



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

Μελέτη του ημερήσιου κύκλου των πλαγκτονικών μικροβιακών  
κοινοτήτων σε περιβάλλον υδατοκαλλιεργειών

**Παπαχρήστου Ηλέκτρα  
Ηράκλειο, 2022**

**Εξεταστική επιτροπή**

**Επιβλέπουσα Ερευνήτρια:** Παρασκευή Πήττα (Ερευνήτρια Α, Ελληνικό Κέντρο  
Θαλάσσιων Ερευνών)

Λαδουκάκης Εμμανουήλ (Αναπληρωτής Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα  
Βιολογίας)

Παφίλης Ευάγγελος (Ερευνητής, Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών)

## Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Περιβαλλοντική Βιολογία» του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης στο Εργαστήριο Μικροβιακής Οικολογίας του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. και θα ήθελα να ευχαριστήσω μια σειρά από ανθρώπους που συνέβαλαν σημαντικά στην εκπόνησή της.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Βιβή Πήττα για την επίβλεψή της και τη προθυμία της για βοήθεια όποτε τη χρειαζόμουν. Επίσης, ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Εμμανουήλ Λαδουκάκη και Ευάγγελο Παφίλη για τη συμβολή τους στη βελτίωση του παρόντος κειμένου.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω και στην Αναστασία Τσιώλα για την συνολική και πολύτιμη καθοδήγηση και βοήθεια καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας. Με ανέλαβε από την αρχή και ήταν δίπλα μου σε κάθε βήμα έως το τέλος!!

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τα μέλη του εργαστηρίου Γενετικής του Ι.ΘΑ.Β.Β.ΥΚ. του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. Τον Κωνσταντίνο Τσιγγενόπουλο και Δημήτρη Τσαπάρη που μου επέτρεψαν να χρησιμοποιήσω το συγκεκριμένο εργαστήριο, τον Jon Kristoffersen για την πολύτιμη βοήθειά του στην προετοιμασία των βιβλιοθηκών, την Χριστίνα Παυλούδη για τις συμβουλές της σε διάφορα στάδια των πειραμάτων και τέλος την Ειρήνη Ρολονίνα, η Βάσω Τερζόγλου και την Κατερίνα Οικονομάκη για τη βοήθειά τους στο εργαστήριο!

Ευχαριστώ επίσης τα μέλη του εργαστηρίου lab42open για την παροχή του cluster ώστε να πραγματοποιήσω τις βιοπληροφορικές αναλύσεις και την ομάδα του Ευάγγελου Παφίλη και ιδιαίτερα τον Χαράλαμπο Ζαφειρόπουλο για την υπερπολύτιμη βοήθεια στις βιοπληροφορικές αναλύσεις και την καθοδήγησή του ώστε να μπω στο κλίμα των υπολογιστικών αναλύσεων γενικά!

Για την παροχή των δειγμάτων, ευχαριστώ τα μέλη της δειγματοληπτικής αποστολής από το Ι.Ω. του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. (Παρασκευή Πήττα, Μανώλης Τσαπάκης, Δημήτρης Αποστολάκης, Κική Μυλωνά, Ιουλία Σαντή, Αναστασία Τσιώλα) και την Εταιρεία υδατοκαλλιεργειών Σελόντα.

Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στη μαμά μου, Εύη, που χωρίς την υλική, και όχι μόνο, στήριξή της δε θα είχα τη δυνατότητα για τη συνέχιση των σπουδών μου προς το παρόν, αλλά και την αδελφή μου Νεφέλη και όλους τους φίλους μου για την καθολική στήριξή τους και που απλά υπάρχουν!

## Περίληψη

Το μικροβιακό πλαγκτόν εμφανίζει διακυμάνσεις ως προς τη σύνθεση και την αφθονία του σε ημερήσια κλίμακα. Αυτές οι διακυμάνσεις σχετίζονται κυρίως με την ένταση της ηλιακής ακτινοβολίας αλλά και τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών στοιχείων, και πιθανώς είναι ιδιαίτερα σημαντικές στο περιβάλλον των υδατοκαλλιεργειών όπου καθημερινά προστίθενται μεγάλες ποσότητες τέτοιων στοιχείων. Στην παρούσα εργασία γίνεται για πρώτη φορά μελέτη της ημερήσιας μεταβλητότητας των κύριων μικροβιακών πλαγκτονικών ομάδων (προκαρυώτες, ευκαρυώτες και ιοί) υπό την επίδραση υδατοκαλλιεργητικής δραστηριότητας. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε ανάλυση metabarcoding (μετακωδικοποίηση) σε πολλαπλά δείγματα νερού από περιβάλλον υδατοκαλλιεργειών (Αργολικός κόλπος, Βουρλιάς) που συλλέχθηκαν σε τρεις στιγμές της ημέρας (πρωί, μεσημέρι, βράδυ). Προκειμένου να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων δειγματοληψία έγινε επί τρεις ημέρες στους τρεις σταθμούς: ένας ανεπηρέαστος (control), ένας με έναν κλωβό (one farm) και ένας με πολλούς κλωβούς (multiple farms). Ενισχύθηκαν περιοχές των γονιδίων 16S και 18S rRNA και της περιοχής ITS για την ανίχνευση των βακτηρίων, ευκαρυωτών και μυκήτων αντίστοιχα, και έγινε προσπάθεια ενίσχυσης των ιικών γονιδίων DNA πολυμεράσης, g20, g23 και φωσφατάσης για τους ιούς. Με τα αποτελέσματα μας φαίνεται πως με την αύξηση της υδατοκαλλιεργητικής δραστηριότητας η σύνθεση των κοινοτήτων προκαρυωτών διαφοροποιήθηκε και συγκριμένα, υπήρξαν ευκαιριακά στελέχη που φάνηκε να «αντικαθιστούν» στελέχη που δεν είναι προσαρμοσμένα σε μεγάλες συγκεντρώσεις θρεπτικών κοντά στους κλωβούς. Επιπλέον, βρέθηκε ημερήσια μεταβλητότητα στους προκαρυώτες που είναι προσκολλημένοι σε σωματίδια, κάτι που πιθανά σχετίζεται με την άμεση εξάρτησή τους από σωματιδιακή οργανική ύλη. Το μεσο-ζωπλαγκτόν και οι πικο- και νανο- αυτότροφοι και ετερότροφοι ευκαρυώτες συμπεριλαμβανομένων των μυκήτων επηρεαστήκαν από την υδατοκαλλιέργεια, ενώ και η ημέρα δειγματοληψίας, δηλαδή περιβαλλοντικές παράμετροι που άλλαξαν κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας (π.χ. η κυκλοφορία του νερού, η θερμοκρασία) επηρέασαν τις ευκαρυωτικές κοινότητες. Η ημερήσια μεταβλητότητα παρατηρήθηκε σε ορισμένα ζωπλαγκτονικά φύλα που είναι γνωστά πως κάνουν κάθετη ημερήσια μετανάστευση και έχουν μέγιστη συνεισφορά στα επιφανειακά νερά το βράδυ. Τα μικρά διάτομα βρέθηκαν να συνεισφέρουν λιγότερο στους σταθμούς με υδατοκαλλιέργεια, ενώ τα μικρά δινομαστιγωτά συνεισέφεραν λιγότερο το βράδυ σε όλους τους σταθμούς. Τα αποτελέσματα χρειάζονται περαιτέρω διερεύνηση, ώστε να ανιχνευθούν τυχόν διαφοροποιήσεις σε ειδικότερα ταξινομικά επίπεδα. Σε αυτήν την πρώτη μελέτη των μυκήτων στην Ανατολική Μεσόγειο βρέθηκε ένα μεγάλο ποσοστό αχαρακτήριστων ειδών και μια συσχέτιση με τα ανόργανα και οργανικά θρεπτικά. Τέλος, οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των ιικών γονιδίων πιθανώς δεν ήταν κατάλληλοι για το περιβάλλον που μελετήθηκε.

**Λέξεις Κλειδιά:** προκαρυώτες, ευκαρυώτες, μύκητες, ιοί, ημερήσια μεταβλητότητα, υδατοκαλλιέργειες, DNA μετακωδικοποίηση

## Summary

Microbial plankton exhibits diel fluctuations in composition and abundance. These fluctuations are related to the light cycle as well as the availability of nutrients, and are probably particularly important in the aquaculture environment where large amounts of such nutrients are added daily. In the present work, for the first time, the daily variability of the main microbial planktonic groups is studied (prokaryotes, eukaryotes and viruses) under the influence of aquaculture activity. For this purpose, DNA metabarcoding analysis was performed on multiple water samples from an aquaculture environment (Argolikos Gulf, Vourlias) that were collected at three time points of the day (morning, noon, evening). To test the repeatability of the results, sampling was repeated for three days in each station: a non-impacted site (control), a site with one fish cage (one farm) and a site with many fish cages (multiple farms). Specific regions of the 16S and 18S rRNA genes and the ITS region were amplified for the detection of prokaryotes, eukaryotes and fungi, respectively, and an attempt was made to amplify the DNA polymerase, g20, g23 and phosphatase genes of viruses. Our results show that the increase in aquaculture activity lead to changes in the composition of prokaryotic communities. In particular, there may be opportunistic strains that "replace" strains that are not adapted to high concentrations of nutrients in areas where fish cages exist. In addition, diurnal variability was found in particle-attached prokaryotes, possibly related to their direct dependence on particulate organic matter. Meso-zooplankton and pico- and nano-autotrophic and heterotrophic eukaryotes, including fungi, were affected by aquaculture. Sampling day, i.e. environmental parameters that change from day to day like water circulation and temperature, significantly affected eukaryotic communities too. The diurnal variability was observed in several zooplankton phyla that are known to perform diel vertical migration, having maximum contribution to the surface waters at night. Small diatoms were found to contribute less to aquaculture stations, while small Dinoflagellata contributed less to all stations at night. Results need further investigation in order to detect any other difference at lower taxonomic levels. In this first study of fungal diversity in the Eastern Mediterranean, a large percentage of uncharacterized species was found along with an association with inorganic and organic nutrients. Finally, the primers used to amplify the viral genes may not have been suitable for the studied environment.

**Key words:** prokaryotes, eukaryotes, fungi, viruses, diel variability, aquacultures, DNA metabarcoding

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.1. Εισαγωγή στο μικροβιακό πλαγκτόν	5
1.2. Μέθοδοι μελέτης του μικροβιακού πλαγκτού	8
1.3. Χρονικές διακυμάνσεις των μικροβιακών πλαγκτονικών κοινοτήτων	9
1.3.1. Μεταβλητότητα στους Προκαρυώτες	10
1.3.2. Μεταβλητότητα στους Ευκαρυώτες	13
1.3.3. Μεταβλητότητα στους ιούς	15
1.4. Το περιβάλλον της υδατοκαλλιέργειας	15
1.5. Σκοπός της εργασίας	17
2. Υλικά και Μέθοδοι	18
2. 1. Συλλογή δειγμάτων	18
2.2. Λύση κυττάρων, εκχύλιση και καθαρισμός γενετικού υλικού	21
2.3. Πολλαπλασιασμός γονιδίων μέσω της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)	23
2.4. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR	26
2.5. Ποσοτικοποίηση DNA και προετοιμασία βιβλιοθηκών	26
2.6. Βιοπληροφορική επεξεργασία των προϊόντων αλληλούχησης	27
2.7. Στατιστική επεξεργασία	28
3. Αποτελέσματα	28
3. 1. Προκαρυώτες	28
3.1.1. Ελεύθεροι προκαρυώτες	29
3.1.2. Προκαρυώτες προσκολλημένοι σε σωματίδια	34
3.1.3. Στελέχη SAR11 και <i>Rhodobacteraceae</i>	39
3. 2. Ευκαρυώτες	40
3.2.1. Μεσο-ζωπλαγκτόν	40
3.2.2. Πικο- και Νανο-ευκαρυώτες	43
3.2.3. Μύκητες	45
3.2.4. Μικροευκαρυώτες	48
3.3. Ιοί	48
4. Συζήτηση	48
4.1. Μεταβλητότητα στη σύνθεση των κοινοτήτων των προκαρυωτών	49
4.2. Μεταβλητότητα στη σύνθεση των κοινοτήτων των ευκαρυωτών	53
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	56

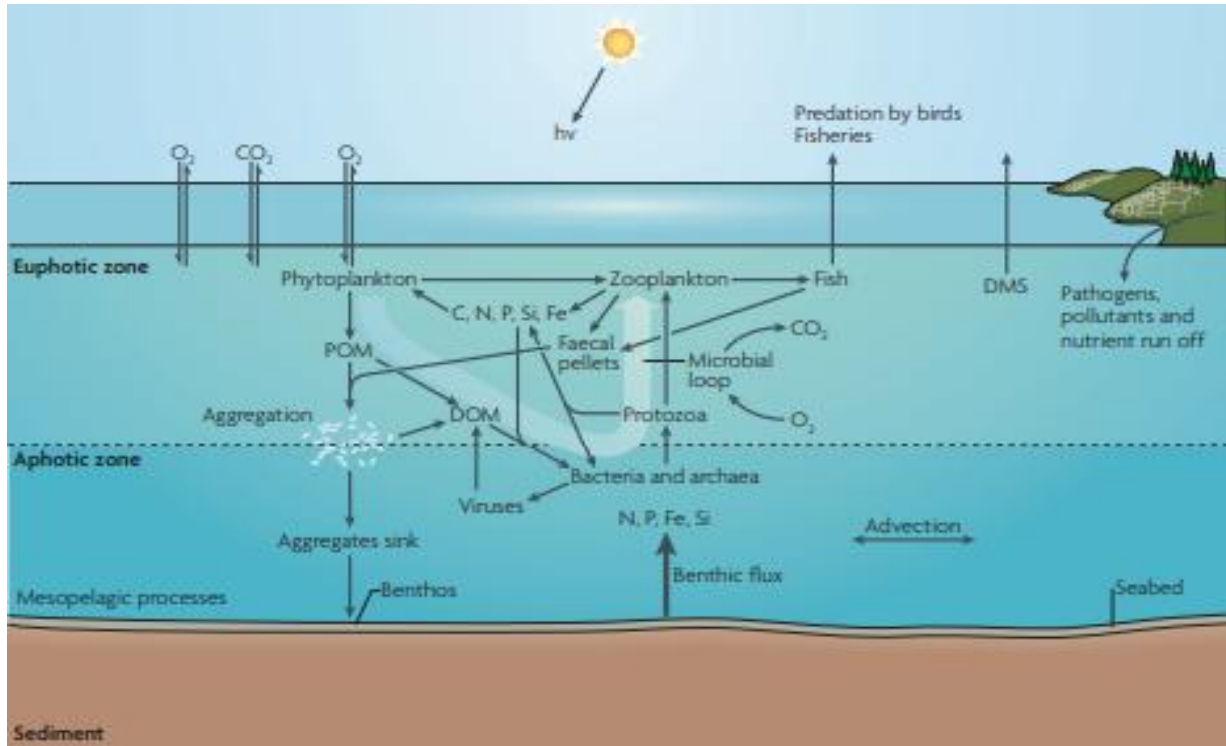
## **1.Εισαγωγή**

### **1.1. Εισαγωγή στο μικροβιακό πλαγκτόν**

Ο όρος πλαγκτόν αναφέρεται σε κάθε οργανισμό που αναπτύσσεται σε υδάτινο οικοσύστημα και μετακινείται παρασυρόμενος με τα ρεύματα, χωρίς να έχει ενεργή δυνατότητα κίνησης. Το πλαγκτόν περιλαμβάνει μικρές οντότητες όπως είναι οι ιοί, μικροοργανισμούς όπως είναι τα Βακτήρια και τα Πρώτιστα αλλά και ανώτερους οργανισμούς όπως είναι οι μέδουσες και τα αυγά των ψαριών (Suthers and Rissik, 2009). Το θαλάσσιο μικροβιακό πλαγκτόν αναφέρεται σε οργανισμούς που είναι πολύ μικροί για να γίνουν αντιληπτοί με ευκρίνεια με το γυμνό μάτι (δηλαδή <0.1 χιλιοστό) και περιλαμβάνει τόσο προκαρυώτες όσο και ευκαρυώτες. Το φάσμα μεγεθών που καλύπτεται με τον όρο «μικροβιακό πλαγκτόν» είναι ευρύ: σύμφωνα με τους Sieburth et al. (1978), αναφερόμαστε σε φεμτο-πλαγκτόν όταν πρόκειται για ιούς (<0.2 μm), σε πικο-πλαγκτόν όταν πρόκειται για μικροοργανισμούς 0.2-2 μm, σε νανο-πλαγκτόν όταν πρόκειται για μικροοργανισμούς 2-20 μm και σε μικρο-πλαγκτόν όταν πρόκειται για μικροοργανισμούς 20-200 μm. Σε όλες αυτές τις τάξεις μεγέθους περιέχονται ιοί, αυτότροφοι και ετερότροφοι προκαρυώτες αλλά και αυτότροφοι, μικτότροφοι και ετερότροφοι ευκαρυώτες. Όλοι αυτοί οι οργανισμοί αλληλεπιδρούν μεταξύ τους αλλά και με το περιβάλλον και παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση των ωκεάνιων και ατμοσφαιρικών βιογεωχημικών κύκλων, για παράδειγμα μέσω της ανοργανοποίησης της οργανικής ύλης από τα βακτήρια και μέσω της απελευθέρωσης οξυγόνου στην ατμόσφαιρα από τους φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς. Επίσης, το μικροβιακό πλαγκτόν τροφοδοτεί τα ανώτερα τροφικά επίπεδα έως τα ψάρια και τα κητώδη, και παίζει βασικό ρόλο στη ρύθμιση του κλίματος, για παράδειγμα μέσω της παραγωγής αερίων του θερμοκηπίου (Azam and Malfatti, 2007; Fenchel, 2008; Guinder et al., 2020).

Οι αλληλεπιδράσεις των πλαγκτονικών κοινοτήτων μεταξύ τους και με το περιβάλλον φαίνονται σχηματικά στην Εικόνα 1.1. Όπως φαίνεται στην εικόνα, σημαντικό ρόλο στο θαλάσσιο περιβάλλον παίζουν τα ετερότροφα Βακτήρια και Αρχαία τα οποία είναι οι μόνοι οργανισμοί που έχουν πρόσβαση στην σωματιδιακή οργανική ύλη (>0.45 μm), που έχει παραγάγει το φυτοπλαγκτόν, καθώς επίσης και στα απεκκρίματα των ψαριών και του ζωπλαγκτού. Με αυτόν τον τρόπο, τα Βακτήρια και Αρχαία έχουν την ικανότητα να ανακυκλώνουν την οργανική ύλη και να την μετατρέπουν σε μορφές που είναι διαθέσιμες εκ νέου από άλλους μικροοργανισμούς. Λόγω αυτής της ανακύκλωσης, η δράση των Βακτηρίων και Αρχαίων στο θαλάσσιο τροφικό πλέγμα έχει ονομαστεί «μικροβιακός βρόχος» (Azam et al., 1983; Azam and Malfatti, 2007; Pomeroy, 2007). Η μεταφορά βιομάζας και ενέργειας σε ανώτερα τροφικά επίπεδα ελέγχεται στη συνέχεια από την θήρευση των Βακτηρίων και Αρχαίων από Πρώτιστα και την μετέπειτα θήρευση των Πρωτίστων από το ζωπλαγκτόν. Όπως φαίνεται στο αριστερό μέρος της εικόνας, σε περίπτωση που η σωματιδιακή οργανική ύλη δεν υδρολυθεί από μικροοργανισμούς είναι πιθανόν να διαφύγει/απομακρυνθεί σε βαθύτερα στρώματα (μεσοπελαγική και βαθυπελαγική ζώνη) και να καταλήξει στον πυθμένα των θαλασσών. Η απομάκρυνση της οργανικής ύλης (εκτός από ρεύματα και δυνάμεις ανάμειξης) εμπεριέχει επίσης την δράση μικροοργανισμών καθώς πολλοί

από αυτούς προσκολλώνται στην ύλη δίνοντάς της μια πιο κολλώδη και πιο βαριά μορφή που καθιζάνει ευκολότερα προς τον πυθμένα. Αυτή η διαδικασία περιγράφεται και λίγο παρακάτω.



**Εικόνα 1.1.** Οι αλληλεπιδράσεις των πλαγκτονικών κοινοτήτων μεταξύ τους και με το περιβάλλον (από Azam and Malfatti, 2007).

Σημαντικές οικολογικές πληροφορίες απορρέουν από το μέγεθος των κυττάρων του πλαγκτού (Peters, 1983) που σχετίζονται με τη δράση των μικροοργανισμών όπως περιγράφηκε εν συντομία παραπάνω. Για παράδειγμα, η κατάσταση του οικοσυστήματος, οι σχέσεις ανάμεσα σε θηρευτές και θηράματα και η απόδοση της απομάκρυνσης άνθρακα στη μεσοπελαγική και βαθυπελαγική ζώνη σχετίζονται με τα μεγέθη των κυττάρων. Έτσι, πολύ συχνά το μέγεθος του πλαγκτού χρησιμοποιείται ως ένα πρώτο βήμα στην ταξινόμηση και μελέτη των μικροοργανισμών.

Το πλαγκτόν περιλαμβάνει τις εξής τάξεις μεγέθους: 1) το μεσο-πλαγκτόν (0,2–20 mm) που περιλαμβάνει κυρίως Κωπήποδα, Κλαδοκεραιωτά και προνύμφες πολλών βενθικών οργανισμών, 2) το μικρο-πλαγκτόν (20–200 μm) που περιλαμβάνει από την μια πλευρά το λεγόμενο «μεγάλο» φυτοπλαγκτόν δηλαδή Διάτομα (είτε σε μεμονωμένα κύτταρα είτε ως αλυσίδες), Δινομαστιγωτά και Βλεφαριδωτά με ικανότητα φωτοσύνθεσης, Τρηματοφόρα και Ακτινόζωα και από την άλλη πλευρά ετερότροφους μικροοργανισμούς όπως Δινομαστιγωτά και Βλεφαριδωτά, 3) το νανο-πλαγκτόν (2–20 μm) που επίσης περιλαμβάνει αυτότροφα και ετερότροφα κύτταρα (κυρίως Διάτομα, Μαστιγωτά, μικρά Βλεφαριδωτά και Κοκκολιθοφόρα και Μύκητες), 4) το πικο-πλαγκτόν

(0,2–2 μm) που περιλαμβάνει ως επί το πλείστον Βακτήρια και Αρχαία και λίγα Μαστιγωτά, και τέλος 4) το φεμτο-πλαγκτόν (<0,2 μm) που περιλαμβάνει τους θαλάσσιους ιούς. Όπως γίνεται αντιληπτό, οι κατηγορίες μεγεθών που αναφέρθηκαν παραπάνω δεν αντικατοπτρίζουν συγκεκριμένες ταξινομικές ομάδες ούτε φυλογενετικά ούτε μεταβολικά. Πράγματι, για παράδειγμα το μικρο-πλαγκτόν μπορεί να περιλαμβάνει αυτότροφα κύτταρα, ετερότροφα και μικτότροφα, ενώ το πικο-πλαγκτόν μπορεί να περιλαμβάνει προκαρυώτες και ευκαρυώτες και σπανιότερα ακόμα και μερικούς μεγάλους ιούς. Επίσης, είναι γνωστό πως διάφορα φυτοπλαγκτονικά κύτταρα μπορεί να διατηρούν εκατοντάδες άλλα μικρότερα κύτταρα «κολλημένα» πάνω τους. Η στενή αυτή σχέση μπορεί να είναι συμβιωτική (Suthers and Rissik, 2009), (όπως για παράδειγμα η σχέση ανάμεσα σε αζωτοδεσμευτικά κυανοβακτήρια και κοκκολιθοφόρα (Not et al., 2016), παρασιτική (όπως για παράδειγμα ανάμεσα σε μύκητες και άλλα ευκαρυωτικά στελέχη) ή ακόμα και σχέση συσσιτισμού όπου το πρόσημο της σύνδεσης των δύο κυττάρων είναι ουδέτερο (ούτε ευνοεί ούτε δυσχεραίνει την ανάπτυξη κάποιου από τα δυο). Η στενή σχέση μπορεί επίσης να υποδηλώνει ανάπτυξη των μικρότερων κυττάρων επάνω στο μεγαλύτερο κύτταρο που λειτουργεί σαν μια ευνοϊκή επιφάνεια ανάπτυξης. Το συσσωμάτωμα που δημιουργείται από τους προσκολλημένους μικρούς και μεγάλους μικροοργανισμούς (είτε ενεργούς είτε ανενεργούς) και τα απεκκρίματα τους συχνά αναφέρεται ως «marine snow» ή το «χιόνι της θάλασσας».

Τέτοια συσσωματώματα αλλά και οι προηγούμενες περιπτώσεις (συμβίωση, παρασιτισμός) αποδεικνύουν την ανάγκη μελέτης όλων των ταξινομικών ομάδων σε όλες τις τάξεις μεγέθους. Για να γίνει αυτή η ανάγκη αντιληπτή αξίζει να αναφερθεί το εξής αξιοσημείωτο: ένα τεράστιο ποσοστό Βακτηρίων βρίσκεται προσκολλημένο σε άλλους οργανισμούς και συσσωματώματα (Lopez-Perez et al., 2016), συνεπώς δεν αρκεί η μελέτη τους μόνο στο πικο-πλαγκτονικό εύρος μεγέθους.

Η λειτουργία των θαλάσσιων πλαγκτονικών μυκήτων στα θαλάσσια οικοσυστήματα αναγνωρίστηκε πρόσφατα (Gao et al., 2010; Wang et al., 2014; Taylor και Cunliffe, 2016) και έτσι οι μύκητες θεωρούνται σε μεγάλο βαθμό υπομελετημένοι (Wang et al., 2018). Σε κάθε περίπτωση είναι γνωστό πως οι μύκητες αποδομούν την οργανική ύλη που έχει παραχθεί από το φυτοπλαγκτόν ή ύλη που βρίσκεται σε αποσύνθεση (σαπροφαγία) ενώ επίσης απορροφούν τον διαλυμένο οργανικό άνθρακα με αξιοσημείωτη συμβολή στη δευτερογενή παραγωγή στα παράκτια θαλάσσια οικοσυστήματα (Gao et al., 2010; Gutiérrez et al., 2011). Ωστόσο, αυτοί οι οικολογικοί ρόλοι προτείνονται κυρίως με βάση τη σύγκριση με τους ομολόγους τους στα χερσαία και γλυκά υδάτινα οικοσυστήματα (Richards et al., 2012; Taylor και Cunliffe, 2016).

