεντρώσεων των βαρέων μετάλλων και στοιχείων (mg per kg; parts per million, ppm) των λιμνοθαλασσών του Αμβρακικού κόλπου. α: σταθμοί δειγματοληψίας στο εσώτερο τμήμα των λιμνοθαλασσών. β: σταθμοί δειγματοληψίας στο κανάλι επικοινωνίας της κάθε λιμνοθάλασσας με τον Αμβρακικό κόλπο.

	Μάζ	ωμα	Λογα	ιοού	Τσο	πέλι	Τσου	καλιό
	α	β	α	β	α	β	α	В
Li	57,23 ± 6,24	23,61 ± 2,9	51,49 ± 10,59	25,12 ± 4,11	36,14 ± 1,14	38,84±0,8	24,42 ± 3,4	26,26 ± 0,93
Be	1,61 ± 0,17	$0,68 \pm 0,08$	1,23 ± 0,21	0,72 ± 0,15	$0,95 \pm 0,06$ $1,03 \pm 0,01$		0,69 ± 0,03	0,7 ± 0,05
Na	23671,34 ±	14464,62 ±	18544,14 ±	14456,82 ±	13484,62 ±	15553,35 ±	13407,97 ±	21094,18 ±
	4834,61	539,81	2165,94	388,14	532,84	418,97	656,56	404,57
Mg	16135,67 ±	7773,66 ±	21271,42 ±	9963,82 ±	12555,34 ±	13880,54 ±	11705,36 ±	12188,87 ±
	2431,51	952,26	4362,03	1300,15	328,6	294,91	1168,18	209,15
Al	57184,29 ±	26947,49 ±	40973,52 ±	30587,25 ±	38109,19 ±	37411,07 ±	30513,42 ±	33266,89 ±
	8745,08	2243,38	10022,31	3020,54	742,84	544,12	3013,19	1074,12
Р	717,36 ±	380,89 ±	454,38 ±	289,52 ±	426,89 ±	554,80 ±	284,74 ±	518,57 ±
	100,08	94,82	107,79	55,95	39,3	20,12	18,21	10,05

Κ	15056,85±	8745,77±	13425,73 ±	9949,47±	12047,33±	11459,03±	8497,63±	9511,93±
	2084,15	858,78	2676,92	949,09	385,97	93,46	744,07	239,78
Ca	30817,22±	66582,98±	124430,3±	65290,06±	60841,88±	68950,18±	113577,13±	54474,71±
	14415,51	17332,56	50495,09	19503,32	2993,1	2101,57	16234,22	2272,53
Sc	12,6 ± 1,97	5,13 ± 0,96	12,67 ± 2,66	5,15 ± 0,89	8,66 ± 0,36	9,32 ± 0,32	5,66 ± 0,83	5,66 ± 0,24
V	107,89±	38,96±6,33	90,65±19,36	37,1 ± 6,47	61,15±2,77	67,89±1,16	42,58 ± 5,7	43,82±1,85
	13,14							
Cr	226,86±	155,74±	164,29±31,45	152,71±	205,02 ±	200,14 ±	193,09 ±	181,56±
	29,58	16,1		18,99	5,03	14,14	6,11	9,85
Mn	443,38 ±	263,18±	654,07 ± 80,67	367,44±	464,71 ±	545,72 ±	439,9±	357,95±3,1
	56,35	37,29		46,57	40,47	26,34	19,27	
Fe	38372,94±	13553,35±	31105,19±	13239,59±	22163,85±	24886,7±	15313,58 ±	14537,4±
	4638,95	2225,27	6670,13	2274,93	1061,2	583,19	2663,16	425,74
Со	18,32±2,05	$8,18 \pm 0,78$	18,42±3,27	9,17 ± 0,17	12,38±0,62	15,56 ± 0,21	9,99 ± 1,47	8,44 ± 0,33
Ni	155,73±	58,14±7,92	143,53 ± 30,19	85,55±	98,39±3,19	105,75±	73,36±	66,78±2,34
	19,87			18,69		1,99	10,85	
Cu	45,86±5,5	16,54±2,49	31,59±6,6	12,53 ± 1,63	21,52±1,22	33,77±0,96	14,37 ± 2,5	15,12±0,72
Zn	90,47±	31,62±6,07	61,68±13,54	28,39 ± 5,12	49 ± 2,01	64,37 ± 1,21	30,91 ± 3,98	54,32±
	12,89							18,71
Ga	13,97 ± 1,71	5,8 ± 0,79	11,08 ± 2,42	$6,07 \pm 1,05$	8,79 ± 0,29	9,31 ± 0,15	$5,93 \pm 0,76$	6,52 ± 0,19
Ge	1,89 ± 0,29	$0,87 \pm 0,03$	1,51 ± 0,26	$0,95 \pm 0,13$	1,27 ± 0,05	1,32 ± 0,06	0,96 ± 0,09	$0,99 \pm 0,04$
As	6,66 ± 0,66	3,03 ± 0,09	4,97 ± 0,39	2,14 ± 0,03	3,92 ± 0,52	5,76 ± 0,09	4,04 ± 0,43	4,13 ± 0,3
Rb	106±14,36	46,91± 5,27	80,91 ± 17,42	45,43 ± 7,03	69,49±2,87	67,37±1,46	$40,6 \pm 4,85$	44,54 ± 1,32
Sr	325,92±	405,11±	872,2±328,23	384,38±	216,43 ±	252,55±	497,21±	274,68±
	150,23	131,75		114,12	18,43	3,22	83,48	15,86
Y	18,21 ± 2,57	9,68 ± 0,86	15,05 ± 1,5	9,28 ± 0,58	$14,73 \pm 0,72$	19,26±0,88	9,57 ± 1	10,49±0,35
Pd	$0,13 \pm 0,02$	$0,1 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,03$	$0,1 \pm 0,01$	0,11 ± 0,01	$0,13 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$	0,09 ± 0
Ag	$0,25 \pm 0,03$	$0,15 \pm 0,05$	$0,12 \pm 0,02$	$0,07 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$	$0,1 \pm 0,01$
Cd	$0,37 \pm 0,05$	0,15 ± 0,01	$0,15 \pm 0,02$	$0,1 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,01$	0,27 ± 0,01	0,15 ± 0	$0,14 \pm 0,02$
Cs	6,69 ± 0,77	2,4 ± 0,4	4,31 ± 0,92	1,71 ± 0,29	3,56 ± 0,17	4,47 ± 0,12	1,90 ± 0,33	2,16 ± 0,09
La	20,26 ± 4,35	11,6 ± 0,99	19,78 ± 0,11	10,68±0,12	16 ± 0,87	19,63±0,86	12,16±1,16	12,22±0,7
Ce	39,15±5,12	20,36 ± 1,35	38,42 ± 0,97	$20,7 \pm 0,14$	28,29 ± 1,57	33,16 ± 1,07	23,54 ± 2,21	22,41 ± 1,33