Σήμερα υπάρχουν μελέτες γύρω από την εποχιακή και άλλη χρονική μεταβλητότητα των μυκήτων σε μερικά θαλάσσια συστήματα, κυρίως στην παράκτια ζώνη (τόσο σε ιζήματα όσο και στη στήλη του νερού). Η ανάπτυξή τους στο νερό θεωρείται πιθανά περιορισμένη λόγω της ανάγκης τους για υψηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών και για προσκόλληση στο υπόστρωμα. Και οι μύκητες, όπως και τα βακτήρια που είναι προσκολλημένα σε σωματίδια είναι ένα τυπικό



παράδειγμα ανάγκης μελέτης αυτών των οργανισμών σε όλα τα εύρη μεγέθους, καθώς συνηθίζουν να παρασιτούν/συμβιώνουν με μεγαλύτερους ή μικρότερους οργανισμούς.

## **1.2. Μέθοδοι μελέτης του μικροβιακού πλαγκτού**

Η επιλογή της μεθόδου σε μια μελέτη του μικροβιακού πλαγκτού εξαρτάται κατά βάση από το επιστημονικό ερώτημα, όμως και η χρονική περίοδος (ιστορικά) που τέθηκε και απαντήθηκε αυτό το ερώτημα έχουν καθορίσει την μέθοδο. Έτσι λοιπόν, οι επιλογές έχουν κυμανθεί από παρατηρήσεις με μικροσκόπιο σε μεμονωμένα δείγματα έως έρευνες μεγάλης κλίμακας, χρησιμοποιώντας συνεχείς καταγραφείς πλαγκτού και ποσοτική δορυφορική τηλεπισκόπηση. Στις μέρες μας παρατηρείται μια προσπάθεια να μελετηθεί το πλαγκτόν σε λειτουργικές ομάδες (π.χ. φυτοπλαγκτόν, παράσιτα, φωτοετερότροφα βακτήρια), που όμως προϋποθέτει τον εντοπισμό και διαχωρισμό αυτών των ομάδων από το σύνολο του πλαγκτού (που συνοδεύεται από τις δυσκολίες που αναφέρθηκαν πιο πάνω σχετικά με τα μεγέθη). Μια επιπλέον αλλαγή της σύγχρονης εποχής σε σχέση με τα προηγούμενα περίπου 25 χρόνια είναι η ανάγκη μελέτης του μικροβιακού πλαγκτού στο κατά το δυνατόν πιο εξειδικευμένο ταξινομικό επίπεδο με χρήση μοριακών τεχνικών.

Γενικότερα, η χρήση της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, της μικροσκοπίας φθορισμού και της κυτταρομετρίας ροής έχουν οδηγήσει στην ανακάλυψη και περαιτέρω διερεύνηση των μικρότερων κυττάρων και των ιών. Επιπλέον, οι μοριακές τεχνικές επιτρέπουν πλέον την μελέτη της σύνθεσης των κοινοτήτων ακόμη και κάτω από το επίπεδο του είδους (Bratbak et al., 2011).

Επιπλέον στην περίπτωση της ημερήσιας μεταβλητότητας, αυτή έχει μελετηθεί τόσο με κλασσικές μεθόδους, όπως είναι για παράδειγμα το μικροσκόπιο για μετρήσεις αφθονίας και τα πειράματα κινητικής για μετρήσεις παραγωγικότητας (για παράδειγμα: Ghiglione et al., 2007; Bratbak et al., 2011), αλλά και με μοριακά εργαλεία, όπως είναι η ανάλυση του μεταγονιδιώματος και του μεταγραφώματος (για παράδειγμα: Aylward et al., 2015; De Corte et al., 2018, ; Becker et al., 2020 π.χ.).

Τρέχουσες μελέτες DNA μετακωδικοποίησης που στοχεύουν στον χαρακτηρισμό των μικροβιακών κοινοτήτων βασίζονται στην ενίσχυση και τον προσδιορισμό της αλληλουχίας σχετικά μικρών περιοχών του γονιδιώματος, οι οποίες βρίσκονται σε όλους τους οργανισμούς που μελετώνται και έχουν επαρκή ανάγνωση αλληλουχίας. Επιπλέον περιλαμβάνουν συντηρημένες περιοχές (με βραδύ ρυθμό αλλαγής) Όσον αφορά τους προκαρυώτες, από τα τέλη της δεκαετίας του 1980 χρησιμοποιούνται βιβλιοθήκες κλώνων ενισχυμένων με PCR που στοχεύουν τα γονίδια 16S rRNA της μικρής υπομονάδας (SSU) - χωρίς τη μεσολάβηση καλλιέργειας. Η αλληλούχιση αυτών των γονιδίων έχει χρησιμεύσει στη μελέτη της ποικιλομορφίας και σύνθεσης φυσικών κοινοτήτων Βακτηρίων και Αρχαίων και στην αποσαφήνιση οικολογικών προτύπων χωρικής και χρονικής ποικιλότητας (για παράδειγμα: Koid et al., 2012; Banerji et al., 2018). Για την ταξινομική ταυτοποίηση των ευκαρυωτών, το γονίδιο της μικρής υπομονάδας 18S rRNA (18S) είναι από τους

πιο συχνά χρησιμοποιούμενους δείκτες, μαζί με το μιτοχονδριακό γονίδιο της υπομονάδας 1 της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI) (για παράδειγμα: Banerji et al., 2018; Gong and Marchetti, 2019; Loos and Nijland, 2020). Για την ταυτοποίηση των μυκήτων ιδιαίτερα, η περιοχή ITS στο οπερόνιο του ριβοσωμικού RNA (rRNA), που περιλαμβάνει τις ITS1, 5.8S και ITS2 περιοχές, έχει γίνει αποδεκτή ως ο επίσημος γραμμοκώδικας (barcode) μυκήτων (για παράδειγμα: Blaaliid et al., 2013; Vangronsveld and Colpaert, 2014; Heeger et al., 2018). Ωστόσο, οι πλαγκτονικές κοινότητες των μυκήτων μπορούν να ανακτηθούν και με τη χρήση του γονιδίου της μικρής υπομονάδας 18S rRNA (Wang et al., 2018; 2019) με πιθανά διαφορετικά αποτελέσματα στην ταξινομική ευκρίνεια.

Η ποικιλότητα και μεταβλητότητα των ικών κοινοτήτων σε φυσικά περιβάλλοντα δεν είναι τόσο καλά μελετημένη. Αυτό οφείλεται εν μέρει στην έλλειψη καθολικών φυλογενετικών δεικτών για ιούς καθώς και στη σχετικά πρόσφατη ανάπτυξη μεθόδων ανεξάρτητων από καλλιέργεια για τη διερεύνηση της ικής ποικιλομορφίας στο περιβάλλον (Aylward et al., 2017). Παρά τη γενική έλλειψη καθολικών δεικτών, ορισμένα γονίδια φαίνεται να διατηρούνται μεταξύ συγκεκριμένων ομάδων. Τέτοια γονίδια είναι αυτό της DNA πολυμεράσης (*DNA pol*) σε ιούς που μοιάζουν με T7, δομικά γονίδια όπως τα *g20* και *g23* σε κυανομοιο-ιούς, και γονίδια που σχετίζονται με την φωτοσύνθεση (π.χ. *psbA*) σε κυανο-ιούς (Chen et al., 2009; Hou et al., 2018).

### **1.3. Χρονικές διακυμάνσεις των μικροβιακών πλαγκτονικών κοινοτήτων**

Η θαλάσσια μικροβιακή ποικιλότητα αποτελεί σημαντικό παράγοντα εκτίμησης των υδρολογικών και κλιματικών συνθηκών σε ποικίλα περιβάλλοντα, τα οποία μπορεί να διαφοροποιούνται τόσο σε χρονική όσο και σε χωρική κλίμακα. Η χρησιμότητα της ως δείκτης ευθύνεται στο ότι οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί έχουν μικρό μέγεθος, μικρό κύκλο ζωής και στο ότι μεταφέρονται στη στήλη του νερού παθητικά. Συγκεκριμένα οι πλαγκτονικές μικροβιακές κοινότητες καθορίζουν την ροή άνθρακα και ενέργειας προς το βενθικό σύστημα, και άρα η γνώση της σύνθεσης και λειτουργίας τους είναι μεγάλης σημασίας για την λειτουργία των ωκεανών γενικότερα. Παρά τη δεδομένη σημασία τους όμως, η δυναμική των πλαγκτονικών μικροβιακών κοινοτήτων έχει μελετηθεί σε μέτριο βαθμό συνυπολογίζοντας έναν σημαντικό παράγοντα: την διαρκή μεταβλητότητα τους. Πράγματι, διάφορα οικολογικά χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών μεταβάλλονται, όπως για παράδειγμα οι απαιτήσεις τους σε πόρους, ο τρόπος παραγωγής ενέργειας, το μέγεθος, η μορφολογία τους ακόμα και η κινητικότητα τους ή η παραγωγή τοξινών (Guinder et al., 2020). Συνολικά λοιπόν, η σύνθεση, η αφθονία, η παραγωγικότητα και άλλα βιολογικά χαρακτηριστικά των μικροβιακών πλαγκτονικών κοινοτήτων μεταβάλλονται με τον χώρο, αλλά και τον χρόνο.

Όσον αφορά τις χρονικές διακυμάνσεις, αυτές μπορεί να είναι εποχιακές και ημερήσιες, όμως έχουν εντοπιστεί και σε μικρότερη χρονική κλίμακα, όπως κατά τη διάρκεια μιας ημέρας κάτι που φαίνεται να σχετίζεται με το ότι αποκρίνονται γρήγορα σε περιβαλλοντικές μεταβολές. Τα ημερήσια μοτίβα καθοδηγούνται κυρίως από τον ημερήσιο κύκλο φωτός, αλλά και από τη

διαθεσιμότητα των θρεπτικών. Σήμερα γνωρίζουμε πως δεν υπάρχουν καθολικά ημερήσια μοτίβα για όλους τους μικροοργανισμούς σε όλα τα περιβάλλοντα. Από τις πιο σημαντικές παραμέτρους που καθορίζουν τα μοτίβα πάντως είναι η συγκέντρωση της χλωροφύλλης, η θερμοκρασία, η ένταση και το μήκος κύματος της ηλιακής ακτινοβολίας, η διάρκεια της ημέρας αλλά και η παρουσία άλλων οργανισμών (κυρίως θηραμάτων, θηρευτών, ιών).

Στην ημερήσια κλίμακα, το βασικότερο στοιχείο που μεταβάλλεται είναι η ένταση της ακτινοβολίας που με τη σειρά της προκαλεί μεταβολές στον μεταβολισμό των κυττάρων, την έκφραση γονιδίων, την περιεκτικότητα σε φωτοσυνθετικές χρωστικές (Becker et al., 2020) και ακόμα και την απορρόφηση στοιχείων (π.χ. μέταλλα και άλλα θρεπτικά). Παρόμοιες μεταβολές δεν συμβαίνουν μόνο στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς. Για παράδειγμα, στις βασικότερες και πιο μελετημένες μεταβολές κατά τον ημερήσιο κύκλο φωτός συγκαταλέγεται η λεγόμενη «ημερήσια κάθετη μετανάστευση του μεσο-ζωπλαγκτού» (ή DVM: diel vertical migration) με σημαντικές επιπτώσεις στην ροή των θρεπτικών (N, P, Fe και άλλων, Davis et al., 2019). Επιπλέον, και το μικρο-πλαγκτόν (βασικό θήραμα για το μεσο-ζωπλαγκτόν) ακολουθεί ημερήσια μεταβλητότητα (Arias et al., 2020), ενώ είναι χαρακτηριστικό το εύρημα των Ghiglione et al. (2007) για την έντονη ημερήσια μεταβλητότητα στα βακτήρια που είναι προσκολλημένα σε σωματίδια με σημαντική αύξηση παραγωγής τη νύχτα (σε αντίθεση με τα ελεύθερα βακτήρια), σύγχρονη με μεταβλητότητα της ποικιλότητάς τους.

Μια καλή κατανόηση της ημερήσιας μεταβλητότητας του μικροβιακού πλαγκτού (είτε πρόκειται για άμεσες επιδράσεις του φωτός στην πρωτογενή παραγωγικότητα είτε για έμμεσες επιδράσεις στην κυτταρική φυσιολογία) είναι προαπαιτούμενο για την κατανόηση της μεταβλητότητας που παρατηρείται σε μεγαλύτερη κλίμακα: δηλαδή, μοτίβων σε εποχιακή και ετήσια κλίμακα (Binder and DuRand, 2002). Καθώς η βιβλιογραφία παρουσιάζει μεγάλη ποικιλία στους μικροοργανισμούς υπό μελέτη, το οικολογικό χαρακτηριστικό υπό μελέτη (π.χ. αφθονία, παραγωγικότητα, μεταβολισμός κ.τ.λ.) αλλά και τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν, η ανάπτυξη των βιβλιογραφικών δεδομένων θα γίνει παρακάτω σε υπο-κεφάλαια.

### **1.3.1. Μεταβλητότητα στους Προκαρυώτες**

Η συνολική ημερήσια μικροβιακή μεταβλητότητα θεωρείται πως καθοδηγείται κατά κύριο λόγο από τα μικρότερα πλαγκτονικά κύτταρα, ακριβώς γιατί αυτά τα κύτταρα (δηλαδή τα ετερότροφα και αυτότροφα βακτήρια) έχουν τεράστια αφθονία και βιομάζα (Binder and DuRand, 2002). Οι ίδιοι επιστήμονες παρατήρησαν πως η αφθονία των αυτότροφων και ετερότροφων βακτηρίων (μαζί με την αφθονία των <3 μm αυτότροφων πικο-ευκαρυωτικών κυττάρων) είχε την υψηλότερη τιμή στο δεύτερο μισό της ημέρας και κατά τη νύχτα. Σε μια συγκριτική ανασκόπηση για την ημερήσια μεταβλητότητα των κυανοβακτηρίων *Synechococcus* και *Prochlorococcus*, οι Binder and DuRand (2002) παρατήρησαν πως το πρώτο γένος έφτασε την υψηλότερη αφθονία πριν το δεύτερο και αυτό συνέβαινε το απόγευμα ή τη νύχτα σε νερά του Ειρηνικού Ωκεανού. Παρομοίως, στην παλαιότερη εργασία των Vaultot and Marie (1999), βρέθηκε πως κύτταρα *Synechococcus*

διαιρούνταν περίπου δύο ώρες πριν από τα κύτταρα *Prochlorococcus*. Επίσης, από την μελέτη των Tsai et al. (2005) προέκυψε πως μόνο για το γένος *Synechococcus*, με την αφθονία του να φτάνει μέγιστες τιμές τη νύχτα. Και το γένος *Prochlorococcus* φάνηκε να ακολουθεί ημερήσιο μοτίβο πρόσληψης του αμινοξέος μεθειονίνη και σε καλλιέργειες, με την μέγιστη απορρόφηση τη νύχτα που ακολουθούνταν από γρήγορη πρωτεϊνοσύνθεση και κυτταρική διαίρεση (Mary et al., 2008).

Οι δύο τελευταίες έρευνες (Tsai et al., 2005; Mary et al., 2008) σχολίασαν το γεγονός πως η διαφορετική πρόσληψη των θρεπτικών στον ημερήσιο κύκλο οδηγούσε σε ανταγωνισμό ανάμεσα στα στελέχη των κυανοβακτηρίων. Σε μια άλλη μελέτη για τον ανταγωνισμό των βακτηρίων για περιοριστικά θρεπτικά κατά τον ημερήσιο κύκλο φάνηκε πως το σύνολο των βακτηρίων παρουσιάζει μέγιστη κυτταρική διαίρεση το βράδυ και επακόλουθη μέγιστη αφθονία το πρωί χωρίς να υπάρχει περιορισμός από το διαθέσιμο άζωτο και φώσφορο. Αντιθέτως, το μεσημέρι ο περιορισμός φάνηκε να είναι και από τα δύο θρεπτικά πιθανόν λόγω ανταγωνισμού με το φυτοπλαγκτόν (Kuipers et al. 2000). Στην Βόρεια θάλασσα, οι Bratbak et al. (2011) περιέγραψαν δύο χρονικές στιγμές κατά το εικοσιτετράωρο όπου οι αφθονίες των βακτηρίων (και των ιών και των πικοπλαγκτονικών κυττάρων) ήταν μέγιστες: το μεσημέρι και αργά τη νύχτα, γεγονός που υποδεικνύει πως η ημερήσια μεταβλητότητα των μικροβιακών ομάδων δεν ρυθμίζεται μόνο από την ηλιακή ακτινοβολία, αλλά και από την θήρευση, την ιική αποδόμηση και την φωτοπαρεμπόδιση.

Σε πιο πρόσφατες μελέτες που βασίστηκαν σε μεταγονιδιωματική και μεταμεταγραφωματική προσέγγιση φάνηκε πως η βακτηριακή κοινότητα είχε υψηλότερη ποικιλότητα την νύχτα (Gilbert et al., 2010). Πράγματι, τόσο η ποικιλότητα της κοινότητας (όπως αυτή εκτιμήθηκε από την αλληλούχηση του 16S rRNA) όσο και η λειτουργική ποικιλότητα (όπως αυτή εκτιμήθηκε από την αλληλούχηση του μεταγραφώματος) ήταν υψηλότερη τη νύχτα, με το μοτίβο να επαναλαμβάνεται σε διάφορες εποχές. Σε αυτήν την μελέτη αξίζει να σημειωθεί πως το αποτέλεσμα προέκυψε από δείγματα που ελήφθησαν μόνο το πρωί και το βράδυ στο κανάλι της Μάγχης (Gilbert et al., 2010) οπότε δεν υπάρχει πληροφορία για τις υπόλοιπες ώρες της ημέρας. Παρόμοιο αποτέλεσμα περιγράφεται και στην εργασία των Ghiglione et al. (2007) όπου η ομάδα των βακτηρίων που είναι προσκολλημένη σε σωματίδια ήταν πιο ενεργή τη νύχτα – παρότι λιγότερο άφθονη και λιγότερο ποικιλόμορφη – συγκεκριμένα κάτω από μεσοτροφικές συνθήκες. Το αποτέλεσμα αυτό είναι από τα λίγα που αφορούν την Μεσόγειο θάλασσα (βορειοδυτικά, σταθμός DYFAMED), καθώς οι περισσότερες αντίστοιχες εργασίες έχουν γίνει στον Ειρηνικό Ωκεανό. Κάτω από ολιγοτροφικές συνθήκες (Ιούνιος μήνας), το ημερήσιο μοτίβο ήταν λιγότερο ισχυρό, και μόνο σε μεγαλύτερο βάθος παρατηρήθηκε αυξημένη συνεισφορά των βακτηρίων προσκολλημένων σε σωματίδια στην συνολική βακτηριακή παραγωγικότητα την ημέρα.

Σε μια άλλη μελέτη στην βορειοδυτική Μεσόγειο (Blanes Bay Microbial Observatory) βρέθηκε μέγιστη βακτηριακή αφθονία, παραγωγικότητα και ποσοστό ενεργών κυττάρων τη νύχτα (Ruiz-Gonzalez et al., 2012). Σε αυτήν την περίπτωση η δειγματοληψία έγινε Φεβρουάριο-Μάρτιο. Αυτή η ενδιαφέρουσα μελέτη τόνισε εκτός των άλλων την σημασία των καιρικών φαινομένων στην παρατήρηση των ημερήσιων μοτίβων καθώς έντονα καιρικά φαινόμενα ανάμεσα στις

δειγματοληψίες εμπόδισαν την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Πιο συγκεκριμένα, οι Ruiz-Gonzalez et al. (2012) παρουσίασαν μια αύξηση στην ενεργότητα των στελεχών *Pelagibacter* και *Roseobacter* και των *Gammaproteobacteria* την νύχτα, ενώ και το στέλεχος *Synechococcus* ενεργοποίησε την ετερότροφη δράση του τη νύχτα. Στο σύνολο των βακτηρίων, βρέθηκε πως η συνεισφορά των *Alphaproteobacteria* *Roseobacter* και *Pelagibacter* ήταν χαμηλότερη το μεσημέρι, ενώ των *Gammaproteobacteria* και *Bacteroidetes* ήταν υψηλότερη το μεσημέρι.

Η ημερήσια μεταβλητότητα έχει μελετηθεί και σε πιο σπάνιες βακτηριακές ομάδες, όπως είναι τα φωτοετερότροφα βακτήρια. Τα εν λόγω βακτήρια χρησιμοποιούν την ηλιακή ακτινοβολία μέσω της βακτηριοχλωροφύλλης για να διασπάσουν οργανικές ενώσεις. Σε μια εργασία βρέθηκε πως η συγκέντρωση της βακτηριοχλωροφύλλης ήταν υψηλότερη τις ώρες της ημέρας που δεν είχε φως, καθώς διαπιστώθηκε σε πειράματα πως η σύνθεση της χρωστικής αυτής παρεμποδίζεται από το φως (Koblizek et al., 2005).

Σε γενικές γραμμές έχουν παρατηρηθεί διάφορα ημερήσια μοτίβα σε διαφορετικές περιοχές αλλά και σε διαφορετικά βάθη, καθώς η αλλαγή στις συνθήκες φωτός επηρεάζει το μικροβιακό πλαγκτόν. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η πρόσφατη εργασία των Vilsova et al. (2018) που ανέλυσαν το συνολικό μικροβιακό μεταμεταγράψωμα ανά τετράωρο σε διαφορετικά βάθη σε μια περιοχή του ολιγοτροφικού Ειρηνικού Ωκεανού. Οι συγγραφείς βρήκαν πως στα υπο-επιφανειακά νερά (κάτω από τα 25 μέτρα) η ημερήσια μεταβλητότητα στο μεταγράψωμα των πιο διαδεδομένων ετερότροφων Βακτηρίων και Αρχαίων ήταν ανύπαρκτη. Αντιθέτως, στα επιφανειακά νερά κάποια στελέχη παρουσίασαν ημερήσια μοτίβα ενώ άλλα όχι. Για παράδειγμα, μεταγραφώματα του στελέχους *Pelagibacter* (SAR11) που κωδικοποιούν πρωτεΐνες για τον διπλασιασμό των κυττάρων παρουσίασαν μέγιστη αφθονία τη νύχτα, ενώ μεταγραφώματα του στελέχους SAR116 που κωδικοποιούν πρωτεΐνες για την αναπνοή και τον μεταβολισμό του αζώτου παρουσίασαν μέγιστες αφθονίες το πρωί.

Από μια άλλη οπτική, η ημερήσια μεταβλητότητα των βακτηρίων σχετίζεται με την ποιότητα και την ποσότητα του διαθέσιμου οργανικού υλικού (DOM: dissolved organic matter). Τα βακτήρια είναι ικανά να προσλάβουν το DOM που μπορεί να προέρχεται είτε από την φωτοσύνθεση είτε από την θήρευση. Συνεπώς, αν σε ένα περιβάλλον τα βακτήρια έχουν στενή σχέση με το DOM του φυτοπλαγκτού, τότε αναμένεται να ακολουθούν έναν κύκλο παραγωγικότητας με μέγιστες τιμές το μεσημέρι και απόγευμα. Αντιθέτως, αν στο περιβάλλον τα βακτήρια έχουν στενή σχέση με το DOM της θήρευσης ή το DOM άλλων (εξωγενών) πηγών οργανικής ύλης, τότε αναμένεται να ακολουθούν έναν κύκλο παραγωγικότητας που σχετίζεται με αυτές τις πηγές (Ruiz Gonzalez et al., 2012). Ειδικότερα στα ολιγοτροφικά περιβάλλοντα, αυτή η σχέση ανάμεσα στην παραγωγικότητα των βακτηρίων και την διαθεσιμότητα/προέλευση του DOM είναι πιο έντονη, καθώς οι πηγές των θρεπτικών είναι χαμηλές. Σε ευτροφικά ή παράκτια συστήματα συχνά η ημερήσια μεταβλητότητα που καθοδηγείται από το DOM μπορεί και να μην είναι ορατή (Gasol et al., 1998).

Τα βακτήρια επιδεικνύουν επίσης εποχιακά μοτίβα στην ποικιλοτήτά τους με συχνά μεγαλύτερη ποικιλοότητα κατά τη διάρκεια του χειμώνα από ότι το καλοκαίρι σε πελαγικά οικοσυστήματα (Gilbert et al., 2010). Αξίζει να σημειωθεί πως οι συγγραφείς της τελευταίας εργασίας τόνισαν πως συνήθως ο περιβαλλοντικός παράγοντας που επηρεάζει την εποχιακή μεταβλητότητα είναι η διάρκεια της ημέρας, ενώ επιπλέον παράγοντες που παίζουν ρόλο είναι η θερμοκρασία και τα θρεπτικά συστατικά.

### 1.3.2. Μεταβλητότητα στους Ευκαρυώτες

Πρόσφατες μελέτες με χρήση σύγχρονων μεθόδων υψηλής ακρίβειας (π.χ. μετα-μεταγραφωματική ανάλυση) επιβεβαίωσαν πως το φως του ήλιου ρυθμίζει την ανάπτυξη και τις κυτταρικές λειτουργίες όλων των φωτοσυνθετικών οργανισμών στους ωκεανούς (Becker et al., 2020, Coesel et al., 2020).

Ξεκινώντας με την μεγάλη ομάδα του φυτοπλαγκτού, έχει βρεθεί πως πολλές φυτοπλαγκτονικές διεργασίες επηρεάζονται από τον ημερήσιο κύκλο φωτός: η φωτοσυνθετική δραστηριότητα, η δέσμευση του αζώτου, η κυτταρική διαίρεση, η πρόσληψη αμινοξέων και η γονιδιακή έκφραση. Είναι γνωστό πως η μέγιστη ένταση ακτινοβολίας - που λαμβάνει χώρα συνήθως νωρίς το μεσημέρι - μειώνει ή παρεμποδίζει την φωτοσυνθετική δραστηριότητα, μέσω ενεργοποίησης ενός φωτο-προστατευτικού μηχανισμού (Brunet et al., 2008). Αυτός ο μηχανισμός έχει μελετηθεί εκτενώς στα διάτομα. Επιπροσθέτως, η αφθονία μεταγραφωμάτων που κωδικοποιούν φωτοευαίσθητες πρωτεΐνες βρέθηκε να εμφανίζει μέγιστη τιμή την αυγή σε νερά του ανοικτού Ειρηνικού ωκεανού, ενώ κάποια άλλα μεταγραφώματα σχετιζόμενα με τη φωτοσύνθεση εμφάνιζαν μέγιστες τιμές καθ' όλη τη διάρκεια ή σε ποικίλες στιγμές της μέρας (Coesel et al., 2020). Επίσης στον Ειρηνικό ωκεανό βρέθηκε πως η παραγωγή των διάφορων χρωστικών (χλωροφύλλες, καροτενοειδή, φαιοφυτίνες) ήταν μέγιστη τη νύχτα σε πικο-φυτοπλαγκτονικά κύτταρα, σε μια μελέτη που συνδύασε την μεταμεταγραφωματική με την πρωτεωμική ανάλυση (Becker et al., 2020). Είναι αξιοσημείωτο πως οι μεταβολές στη φωτοσυνθετική δραστηριότητα του φυτοπλαγκτού κατά τη διάρκεια ενός εικοσιτετραώρου είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με τις μεταβολές στο μεταβολισμό των ετερότροφων μικροοργανισμών (Aylward et al., 2017), κάτι που θα συζητηθεί και παρακάτω.

Αναφορικά με την ημερήσια μεταβλητότητα του πικο-φυτοπλαγκτού βρέθηκε από ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες πως οι αφθονίες φτάνουν υψηλότερες τιμές αργά το απόγευμα ή τη νύχτα τόσο στην Βόρεια Θάλασσα (Bratbak et al., 2011) όσο και στον Ειρηνικό (Tsai et al. 2005, Hu et al., 2018) που μάλιστα σχετίζονται με αυξημένη κυτταρική διαίρεση εκείνες τις ώρες. Σε καλλιέργειες επίσης επιβεβαιώθηκε η αυξημένη κυτταρική διαίρεση κατά τη διάρκεια της νύχτας στο στέλεχος *Phaeocystis pouchetii* (Jakobsen and Veldhuis, 2005).

Προχωρώντας προς τα ετερότροφα ευκαρυωτικά κύτταρα, έχει βρεθεί συσχέτιση ανάμεσα στην θήρευση μέσω φαγοκυττάρωσης από Πρώτιστα σε φυτοπλαγκτονικά θηράματα στον

Ειρηνικό Ωκεανό: η φαγοκυττάρωση βρέθηκε μέγιστη τη νύχτα, πιθανά ακολουθώντας την αφθονία (δηλαδή την διαθεσιμότητα) του θηράματος-φυτοπλαγκτού (Hu et al., 2008). Αντίστοιχα αποτελέσματα βρέθηκαν και σε καλλιέργειες ετερότροφων δινομαστιγιωτών (*Gyrodinium dominans* και *Oxyrrhis marina*) που ανέπτυξαν υψηλότερους ρυθμούς κυτταρικής διαίρεσης την νύχτα, σε αντίθεση με μικτότροφα στελέχη (*Karlodinium armiger* και *Strombidium sp*) που διαιρούνταν περισσότερο κατά την διάρκεια της ημέρας (Arias et al., 2020). Η βιομάζα των βλεφαριδωτών σε μια μελέτη στην βορειοδυτική Μεσόγειο που συνυπολόγισε το συνολικό επιφανειακό στρώμα (ως τα 50 μέτρα βάθος) παρουσίασε τις χαμηλότερες τιμές τη νύχτα και τις υψηλότερες αργά το απόγευμα (Perez et al., 2000). Στην ίδια εργασία ήταν χαρακτηριστικό πως κάποια ετερότροφα βλεφαριδωτά βρίσκονταν στα 20-30 m βάθος την ημέρα και στην επιφάνεια τη νύχτα, ενώ άλλα παρουσίαζαν το ακριβώς αντίθετο μοτίβο. Τέλος, η αφθονία των νανομαστιγιωτών παρουσίασε υψηλότερες τιμές την ημέρα στην Ανατολική Θάλασσα της Κίνας (Tsai et al., 2005).

Η ημερήσια κατακόρυφη μετανάστευση του μεσοζωοπλαγκτού ή DVM αποτελεί ίσως το πιο μελετημένο ημερήσιο πλαγκτονικό μοτίβο. Η DVM μπορεί να περιγραφεί ως η κατακόρυφη μετακίνηση του μεσο-ζωοπλαγκτού στη στήλη του νερού μέσα σε εικοσιτέσσερις ώρες, κάτι που δημιουργεί μια ενεργή ροή άνθρακα. Συγκεκριμένα, η DVM σε συνδυασμό με άλλες διαδικασίες (βιοτικές και αβιοτικές) προκαλεί την μεταφορά άνθρακα από το επιπελαγικό προς το μεσοπελαγικό και βαθυπελαγικό στρώμα (Turner, 2014). Το πιο κοινό μοτίβο σχετικά με την DVM είναι μια κάθοδος οργανισμών σε κάποιο βάθος κατά τη διάρκεια της ημέρας και μια άνοδος αυτών στην επιφάνεια κατά τη διάρκεια της νύχτας (Cohen and Forward, 2009). Η DVM είναι μια συμπεριφορά του μεσο-ζωοπλαγκτού που έχει συσχετιστεί με διάφορες εξωγενείς και ενδογενείς παραμέτρους, με τις πρώτες να περιλαμβάνουν το φως, τη θερμοκρασία, αλατότητα, συγκέντρωση του οξυγόνου και της χλωροφύλλης, την υδροστατική πίεση και την στρωμάτωση της στήλης και τους δεύτερους να περιλαμβάνουν το φύλο, την ηλικία, κατάσταση σίτισης και τους βιολογικούς ρυθμούς του οργανισμού (van Haren, 2014). Ανάμεσα σε αυτά, οι αλλαγές στην ένταση του φωτός (σεληνιακός κύκλος, διάρκεια του φωτός της ημέρας, συννεφιά), όπως και η παρουσία θηραμάτων και θηρευτών φαίνεται να είναι οι κύριοι παράγοντες για την παρατηρούμενη ημερήσια, μηνιαία και εποχιακή μεταβλητότητα της DVM (Cohen and Forward, 2009). Συγκεκριμένα το φως μπορεί να δράσει ως ενδογενής παράγοντας, ρυθμίζοντας τους κικκαδικούς ρυθμούς των οργανισμών, ή ως εξωγενής παράγοντας (Potiris et al., 2018). Πιθανές αιτίες για την αλλαγή βάθους το πρωί που έχουν προταθεί είναι η προσπάθεια αποφυγής της επιβλαβούς UV ακτινοβολίας ή/και η αναζήτηση τροφής σε βάθη χωρίς παρουσία θηρευτών.

Στην εργασία τους οι Potiris et al. (2018) παρατήρησαν τέσσερα διαφορετικά πρότυπα μετανάστευσης του μεσο-ζωοπλαγκτού στο Κρητικό πέλαγος: η πρώτη ομάδα οργανισμών δεν μετανάστευε και παρέμενε μόνιμα σε βάθος 400-450 μέτρων, η δεύτερη ακολουθούσε το «κλασσικό» ημερήσιο πρότυπο που προαναφέρθηκε και συγκεκριμένα παρέμενε σε βάθος 400-450 μέτρων το πρωί (με άμεση συσχέτιση με το βάθος μέγιστης χλωροφύλλης) και σε βάθη 0-150 μέτρων το βράδυ, η τρίτη μετανάστευε διαφορετικά και ανάλογα με τη χρονική περίοδο του έτους από τα 350 στα 300 μέτρα ή από τα 250 στα 200 μέτρα, και τέλος, η τέταρτη ομάδα ακολουθούσε

παρόμοιο πρότυπο με τη δεύτερη με τη διαφορά ότι το πρωί βρισκόταν σε ρηχότερα νερά (180-240 μέτρα) και το βράδυ σε ακόμα ρηχότερα νερά (60-90 μέτρα).

Όσον αφορά τους θαλάσσιους πλαγκτονικούς μύκητες, όπως προαναφέρθηκε είναι γενικά υπομελετημένοι ως προς την ποικιλότητα και λειτουργία τους. Το ίδιο ισχύει και για τα ημερήσια μοτίβα που μπορεί να παρουσιάζουν. Ωστόσο, οι Kolody et al. (2019) μελέτησαν το μεταγράφημα συνολικά του μικροβιακού πλαγκτού σε τετράωρα διαστήματα για περίπου 3 ημέρες και παρατήρησαν πως οι μύκητες δεν παρουσίασαν κάποια σημαντική ημερήσια μεταβλητότητα (παρόμοια με τα Αρχαία), ενώ όλοι οι άλλοι μικροοργανισμοί έκαναν το αντίθετο.

### **1.3.3. Μεταβλητότητα στους ιούς**

Μοριακές αναλύσεις της κοινότητας των ιών έχουν δείξει πως ο ρυθμός με τον οποίο αλλάζει η σύνθεση της κοινότητας δεν είναι σταθερός και εξαρτάται πιθανά από το περιβάλλον και την εποχή του χρόνου. Οι Needham et al. (2013) δεν βρήκαν ανιχνεύσιμη αλλαγή της σύνθεσης της ικής κοινότητας σε διάστημα 48 ωρών.

Ανάμεσα στα πιο τυπικά ευρήματα για την χρονική μεταβλητότητα των ιών είναι η στενή σχέση που αναπτύσσουν με τους ξενιστές του. Για παράδειγμα, μια μελέτη με εκτεταμένη δειγματοληψία κατά τη διάρκεια μιας άνθισης φυτοπλαγκτού έδειξε πολύ στενή συσχέτιση μεταξύ της βακτηριακής και ικής παραγωγής κυρίως μετά την κατάρρευση της άνθισης. Αυτή η συσχέτιση είχε καθυστέρηση μιας ημέρας (time lag) με την αύξηση της βακτηριακής παραγωγικότητας να προηγείται. Επιπλέον, η ική παραγωγικότητα και σε άλλη μελέτη φάνηκε να μεγιστοποιείται σε διαστήματα υψηλής βακτηριακής δραστηριότητας και αυτό θα μπορούσε να είναι μια στρατηγική για την αύξηση του αριθμού των νεοπαραγόμενων ιών (Winter et al., 2004). Στην τελευταία εργασία βρέθηκε πως η ική λύση συνέβαινε από το μεσημέρι έως το απόγευμα και η ική μόλυνση κυρίως κατά τη διάρκεια της νύχτας στην Βόρεια Θάλασσα. Οι Winget et al. (2009) ανέφεραν πως δεν υπήρχαν σημαντικές ημερήσιες διακυμάνσεις στην ική αφθονία, σε αντίθεση με την ική παραγωγικότητα. Τέλος, μελέτες που αφορούσαν την μεταγραφική δραστηριότητα των ιών στην εύρωτη ζώνη στον ανοιχτό Ειρηνικό (Aylward et al., 2017) και σε παράκτιο σύστημα επίσης του Ειρηνικού ωκεανού (κόλπος Οσάκα, Yoshida et al., 2017), βρήκαν ημερήσιες διακυμάνσεις στην μεταγραφή γονιδίων με μέγιστη μεταγραφική δραστηριότητα το απόγευμα.

## **1.4. Το περιβάλλον της υδατοκαλλιέργειας**

Η υδατοκαλλιέργεια αναμένεται να αποτελέσει βασική πηγή πρωτεϊνών στο κοντινό μέλλον και πιθανά να ξεπεράσει την παροχή θαλασσινών για τον ανθρώπινο πληθυσμό από την αλιεία (Duarte et al., 2009). Αν και η υδατοκαλλιέργεια παρέχει μια σταθερή, υψηλής ποιότητας τροφή για τον άνθρωπο, η μεγάλη βιομηχανική δραστηριότητα υδατοκαλλιέργειας προκαλεί σοβαρές



περιβαλλοντικές ανησυχίες, λόγω της απελευθέρωσης μεγάλων ποσοτήτων οργανικής και ανόργανης ύλης στο εγγύς περιβάλλον, όπως είναι οι ιχθυοτροφές που δεν έχουν καταναλωθεί αλλά και οι απεκκρίσεις των ψαριών (Choi et al., 2018). Επιπλέον πιθανά καταστροφικές συνέπειες για το περιβάλλον μπορεί να προκύψουν από την χρήση αντιβιοτικών, την απελευθέρωση μετάλλων και την αλληλεπίδραση άγριων και καλλιεργούμενων ειδών (για παράδειγμα μέσω της μετάδοσης ασθενειών και την ανταλλαγή γονιδίων). Μέχρι σήμερα, οι περισσότερες αρνητικές συνέπειες έχουν παρατηρηθεί στο υποκείμενο ίζημα, π.χ. ευτροφισμός, υποξικά φαινόμενα, μείωση λιβαδιών, αλλαγή της μειο- και μακρο-πανίδας (Karakassis et al., 2000; Kalantzis and Karakassis, 2006).

Στην Ανατολική Μεσόγειο, οι μονάδες υδατοκαλλιέργειας λαυρακιού και τσιπούρας βρίσκονται συνήθως σε ρηχές και προστατευόμενες περιοχές, καθώς και σε ημίκλειστους κόλπους, κάτι που μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερο περιβαλλοντικό αντίκτυπο λόγω της μειωμένης ανανέωσης του νερού, από ότι σε μονάδες σε πιο εκτεθειμένες περιοχές (Maldonado et al., 2005). Παρόλα αυτά είναι γνωστό πως οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις εξαρτώνται και από άλλους παράγοντες, όπως είναι για παράδειγμα η υδρογραφία της περιοχής, οι περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία κ.α.) και η παλιρροιακή ροή (Duarte et al., 2019; Tsagkaraki et al., 2013). Συγκεκριμένα η μεγάλη εισροή ανόργανων θρεπτικών (π.χ.  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  κ.ά.) αλλά και οργανικών ενώσεων προκαλεί εμπλουτισμό τόσο στο περιβάλλον νερό όσο και στο υποκείμενο ίζημα (Stirling and Dey, 1990; Karakassis et al., 2001). Ιδιαίτερα για τα φωσφορικά και την αμμωνία, έχει βρεθεί ότι παίρνουν τις μεγαλύτερες τιμές τους λίγες ώρες μετά το τάισμα των ψαριών (Pitta et al., 1999; Karakassis et al., 2001). Παρά όμως, τη μεγάλη ποσότητα διαλυμένων θρεπτικών στοιχείων που απορρίπτονται στο θαλάσσιο περιβάλλον κοντά σε μονάδες υδατοκαλλιέργειας (από τα οποία τουλάχιστον τα μισά είναι άμεσα διαθέσιμα για το φυτοπλαγκτόν) συχνά δεν ανιχνεύονται σημαντικές αλλαγές στην συγκέντρωση της χλωροφύλλης στη στήλη του νερού (Pitta et al., 1999; Karakassis et al., 2001) ούτε στην αφθονία του πικο-, νανο- και μικροπλαγκτού (Pitta et al. 1999, 2005; Yucel-Gier et al. 2008) ή την ποικιλότητα του μικροπλαγκτού (Pitta et al. 1999, Yucel-Gier et al. 2008).. Αυτό παλαιότερα είχε αποδοθεί σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η γρήγορη διασπορά των θρεπτικών λόγω ρευμάτων (Gowen and Bradbury, 1987). Μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ανατολική Μεσόγειο πιο πρόσφατα όμως, έχοντας στόχο να εξηγηθεί αυτό το φαινόμενο (η λεγόμενη μοίρα των «θρεπτικών φαντασμάτων»), έδειξε ότι η θήρευση από τα πρώτιστα παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της βιομάζας του φυτοπλαγκτού, μεταφέροντας έτσι αποτελεσματικά τα θρεπτικά στα ανώτερα τροφικά επίπεδα και διατηρώντας την χλωροφύλλη σε πολύ χαμηλά επίπεδα (Pitta et al., 2009).

Οι Maldonado et al. (2005) εξέτασαν τη συγκέντρωση διαλυμένων ανόργανων θρεπτικών ουσιών και την αφθονία ετερότροφων βακτηρίων τόσο στο επιφανειακό νερό όσο και στο νερό κοντά στο βυθό σε μονάδες υδατοκαλλιέργειας που βρίσκονταν σε εκτεθειμένες περιοχές, και δεν βρήκαν ουσιαστικές διαφορές με τους σταθμούς ελέγχου. Αντίθετα, οι περισσότερες διακυμάνσεις εξηγήθηκαν ως συνάρτηση του βάθους (επιφάνεια έναντι του βυθού) ή της εποχής (άνοιξη έναντι του καλοκαιριού). Μία άλλη μελέτη που εξέτασε την εποχιακή διακύμανση και τις πιθανές αλληλεπιδράσεις βακτηριακών και μικρο-ευκαρυωτικών πλαγκτονικών κοινοτήτων σε μια ημι-

εντατική υδατοκαλλιέργεια λαβρακιού στη λιμνοθάλασσα Ria de Aveiro (Πορτογαλία) έδειξε ότι η σύνθεση των κοινοτήτων αυτών παρουσίαζε εποχιακή διακύμανση. Οι κύριοι παράγοντες όσον αφορά αυτή την διακύμανση ήταν η θερμοκρασία, η αλατότητα και η διαθεσιμότητα των νιτρικών αλάτων που διέφεραν ανάλογα με την εποχή (Duarte et al, 2019). Επίσης, η ισχυρή τροφική και μεταβολική συσχέτιση μεταξύ των βακτηριακών και μικρο-ευκαρυωτών κοινοτήτων που παρατηρήθηκε σε αυτή τη μελέτη μπορεί να συμβάλει στις εποχιακές διακυμάνσεις των κοινοτήτων στα συστήματα υδατοκαλλιέργειας (Duarte et al., 2019).

Οι αλλαγές που προκαλούνται στα υδάτινα οικοσυστήματα σε περιοχές όπου υπάρχει υδατοκαλλιεργητική δραστηριότητα λόγω της διασποράς ουσιών γύρω από τους κλωβούς, μπορούν να χρησιμεύσουν για τη μελέτη της απόκρισης των μικροβιακών πλαγκτονικών κοινοτήτων σε άλλες διαταραχές, υπό το πρίσμα ενός δυναμικού περιβάλλοντος. Μια μελέτη για τις αλλαγές στην σύνθεση των πλαγκτονικών κοινοτήτων ως απόκριση στον εμπλουτισμό του νερού με θρεπτικά σε δύο περιοχές (με υδατοκαλλιέργειες και εκτεθειμένες σε μεγάλες ταχύτητες ρευμάτων) στην Ανατολική Μεσόγειο, έδειξε ότι πρώτον ο τύπος του συστήματος (π.χ. το πόσο ολιγοτροφικό είναι) και οι υπάρχουσες πλαγκτονικές κοινότητες στην περιοχή μελέτης παίζουν σημαντικό ρόλο στις αλλαγές μετά τον εμπλουτισμό. Δεύτερον, η μελέτη έδειξε ότι η γνώση της υδρογραφίας της περιοχής είναι πολύ σημαντική για την ανίχνευση της επίδρασης που υπάρχει από τις υδατοκαλλιέργειες ακόμα και αν πρόκειται για ένα σύστημα με καλή ανανέωση της στήλης. Για παράδειγμα στην περίπτωση της Λέσβου, η συσσώρευση των θρεπτικών ήταν αρκετά μακριά και κατάντη των κλωβών και η απόκριση του πλαγκτού στον εμπλουτισμό θρεπτικών ήταν πιο έντονη εκεί. Σε μεγάλες αποστάσεις από τους κλωβούς των ψαριών (>80 μέτρα) παρατηρήθηκε αύξηση της αφθονίας των βακτηρίων, νανο-μαστιγωτών και μεσο-ζωοπλαγκτού, μείωση των διατόμων και αύξηση των μεγαλύτερων δινομαστιγωτών και βλεφαριδωτών. Με άλλα λόγια, το μεγαλύτερο μέγεθος μικρο-ζωοπλαγκτόν επικράτησε κατάντη των κλωβών. Ανάντη των κλωβών, η σύνθεση των κοινοτήτων φάνηκε να είναι χαρακτηριστική των ολιγοτροφικών συνθηκών της περιοχής το καλοκαίρι, δηλαδή στο μικρο-πλαγκτόν κυριαρχούσαν μεγάλα διάτομα και μικρότερα κύτταρα μικρο-ζωοπλαγκτού (Tsagkaraki et al., 2013).

### **1.5. Σκοπός της εργασίας**

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της ημερήσιας μεταβλητότητας, για πρώτη φορά, όλων των μικροβιακών πλαγκτονικών ομάδων (προκαρυώτες, ευκαρυώτες, μύκητες, ιοί) στην παράκτια ζώνη της Ανατολικής Μεσογείου σε ένα περιβάλλον όπου υπάρχει επίδραση υδατοκαλλιεργητικής δραστηριότητας. Πιο συγκεκριμένα, με το πέρας της εργασίας στοχεύουμε να απαντήσουμε στα ακόλουθα ερωτήματα: 1] Ποιά είναι η επίδραση της στιγμής της ημέρας στην ποικιλότητα των μικροβιακών πλαγκτονικών ομάδων; Υπάρχουν στελέχη που επικρατούσαν κάποια στιγμή; 2] Ποιά είναι η επίδραση της υδατοκαλλιεργητικής δραστηριότητας στην ποικιλότητα των μικροβιακών πλαγκτονικών ομάδων; Υπάρχουν στελέχη που ευνοούνται ή επηρεάζονται αρνητικά από την υδατοκαλλιέργεια; 3] Ποιές βιοτικές (συγκέντρωση χλωροφύλλης

και φαιοφυτίνης) ή/και αβιοτικές (συγκέντρωση ανόργανων και οργανικών θρεπτικών αλάτων) παράμετροι επηρεάζουν περισσότερο την σύνθεση των μικροβιακών κοινοτήτων και τις διαφορές μεταξύ τους;

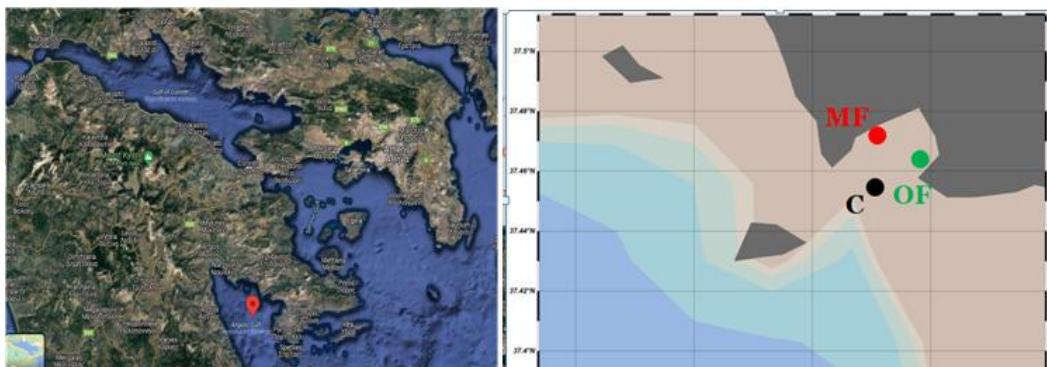
Για την προσέγγιση των παραπάνω ερωτημάτων, πραγματοποιήθηκε ανάλυση DNA μετακωδικοποίησης σε πολλαπλά δείγματα νερού από περιβάλλον υδατοκαλλιέργειών.

## **2. Υλικά και Μέθοδοι**

### **2. 1. Συλλογή δειγμάτων**

Στην παρούσα εργασία συλλέχθηκαν δείγματα επιφανειακού θαλασσινού νερού (1-2 μέτρα βάθος) από περιβάλλον υδατοκαλλιέργειών. Τα δείγματα συλλέχθηκαν κατά την αποστολή του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. στα πλαίσια του Ευρωπαϊκού προγράμματος TAPAS (<http://tapas-h2020.eu/>) που πραγματοποιήθηκε τον Ιούνιο του 2017 στον Βουρλιά (Αργολικός Κόλπος) με το Ωκεανογραφικό Σκάφος “ΦΙΛΙΑ”. Στην περιοχή της δειγματοληψίας (Εικόνα 2.1.) αναπτύσσεται εντατική εμπορική υδατοκαλλιέργεια τσιπούρας και λαβρακιού και παράγονται πάνω από 2.500 τόνοι ψαριών ετησίως σε πολλούς μικρούς κλωβούς. Η επιχείρηση ακολουθεί πρότυπα ISO 14001, GLOBALG.A.P., Fish from Greece and OHSAS 18001 και έχει ενταχθεί ως Allocated Zone for Aquaculture.

Δείγματα συλλέχθηκαν από δύο σταθμούς εντός της ζώνης ανάπτυξης των υδατοκαλλιέργειών. Συγκεκριμένα, σε απόσταση λίγων μέτρων από τον πρώτο σταθμό υπήρχε ένας κλωβός (από εδώ και στο εξής αναφέρεται ως OF: one farm), ενώ σε απόσταση λίγων μέτρων από τον δεύτερο σταθμό υπήρχαν πολλοί κλωβοί (από εδώ και στο εξής αναφέρεται ως MF: multiple farms). Επιπλέον δείγματα συλλέχθηκαν από έναν τρίτο σταθμό μάρτυρα που βρισκόταν >1 χιλιόμετρο μακριά από τους κλωβούς (control: C), δηλαδή εκτός της ζώνης ανάπτυξης των υδατοκαλλιέργειών. Οι συντεταγμένες των σταθμών φαίνονται στον Πίνακα 2.1. και στην Εικόνα 2.1. απεικονίζεται ο χάρτης με τις περιοχές δειγματοληψίας. Στον κάθε σταθμό έγινε δειγματοληψία σε τρεις διαφορετικές στιγμές μέσα στη μέρα: 06:00 το πρωί (αυτή η στιγμή θα αναφέρεται ως morning), 14:00 το μεσημέρι (αυτή η στιγμή θα αναφέρεται ως noon) και 22:00 το βράδυ (αυτή η στιγμή θα αναφέρεται ως evening). Η δειγματοληψία στους τρεις σταθμούς και στις τρεις στιγμές της ημέρας επαναλήφθηκε τρεις συνεχόμενες ημέρες προκειμένου να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων (29 και 30 Ιουνίου και 1 Ιουλίου 2017, που αναφέρονται ως D1, D2 και D3, αντίστοιχα).



Εικόνα 2.1. Ο χάρτης και οι συντεταγμένες των σταθμών δειγματοληψίας.