Pr	$4,63 \pm 0,85$	2,69 ± 0,18	$4,75 \pm 0,15$	2,61 ± 0,03	3,66 ± 0,2	4,51 ± 0,26	2,89 ± 0,27	2,86 ± 0,15
Nd	17,85±3,29	$10,56 \pm 0,67$	18,95±0,81	10,61 ± 0,19	14,39±0,76	18,09 ± 1,05	11,39±0,99	11,23±0,71
Eu	$0,84 \pm 0,15$	$0,5 \pm 0,03$	$0,87 \pm 0,03$	$0,53 \pm 0,01$	$0,71 \pm 0,04$	$0,9 \pm 0,06$	$0,53 \pm 0,04$	$0,54 \pm 0,02$
Sm	$3,79 \pm 0,64$	2,24 ±0,16	3,94 ± 0,13	2,28 ± 0,01	3,1 ± 0,19	3,86 ± 0,24	2,41 ± 0,21	$2,43 \pm 0,13$
Gd	$3,84 \pm 0,59$	2,16 ± 0,12	3,77 ± 0,06	2,11 ± 0,04	3,07 ± 0,19	3,91 ± 0,2	2,3 ± 0,24	$2,33 \pm 0,1$
Tb	$0,56 \pm 0,09$	0,29 ± 0,02	0,51 ± 0,02	0,3 ± 0,01	$0,44 \pm 0,02$	$0,56 \pm 0,03$	0,31 ± 0,03	0,33 ± 0,01
Dy	$3,4 \pm 0,47$	1,82 ± 0,15	3 ± 0,22	1,83 ± 0,07	$2,73 \pm 0,07$	3,41 ± 0,18	1,87 ± 0,17	1,99 ± 0,07
Но	0,66 ± 0,09	$0,34 \pm 0,03$	$0,55 \pm 0,06$	$0,34 \pm 0,03$	$0,52 \pm 0,02$	$0,66 \pm 0,04$	$0,35 \pm 0,04$	$0,38 \pm 0,01$
Er	$1,94 \pm 0,25$	1 ± 0,09	1,59 ± 0,2	0,99 ± 0,05	1,51 ± 0,07	1,94 ± 0,09	1,01 ± 0,12	1,11 ± 0,03
Tm	$0,27 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,01$	0,22 ± 0,03	$0,14 \pm 0,01$	0,21 ± 0	0,26 ± 0,01	$0,14 \pm 0,02$	0,16 ± 0,01
Yb	1,81 ± 0,24	0,91 ± 0,09	1,49 ± 0,24	0,9 ± 0,14	1,39 ± 0,06	$1,76 \pm 0,08$	$0,95 \pm 0,13$	$1,06 \pm 0,04$
Lu	$0,27 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,01$	0,21 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,21 ± 0	$0,25 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,02$	0,15 ± 0,01
T1	$0,63 \pm 0,08$	$0,36 \pm 0,03$	$0,39 \pm 0,08$	$0,3 \pm 0,03$	$0,37 \pm 0,01$	$0,45 \pm 0$	$0,28 \pm 0,03$	0,31 ± 0,02
Pb	28,59±3,04	10,78±1,5	14,91 ± 3,24	10,7 ± 2,34	$13,53 \pm 0,58$	14,37±0,31	$10,24 \pm 0,5$	11,69±1,12
Th	6,61 ± 1,06	3,01 ± 0,39	5,68 ± 1,04	2,99 ± 0,36	$4,52 \pm 0,17$	5,17 ± 0,2	$3,28 \pm 0,5$	$3,44 \pm 0,19$
U	2,61 ± 0,34	1,66 ± 0,23	1,92 ± 0,33	$1,22 \pm 0,24$	$1,36 \pm 0,04$	$2,03 \pm 0,08$	1,89 ± 0,15	1,31 ± 0,17

Πίνακας 3: Τα αποτελέσματα της ανάλυσης SIMPER για τη συμβολή των διαφορετικών βαρέων μετάλλων και στοιχείων στην ανομοιότητα μεταξύ των λιμνοθαλασσών του Αμβρακικού κόλπου. AD: μέση ανομοιότητα. Av: μέση τιμή. Με έντονη γραφή υποδηλώνονται τα χημικά στοιχεία σύμφωνα με τα οποία τα ιζήματα κατηγοριοποιούνται ως ρυπασμένα. Με πλάγια γραφή υποδηλώνονται τα κοινά στοιχεία που συμβάλουν στην ομοιότητα μεταξύ των λιμνοθαλασσών.

	Av.	Av.	Contr.	Cum		Av.	Av.	Contr.	Cum
	Λογαρού	Τσουκαλιό	%	%		Λογαρού	Τσοπέλι	%	%
Λογαρού – Τσουκαλιό		AD = 4,7	8		Λογαρού – Τσοπέλι				
44Ca	6,86	6,86	24,48	24,48	44Ca	6,86	6,22	22,72	22,72
56Fe	3,27	2,98	16,74	41,22	56Fe	3,27	3,74	16,82	39,53
24Mg	2,76	2,67	14,19	55,41	27 <i>Al</i>	4,31	4,75	15,47	55,00
23Na	2,93	3,21	14,03	69,44	39K	2,46	2,65	8,54	63,54
39K	2,46	2,32	5,82	75,26	88Sr	0,55	0,37	6,25	69,79
27 <i>Al</i>	4,31	4,36	4,68	79,94	23Na	2,93	2,94	6,22	76,01