**Πίνακας 2.1.** Οι συντεταγμένες των σταθμών δειγματοληψίας C, OF, MF (ίδιοι για κάθε στιγμή και ημέρα). Η συγκέντρωση του σωματιδιακού άνθρακα και αζώτου (POC, PON), της χλωροφύλλης (Chl) και φαιοφυτίνης, των φωσφορικών (PO4 3-), νιτρικών (NO2-) και νιτρωδών (NO3-), αμμωνιακών (NH4+) και πυριτικών (SiO2) αλάτων στους σταθμούς δειγματοληψίας.

Δείγμα	Γεωγραφικό μήκος	Γεωγραφικό πλάτος	Ημέρα	POC	PON	Chl	Φαιοφυτίνη	PO4 3-	NO2-	NO3 -	NH4+	SiO2
C morning	23.02473	37.45472	1	149.6	18.2	0.23	0.04	0.01	0	0.07	0.14	0.06
C noon			1	155.8	13.7	0.25	0.04	0	0	0.13	0.1	0.11
C evening			1	238.2	23.8	3.42	0.62	0	0.01	0.21	0.11	0.09
MF morning	23.02679	37.47132	1	272.8	42.2	0.52	0.15	0.02	0.01	0.37	0.69	0.06
MF noon			1	282.2	37.4	0.48	0.1	0.05	0.01	0.23	1.53	0.1
MF evening			1	282.2	37.4	0.96	0.37	0.03	0.02	0.28	1.24	0.12
OF morning	23.04813	37.4634	1	241.9	40.5	0.22	0.11	0.03	0.02	0.29	1.16	0.1
OF noon			1	222.7	28.2	1.69	0.52	0.01	0	0.18	0.23	0.09
OF evening			1	316.4	35.6	0.49	0.16	0	0.01	0.17	0.78	0.11
C morning			2	99.1	9.8	0.22	0.06	0.01	0	0.12	0.05	0.1
C noon			2	194.2	21.1	0.73	0.1	0	0.01	0.24	0.07	0.1
C evening			2	237	26	0.73	0.18	0.01	0.02	0.27	0.1	0.05
MF morning			2	153	19.4	0.58	0.11	0.02	0.02	0.25	0.55	0.13

MF noon	2	202.6	29.4	0.84	0.17	0.02	0.02	0.22	0.7	0.09
MF evening	2	294.6	44.9	0.77	0.21	0.01	0.02	0.2	0.7	0.11
OF morning	2	230	30.8	0.61	0.19	0.04	0.01	0.24	1.09	0.14
OF noon	2	267.5	38.2	0.85	0.25	0.01	0.02	0.22	0.74	0.1
OF evening	2	312.9	50.2	0.83	0.22	0.01	0.02	0.39	0.82	0.1
C morning	3	111.4	11.8	0.33	0.06	0.01	0.05	0.2	0.04	0.07
C noon	3	170.9	21.5	0.36	0.1	0	0.06	0.2	0.04	0.05
C evening	3	157.2	16.4	0.38	0.1	0	0.06	0.31	0.08	0.03
MF morning	3	156.7	23.2	0.88	0.19	0.02	0.09	0.38	0.61	0.06
MF noon	3	265.4	35.2	1.13	0.37	0.04	0.06	1.46	1.45	0.08
MF evening	3	193.1	24.9	0.6	0.24	0.01	0.09	0.34	0.7	0.05
OF morning	3	200.9	32.9	0.65	0.25	0.02	0.07	0.42	0.7	0.09
OF noon	3	315.4	40.2	0.7	0.26	0.01	0.06	0.44	0.59	0.05
OF evening	3	382.4	55.5	0.98	0.48	0.03	0.04	0.27	1.28	0.04

Προκειμένου να μελετηθεί η ποικιλότητα του πικο-, νανο-, μικρο-πλαγκτού και μεσο-πλαγκτού με γενετικούς δείκτες, συλλέχθηκε νερό από τους προαναφερθέντες σταθμούς. Συγκεκριμένα, για τη συλλογή του πικο-, νανο- και μικρο-πλαγκτού έγινε χρήση φιαλών Niskin και στη συνέχεια, το νερό μεταφέρθηκε σε δοχεία πολυεθυλενίου με χαμηλή πυκνότητα (low-density polyethylene) τα οποία είχαν προηγουμένως πλυθεί μια φορά με χαμηλής περιεκτικότητας υδροχλωρικό οξύ και ξεπλυθεί τρεις φορές με απιονισμένο νερό. Ακολούθησε διήθηση του νερού σε πολυανθρακικές μεμβράνες με περισταλτική αντλία υπό χαμηλή πίεση. Συγκεκριμένα, περίπου 20 λίτρα νερό διηθήθηκαν πρώτα σε δίκτυ 200 μm για να απομακρυνθούν μεγάλοι οργανισμοί και ακολούθως 1) σε μεμβράνες με διάμετρο πόρου 20 μm για την απομόνωση του μικρο-πλαγκτού και 2) σε μεμβράνες με διάμετρο πόρων 5 και 2 μm για την απομόνωση του νανο-πλαγκτού (η σειριακή χρήση των 5 και 2 μm μεμβρανών είχε σκοπό την διευκόλυνση της διήθησης). Για την συλλογή του πικο-πλαγκτού το τελευταίο διήθημα διηθήθηκε περαιτέρω 3) σε πολυεθερσουλφονικές μεμβράνες με διάμετρο πόρου 0,2 μm. Για όλες αυτές τις διηθήσεις χρησιμοποιήθηκε ανοξείδωτο σύστημα διήθησης από ασάλι διαμέτρου 142 mm. Για τη συλλογή του μεσο-ζωπλαγκτού χρησιμοποιήθηκε πλαγκτονικό δίκτυ με διάμετρο πόρου 200 μm το οποίο σύρθηκε κάθετα. Το δίκτυ είχε διάμετρο 0.57 μέτρα και σε αυτό ήταν προσαρτημένο ένα ροόμετρο (περίπου 5 κυβικά μέτρα νερό διηθήθηκε σε κάθε σύρση). Το δίκτυ ξεπλύθηκε με διηθημένο σε 0,2 μm θαλασσινό νερό και συγκεντρώθηκε σε μεμβράνες πόρου 2 μm με χρήση αντλίας κενού.

Συνολικά, προέκυψαν 27 δείγματα για κάθε μία από τις παραπάνω κλάσεις μεγέθους (δηλ. 0,2 μm, 2 και 5 μm, 20 μm και 200 μm, Πίνακας 2.2.) από όπου ανακτήθηκαν οι μικροβιακές πλαγκτονικές κοινότητες με τη διαδικασία που θα περιγραφεί παρακάτω. Οι μεμβράνες αποθηκεύτηκαν στους -20°C στο Ω/Σ «ΦΙΛΙΑ» και μεταφέρθηκαν στους -80°C έως την επεξεργασία τους στο εργαστήριο Μικροβιακής Οικολογίας στο ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.

**Πίνακας 2.2.** Σύνοψη των δειγμάτων που ελήφθησαν (κλάση μεγέθους, τρόπος συλλογής, γονίδιο ή περιοχή προς πολλαπλασιασμό και αλληλούχηση και αντιστοίχιση σε πλαγκτονική ομάδα).

		Κλάση μεγέθους				
		<0.2 μm	0,2-2 μm	2-20 μm	20-200 μm	>200 μm
<b>Τρόπος συλλογής δείγματος</b>	χημική διήθηση	υπερσυγκέντρωση	και διήθηση σε πολυεθερσουλφονική ή μεμβράνη 0,2 μm	σε διήθηση σε πολυκαρβονικές μεμβράνες 5 και 2 μm	σε διήθηση σε πολυκαρβονική μεμβράνη 20 μm	σύρση πλαγκτονικού διχτυού 200 μm
<b>Επιλεγμένο γονίδιο ή περιοχή προς αλληλούχηση</b>	DNApol, g20, g23, vPHO		1) 16S rRNA  2) 18S rRNA	1) 16S rRNA  2) 18S rRNA  3) ITS1-ITS2	1) 16S rRNA  2) 18S rRNA  3) ITS1-ITS2	1) 16S rRNA  2) 18S rRNA  3) ITS1-ITS2
<b>Τι περιλαμβάνεται σε κάθε κλάση μεγέθους</b>	ιοί		1) προκαρυώτες σε "ελεύθερη" μορφή  2) πικο-ευκαρυώτες	1) προκαρυώτες σε σωματίδια  2) νανο-ευκαρυώτες	προσκολλημένοι σε  2) μικρο-ευκαρυώτες	σε >2 μm  2) μεσο-ευκαρυώτες
				3) μύκητες είτε σε "ελεύθερη" μορφή είτε προσκολλημένοι σε >2 μm σωματίδια		

## **2.2. Λύση κυττάρων, εκχύλιση και καθαρισμός γενετικού υλικού**

Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του ολικού γενετικού υλικού (DNA) από όλες τις μεμβράνες χρησιμοποιώντας ένα τροποποιημένο CTAB πρωτόκολλο (Winperenninckx et al., 1993; Hingamp et al. 2013). Αρχικά πραγματοποιήθηκε παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος CTAB σε υπερκάθαρο νερό ([2% CTAB (βρωμιούχο κετυλοτριμεθυλαμμώνιο), 100 mM TrisHCl (pH = 8), 20

mM EDTA, 1.4 M NaCl, 0,2% β-μερκαπτοαιθανόλη, 0.1 mg mL<sup>-1</sup> πρωτεΐνάση K, 10 mM DTT (διθειοθρεϊτόλη), Πίνακας 2.3.] με ανάδευση σε μαγνητική πλάκα και ήπια θέρμανση (<50°C). Στη συνέχεια, έγινε λύση των κυττάρων με επώαση των μεμβρανών στο διάλυμα CTAB στους 58-60°C και περιστροφή με ταχύτητα περίπου μία στροφή/δέκα δευτερόλεπτα για δύο ώρες. Η επιλογή του εν λόγω πρωτοκόλλου έγινε γνωρίζοντας πως το CTAB προκαλεί τη λύση των μεμβρανών των κυττάρων, ενώ ταυτόχρονα απομακρύνει τους πολυσακχαρίτες και δευτερογενείς μεταβολίτες (ουσίες που αν δεν απομακρυνθούν μπορεί να αναστείλουν τη διαδικασία της PCR μετέπειτα). Η β-μερκαπτοαιθανόλη μετουσιώνει τις RNάσες, η πρωτεΐνάση K πέπτει τις πρωτεΐνες, ενώ η διθειοθρεϊτόλη παίζει βοηθητικό ρόλο στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Μετά το πέρας της επώασης, έγινε προσθήκη διαλύματος χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) σε ίσο όγκο με τον όγκο του δείγματος υπό λύση (περίπου 10 mL). Σκοπός της προσθήκης αυτής ήταν η απομάκρυνση των οργανικών στοιχείων που προέκυψαν από την λύση των κυττάρων (για παράδειγμα, λιπίδια, υδατάνθρακες, στοιχεία των μεμβρανών και τοιχωμάτων) στην λεγόμενη «οργανική φάση» και της απομόνωσης του γενετικού υλικού στην λεγόμενη «υδάτινη φάση» (υπερκείμενη). Ο διαχωρισμός των φάσεων έγινε με φυγοκέντρηση των φιαλιδίων στις 8000 rpm για 20 λεπτά στους 10°C. Μετά από την φυγοκέντρηση, η υδάτινη φάση μεταφέρθηκε σε νέο φιαλίδιο με ιδιαίτερη προσοχή ώστε να προστατευθεί το γυμνό DNA. Στο νέο φιαλίδιο προστέθηκε καθαρή ισοπροπανόλη σε όγκο 2/3 του όγκου του δείγματος. Σκοπός αυτής της προσθήκης ήταν η κατακρήμνιση του DNA. Για την αποτελεσματικότερη κατακρήμνιση, τα δείγματα παρέμειναν στους 4°C για όλη τη νύχτα. Την επόμενη μέρα ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 25 λεπτά στους 4°C, προκειμένου να δημιουργηθεί η πελέτα (ίζημα) του DNA. Στην πελέτα προστέθηκε διάλυμα αιθανόλης (76%) και οξικού αμμωνίου (10 mM) σε όγκο 2 ml και το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 8000 rpm για 25 λεπτά στους 4°C. Στις περιπτώσεις όπου η πελέτα δεν ήταν ορατή με το γυμνό μάτι, η διαδικασία της κατακρήμνισης επαναλήφθηκε για να βεβαιωθούμε ότι δεν είχαμε απώλεια DNA. Με το πέρας της διαδικασίας, η πελέτα του DNA παρέμεινε στους 37°C για περίπου 1 ώρα έως ότου εξατμιστεί πλήρως η υπολειπόμενη αιθανόλη. Στην ξηρή πελέτα προστέθηκαν 100-200 μL υπερκάρθαρο νερό ώστε να επαναδιαλυτοποιηθεί το DNA.

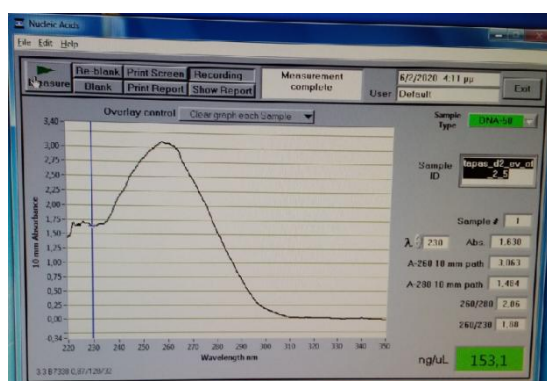
Η εκχύλιση του ολικού γενετικού υλικού από τους ιούς δεν πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, ενώ χρησιμοποιήθηκε διαφορετικό πρωτόκολλο.

Η ποσότητα και ποιότητα του DNA που εκχυλίστηκε προσδιορίστηκε με φωτόμετρο NanoDrop (ND-100, Thermo Scientific). Στη συνέχεια, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C. Καθ' όλη τη διαδικασία, φορούσαμε γάντια με σκοπό την προστασία της υγείας μας από τοξικά χημικά διαλύματα καθώς και την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων τόσο μεταξύ τους όσο και με το πλησίον περιβάλλον.

**Πίνακας 2.3.** Συνταγή διαλύματος CTAB 2% (οι ποσότητες αντιστοιχούν σε όγκο διαλύματος 100 ml). Τα συστατικά με \* αντιστοιχούν σε 10 ml δείγματος, καθώς τοποθετούνταν σε κάθε φιαλίδιο ξεχωριστά.

Συστατικά	Ποσότητα	Τελική συγκέντρωση
CTAB	2 gr	2% w/v
Tris-HCl 1 M, Ph 8	10 ml	100 mM
EDTA 0.5 M, Ph 8	4 ml	20 mM
NaCl 5 M	28 ml	1.4 M
β-μερκαπτοαιθανόλη με ποσότητες και συγκεντρώσεις	20 μl*	0,2%
πρωτεΐνωση K	100ul*	0.1 mg mL <sup>-1</sup>
DTT	100ul*	10 mM
Υπερκάθαρο νερό	54 ml	

Στην Εικόνα 2.2. παρουσιάζεται ένα ενδεικτικό αποτέλεσμα εκχύλισης DNA από το δείγμα D2, OF evening (2 και 5 μm). Η ποσότητα του DNA που εκχυλίστηκε από το συγκεκριμένο δείγμα είναι 153,1 ng/μl με λόγο 260/280 nm 2,06. Γνωρίζουμε πως ο λόγος 260/280 αντιπροσωπεύει το μήκος κύματος όπου απορροφά το DNA (260 nm) προς το μήκος κύματος όπου απορροφούν οι πρωτεΐνες (280 nm), συνεπώς αποτελεί ένα μέτρο της καθαρότητας του DNA. Όσο ο λόγος αυτός πλησιάζει την τιμή 2, τόσο πιο καθαρό DNA έχει εκχυλιστεί. Για το συγκεκριμένο δείγμα, συμπεράναμε λοιπόν πως τόσο η ποσότητα όσο και η ποιότητα του DNA του ήταν ικανοποιητικές.



**Εικόνα 2.2.** Τα αποτελέσματα της εκχύλισης DNA, όπως προέκυψαν από το όργανο μέτρησης (NanoDrop™ 100 Spectrophotometer).

### **2.3. Πολλαπλασιασμός γονιδίων μέσω της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)**

Σκοπός της εργασίας ήταν να εκτιμηθεί η ποικιλότητα του πικο-, νανο- και μικρο-πλαγκτού με γενετικούς δείκτες. Για αυτό το σκοπό, επιλέχθηκαν γονίδια ειδικά για κάθε πλαγκτονική ομάδα και αγοράστηκαν οι αντίστοιχοι εκκινητές των γονιδίων. Για τον πολλαπλασιασμό των γονιδίων χρησιμοποιήθηκε ένα πρωτόκολλο PCR δύο σταδίων.



Τα γονίδια που επιλέχθηκαν για να χαρακτηριστεί η ποικιλότητα του μικροβιακού πλαγκτού στα δείγματα συνοψίζονται στον Πίνακα 2.2. και ήταν τα ακόλουθα:

1) το γονίδιο 16S rRNA και συγκεκριμένα η περιοχή του V3-V4 για την ανίχνευση των προκαρυωτών (Βακτήρια και Αρχαία) τόσο στην κλάση μεγέθους 0,2-2 μm (περιλαμβάνει τους λεγόμενους «ελεύθερους» προκαρυώτες) όσο και στην κλάση μεγέθους >2 μm (περιλαμβάνει τους λεγόμενους προκαρυώτες προσκολλημένους σε σωματίδια)

2) το γονίδιο 18S rRNA και συγκεκριμένα η περιοχή του V9 για την ανίχνευση των ευκαρυωτών σε όλες τις κλάσεις μεγέθους: 0,2-2 μm (περιλαμβάνει το λεγόμενο ευκαρυωτικό πικο-πλαγκτόν), 2-20 μm (περιλαμβάνει το νανο-πλαγκτόν), 20-200 μm (περιλαμβάνει το μικρο-πλαγκτόν) και >200 μm (περιλαμβάνει το μεσο-πλαγκτόν)

3) μέρος της περιοχής ITS του rRNA οπερονίου για την ανίχνευση των μυκήτων στις κλάσεις μεγέθους 2-20 μm, 20-200 μm και >200 μm.

Στον Πίνακα 2.2. παρουσιάζονται και τα γονίδια που επιλέχθηκαν για τον εντοπισμό των ιικών ομάδων που όμως δεν συζητιούνται περαιτέρω, καθώς η διαδικασία πολλαπλασιασμού τους δεν ήταν επιτυχημένη.

Στην πρώτη αντίδραση PCR, το εκάστοτε γονίδιο-στόχος πολλαπλασιάστηκε με τους ειδικούς εκκινητές (τα ζεύγη των εκκινητών καθώς και πληροφορίες σχετικά με την αλληλουχία τους και το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος παρατίθενται στον Πίνακα 2.3.). Η πρώτη αυτή αντίδραση για τα γονίδια 16S rRNA και 18S rRNA περιείχε το υπόστρωμα DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα της PCR (5X) με μείγμα νουκλεοτιδίων (dNTPs, 10 mM) και MgCl<sub>2</sub> (25 mM) από το KAPA Hifi PCR kit, τους αντίστοιχους για κάθε γονίδιο εμπρόσθιους και οπίσθιους εκκινητές (10 μM) και Kapa Taq DNA πολυμεράση υψηλής ακριβείας (1U/μl). Τα στάδια του πρωτοκόλλου της PCR που χρησιμοποιήθηκε για το 16S rRNA γονίδιο ήταν: 95 °C για 5 min, ακολούθως 26 κύκλοι στους 98 °C για 20s, 57 °C για 2 min, 72 °C για 1 min, και τέλος 72 °C για 7 min. Τα στάδια του πρωτοκόλλου της PCR που χρησιμοποιήθηκε για το 18S rRNA γονίδιο ήταν: 95 °C για 5 min, ακολούθως 30 κύκλοι στους 98 °C για 20s, 63 °C για 90s, 72 °C για 90s, και τέλος 72 °C για 10 min.

Για την περιοχή ITS1-ITS2, το πρωτόκολλο τροποποιήθηκε και κατέληξε μετά από πολλές δοκιμές να είναι ως εξής: Η αντίδραση περιείχε το υπόστρωμα DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα της PCR (Buffer A 10X with MgCl<sub>2</sub>) από το FastGene® Taq DNA PCR kit, μείγμα νουκλεοτιδίων (dNTPs, 10mM) από το KAPA Hifi PCR kit, τους αντίστοιχους για κάθε γονίδιο εμπρόσθιους και οπίσθιους εκκινητές (10μM) και FastGene® DNA πολυμεράση (5U/μl). Τα στάδια του πρωτοκόλλου της PCR που χρησιμοποιήθηκε για την περιοχή ITS1-ITS2 ήταν: 95 °C για 5 min, ακολούθως 35 κύκλοι στους 95 °C για 30s, 52 °C για 30s, 68 °C για 30s, και τέλος 68 °C για 10 min.

**Πίνακας 2.3.** Πληροφορίες για τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το κάθε γονίδιο.

Γενετικός τόπος	Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία (5' - 3')	Μέγεθος προϊόντος	Βιβλιογραφική αναφορά
16S rRNA	341F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTG TATAAGAGACAGCCTACGGGN GGCWGACAG	450-500 bp	Klindworth et al., 2013
	805RB1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGT GTATAAGAGACAGGACTACNV GGGTATCTAATCC		
18S rRNA	1380f	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTG TATAAGAGACAGCCCTGCCHTT TGACACAC	180-250 bp	Amaral-Zettler et al., 2009
	1510r	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGT GTATAAGAGACAGCCTTCYGC AGGTTACCTAC		
ITS1-ITS2	ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTA A	300-400 bp	Wang et al., 2018
	ITS2-(R)	GCTGCGTTCTTCATCGATGC		

Όσον αφορά τα δείγματα που είχαν λιγοστό DNA ή/και πολλούς παρεμποδιστές PCR χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της nested PCR κατά την οποία γίνεται αρχικά πολλαπλασιασμός του επιθυμητού γονιδίου με τους αντίστοιχους εκκινητές και στη συνέχεια το προϊόν αυτής της αντίδρασης χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την επόμενη αντίδραση. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στην nested PCR ήταν το ίδιο με το αρχικό για το κάθε γονίδιο.

Η δεύτερη αντίδραση PCR έγινε με εκκινητές που περιλαμβάνουν τους δείκτες και τους συνδέτες Illumina, ώστε το κάθε δείγμα να αποκτήσει έναν μοναδικό κωδικό και να μπορεί να αναγνωριστεί στα στάδια που ακολουθούν μετά την αλληλούχηση. Η αντίδραση αυτή περιείχε ως υπόστρωμα το καθαρισμένο προϊόν της πρώτης PCR, το ρυθμιστικό διάλυμα της PCR (5X) με μείγμα νουκλεοτιδίων (dNTPs, 10mM) από το KAPA Hifi PCR kit, εμπρόσθιους και οπίσθιους εκκινητές (10μM) και Kara Taq DNA πολυμεράση υψηλής ακριβείας (1U/μl). Τα στάδια του πρωτοκόλλου της PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν: 98 °C για 3min, ακολούθως 8 κύκλοι στους 98 °C για 30s, 55 °C για 30s, 72 °C για 30s, και τέλος 72 °C για 5 min.

Για τον έλεγχο του αποτελέσματος της πρώτης αντίδρασης και ανεξάρτητα από το πρωτόκολλο, έγινε ηλεκτροφόρηση με 4 μl από το προϊόν της PCR για 35 λεπτά στα 90 volt σε πήκτωμα αγαρόζης 1-1.5%, το οποίο περιείχε 3.5 μl βρωμιούχο αιθίδιο. Το βρωμιούχο αιθίδιο χρησιμοποιήθηκε καθώς έχει την ικανότητα να συνδέεται με τα μόρια DNA και να φθορίζει σε υπεριώδη ακτινοβολία, δίνοντας τη δυνατότητα να εκτιμηθεί οπτικά η αποτελεσματικότητα της PCR. Το πήκτωμα αγαρόζης φωτογραφιζόταν υπό υπεριώδη φωτισμό με το DNA να εμφανίζεται σε πορτοκαλί ζώνες και την ποσότητά του να είναι ανάλογη της έντασης του χρώματος των ζωνών. Για να ελεγχθεί αν είχε πολλαπλασιαστεί το επιθυμητό γονίδιο έγινε σύγκριση με 2,5 μl

δείκτη μοριακών μεγεθών (ladder Nirron Genetics, με διακριτές ζώνες μεγέθους 200-600 bp) κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. Για τον έλεγχο του αποτελέσματος της δεύτερης αντίδρασης, έγινε ηλεκτροφόρηση και επεξεργασία των εικόνων με 2,5 μl από το προϊόν της PCR όπως περιγράφηκε παραπάνω.

## **2.4. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR**

### **Προετοιμασία**

Για τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκαν μαγνητικά σφαιρίδια AMPure XP. Τα σφαιρίδια και η αιθανόλη που περιλαμβάνει το πρωτόκολλο αφήνονταν εκτός ψυγείου ώσπου να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου προτού χρησιμοποιηθούν.

### **Διαδικασία**

Για την διαδικασία καθαρισμού των προϊόντων της PCR αρχικά έγινε ανάδευση των μαγνητικών σφαιριδίων AMPure XP για περίπου 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια με τη χρήση πολυπιπέτας προστέθηκε κατάλληλος όγκος σφαιριδίων σε κάθε φρεάτιο της πλάκας PCR που περιείχε δείγμα. Ο όγκος υπολογίστηκε ως 0.9 μl επί του όγκου του κάθε δείγματος για να απομακρυνθούν παραπροϊόντα της PCR με μεγαλύτερο ή μικρότερο μέγεθος από το επιθυμητό γονίδιο. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ανάδευση των δειγμάτων με τα μαγνητικά σφαιρίδια με την πολυπιπέτα, ώσπου να ομογενοποιηθεί το δείγμα. Αφού επώαστηκαν τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς ανακίνηση για 5 λεπτά, η πλάκα PCR τοποθετήθηκε σε ειδική μαγνητική βάση για 2 λεπτά ή μέχρι το υπερκείμενο να είναι διαυγές. Σε αυτό το βήμα, τα μαγνητικά σφαιρίδια έχουν δεσμεύσει το DNA και προσκολλώνται στους μαγνήτες της μαγνητικής πλάκας. Ενώ η πλάκα PCR βρισκόταν ακόμη στη μαγνητική βάση, το υπερκείμενο αφαιρέθηκε με τη χρήση πολυπιπέτας. Κατόπιν, με την πλάκα PCR ακόμη στη μαγνητική βάση, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των σφαιριδίων με την προσθήκη 200 μl αιθανόλης 80% σε κάθε φρεάτιο που περιείχε δείγμα. Ακολούθησε επώαση της πλάκας PCR στη μαγνητική βάση για 30 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και απορρίφθηκε. Η διαδικασία του καθαρισμού με αιθανόλη επαναλήφθηκε δύο φορές. Η πλάκα PCR παρέμεινε στη μαγνητική βάση έως ότου εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη (περίπου για 10 λεπτά), μετά αφαιρέθηκε από τη μαγνητική βάση και τέλος προστέθηκαν 25 μl νερού PCR σε κάθε φρεάτιο που περιείχε δείγμα. Έτσι, το προϊόν της PCR επαναιωρήθηκε με ήπια ανάδευση με χρήση πολυπιπέτας. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά και η πλάκα τοποθετήθηκε στη μαγνητική βάση εκ νέου για 2 λεπτά ή μέχρι το υπερκείμενο να είναι διαυγές. Με τη χρήση πολυπιπέτας το καθαρό πλέον υπερκείμενο μεταφέρθηκε προσεκτικά σε μια νέα πλάκα PCR.

## **2.5. Ποσοτικοποίηση DNA και προετοιμασία βιβλιοθηκών**

Μετά τον καθαρισμό των προϊόντων της δεύτερης αντίδρασης PCR, ποσοτικοποιήθηκε το DNA με τη χρήση φθοριόμετρου Qubit™ 4 Fluorometer. Σκοπός αυτής της ακριβούς ποσοτικοποίησης ήταν να υπολογιστεί η ποσότητα του κάθε δείγματος που θα πρέπει να προστεθεί στην βιβλιοθήκη ώστε το κάθε δείγμα να συνεισφέρει ισόποσα στην βιβλιοθήκη. Για την ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε το Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) και ακολουθήθηκε η διαδικασία σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Συνολικά, δημιουργήθηκαν τρεις βιβλιοθήκες: η πρώτη περιείχε τα αντίγραφα των γονιδίων 16S rRNA, η δεύτερη τα αντίγραφα των γονιδίων 18S rRNA και η τρίτη τα αντίγραφα της περιοχής ITS1-ITS2. Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε στην πλατφόρμα Illumina MiSeq στο ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. Κρήτης.

## **2.6. Βιοπληροφορική επεξεργασία των προϊόντων αλληλούχησης**

Η βιοπληροφορική επεξεργασία των προϊόντων αλληλούχησης πραγματοποιήθηκε μέσω της PEMA v. 2.1.4 (Zafeiropoulos et al., 2020), που είναι διαθέσιμη στη συστοιχία υπολογιστών υψηλής υπολογιστικής απόδοσης HPC Zorbas (παρέχεται από το Ι.Θ.Α.Β.Β.ΥΚ., ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε., Zafeiropoulos et al., 2021, <https://hpc.hcmr.gr>).

Εργαλεία/εφαρμογές όπως τα QIIME 2 (Boylen et al., 2019), SLIM (Dufresne et al., 2019), OBI TOOLS <https://git.metabarcoding.org/obitools/obitools/-/wikis/home>), θα μπορούσαν υπό προϋποθέσεις/συνδιαστικά να χρησιμοποιηθούν επίσης για βιοπληροφορική επεξεργασία των προϊόντων αλληλούχησης. Το γεγονός ότι η ροή εργασίας PEMA υποστηρίζει την βιοπληροφορική ανάλυση όλων των γονιδίων «μαρτύρων» (marker genes) που αναλύθηκαν πειραματικά συνετέλεσε στην επιλογή της. Η άμεση διαθεσιμότητα της ροής εργασίας (συμπεριλαμβανομένων όλων των απαραίτητων τρίτων πακέτων λογισμικού) συνετέλεσαν επίσης σε αυτή την επιλογή.

Οι ακατέργαστες αναγνώσεις (ορθή και ανάστροφη) του γονιδίου 16S rRNA για κάθε δείγμα επεξεργάστηκαν με τη χρήση του trimmomatic (v.0.38) (Bolger et al., 2014). Οι αλληλουχίες των δύο άκρων σχηματίστηκαν με τη χρήση του αλγόριθμου PANDAseq (v. 2.11), με ελάχιστη επικάλυψη της ορθής και ανάστροφης ανάγνωσης κάθε δείγματος ορισμένη στα 5 νουκλεοτίδια για το γονίδιο 16S, στα 20 νουκλεοτίδια για το γονίδιο 18S και στα 10 νουκλεοτίδια για την περιοχή ITS1-ITS2. Μόνο αλληλουχίες με μήκος περισσότερο από 150 νουκλεοτίδια κρατήθηκαν για περαιτέρω αναλύσεις. Η ομαδοποίηση σε φυλότυπους (Operational taxonomic Units, OTUs), που είχαν ομοιότητα αλληλουχίας 98%, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αλγορίθμου VSEARCH (v2.9.1) για τα 16S και 18S, και με τον αλγόριθμο SWARM (v2) (Mahé et al., 2015) για την περιοχή ITS1-ITS2. Οι αλληλουχίες χίμαιρες αφαιρέθηκαν είτε με τον αλγόριθμο VSEARCH (v2.9.1.) είτε με τον αλγόριθμο UCHIME\_DENOVO3 (μύκητες). Σε όλες τις περιπτώσεις, η ταξινομική ταυτοποίηση των OTUs έγινε με τη χρήση του αλγορίθμου CREST (version 3.0) και τη βάση δεδομένων Silva\_132 (προκαρυώτες), PR2 (ευκαρυώτες) και PR2 και MIDORI version 2 (μύκητες) (Πίνακας 2.4.). Τέλος, ο

αριθμός των OTUs για κάθε δείγμα και η ταξινομική τους ανάλυση ενσωματώθηκαν σε έναν πίνακα OTU. Ο προκύπτων πίνακας OTU χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω στατιστικές αναλύσεις.

**Πίνακας 2.4.** Πληροφορίες για τις βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν για την ταξινομική ταυτοποίηση των OTUs .

Βάση Δεδομένων (έκδοση)	Ταξινομική ομάδα	Ιστοσελίδα	Βιβλιογραφία
SILVA (132)	Προκαρυώτες	<a href="https://www.arb-silva.de/">https://www.arb-silva.de/</a>	<a href="https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209">https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209</a>
PR2 (4.14.0)	Ευκαρυώτες	<a href="https://pr2-database.org/http://reference-midori.info/index.html">https://pr2-database.org/http://reference-midori.info/index.html</a>	DOI: 10.1111/1755-0998.13465 <a href="https://doi.org/10.1038/sdata.2017.27">https://doi.org/10.1038/sdata.2017.27</a>
MIDORI 2	Μύκητες	<a href="https://pr2-database.org/http://reference-midori.info/index.html">https://pr2-database.org/http://reference-midori.info/index.html</a>	<a href="https://doi.org/10.1038/sdata.2017.27">https://doi.org/10.1038/sdata.2017.27</a>

## **2.7. Στατιστική επεξεργασία**

Έγινε ανάλυση κύριων συνιστωσών (principal coordinate analysis, PCO) για την ομαδοποίηση των δεδομένων. Η ύπαρξη σημαντικών διαφορών στις μικροβιακές κοινότητες ανάμεσα στους σταθμούς δειγματοληψίας ελέγχθηκε εφαρμόζοντας πολυπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης (PERMANOVA) χρησιμοποιώντας τον διαχωριστικό παράγοντα «υδατοκαλλιέργεια» έχοντας δύο επίπεδα: καθόλου υδατοκαλλιέργεια (C) ή υδατοκαλλιέργεια (FARM: OF και MF μαζί) και «στιγμή της ημέρας» έχοντας τρία επίπεδα (morning, noon, evening). Επίσης χρησιμοποιήθηκε και ο παράγοντας «τύπος υδατοκαλλιέργειας» με τρία επίπεδα (C, OF, MF) και ημέρα επανάληψης (D1, D2, D3). Η μηδενική υπόθεση ήταν ότι δεν υπάρχουν διαφορές. Τα πλέγματα ανομοιότητας τύπου Bray-Curtis υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας μετασχηματισμένα βιολογικά δεδομένα (τετραγωνική ρίζα) και οι Ευκλείδειες αποστάσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας κανονικοποιημένα αβιοτικά δεδομένα (Clarke and Ainsworth 1993). Ο έλεγχος υποθέσεων έγινε με 999 μεταθέσεις και για τις δοκιμές ανά ζεύγη χρησιμοποιήθηκε το επίπεδο σημαντικότητας 0.05. Επιπλέον ανάλυση έγινε (redundancy analysis, RDA) για να ελεγχθεί αν η διακύμανση των βιολογικών δεδομένων εξηγήθηκε από τα αβιοτικά δεδομένα (συγκέντρωση θρεπτικών και χλωροφύλλης). Οι αναλύσεις έγιναν με το λογισμικό πακέτο PRIMER v6 (PRIMER-E Ltd, Plymouth Marine Laboratory, Natural Environmental Research Council, UK) με πρόσθετο λογισμικό PERMANOVA + (Anderson et al., 2008).

## **3. Αποτελέσματα**

### **3. 1. Προκαρυώτες**

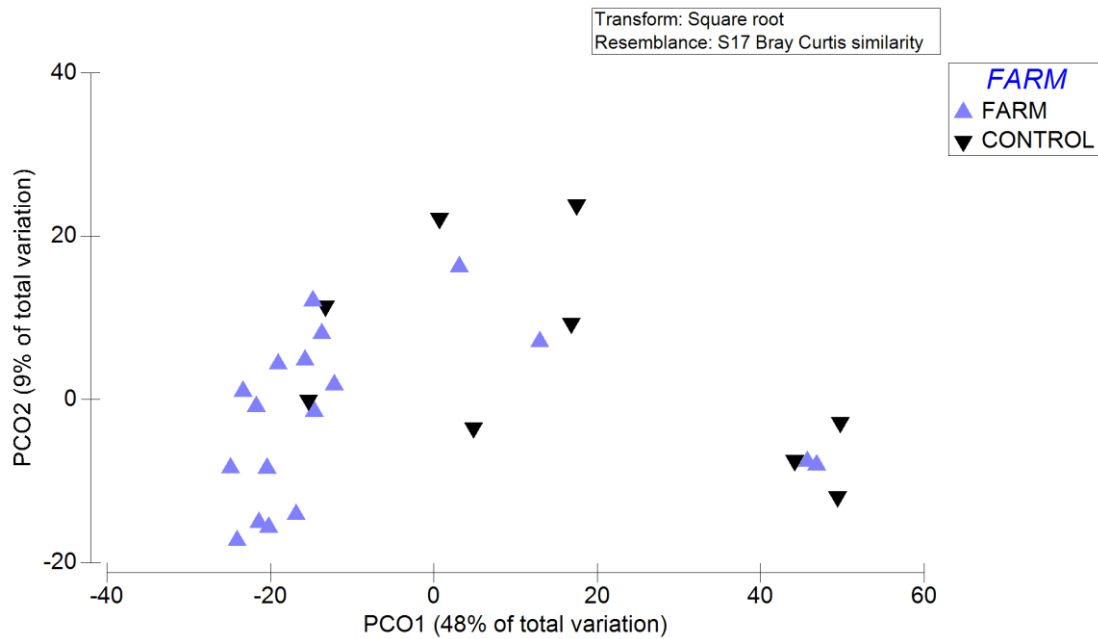
### 3.1.1. Ελεύθεροι προκαρυώτες

Μετά την αφαίρεση των δειγμάτων αρνητικού ελέγχου (blanks), ο τελικός πίνακας OTUs για τους ελεύθερους προκαρυώτες περιελάμβανε 815.242 αλληλουχίες που μετά την επεξεργασία τους απέδωσαν 4.101 OTUs. Ο αριθμός αλληλουχιών ανά δείγμα κυμαινόταν από 2.863 (D2 C noon) έως 70.187 (D2 OF evening), με κατά μέσο όρο 30.194 αλληλουχίες ανά δείγμα.

**Πίνακας 3.1.** Δείκτης ομοιογένειας (J Pielou) και ποικιλότητας (H Shannon-Wiener) για την κοινότητα των ελεύθερων προκαρυωτών και των προκαρυωτών που είναι προσκολλημένοι σε σωματίδια με βάση τα δεδομένα για τη στιγμή της ημέρας (morning, noon, evening) και τον τύπο της υδατοκαλλιέργειας (Control, OF, MF). Οι τιμές προέκυψαν από τον μέσο όρο των τριών ημερών δειγματοληψίας.

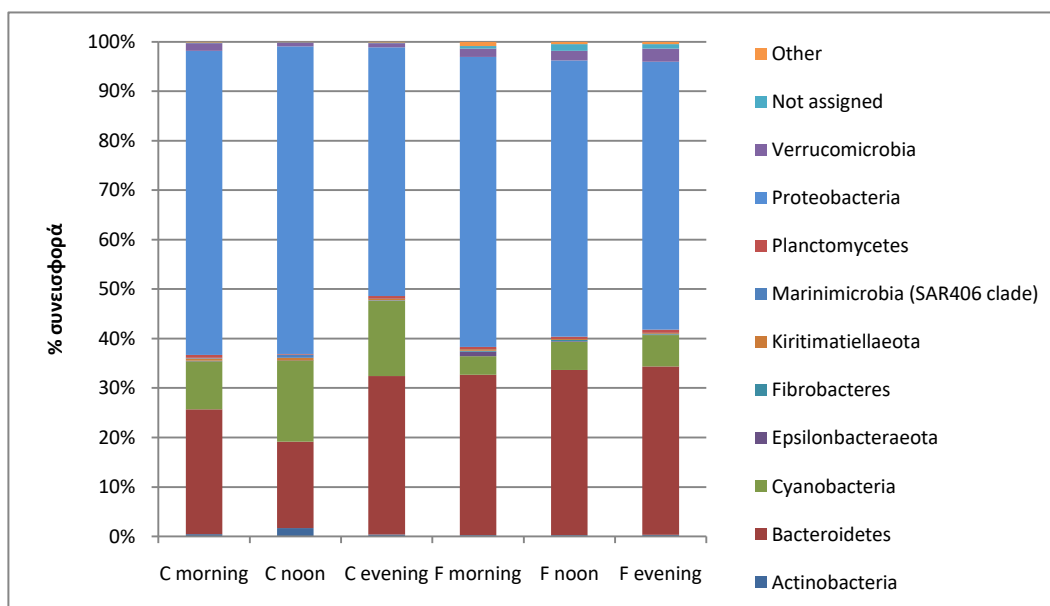
	Ελεύθεροι προκαρυώτες		Προκαρυώτες προσκολλημένοι σε σωματίδια	
	J Pielou δείκτης ομαλότητας	H Shannon-Wiener δείκτης ποικιλότητας	J Pielou δείκτης ομαλότητας	H Shannon-Wiener δείκτης ποικιλότητας
C morning	0.9	5.7	0.9	5.3
C noon	0.9	5.0	0.9	5.6
C evening	0.9	5.8	0.9	5.2
OF morning	0.9	5.6	0.9	5.4
OF noon	0.9	5.9	0.9	5.3
OF evening	0.9	6.0	0.8	5.3
MF morning	0.9	6.3	0.9	5.1
MF noon	0.9	6.1	0.9	5.6
MF evening	0.9	6.2	0.9	5.1

Ο δείκτης προκαρυωτικής ομοιογένειας Pielou δεν παρουσίασε διαφορές μεταξύ των σταθμών δειγματοληψίας (C, OF, MF) ή μεταξύ της στιγμής της ημέρας (morning, noon, evening) και ήταν περίπου 0.9 σε όλες τις περιπτώσεις (Πίνακας 3.1.). Αντιθέτως, ο δείκτης ποικιλότητας Shannon παρουσίασε μια τάση αύξησης από τον σταθμό C προς τους σταθμούς MF (Πίνακας 3.1.) με μέγιστη τιμή 6.3 στους σταθμούς MF morning. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης PERMANOVA έδειξαν ότι στο ταξινομικό επίπεδο του είδους, η επίδραση της υδατοκαλλιέργειας προκάλεσε σημαντικές διαφορές στα πρότυπα της προκαρυωτικής κοινότητας (Pseudo-F=4.59,  $p<0,05$ ), παρόμοια με την επίδραση του τύπου υδατοκαλλιέργειας (Pseudo-F=3.1751,  $p<0,05$ ). Αντίθετα η στιγμή της ημέρας δεν διαφοροποίησε την κοινότητα των ελεύθερων προκαρυωτών. Η διαφοροποίηση των σταθμών με βάση την υδατοκαλλιεργητική δραστηριότητα παρουσιάζεται στην ανάλυση PCO (Εικόνα 3.1.).



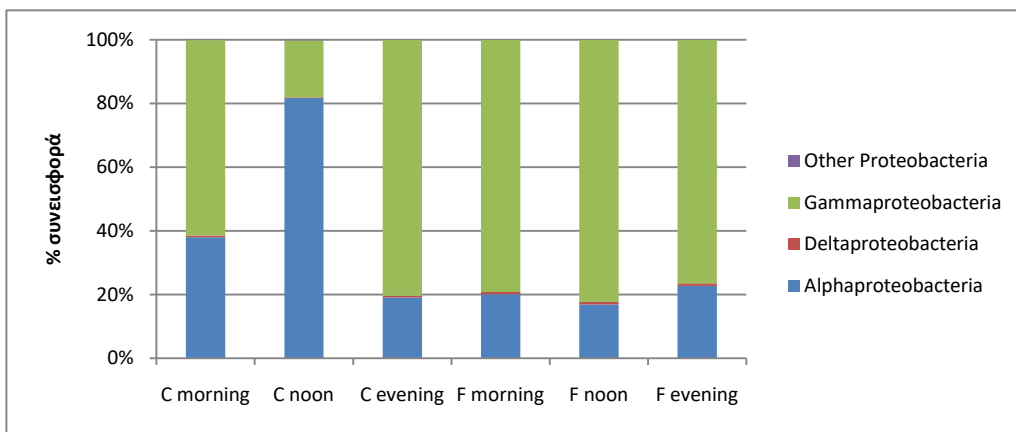
**Εικόνα 3.1.** Το διάγραμμα με βάση την ανάλυση Principal Coordinates (PCO), όπου φαίνεται η διαφοροποίηση στη σύνθεση της ελεύθερης προκαρυωτικής κοινότητας με βάση την παράμετρο «υδατοκαλλιέργεια».

Το φύλο των Proteobacteria ήταν αυτό που καταλάμβανε το μεγαλύτερο ποσοστό των κοινοτήτων των ελεύθερων προκαρυωτών (50%-60%) σε όλους τους σταθμούς ανεξάρτητα από την στιγμή της ημέρας. Δεύτερο σε ποσοστό ήταν το φύλο των Bacteroidetes (20-35%) και τρίτο το φύλο Cyanobacteria. Τα Cyanobacteria καταλάμβαναν μεγαλύτερο ποσοστό στις κοινότητες των ελεύθερων προκαρυωτών στους σταθμούς C (10 με 20%) σε σχέση με τους FARM (περίπου 5%). Σε αντίθεση με τα Cyanobacteria, τα Verrucomicrobia καταλάμβαναν μεγαλύτερο μέρος της κοινότητας στους σταθμούς FARM (Εικόνα 3.2.).



**Εικόνα 3.2.** Η ποσοστιαία συνεισφορά των φύλων των ελεύθερων προκαρυωτών στον σταθμό μάρτυρα (C) και στους σταθμούς με υδατοκαλλιέργειες στις τρεις στιγμές της ημέρας (morning, noon, evening). Οι τιμές προέκυψαν από τον μέσο όρο των τριών ημερών δειγματοληψίας.

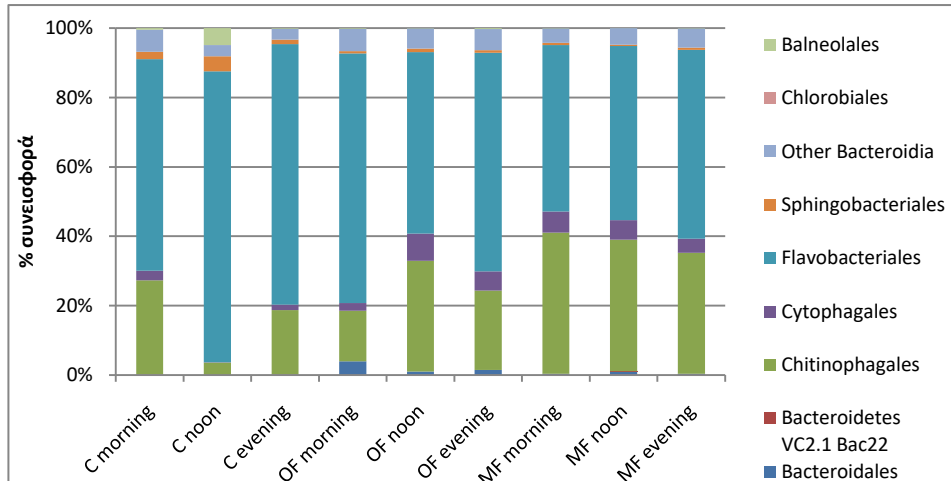
Όσον αφορά τα Proteobacteria, επικράτησε η κλάση Gammaproteobacteria (περίπου 80% επί του συνόλου των Proteobacteria) στους σταθμούς FARM και στις τρεις στιγμές της ημέρας. Αντίστοιχο ποσοστό Gammaproteobacteria παρατηρήθηκε στους σταθμούς C μόνο τη στιγμή evening. Η κλάση Alphaproteobacteria επικράτησε στους σταθμούς C noon ενώ στους σταθμούς C morning οι κλάσεις Alpha- και Gammaproteobacteria συνεισέφεραν περίπου το ίδιο. (Εικόνα 3.3.). Η κλάση Deltaproteobacteria βρέθηκε σε γενικά πολύ χαμηλό ποσοστό (<5%) που όμως ήταν υψηλότερο στους σταθμούς FARM από ότι στους C.



**Εικόνα 3.3.** Η ποσοστιαία συνεισφορά των κλάσεων των Proteobacteria στον σταθμό μάρτυρα (C) και στους σταθμούς με υδατοκαλλιέργειες στις τρεις στιγμές της ημέρας (morning, noon, evening). Οι τιμές προέκυψαν από τον μέσο όρο των τριών ημερών δειγματοληψίας.

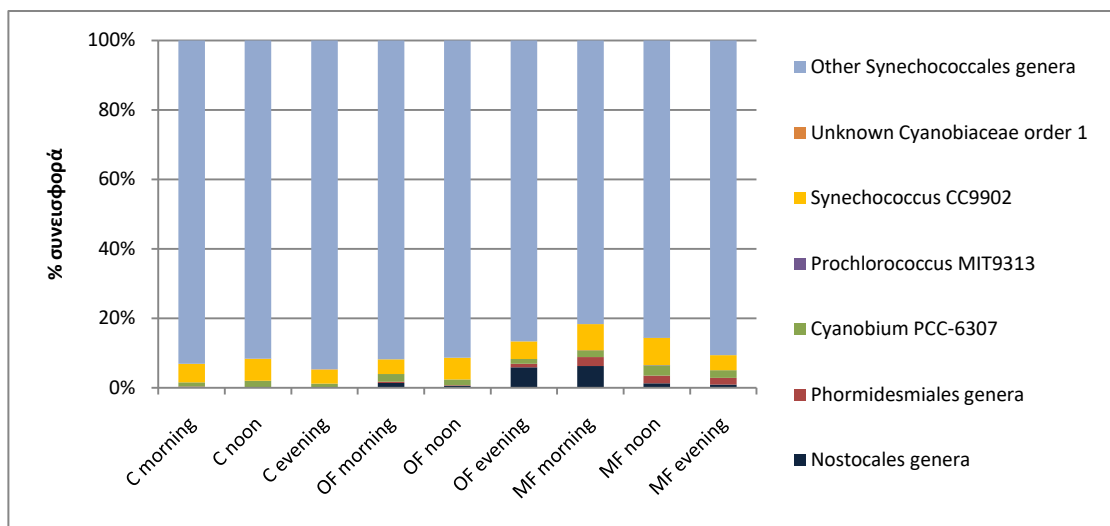
Στο φύλο Bacteroidetes, η επικρατούσα τάξη ήταν τα Flavobacteriales, η οποία κυμαινόταν από 50% στους MF morning έως 80% στους C noon (Εικόνα 3.4.). Επόμενη σε ποσοστιαία συνεισφορά ήταν η τάξη Chitinophagales με ένα ιδιαίτερο πρότυπο σε σχέση με την υδατοκαλλιέργεια: η ποσοστιαία συνεισφορά αυτής της τάξης βρέθηκε να αυξάνεται από τους σταθμούς C στους σταθμούς με έναν κλωβό (OF) και ακόμα περισσότερο στους σταθμούς με πολλούς κλωβούς (MF) φτάνοντας εκεί περίπου 40%. Επίσης, μεγαλύτερη ποσοστιαία συνεισφορά στους σταθμούς με υδατοκαλλιέργειες σε σχέση με τους σταθμούς C παρουσίασε και η τάξη Cytophagales (Εικόνα 3.4.) φτάνοντας ως και 10% συνεισφορά στους σταθμούς OF/MF.





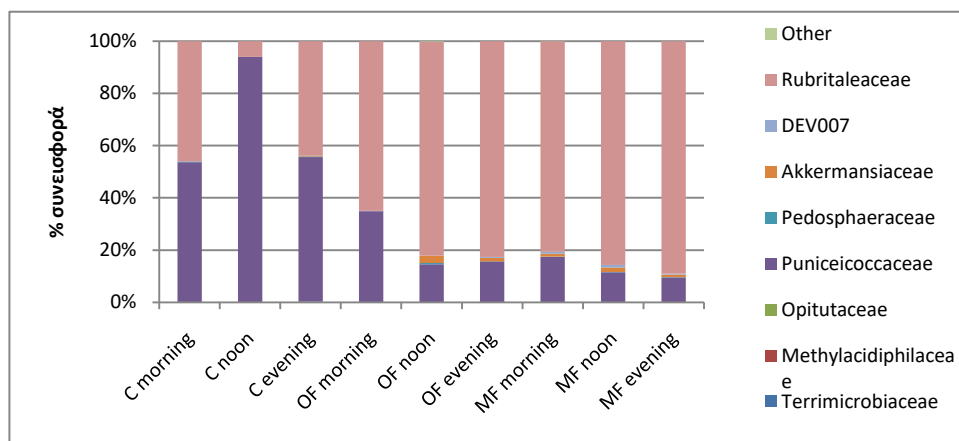
**Εικόνα 3.4.** Η ποσοστιαία συνεισφορά των τάξεων των Bacteroidetes στο σταθμό μάρτυρα (C) και στους σταθμούς με έναν κλωβό (OF) και πολλούς κλωβούς (MF) στις τρεις στιγμές της ημέρας (morning, noon, evening). Οι τιμές προέκυψαν από τον μέσο όρο των τριών ημερών δειγματοληψίας.