31P	0,44	0,49	3,71	83,65	24Mg	2,76	2,81	5,46	81,47
88Sr	0,55	0,47	3,26	86,91	31P	0,44	0,54	3,66	85,12
52Cr	0,29	0,33	1,74	88,65	52Cr	0,29	0,35	2,05	87,17
66Zn	0,15	0,16	1,63	90,28	55Mn	0,51	0,55	1,49	88,66
	•				66Zn	0,15	0,18	1,24	89,89
					65Cu	0,10	0,13	0,88	90,77

	Av.	Av.	Contr.	Сит		Av.	Av.	Contr.	Сит
	Μάζωμα	Λογαρού	%	%		Μάζωμα	Τσοπέλι	%	%
Μάζωμα –		AD = 8.5	9		Μάζωμα –	AD = 7 47			
Λογαρού		110 0,0	,		Τσοπέλι				
44Ca	5,50	6,86	33,17	33,17	44Ca	5,50	6,22	32,26	32,26
27 <i>Al</i>	4,99	4,31	18,63	51,81	56Fe	3,84	3,74	18,54	50,81
56Fe	3,84	3,27	12,29	64,09	27 <i>A</i> l	4,99	4,75	11,54	62,35
23Na	3,40	2,93	10,01	74,10	23Na	3,40	2,94	11,21	73,56
39K	2,68	2,46	7,18	81,28	24Mg	2,66	2,81	7,79	81,35
24Mg	2,66	2,76	3,51	84,80	88Sr	0,48	0,37	2,61	83,96
31P	0,57	0,44	2,96	87,75	39K	2,68	2,65	2,29	86,25
88Sr	0,48	0,55	2,03	89,78	55Mn	0,46	0,55	2,11	88,36
52Cr	0,34	0,29	1,13	90,91	31P	0,57	0,54	1,84	90,20

	Av.	Av.	Contr.	Cum%		Av.	Av.	Contr.	Сит	
	Μάζωμα	Τσουκαλιό	%			Τσοπέλι	Τσουκαλιό	%	%	
Μάζωμα – Τσουκαλιό		AD = 12,3	37		Τσοπέλι – Τσουκαλιό	AD = 7,36				
44Ca	5,50	6,86	32,88	32,88	44Ca	6,22	6,86	21,73	21,73	
27 <i>Al</i>	4,99	4,36	15,01	47,88	56Fe	3,74	2,98	19,57	41,30	
56Fe	3,84	2,98	13,58	61,46	23Na	2,94	3,21	13,46	54,76	
23Na	3,40	3,21	11,60	73,06	27 <i>A</i> l	4,75	4,36	13,32	68,08	
24Mg	2,66	2,67	7,79	80,85	39K	2,65	2,32	8,60	76,68	
39K	2,68	2,32	6,17	87,02	24Mg	2,81	2,67	5,15	81,83	
31P	0,57	0,49	2,37	89,39	88Sr	0,37	0,47	2,44	84,27	
88Sr	0,48	0,47	1,43	90,83	31P	0,54	0,49	2,09	86,36	

55Mn	0,55	0,48	1,62	87,97
85Rb	0,20	0,16	1,10	89,07
60Ni	0,25	0,20	1,10	90,17

Πίνακας 4: Τα είδη των πολυχαίτων που βρέθηκαν στις λιμνοθάλασσες του Αμβρακικού κόλπου και η πραγματική τους αφθονία (αριθμός ατόμων). α: σταθμοί δειγματοληψίας στο εσώτερο τμήμα των λιμνοθαλασσών. β: σταθμοί δειγματοληψίας στο κανάλι επικοινωνίας της κάθε λιμνοθάλασσας με τον Αμβρακικό κόλπο.