Όσον αφορά το φύλο Cyanobacteria, βρέθηκε πως οι περισσότερες αλληλουχίες ταξινομήθηκαν εντός της τάξης *Synechococcales* (από 80 έως και 95%) αλλά το γένος ή είδος τους παρέμεινε αδιευκρίνιστο σε όλους τους σταθμούς. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.5., οι σταθμοί OF και MF διέφεραν από τους C καθώς οι πρώτοι είχαν υψηλότερη ποικιλομορφία. Συγκεκριμένα τα γένη *Phormidesmiales* και *Nostocales* είχαν ιδιαίτερη συνεισφορά στους OF/MF.



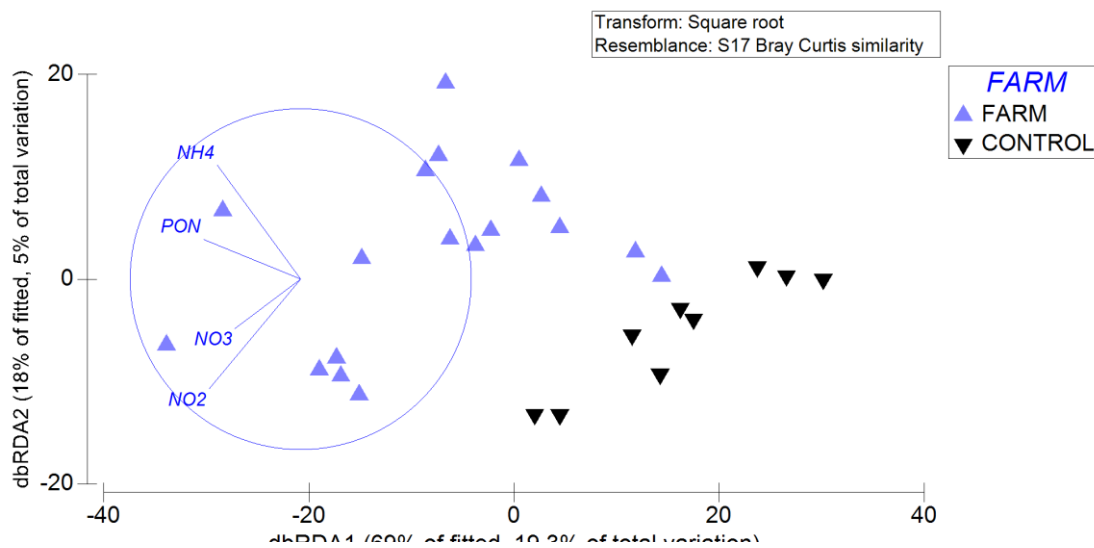
**Εικόνα 3.5.** Η ποσοστιαία συνεισφορά των γενών των Cyanobacteria στο σταθμό μάρτυρα (C) και στους σταθμούς με έναν κλωβό (OF) και πολλούς κλωβούς (MF), στις τρεις στιγμές της ημέρας (morning, noon, evening). Οι τιμές προέκυψαν από τον μέσο όρο των τριών ημερών δειγματοληψίας.

Τέλος, διαφορές ανάμεσα στους C και OF/MF παρατηρήθηκαν και στο φύλο Verrucocomicrobia όπου το ποσοστό της οικογένειας *Rubritaleaceae* κυμαινόταν από 5 ως 35% στον σταθμό μάρτυρα, μεταξύ 65 και 85% στους σταθμούς με έναν κλωβό, και μεταξύ 80 και 90% στους σταθμούς με πολλούς κλωβούς. Την αντίθετη τάση παρουσίασε η οικογένεια *Puniceicoccaceae* (Εικόνα 3.6.).



**Εικόνα 3.6.** Η ποσοστιαία συνεισφορά των οικογενειών των Verrucocomicrobia στο σταθμό μάρτυρα (C) και στους σταθμούς με έναν κλωβό (OF) και πολλούς κλωβούς (MF), στις τρεις στιγμές της ημέρας (morning, noon, evening). Οι τιμές προέκυψαν από τον μέσο όρο των τριών ημερών δειγματοληψίας.

Τα πρότυπα της κοινότητας των ελεύθερων προκαρυωτών στο ταξινομικό επίπεδο του είδους συσχετίστηκαν σημαντικά με τις ακόλουθες μεταβλητές: οι συγκεντρώσεις των PON, NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub> και NO<sub>2</sub> (R<sup>2</sup>=0.28033, p<0,05). Όταν στο γραμμικό μοντέλο εισήχθησαν μόνο αυτές οι τέσσερις σημαντικές παράμετροι (κριτήριο επιλογής: AICc, διαδικασία επιλογής: σταδιακή), βρέθηκε ότι το 24% της μεταβλητότητας των κοινοτήτων των ελεύθερων προκαρυωτών εξηγήθηκε από τη σωρευτική δράση τους (p<0,05) (Εικόνα 3.7.).

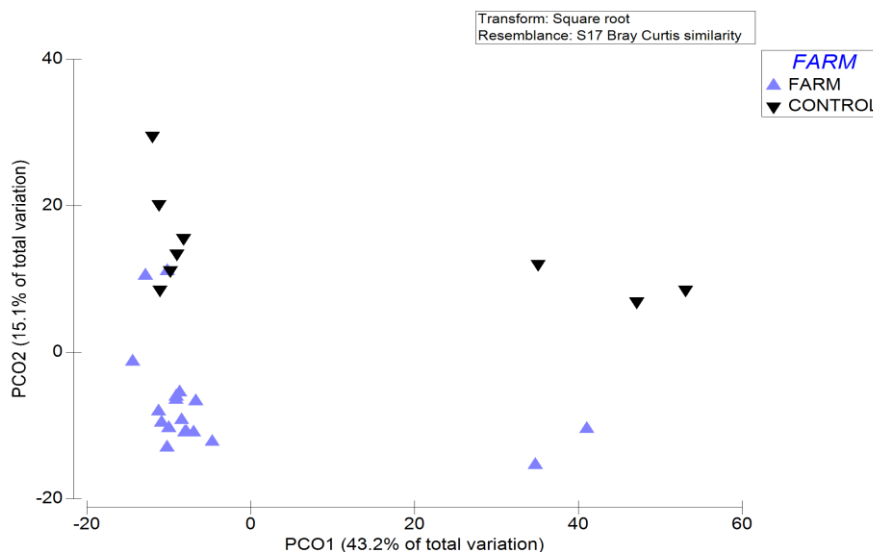


**Εικόνα 3.7.** Ανάλυση τύπου distance-based redundancy analysis (dbRDA) για τις κοινότητες των ελεύθερων προκαρυωτών στο ταξινομικό επίπεδο του είδους βάσει της παραμέτρου της ύπαρξης υδατοκαλλιεργειών ή όχι. Μόνο οι στατιστικά σημαντικές αβιοτικές παράμετροι χρησιμοποιούνται στο μοντέλο (δηλαδή, οι συγκεντρώσεις των PON, NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub> και NO<sub>2</sub>). Το μήκος των γραμμών δείχνει τη σχετική ένταση συσχέτισης. Η ομοιότητα των κοινοτήτων βασίστηκε στον υπολογισμό του δείκτη Bray Curtis μετά από μετασχηματισμό των 16S rRNA γονιδίων (τετραγωνική ρίζα).

### 3.1.2. Προκαρυώτες προσκολλημένοι σε σωματίδια

Μετά την αφαίρεση των δειγμάτων αρνητικού ελέγχου, ο τελικός πίνακας OTUs για τους προκαρυώτες που είναι προσκολλημένοι σε σωματίδια περιελάμβανε 2.017.116 αλληλουχίες που μετά την επεξεργασία τους απέδωσαν 4.101 OTUs. Ο αριθμός αλληλουχιών ανά δείγμα κυμαινόταν από 9.777 (D2 OF morning) έως 527.598 (D1 OF evening), με κατά μέσο όρο 74.708 αλληλουχίες ανά δείγμα.

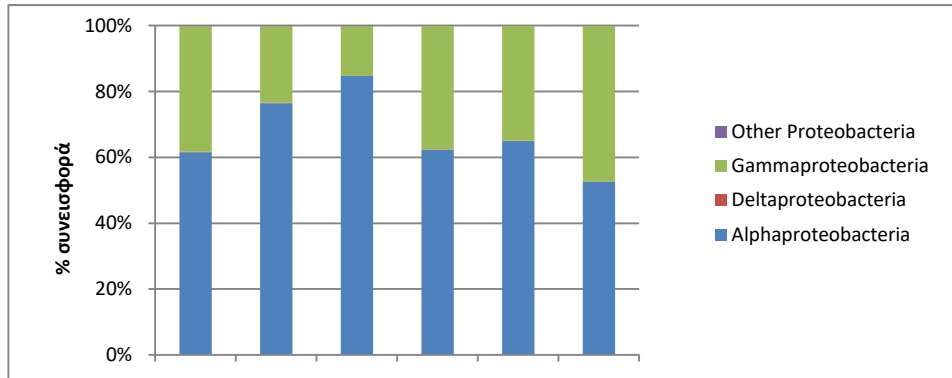
Ο δείκτης προκαρυωτικής ομοιογένειας Pielou και ο δείκτης ποικιλότητας Shannon δεν παρουσίασαν διαφορές μεταξύ των σταθμών δειγματοληψίας ή μεταξύ της στιγμής της ημέρας για τις κοινότητες των προκαρυωτών που είναι προσκολλημένα σε σωματίδια (Πίνακας 3.1.). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης PERMANOVA έδειξαν ότι στο ταξινομικό επίπεδο του είδους, η επίδραση της υδατοκαλλιεργητικής δραστηριότητας προκάλεσε σημαντικές διαφορές στα πρότυπα της προκαρυωτικής κοινότητας (Pseudo-F=4.778,  $p < 0,05$ ), παρόμοια με την επίδραση του τύπου υδατοκαλλιέργειας (Pseudo-F=2.7429,  $p < 0,05$ ). Τέλος, η ανάλυση έδειξε ότι και η στιγμή της ημέρας προκάλεσε σημαντικές διαφορές (Pseudo-F=2.1034,  $p < 0,05$ ). Η διαφοροποίηση των σταθμών με βάση την υδατοκαλλιεργητική δραστηριότητα παρουσιάζεται στην ανάλυση PCO (Εικόνα 3.8.).



**Εικόνα 3.8.** Το διάγραμμα με βάση την ανάλυση Principal Coordinates (PCO), όπου φαίνεται η διαφοροποίηση στη σύνθεση της κοινότητας προκαρυωτών που είναι προσκολλημένοι σε σωματίδια με βάση την παράμετρο «υδατοκαλλιέργεια».

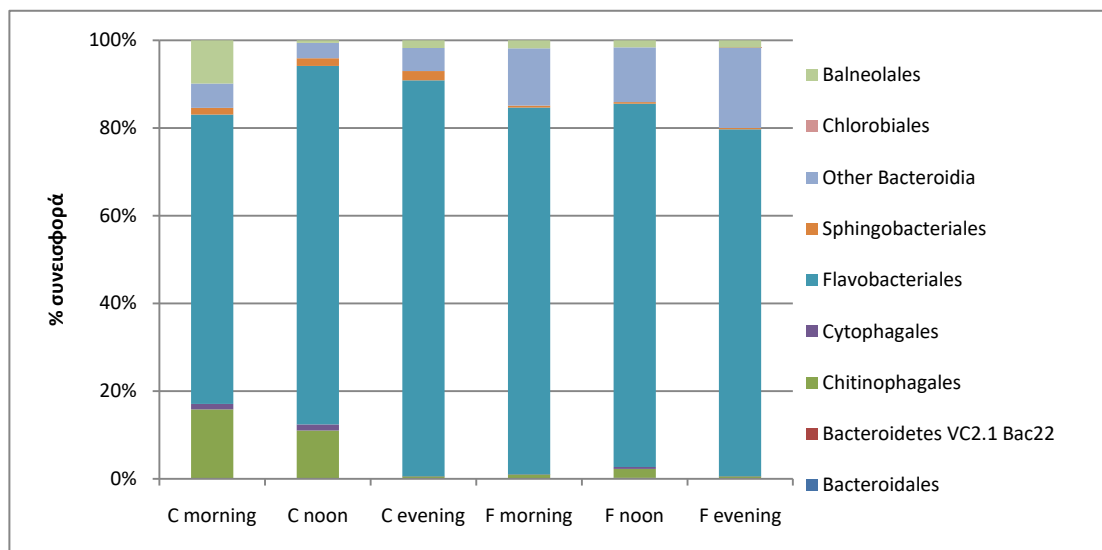
Το φύλο των Proteobacteria ήταν αυτό που καταλάμβανε το μεγαλύτερο μέρος των κοινοτήτων των προσκολλημένων σε σωματίδια προκαρυωτών (45-55%) σε όλους τους σταθμούς και στις τρεις διαφορετικές στιγμές της ημέρας. Ακολούθησε σε ποσοστιαία συνεισφορά το φύλο των Bacteroidetes (10-30%) που καταλάμβανε μεγαλύτερο ποσοστό στους σταθμούς FARM (περίπου 30%) από ότι στους C (10-20%). Αντιθέτως, το φύλο Cyanobacteria είχε μεγαλύτερη ποσοστιαία συνεισφορά στους σταθμούς C, με το μεγαλύτερο ποσοστό τους (περίπου 35%) να καταγράφεται τη στιγμή morning. Όπως και με τους ελεύθερους προκαρυώτες, τα Cyanobacteria απαρτίζονταν σχεδόν αποκλειστικά από την τάξη *Synechococcales* (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

Ανάμεσα στις κλάσεις των Proteobacteria, η επικρατέστερη ήταν τα Alphaproteobacteria σε όλους τους σταθμούς και στιγμές της ημέρας (Εικόνα 3.9.). Στην Εικόνα 3.9. φαίνεται μια τάση αύξησης του ποσοστού των Alphaproteobacteria από τη στιγμή morning (περίπου 60%) προς τη στιγμή evening (περίπου 80%) στους C. Η αντίθετη ακριβώς τάση φαίνεται για τα Gammaproteobacteria. Στους σταθμούς FARM το ποσοστό των Alphaproteobacteria δεν ξεπέρασε το 65%.



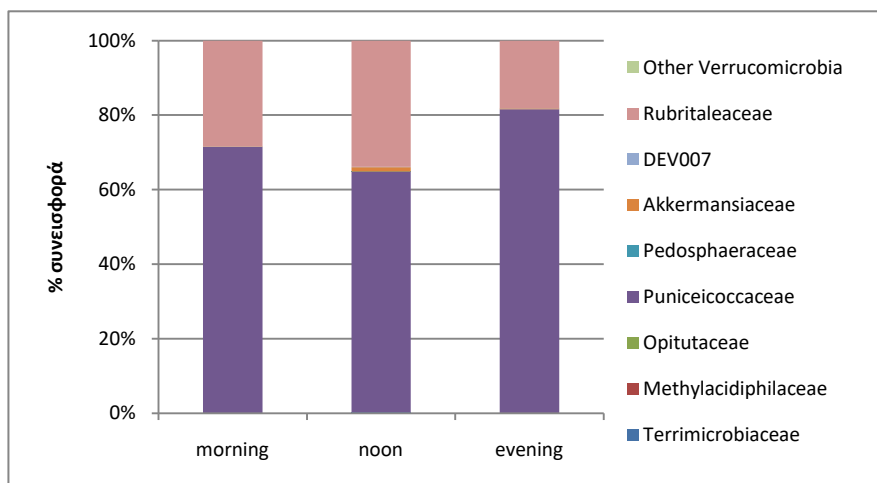
**Εικόνα 3.9.** Οι κλάσεις των Proteobacteria και η ποσοστιαία συνεισφορά τους στον σταθμό μάρτυρα (C ) και στους σταθμούς με υδατοκαλλιέργειες στις τρεις στιγμές της ημέρας (morning, noon, evening). Οι τιμές προέκυψαν από τον μέσο όρο των τριών ημερών δειγματοληψίας.

Στο φύλο Bacteroidetes, η κυρίαρχη τάξη ήταν τα Flavobacteriales (70-90%). Οι σταθμοί μάρτυρες παρουσίασαν μεγαλύτερη ποικιλομορφία σε σχέση με τους FARM, ιδιαίτερα τις στιγμές morning και noon. Η τάξη Chitinophagales αποτέλεσε το 10% και 20% των κοινοτήτων των προσκολλημένων σε σωματίδια προκαρυωτών στους C τις στιγμές noon και morning αντίστοιχα, ενώ στους σταθμούς με υδατοκαλλιέργειες η ίδια τάξη καταλάμβανε πολύ μικρό ποσοστό των κοινοτήτων. Το ίδιο αποτέλεσμα βρέθηκε και για την τάξη Sphingobacteriales, που όμως η ποσοστιαία αφθονία της ήταν αρκετά μικρότερη (Εικόνα 3.10.).



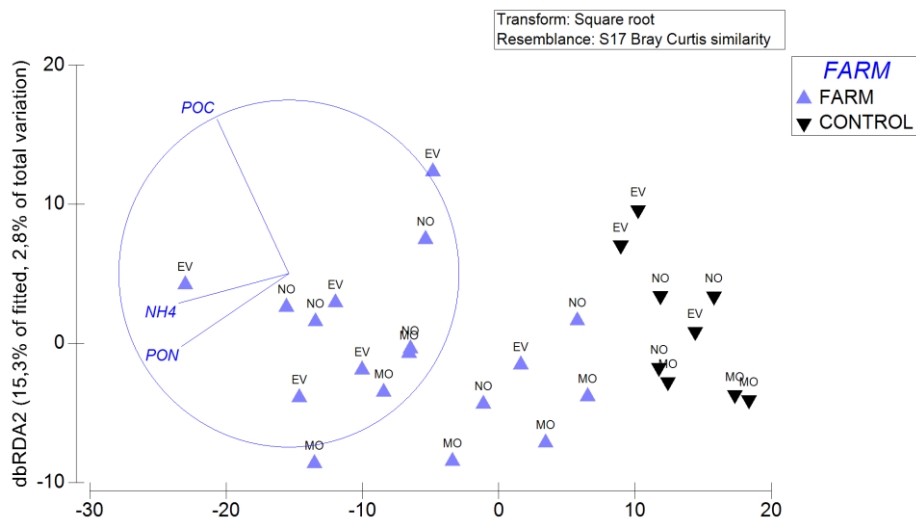
**Εικόνα 3.10.** Οι τάξεις των Bacteroidetes και η ποσοστιαία συνεισφορά τους στο σταθμό μάρτυρα (C) και στους σταθμούς με υδατοκαλλιέργειες (F) στις τρεις στιγμές της ημέρας (morning, noon, evening). Οι τιμές προέκυψαν από τον μέσο όρο των τριών ημερών δειγματοληψίας.

Τέλος, στο φύλο Verrucomicrobia, το οποίο γενικά είχε πολύ μικρή συνεισφορά στη σύνθεση των κοινοτήτων των προσκολλημένων σε σωματίδια προκαρυωτών (<2%), επικρατέστερη ήταν η οικογένεια *Puniceococcaceae* από 65% τη στιγμή noon έως και 80% τη στιγμή evening συνυπολογίζοντας όλους τους σταθμούς. Το ποσοστό της οικογένειας *Rubritaleaceae* κυμάνθηκε από 20% τη στιγμή evening έως και 35% τη στιγμή noon (Εικόνα 3.11.).

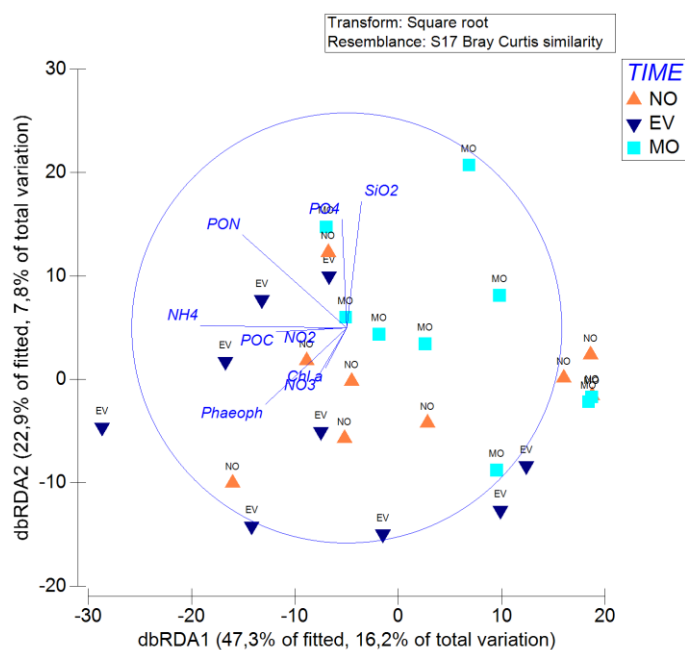


**Εικόνα 3.11.** Οι οικογένειες των Verrucomicrobia και η ποσοστιαία συνεισφορά τους στις τρεις στιγμές της ημέρας (morning, noon, evening). Οι τιμές προέκυψαν από τον μέσο όρο των τριών ημερών δειγματοληψίας.

Τα πρότυπα της κοινότητας των προκαρυωτών που είναι προσκολλημένα σε σωματίδια στο ταξινομικό επίπεδο του είδους συσχετίστηκαν σημαντικά με τις ακόλουθες μεταβλητές: συγκεντρώσεις των POC, PON και  $\text{NH}_4$  ( $R^2=0,18012$ ,  $p<0,05$ ). Όταν στο γραμμικό μοντέλο εισήχθησαν μόνο αυτές οι τρεις σημαντικές παράμετροι (κριτήριο επιλογής: AICc, διαδικασία επιλογής: σταδιακή), βρέθηκε ότι το 17% της μεταβλητότητας των κοινοτήτων των προσκολλημένων σε σωματίδια προκαρυωτών εξηγήθηκε από τη σωρευτική δράση τους ( $p<0,05$ ) (Εικόνα 3.12.).



**Εικόνα 3.12.** Ανάλυση τύπου distance-based redundancy analysis (dbRDA) για τις κοινότητες των βακτηρίων που είναι προσκολλημένα σε σωματίδια στο ταξινομικό επίπεδο του είδους βάσει της παραμέτρου της ύπαρξης υδατοκαλλιεργειών ή όχι. Μόνο οι στατιστικά σημαντικές αβιοτικές παράμετροι χρησιμοποιούνται στο μοντέλο (δηλαδή, οι συγκεντρώσεις των POC, PON και NH<sub>4</sub>). Το μήκος των γραμμών δείχνει τη σχετική ένταση συσχέτισης. Η ομοιότητα των κοινοτήτων βασίστηκε στον υπολογισμό του δείκτη Bray Curtis μετά από μετασχηματισμό των 16S rRNA γονιδίων (τετραγωνική ρίζα).

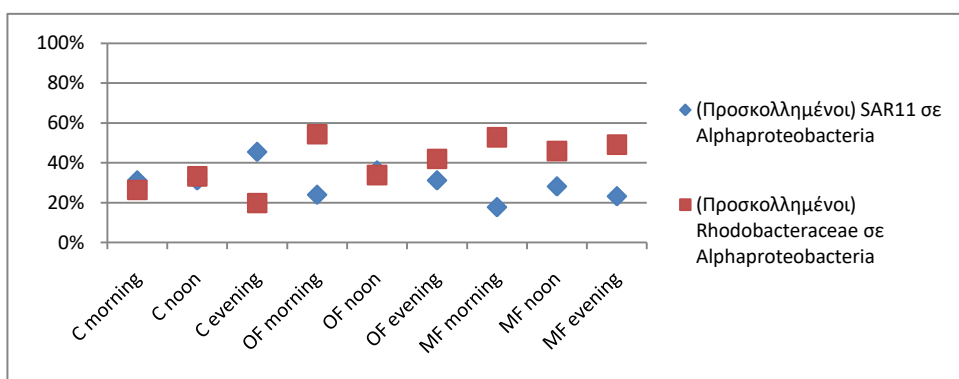
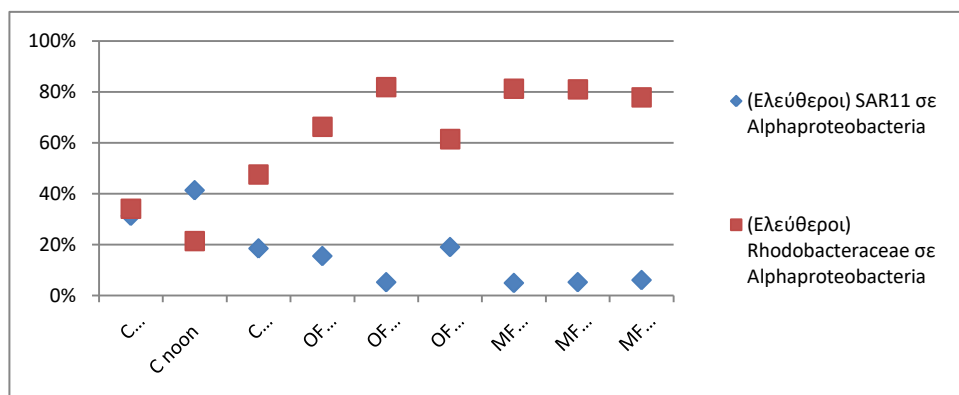


**Εικόνα 3.13.** Ανάλυση τύπου distance-based redundancy analysis (dbRDA) για τις κοινότητες των βακτηρίων που είναι προσκολλημένα σε σωματίδια στο ταξινομικό επίπεδο του είδους βάσει της παραμέτρου της στιγμής της ημέρας. Το μήκος των γραμμών δείχνει τη σχετική ένταση συσχέτισης. Η ομοιότητα των κοινοτήτων βασίστηκε στον υπολογισμό του δείκτη Bray Curtis μετά από μετασχηματισμό των 16S rRNA γονιδίων (τετραγωνική ρίζα).

### 3.1.3. Στελέχη SAR11 και *Rhodobacteraceae*

Δύο στελέχη προκαρυωτών εντός της κλάσης Alphaproteobacteria επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση: το SAR11 και η οικογένεια *Rhodobacteraceae* που είναι από τα επικρατέστερα στελέχη στο σύνολο των προκαρυωτών και στα Alphaproteobacteria ειδικότερα. Η επιλογή έγινε καθώς τα δύο στελέχη έχουν αντίθετες στρατηγικές ανάπτυξης στη στήλη του νερού (το πρώτο είναι ολιγοτροφικό και το δεύτερο ευκαιριακό) και γι' αυτό πιθανόν να παρουσιάζουν διαφορετική ανάπτυξη στους σταθμούς υδατοκαλλιέργειας.

Στους ελεύθερους προκαρυώτες, το ποσοστό του στελέχους SAR11 στα Alphaproteobacteria κυμάνθηκε από 19 έως 41% στους σταθμούς C, από 5% έως 19% στους OF και από 5 έως 6% στους MF (Εικόνα 3.14.α). Αντίστοιχα το ποσοστό του SAR11 σε όλους τους προκαρυώτες κυμάνθηκε από 2 έως 19% στους σταθμούς C, από 1 έως 7% στους OF και από 0 έως 1% στους MF στις διάφορες στιγμές της ημέρας. Ήταν χαρακτηριστικό πως η οικογένεια *Rhodobacteraceae* είχε ακριβώς το αντίθετο μοτίβο: το ποσοστό της οικογένειας στα Alphaproteobacteria κυμάνθηκε από 21 έως 48% στους C, από 61 έως 82% στους OF και από 78 έως 81% στους MF στις διάφορες στιγμές της ημέρας (Εικόνα 3.13.). Επιπλέον το ποσοστό της οικογένειας σε όλους τους προκαρυώτες κυμάνθηκε από 4 έως 7% στους C, από 7 έως 10% στους OF και από 7 έως 9% στους MF.





**Εικόνα 3.14.** Η τάση που εμφανίζει η ποσοστιαία συνεισφορά των SAR11 και *Rhodobacteraceae* στα Alpharproteobacteria στους ελεύθερους προκαρυώτες (**α, επάνω**) και στους προκαρυώτες που είναι προσκολλημένοι σε σωματίδια (**β, κάτω**).

Στους προκαρυώτες που είναι προσκολλημένοι σε σωματίδια, το ποσοστό του στελέχους SAR11 στα Alpharproteobacteria κυμάνθηκε από 31 έως 46% στους σταθμούς C, από 24 έως 36% στους OF και από 18 έως 28% στους MF (Εικόνα 3.14.). Αντίστοιχα το ποσοστό του στελέχους σε όλους τους προσκολλημένους σε σωματίδια προκαρυώτες, κυμάνθηκε από 9 έως 24% στους σταθμούς C, από 6 έως 14% στους OF και από 7 έως 10% στους MF. Αντίθετα, το ποσοστό της οικογένειας *Rhodobacteraceae* των Alpharproteobacteria κυμάνθηκε από 20 έως 33% στους C, από 34 έως 54% στους OF και από 46 έως 53% στους MF στις διάφορες στιγμές της ημέρας (Εικόνα 3.14.β). Αντίστοιχα το ποσοστό της σε όλους τους προσκολλημένους σε σωματίδια προκαρυώτες, κυμάνθηκε από 3 έως 10% στους σταθμούς C, από 13 έως 14% στους OF και από 11 έως 18% στους MF.

## **3. 2. Ευκαρυώτες**

### **3.2.1. Μεσο-ζωοπλαγκτόν**

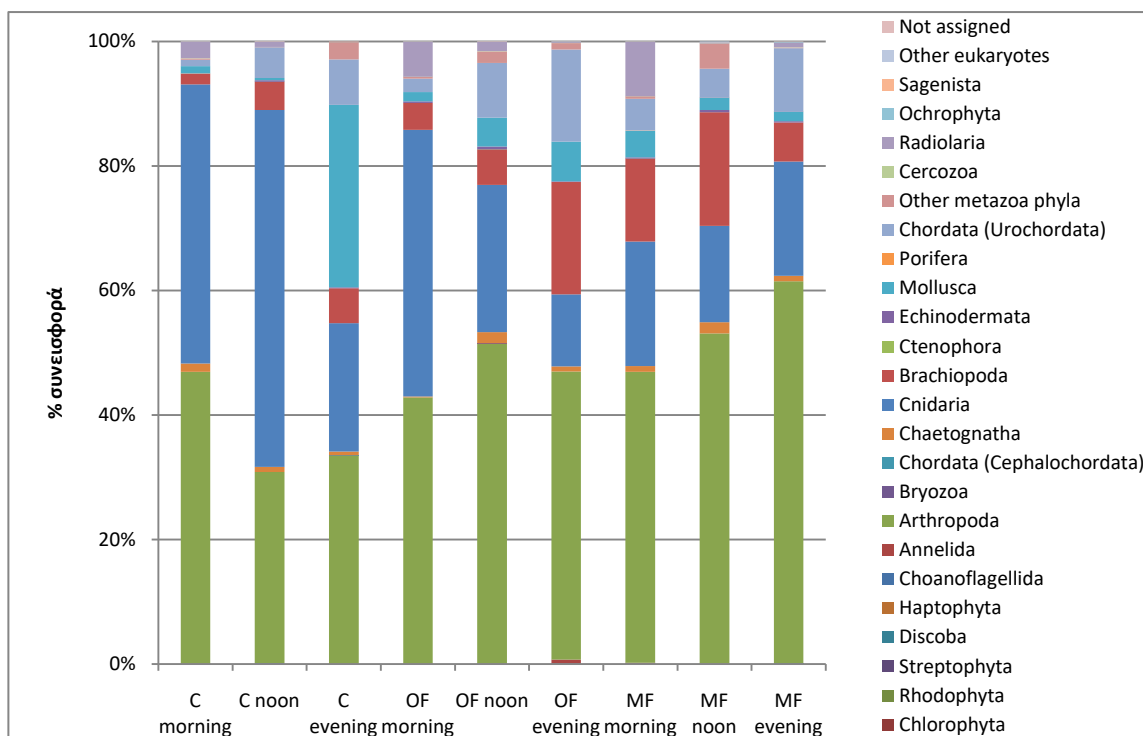
Μετά την αφαίρεση τεσσάρων δειγμάτων (D1 MF noon, D1 C evening, D1 C morning, D1 OF morning) που είχαν πολύ λίγες αλληλουχίες, ο τελικός πίνακας OTUs για το μεσο-ζωοπλαγκτόν (κλάση μεγέθους >200 μm) περιελάμβανε 351.211 αλληλουχίες που μετά την επεξεργασία τους απέδωσαν 1.177 OTUs. Ο αριθμός αλληλουχιών ανά δείγμα κυμαινόταν από 4.970 (D2 OF morning) έως 68.141 (D1 MF evening), με κατά μέσο όρο 15.270 αλληλουχίες ανά δείγμα.

Ο δείκτης ομοιογένειας Pielou δεν παρουσίασε διαφορές μεταξύ των σταθμών δειγματοληψίας ή μεταξύ της στιγμής της ημέρας για τις κοινότητες του μεσο-ζωοπλαγκτού, ενώ και ο δείκτης ποικιλότητας Shannon δεν ακολούθησε κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο (Πίνακας 3.2.). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης PERMANOVA έδειξαν ότι στο ταξινομικό επίπεδο του είδους, ο τύπος της υδατοκαλλιέργειας οδήγησε σε σημαντικές διαφορές (Pseudo-F=2,3275,  $p<0,05$ ). Επίσης, η επίδραση της ημέρας δειγματοληψίας (D1, D2, D3) προκάλεσε σημαντικές διαφορές στα πρότυπα της κοινότητας μεσο-ζωοπλαγκτού (Pseudo-F=5,9096,  $p<0,05$ ).

**Πίνακας 3.2.** Δείκτης ομοιογένειας (J Pielou) και ποικιλότητας (H Shannon-Wiener) για τις κοινότητες του μεσο-ζωοπλαγκτού και των πικο-νανο ευκαρυωτών με βάση τα δεδομένα για τη στιγμή της ημέρας (morning, noon, evening) και τον τύπο του σταθμού δειγματοληψίας (C, OF, MF). Οι τιμές προέκυψαν από τον μέσο όρο των τριών ημερών δειγματοληψίας.

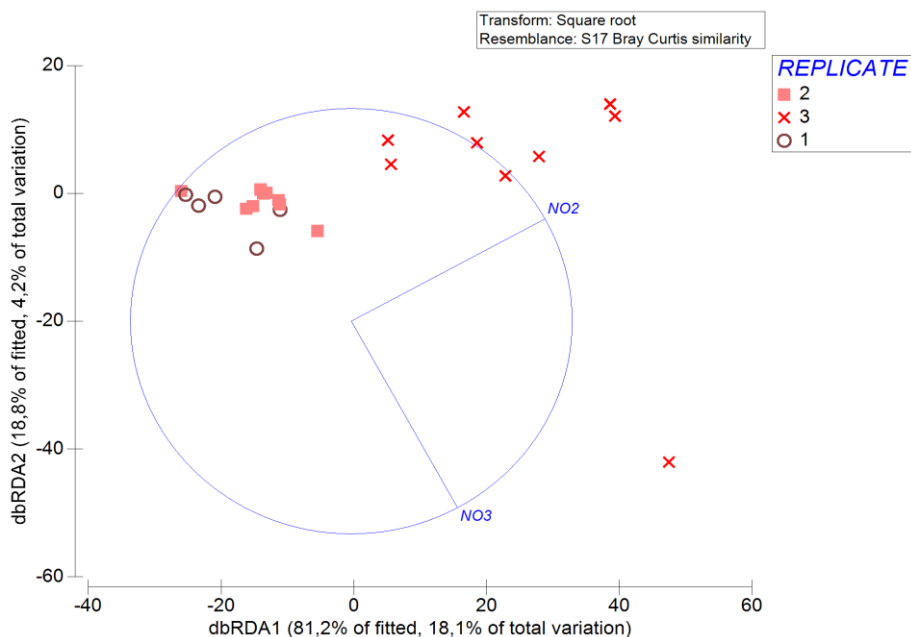
	Μεσο-ζωοπλαγκτόν		Πικο-Νανο Ευκαρυώτες	
	J Pielou δείκτης ομαλότητας	H Shannon-Wiener δείκτης ποικιλότητας	J Pielou δείκτης ομαλότητας	H Shannon-Wiener δείκτης ποικιλότητας
<b>C morning</b>	0.9	5.3	0.9	6.7
<b>C noon</b>	0.9	4.9	0.9	5.8
<b>C evening</b>	0.9	5.0	0.9	5.5
<b>OF morning</b>	0.9	5.0	0.9	5.7
<b>OF noon</b>	0.9	5.1	0.9	5.8
<b>OF evening</b>	0.9	4.9	0.9	5.8
<b>MF morning</b>	0.9	5.0	0.9	6.3
<b>MF noon</b>	0.9	4.8	0.9	6.5
<b>MF evening</b>	0.9	5.0	0.9	6.1

Η ανάλυση της σύνθεσης των κοινοτήτων μεσο-ζωοπλαγκτού έδειξε πως το επικρατές φύλο ήταν τα Arthropoda (έως και 60%), αποτελούμενο αποκλειστικά από Crustacea, στα οποία βρέθηκαν Maxillopoda, Malacostraca και κάποια Branchiopoda ενώ τα περισσότερα ήταν άγνωστα Crustacea. Το φύλο των Arthropoda είχε μεγαλύτερη ποσοστιαία συνεισφορά στους σταθμούς με υδατοκαλλιεργητική δραστηριότητα (FARM), σε αντίθεση με το δεύτερο πιο επικρατές φύλο των Cnidaria, που καταλάμβανε μεγαλύτερο μέρος της κοινότητας στους C (έως και 60% το μεσημέρι). Το φύλο Cnidaria αποτελούνταν κυρίως από Hydrozoa. Επίσης, βρέθηκε πως στους σταθμούς MF το ποσοστό των Arthropoda ήταν υψηλότερο τη στιγμή morning (45%) προς την noon (55%) και την evening (60%). Όπως και τα Arthropoda, το φύλο Mollusca είχε μεγαλύτερη ποσοστιαία συνεισφορά στους σταθμούς FARM, με εξαίρεση το σταθμό μάρτυρα την στιγμή evening όπου μετρήθηκε το μέγιστο ποσοστό του φύλου (30%). Τέλος, το φύλο Brachiozoa είχε υψηλότερη συνεισφορά στους FARM (5-20%) από ότι στους C (έως 5%), ενώ και το φύλο Radiolaria εμφάνισε σε κάποιους σταθμούς υψηλή ποσοστιαία συνεισφορά (OF morning, MF morning, περίπου 10%). (Εικόνα 3.15.).



**Εικόνα 3.15.** Η ποσοστιαία συνεισφορά των φύλων στις κοινότητες μεσο-ζωοπλαγκτού στον σταθμό μάρτυρα (C), στο σταθμό με έναν κλωβό (OF) και στο σταθμό με πολλούς κλωβούς (MF) στις τρεις στιγμές της ημέρας (morning, noon, evening). Οι τιμές προέκυψαν από τον μέσο όρο των τριών ημερών δειγματοληψίας.

Τα πρότυπα της κοινότητας του μεσο-ζωοπλαγκτού στο ταξινομικό επίπεδο του είδους συσχετίστηκαν σημαντικά με τις ακόλουθες μεταβλητές: συγκεντρώσεις  $\text{NO}_3$  και  $\text{NO}_2$  ( $R^2=0,22244$ ,  $p<0,05$ ). Όταν στο γραμμικό μοντέλο εισήχθησαν μόνο οι δύο σημαντικές παράμετροι (κριτήριο επιλογής: AICc, διαδικασία επιλογής: σταδιακή), βρέθηκε ότι το μόλις το 22% της μεταβλητότητας των κοινοτήτων του μεσο-ζωοπλαγκτού εξηγήθηκε από τη σωρευτική δράση τους ( $p<0,05$ ) με ιδιαίτερα έντονο τον διαχωρισμό της τρίτης ημέρας δειγματοληψίας (Εικόνα 3.16.).



**Εικόνα 3.16.** Ανάλυση τύπου distance-based redundancy analysis (dbRDA) για τις κοινότητες του μεσο-ζωοπλαγκτού στο ταξινομικό επίπεδο του είδους βάσει της παραμέτρου της ημέρας δειγματοληψίας. Μόνο οι στατιστικά σημαντικές αβιοτικές παράμετροι χρησιμοποιούνται στο μοντέλο (δηλαδή, οι συγκεντρώσεις των θρεπτικών  $\text{NO}_3$  και  $\text{NO}_2$ ). Το μήκος των γραμμών δείχνει τη σχετική ένταση συσχέτισης. Η ομοιότητα των κοινοτήτων βασίστηκε στον υπολογισμό του δείκτη Bray Curtis μετά από μετασχηματισμό των 18S rRNA γονιδίων (τετραγωνική ρίζα).

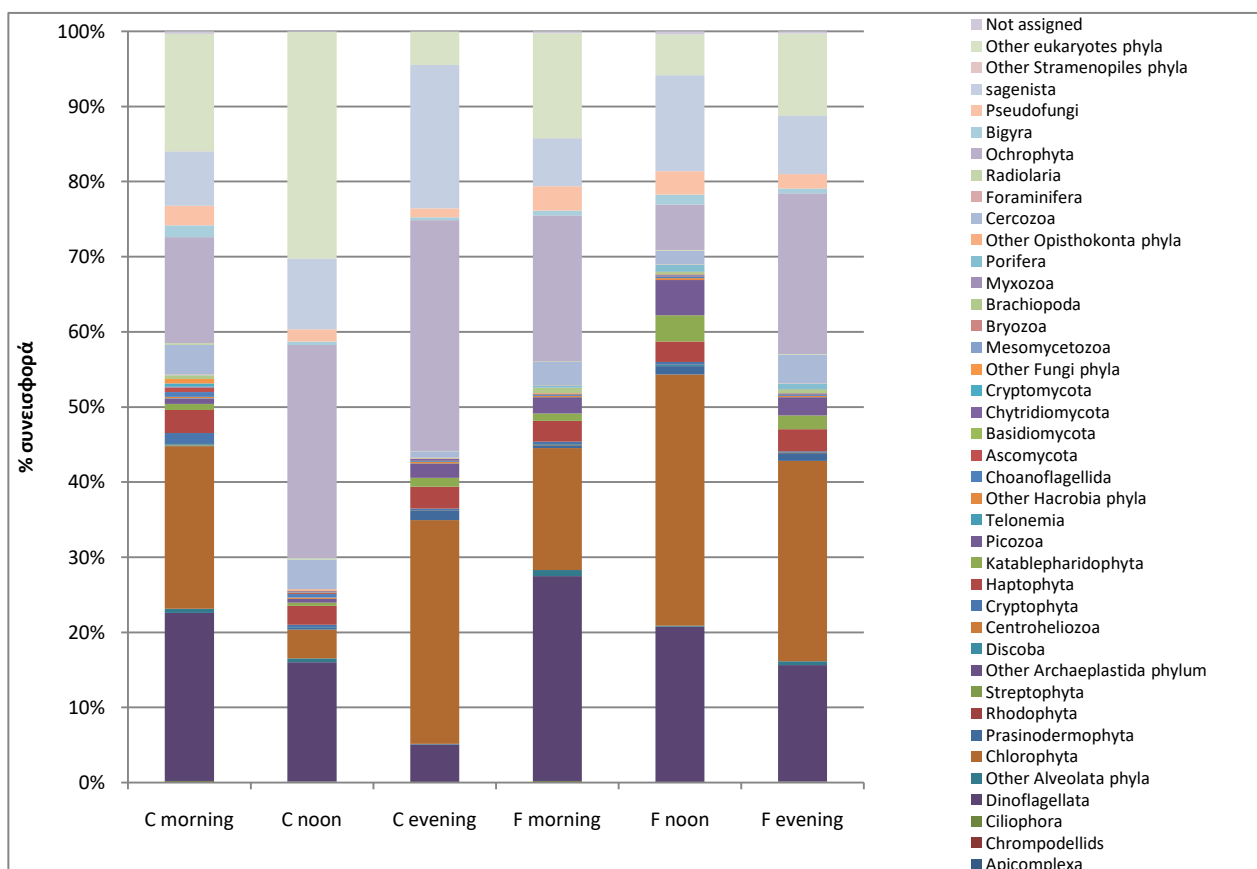
### 3.2.2. Πικο- και Νανο-ευκαρυώτες

Μετά την αφαίρεση έξι δειγμάτων (D1 MF morning, D1 MF noon, D2 OF noon, D3 C noon, D3 C evening, D2 C morning) που είχαν λίγες αλληλουχίες, ο τελικός πίνακας OTUs για τους πικο- και νανο-ευκαρυώτες περιελάμβανε 368.188 αλληλουχίες που μετά την επεξεργασία τους απέδωσαν 3.568 OTUs. Ο αριθμός αλληλουχιών ανά δείγμα κυμαινόταν από 3.828 (D2 OF evening) έως 50.993 (D3 MF evening), με κατά μέσο όρο 17.294 αλληλουχίες ανά δείγμα.

Ο δείκτης ομοιογένειας Pielou δεν παρουσίασε διαφορές μεταξύ των σταθμών δειγματοληψίας ή μεταξύ της στιγμής της ημέρας για τις κοινότητες των πικο- και νανο-ευκαρυωτών, ενώ ο δείκτης ποικιλότητας Shannon παρουσίασε διακυμάνσεις με μέγιστες τιμές στους σταθμούς MF όλες τις στιγμές της ημέρας, καθώς και στους C τη στιγμή morning (Πίνακας 3.2.). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης PERMANOVA έδειξαν ότι στο ταξινομικό επίπεδο του είδους, ο τύπος της υδατοκαλλιέργειας οδήγησε σε σημαντικές διαφορές (Pseudo-F=2,4449,  $p < 0,05$ ). Επίσης, η επίδραση της ημέρας δειγματοληψίας (D1, D2, D3) προκάλεσε σημαντικές διαφορές στα πρότυπα των κοινοτήτων των πικο-και νανο-ευκαρυωτών (Pseudo-F=6,0281,  $p < 0,05$ ) όπως και στο μεσο-ζωοπλαγκτόν.

Τα πιο επικρατή φύλα στην κλάση πικο- και νανο- ευκαρυώτες ήταν τα Dinoflagellata (δινομαστιγωτά), τα οποία αποτελούνταν κυρίως από την οικογένεια *Dinophyceae* και την τάξη

Syndiniales, ενώ υπήρχαν και αρκετές άγνωστες αλληλουχίες. Τα Dinoflagellata καταλάμβαναν λίγο μεγαλύτερο ποσοστό στους σταθμούς FARM (15-30%) από ότι στους C (5-25%). Σε όλους τους σταθμούς, το ποσοστό των Dinoflagellata παρουσίαζε τη μέγιστη συνεισφορά το πρωί, μειωνόταν το μεσημέρι και παρουσίαζε τη χαμηλότερη συνεισφορά το βράδυ. Επίσης, αρκετά μεγάλο ποσοστό των κοινοτήτων καταλάμβαναν και τα Chlorophyta, με ποσοστιαία συνεισφορά από 5% στους σταθμούς C την στιγμή που έως και 35% στους σταθμούς με υδατοκαλλιέργειες την ίδια στιγμή. Οι οικογένειες που επικράτησαν ήταν οι *Chlorodendraceae* και *Mamiellaceae*. Τα Bacillariophyta (διάτομα) παρουσίασαν μεγαλύτερη ποσοστιαία συνεισφορά στους σταθμούς C τις στιγμές που και evening (φτάνοντας περίπου 30% του συνόλου των πικο- και νανο- ευκαρυωτών) σε σχέση με τους σταθμούς FARM (5 και 20%, αντίστοιχα). Αντίστοιχα και το φύλο Radiolaria είχε υψηλότερη συνεισφορά στους C τις στιγμές morning και noon από ότι στους FARM. Τέλος, το φύλο Sagenista είχε συνεισφορά στην κοινότητα πικο- και νανο- ευκαρυωτών από περίπου 5% τη στιγμή morning στους σταθμούς με υδατοκαλλιέργειες έως περίπου 20% τη στιγμή evening στους C. Παρότι οι μύκητες εξετάστηκαν με την αλληλούχηση της περιοχής ITS, βρέθηκαν και με το γονίδιο 18S rRNA, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.17. (Φύλα Pseudofungi, Ascomycota, Basidiomycota και άλλα).



**Εικόνα 3.17.** Η ποσοστιαία συνεισφορά των φύλων στις κοινότητες πικο- και νανο- ευκαρυωτών στον σταθμό μάρτυρα (C) και στους σταθμούς με υδατοκαλλιεργητική δραστηριότητα (Farm) στις τρεις στιγμές της ημέρας (morning, noon, evening). Οι τιμές προέκυψαν από τον μέσο όρο των τριών ημερών δειγματοληψίας.

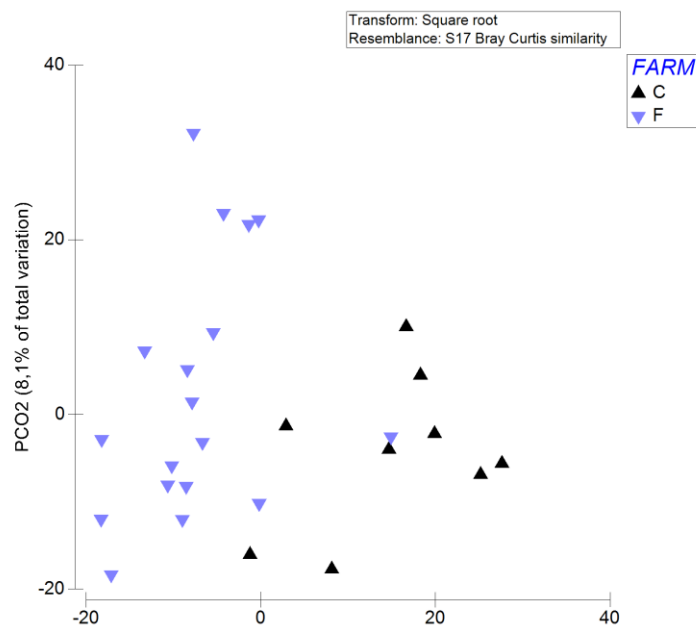
### 3.2.3. Μύκητες

Μετά την αφαίρεση των δειγμάτων αρνητικού ελέγχου και OTUs που περιλάμβαναν άλλους ευκαρυώτες (κυρίως κνιδάρια), ο τελικός πίνακας OTUs για την περιοχή ITS, περιελάμβανε 559.802 αλληλουχίες που μετά την επεξεργασία τους απέδωσαν 5.285 OTUs. Ο αριθμός αλληλουχιών ανά δείγμα κυμαινόταν από 6.288 (3C\_noon) έως 81.275 (2MF\_morning), με κατά μέσο όρο 19.993 αλληλουχίες ανά δείγμα.

**Πίνακας 3.3.** Δείκτης ομοιογένειας (J Pielou) και ποικιλότητας (H Shannon-Wiener) για τις κοινότητες των μυκήτων με βάση τα δεδομένα για τη στιγμή της ημέρας (morning, noon, evening) και τον τύπο του σταθμού δειγματοληψίας (Control, OF, MF). Οι τιμές προέκυψαν από τον μέσο όρο των τριών ημερών δειγματοληψίας.