		Μάζ	ζωμα	Λογα	αρού	Τσο	πέλι	Τσου	καλιό
		α	β	α	β	α	β	α	β
Nephtyidae	Nephthys hombergii		5	14	12		5		
	Platynereis dumerilii		2		5		1		
Nere	Hediste diversicolor	1							1
ididae	Nereididae sp1. juv.		1						
	Nereididae sp2.		1						
<u> </u>	Heteromastus filiformis				12	25	59		
apit	Mediomastus fragilis				6		3		
ellida	Capitella capitata					1			
ae	Capitellidae sp1.					1			
Phyllodocidae	Nereiphylla rubiginosa				7		3	1	
Orbiniidae	Naineris laevigata				16	20			
	Hydroides dianthus				2				
Serpulidae	Serpulidae sp.				1				
	Ficopomatus enigmaticus						1		2
	Spio filicornis		4						
	Prionospio cirrifera		1						
Spio	Scolelepis tridentata			1	2				
nida	<i>Scolelepis</i> sp.			1					
ſŎ	Spionidae sp1.				1				
	Spionidae sp2.				1				

	Harmothoe imbricata		4		
Polynoidae	Harmothoe spinifera		1		
	Harmothoe areolata			1	
Sabellidae	Sabellidae sp1.		1		
	Sabellidae sp2.		1		
Pectinaridae	Pectinaria belgica		2		
Terebelidae	Terebella lapidaria		1		

Πίνακας 5: Τα αποτελέσματα της επεξεργασίας των αλληλουχιών κατά τα στάδια αφαίρεσης του θορύβου. Εσ: σταθμοί στο εσώτερο τμήμα των λιμνοθαλασσών. Εξ: σταθμοί στο κανάλι επικοινωνίας των λιμνοθαλασσών με τον Αμβρακικό κόλπο. Α, Β, Γ: τα επαναληπτικά δείγματα. α: αριθμός αρχικών αλληλουχιών. β: αριθμός αλληλουχιών μετά από το αρχικό φιλτράρισμα. γ: αριθμός αλληλουχιών μετά από την αφαίρεση των σφαλμάτων αλληλούχισης.δ: αριθμός ομαδοποιημένων αλληλουχιών. στ: αριθμός ομαδοποιημένων αλληλουχιών. στ: αριθμός ομαδοποιημένων αλληλουχιών.

A/A	Δείγμα	α	β	γ	δ	ε	στ
1	Μάζωμα Εσ Α	5980	4653	4136	1696	0	1696
2	Μάζωμα Εσ Β	6102	5427	4364	2110	0	2110
3	Μάζωμα Εσ Γ	6530	5624	4435	1883	36	1847
4	Μάζωμα Εξ Α	4962	3700	3544	2001	61	1940
5	Μάζωμα Εξ Β	6692	5515	4572	2176	0	2176
6	Μάζωμα Εξ Γ	5877	4671	3918	1942	47	1895
7	Λογαφού Εσ Α	4607	3978	3217	1646	0	1646
8	Λογαφού Εσ Β	6497	5480	4672	2254	211	2043
9	Λογαφού Εσ Γ	4862	4055	3530	1884	57	1827
10	Λογαφού Εξ Α	4970	3878	3027	1513	0	1513
11	Λογαφού Εξ Β	6873	5215	4800	2353	141	2212
12	Λογαφού Εξ Γ	6504	5048	4324	2021	0	2021
13	Τσοπέλι Εσ Α	6871	5798	4385	1895	39	1856

14	Τσοπέλι Εσ Β	7159	5797	4612	1742	0	1742
15	Τσοπέλι Εσ Γ	5483	4245	3488	1541	0	1541
16	Τσοπέλι Εξ Α	5477	4238	3610	1606	67	1539
17	Τσοπέλι Εξ Β	7335	5725	5110	2232	181	2051
18	Τσοπέλι Εξ Γ	3460	4451	3760	1607	62	1545
19	Τσουκαλιό Εσ Α	4530	3849	3484	1700	0	1700
20	Τσουκαλιό Εσ Β	5410	4624	4065	2010	0	2010
21	Τσουκαλιό Εσ Γ	4109	3405	3091	1515	0	1515
22	Τσουκαλιό Εξ Α	6024	4974	4469	2128	206	1922
23	Τσουκαλιό Εξ Β	5341	4537	3945	1993	0	1993
24	Τσουκαλιό Εξ. Γ	5724	2861	2428	1172	23	1149
Σύνολο		137379	111748	94986	44620	1131	43489