	ΜΥΚΗΤΕΣ	
	J Pielou δείκτης ομαλότητας	H Shannon-Wiener δείκτης ποικιλότητας
<b>C morning</b>	0.9	5.1
<b>C noon</b>	0.9	4.9
<b>C evening</b>	0.9	5.0
<b>OF morning</b>	0.9	5.2
<b>OF noon</b>	0.9	4.9
<b>OF evening</b>	0.9	4.6
<b>MF morning</b>	0.9	5.1
<b>MF noon</b>	0.9	5.3
<b>MF evening</b>	0.9	5.3

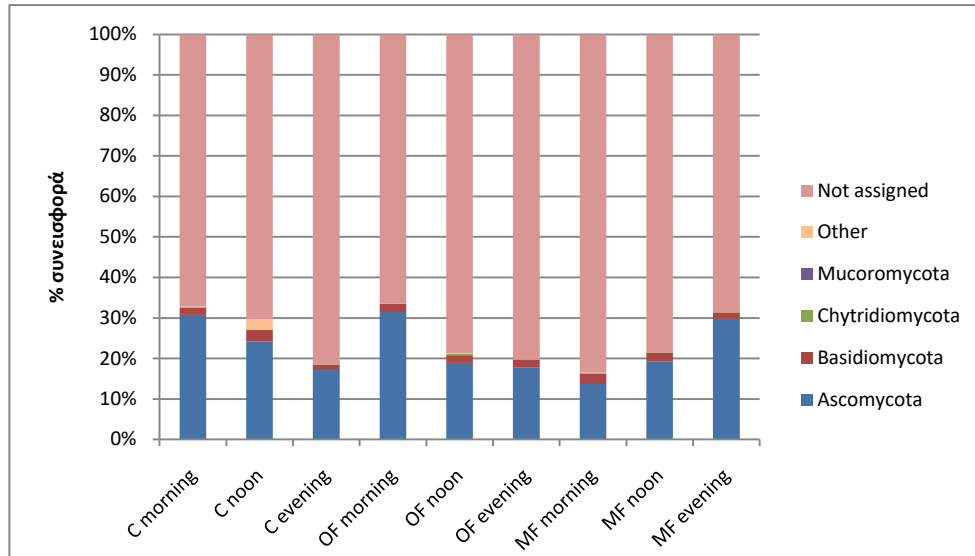
Ο δείκτης ομοιογένειας Pielou δεν παρουσίασε διαφορές μεταξύ των σταθμών δειγματοληψίας ή μεταξύ της στιγμής της ημέρας για τις κοινότητες των μυκήτων, ενώ ο δείκτης ποικιλότητας Shannon παρουσιάζει διακυμάνσεις στους MF που είχε τις περισσότερες μεγαλύτερες τιμές (Πίνακας 3.3.). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης PERMANOVA έδειξαν ότι στο ταξινομικό επίπεδο του είδους, η επίδραση της υδατοκαλλιέργειας προκάλεσε σημαντικές διαφορές στα πρότυπα της κοινότητας μυκήτων (Pseudo-F=1,9509,  $p<0,05$ ), όπως και η επίδραση του τύπου υδατοκαλλιέργειας (Pseudo-F=1,7121,  $p<0,05$ ). Η διαφοροποίηση των σταθμών με βάση την ύπαρξη υδατοκαλλιεργητικής δραστηριότητας παρουσιάζεται στην ανάλυση PCO (Εικόνα 3.18).



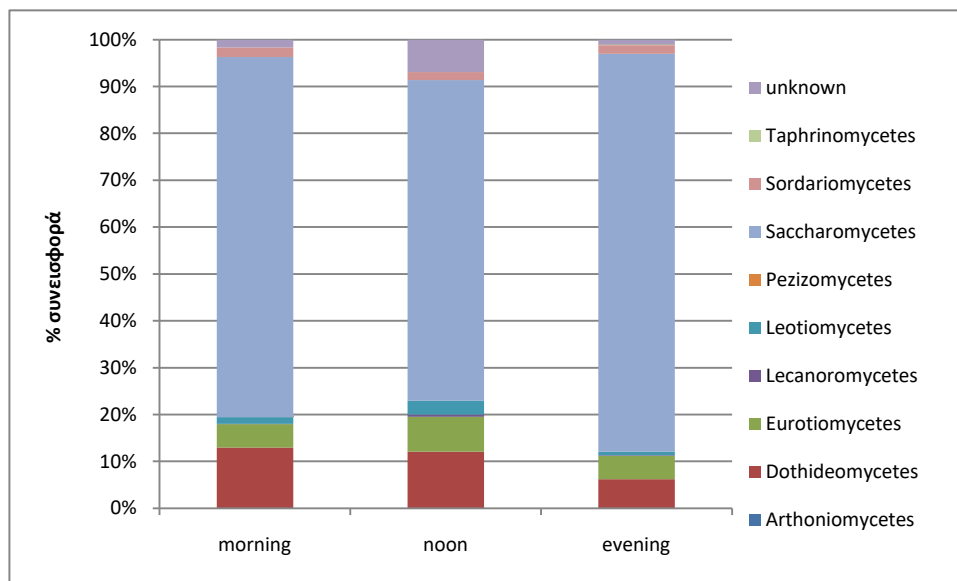
**Εικόνα 3.18.** Το διάγραμμα με βάση την ανάλυση Principal Coordinates (PCO), όπου φαίνεται η διαφοροποίηση στη σύνθεση των δειγμάτων για το γονίδιο ITS με βάση την παράμετρο της ύπαρξης υδατοκαλλιεργητικής δραστηριότητας (FARM) ή όχι (CONTROL). Με OF φαίνονται τα δείγματα που προέρχονται από τον σταθμό με τους πολλούς κλωβούς, και με MF τα δείγματα που προέρχονται από τον σταθμό με τους πολλούς κλωβούς.

Ήταν αξιοσημείωτο πως οι περισσότερες αλληλουχίες (65-85%) που ανακτήθηκαν από την ανάλυση της περιοχής ITS παρέμειναν χωρίς ταξινομική αναγνώριση (not assigned) όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.19. Το πιο επικρατές φύλο των μυκήτων ήταν το Ascomycota, το οποίο αποτελούσε από το 15% των κοινοτήτων στους MF το πρωί έως και 35% στους OF επίσης το πρωί. Το δεύτερο επικρατέστερο φύλο ήταν το Basidiomycota που συνεισέφερε περίπου 2-3% σε όλους τους σταθμούς. Πολύ μικρή ποσοστιαία συνεισφορά είχαν Chytridiomycota και τα Mycoromycota (Εικόνα 3.19).

Εντός του φύλου Ascomycota, η πιο επικρατής κλάση ήταν η Saccharomycetes (70% το μεσημέρι έως και 85% το βράδυ στο σύνολο των Ascomycota). Το αντίστοιχο ποσοστό της κλάσης Dothideomycetes ήταν από περίπου 10% το πρωί και το μεσημέρι και 5% το βράδυ σε όλους τους σταθμούς, ενώ το ποσοστό των Eurotiomycetes και Leotiomycetes ήταν υψηλότερο το μεσημέρι (Εικόνα 3.20).



**Εικόνα 3.19.** Η ποσοστιαία συνεισφορά των φύλων των μυκήτων στον σταθμό μάρτυρα (C), στον σταθμό με έναν κλωβό (OF) και στον σταθμό με πολλούς κλωβούς (MF) στις τρεις στιγμές της ημέρας (morning, noon, evening). Οι τιμές προέκυψαν από τον μέσο όρο των τριών ημερών δειγματοληψίας.

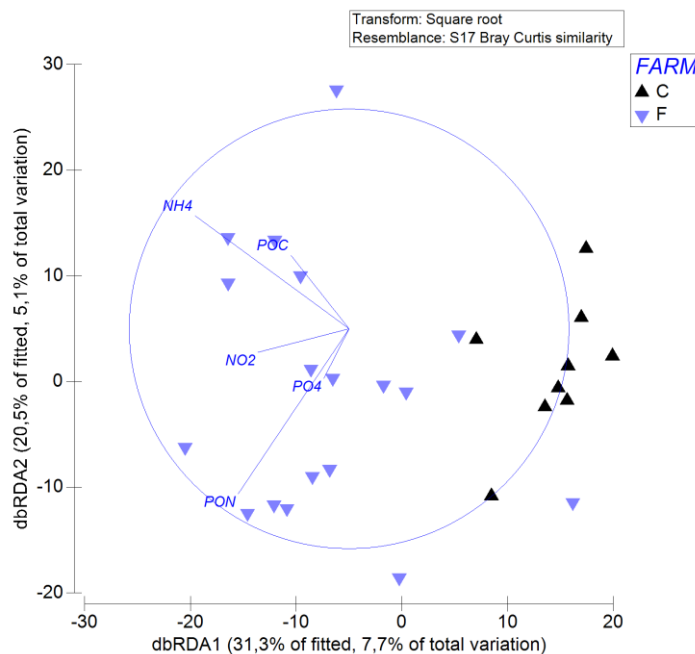


**Εικόνα 3.20.** Η ποσοστιαία συνεισφορά των κλάσεων των Ascomycota στις κοινότητες των μυκήτων στις τρεις διαφορετικές στιγμές της ημέρας (morning, noon, evening). Οι τιμές προέκυψαν από τον μέσο όρο των τριών ημερών δειγματοληψίας.

Τα πρότυπα της κοινότητας των μυκήτων στο ταξινομικό επίπεδο του είδους συσχετίστηκαν σημαντικά με τις ακόλουθες μεταβλητές: συγκεντρώσεις των POC, PON, NH<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub> και PO<sub>4</sub> (R<sup>2</sup>=0,24754, p<0,05). Βρέθηκε ότι περίπου το 14% της μεταβλητότητας των κοινοτήτων



μυκήτων εξηγήθηκε από τη σωρευτική δράση όλων των αβιοτικών παραμέτρων ( $p < 0,05$ ) (Εικόνα 3.21.).



**Εικόνα 3.21.** Ανάλυση τύπου distance-based redundancy analysis (dbRDA) για τις κοινότητες των μυκήτων στο ταξινομικό επίπεδο του είδους βάσει της παραμέτρου της ύπαρξης υδατοκαλλιεργειών ή όχι. Το μήκος των γραμμών δείχνει τη σχετική ένταση συσχέτισης. Η ομοιότητα των κοινοτήτων βασίστηκε στον υπολογισμό του δείκτη Bray Curtis μετά από μετασχηματισμό των αλληλουχιών για την περιοχή ITS1-ITS2 (τετραγωνική ρίζα).

### 3.2.4. Μικροευκαρυώτες

Η εκχύλιση DNA από τις μεμβράνες 20  $\mu\text{m}$  δεν ήταν επιτυχής. Σαν αποτέλεσμα, το χαμηλής ποιότητας DNA δεν επέτρεψε τον πολλαπλασιασμό του 16S και 18S γονιδίου, και έτσι, η μικροπλαγκτονική κοινότητα είναι προς το παρόν άγνωστη.

### 3.3. Ιοί

Όπως προαναφέρθηκε, καμία PCR δεν ήταν επιτυχημένη για κάποιο ιικό γονίδιο, συνεπώς η μελέτη των ιικών κοινοτήτων στον κόλπο του Βουρλιά δεν συζητείται περαιτέρω προς το παρόν, όμως θα γίνει προσπάθεια να αλληλουχηθεί το σύνολο του γονιδιώματος των ιών στο μέλλον.

## 4. Συζήτηση

Είναι γνωστό πως ανάλογα με τα μικροβιακά πλαγκτονικά στελέχη σε ένα οικοσύστημα, προβλέπονται διαφορετικές λειτουργίες (π.χ. μεταβολικά μονοπάτια, ανοργανοποίηση). Έτσι, η μελέτη της σύνθεσης της προκαρυωτικής αλλά και της ευκαρυωτικής κοινότητας σε ένα περιβάλλον υδατοκαλλιέργειας είναι πολύ σημαντική καθώς θα μας επιτρέψει να κατανοήσουμε τους κύκλους των θρεπτικών, τη ροή άνθρακα και τη λειτουργία και βιωσιμότητα αυτών των συστημάτων.

#### **4.1. Μεταβλητότητα στη σύνθεση των κοινοτήτων των προκαρυωτών**

*Οι ελεύθεροι προκαρυώτες δεν επηρεάστηκαν από την στιγμή της ημέρας, αλλά από την παρουσία και την ένταση της υδατοκαλλιέργειας*

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν πως η κοινότητα των ελεύθερων προκαρυωτών διαφοροποιήθηκε λόγω της ύπαρξης υδατοκαλλιέργειας και περαιτέρω, λόγω της ύπαρξης ενός ή πολλών κλωβών. Η ποικιλότητα των ελεύθερων προκαρυωτών ήταν υψηλότερη στους σταθμούς Farm από ότι στους C. Διάφορες ομάδες βρέθηκαν να συνεισφέρουν σημαντικά περισσότερο στους Farm, με χαρακτηριστικά τα φύλα Proteobacteria, Bacteroidetes και Verrucomicrobia. Το γεγονός πως ακόμα και σε επίπεδο φύλου βρέθηκαν διαφορές ανάμεσα στους σταθμούς αποδεικνύει τη σημασία της υδατοκαλλιέργειας στην διαμόρφωση της μικροβιακής κοινότητας, δηλαδή τη σημασία των θρεπτικών που προστίθενται και των απεκκριμάτων των ψαριών. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με την μελέτη των Xiong et al. (2015) που μελέτησαν τις αλλαγές στη σύνθεση των βακτηριακών κοινοτήτων σε ένα ευτροφικό περιβάλλον με υδατοκαλλιέργειες και των Duarte et al. (2019) που μελέτησαν τις εποχιακές αλλαγές των κοινοτήτων σε υδατοκαλλιέργειες.

Το σύνολο του φύλου Bacteroidetes ήταν αναμενόμενο να είναι πιο άφθονο κοντά στους κλωβούς όπου υπάρχει έντονη εισροή θρεπτικών, γεγονός που έχει αναφερθεί και σε άλλες παρόμοιες μελέτες (Taniguchi et al., 2020). Το φύλο Bacteroidetes θεωρείται μια ευκαιριακή ομάδα βακτηρίων με ποικίλα συστήματα πρόσληψης θρεπτικών και δυνατότητα μεταβολισμού περίπλοκων ενώσεων και σωματιδιακής οργανικής ύλης (Fernandez-Gomez et al., 2013). Εντός του φύλου αυτού ήταν επίσης αναμενόμενη η διαφοροποίηση των τάξεων Cytophagales και Chitinophagales. Τα Cytophagales, μια ευκαιριακή ομάδα βακτηρίων (Zaneveld et al., 2016), είχε μεγαλύτερο ποσοστό στους Farm και μάλιστα η ποσοστιαία συνεισφορά της στο σύνολο των Bacteroidetes αυξήθηκε με την αύξηση της έντασης της υδατοκαλλιεργητικής δραστηριότητας (ποσοστό σε MF > OF >> C). Παρομοίως, η τάξη Chitinophagales έδειξε το ίδιο πρότυπο μεταξύ των σταθμών (ποσοστό σε MF > OF >> C). Και στο φύλο Verrucomicrobia εντοπίστηκε διαφοροποίηση ανάλογα με την ένταση της υδατοκαλλιέργειας, με την οικογένεια *Rubritaleaceae* να αυξάνεται από τους C, προς τους OF και MF. Η τάση αύξησης ορισμένων ομάδων μεταξύ των σταθμών OF και MF αποδεικνύει πως η ένταση της προσθήκης θρεπτικών καθοδηγεί αλλαγές σε διάφορες βιολογικές μεταβλητές. Η τάξη Flavobacteriales δεν παρουσίασε έντονη διαφοροποίηση ανάμεσα

στους σταθμούς, ήταν όμως η πιο άφθονη εντός του φύλου Bacteroidetes, εύρημα που συμφωνεί με τους Duarte et al. (2019) για περιβάλλον υδατοκαλλιέργειας.

Αντίθετα με το φύλο Bacteroidetes, το φύλο Cyanobacteria καταλάμβανε μεγαλύτερο ποσοστό των κοινοτήτων στους σταθμούς C σε σχέση με τους Farm, όμως η ποικιλότητα εντός του φύλου ήταν υψηλότερη στους Farm. Συγκεκριμένα, στους Farm βρέθηκε ένα αχαρακτήριστο είδος *Synechococcales* και επιπλέον τα στελέχη *Nostocales* και *Phormidesmiales*, ενώ στους C υπήρχε πολύ χαμηλή παρουσία από τα δυο τελευταία γένη και κυριαρχούσε μόνο το αχαρακτήριστο *Synechococcales*. Η υψηλότερη ποσοστιαία αφθονία των Cyanobacteria στους σταθμούς μάρτυρες αποδείχθηκε και ποσοτικά με τον αριθμό των κυανοβακτηρίων, όπως αυτός μετρήθηκε με την κυτταρομετρία ροής (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται εδώ). Και οι Fodelianakis et al. (2014) βρήκαν πως η οικογένεια *Synechococcaceae* συνεισέφερε λιγότερο στους σταθμούς κάτω από κλωβούς. Τα Gamma- και Deltaproteobacteria καταλάμβαναν μεγαλύτερο ποσοστό των Proteobacteria στους σταθμούς Farm, ενώ στους C τα Alpha- ήταν είτε επικρατή είτε ίσα με τα Gammaproteobacteria.

Τα πρότυπα στη σύνθεση της κοινότητας των ελεύθερων προκαρυωτών στο ταξινομικό επίπεδο του είδους συσχετίστηκαν με τις συγκεντρώσεις των θρεπτικών PON, NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub> και NO<sub>2</sub>. Η αμμωνία είναι μια ένωση που διαφεύγει από τους κλωβούς και ανιχνεύεται σε υπολογίσιμες συγκεντρώσεις κοντά σε κλωβούς (Stirling and Dey, 1990; Karakassis et al., 2001; Pitta et al., 2005) και έτσι, θα μπορούσε να έχει επηρεάσει την κοινότητα των προκαρυωτών. Παρόμοια σχέση ανάμεσα σε προκαρυώτες (π.χ. *Flavobacteriales*, *Rhodobacteraceae*, *Synechococcaceae*) και την συγκέντρωση αμμωνιακών αλάτων έχει βρεθεί και αλλού (Vlahos et al., 2013; Frade et al., 2020; Bi et al., 2022), και συγκεκριμένα σε ένα λιμνοθαλάσσιο περιβάλλον υδατοκαλλιέργειας στην Πορτογαλία τονίστηκε η άμεση εξάρτηση της βακτηριακής κοινότητας από την συγκέντρωση των νιτρικών αλάτων (Duarte et al., 2019).

Η στιγμή της ημέρας δεν επηρέασε την ποικιλότητα των ελεύθερων προκαρυωτών ούτε όταν εξετάστηκαν οι ομάδες των σταθμών ξεχωριστά (C, OF, MF). Ελαφρώς υψηλότερη ποικιλότητα σε επίπεδο φύλων και σε επίπεδο γενών Cyanobacteria παρατηρήθηκε όμως το πρωί στους σταθμούς MF σε σχέση με όλους τους άλλους. Περαιτέρω διερεύνηση θα μας επιτρέψει να εντοπίσουμε τυχόν διαφορές με βάση τη στιγμή της ημέρας σε συγκεκριμένα στελέχη.

*Οι προκαρυώτες που βρίσκονταν προσκολλημένοι σε σωματίδια επηρεάστηκαν από την στιγμή της ημέρας και από την παρουσία και ένταση της υδατοκαλλιέργειας*

Οι προκαρυώτες που αναπτύσσονται προσκολλημένοι σε σωματίδια μελετήθηκαν ξεχωριστά καθώς είναι γνωστό πως τα σωματίδια είναι πιο άφθονα σε περιβάλλοντα υδατοκαλλιέργειας από ότι σε άλλα θαλάσσια περιβάλλοντα (Taniguchi and Eguchi, 2020) και επίσης είναι γνωστό πως οι προκαρυώτες αναπτύσσονται με μεγαλύτερο ρυθμό όταν βρίσκονται πάνω σε σωματίδια. Μάλιστα αυτή η στρατηγική ανάπτυξης θεωρείται ευνοϊκή για τους μικροοργανισμούς. Επάνω σε

σωματίδια έχουν μετρηθεί υψηλοί ρυθμοί υδρόλυσης οργανικής ύλης και έτσι, σε αυτήν την μελέτη αναμέναμε να δούμε διαφορετικούς προκαρυώτες στις δύο καταστάσεις (ελεύθεροι και προσκολλημένοι) και επιπλέον, να δούμε διαφορετικούς προκαρυώτες στους σταθμούς που δεν είχαν επίδραση από υδατοκαλλιέργεια (θεωρητικά δηλαδή οι σταθμοί μάρτυρες θα είχαν χαμηλότερο φορτίο σε σωματίδια).

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν πως η κοινότητα των προσκολλημένων σε σωματίδια προκαρυωτών διαφοροποιήθηκε με βάση τη στιγμή της ημέρας αλλά και λόγω της ύπαρξης υδατοκαλλιέργειας και της ύπαρξης ενός ή πολλών κλωβών. Σαν σύνολο η ποικιλότητα και ομοιογένεια των προσκολλημένων προκαρυωτών δεν διέφερε έντονα ανάμεσα στους Farm και C, όμως σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν σε πολλά ταξινόμικά επίπεδα.

Πρώτον, όπως και με τους ελεύθερους προκαρυώτες, το φύλο Proteobacteria ήταν το επικρατέστερο. Η κλάση Alphaproteobacteria έδειξε αύξηση από το πρωί ως το βράδυ στους ανεπηρέαστους σταθμούς μάρτυρες, όμως δεν παρουσίασε κάποιο ημερήσιο πρότυπο στους OF και MF. Δεύτερον, ήταν χαρακτηριστικό πως το φύλο Bacteroidetes αποτελούσε μεγαλύτερο μέρος της κοινότητας στους σταθμούς Farm από ότι στους C, με ιδιαίτερο πρότυπο κατά τη διάρκεια της ημέρας: στους C, το φύλο βρέθηκε να αυξάνεται από το πρωί ως το βράδυ (με κυρίαρχο υπεύθυνο στέλεχος τα Flavobacteriales) ενώ στους OF βρέθηκε να μειώνεται από το πρωί ως το βράδυ (εδώ το ποσοστό των Flavobacteriales μειωνόταν προς το βράδυ, και τουναντίον, το ποσοστό των Balneolales και άγνωστων Bacteroidia αυξανόταν). Τρίτον, τα Cyanobacteria παρουσίασαν την αντίθετη τάση (όπως και στους ελεύθερους προκαρυώτες) και αποτέλεσαν χαμηλότερο μέρος της κοινότητας στους Farm από ότι στους C και το αντίστροφο ημερήσιο πρότυπο: στους C, το φύλο βρέθηκε να μειώνεται από το πρωί ως το βράδυ ενώ στους OF βρέθηκε να αυξάνεται από το πρωί ως το βράδυ. Αξιοσημείωτο είναι πως στους σταθμούς MF δεν παρατηρήθηκαν αντίστοιχα ημερήσια μοτίβα και πιθανόν αυτό να σχετίζεται με την συνεχόμενα υψηλή συγκέντρωση θρεπτικών στο περιβάλλον κατά τη διάρκεια της ημέρας, γεγονός που ίσως δεν οδηγεί σε έντονες ημερήσιες διακυμάνσεις στις κοινότητες των προκαρυωτών. Αντίθετα στους σταθμούς OF όπου τα θρεπτικά προστίθενται το πρωί σε αναλογία μόνο ενός κλωβού, πιθανόν είναι περισσότερο αναμενόμενο αυτά τα θρεπτικά να οδηγήσουν σε διαφοροποίηση των προκαρυωτών που είναι προσκολλημένοι σε σωματίδια.

Οι σταθμοί C παρουσίασαν μεγαλύτερη ποικιλότητα από τους σταθμούς Farm όσον αφορά τις τάξεις εντός των Bacteroidetes. Συγκεκριμένα, οι τάξεις Chitinophagales και Cytophagales (μέγιστο ποσοστό: πρωί και μεσημέρι) και Sphingobacteriales (μέγιστο ποσοστό: μεσημέρι και βράδυ) καταλάμβαναν μεγαλύτερο ποσοστό των Bacteroidetes στους σταθμούς C από ότι στους Farm. Ημερήσια μεταβλητότητα παρουσίασε και η συνεισφορά των οικογενειών εντός του φύλου Verrucomicrobia με την οικογένεια *Akkermansiaceae* να συνεισφέρει περισσότερο το μεσημέρι στους OF και MF. Γενικά, λίγα είναι γνωστά όσον αφορά την κατανομή και την ποικιλότητα των Verrucomicrobia στα θαλάσσια περιβάλλοντα (Freitas et al., 2012), οπότε θεωρείται δύσκολη η συσχέτισή τους με κάποιο οικολογικό στοιχείο. Στην εργασία των Xiong et al. (2015) βρέθηκε πως η δράση υδατοκαλλιέργειας επηρεάζει τόσο πολύ τους προκαρυώτες, ώστε οι εποχιακές αλλαγές

στη σύνθεση των κοινοτήτων δεν είναι σημαντικότερες από τις αλλαγές στη σύνθεση των κοινοτήτων λόγω υδατοκαλλιέργειας. Σε μια πρόσφατη εργασία της επίδρασης της υδατοκαλλιέργειας στο σύνολο του βακτηριοπλαγκτού (ελεύθερη και προσκολλημένη κατάσταση) στην Ανατολική Μεσόγειο και συγκεκριμένα στην Σητεία, οι Fodelianakis et al. (2014) παρατήρησαν πως τα τρία πιο άφθονα φύλα ήταν τα ίδια με την παρούσα εργασία: Proteobacteria, Bacteroidetes και Cyanobacteria. Ανάμεσα στα υπό εξέταση στελέχη βακτηρίων, οι συγγραφείς εντόπισαν μερικά να ευνοούνται και άλλα να μειώνονται κάτω από τους κλωβούς. Πιο συγκεκριμένα, οι οικογένειες *Rhodobacteraceae*, *Alteromonadaceae* *Cryomorphaceae* βρέθηκαν πιο αυξημένες στους επηρεασμένους σταθμούς, κάτι που σχετίζεται με την αναγνωρισμένη ικανότητα των μελών αυτών των οικογενειών για αποδόμηση οργανικής ύλης (είτε από φυτοπλαγκτόν είτε άλλης προέλευσης, π.χ. από απεκκρίματα ή χερσαίας πηγής). Στην δική μας περίπτωση, η οικογένεια *Rhodobacteraceae* είχε την υψηλότερη συνεισφορά στο σύνολο των προκαρυωτών στους σταθμούς MF, υποστηρίζοντας την άποψη πως τα μέλη της οικογένειας αυτής έχουν προσαρμοστεί να αναπτύσσονται και να κυριαρχούν σε περιβάλλοντα όπου υπάρχουν μεγάλες συγκεντρώσεις θρεπτικών (Tripp et al., 2013; Zaneveld et al., 2016; Frade et al., 2020). Αντιθέτως, το στέλεχος SAR11 (*Pelagibacteraceae* οικογένεια) βρέθηκε να έχει την αντίθετη συμπεριφορά: είχε την υψηλότερη συνεισφορά στο σύνολο των προκαρυωτών στους σταθμούς C, αποδεικνύοντας πως είναι ένα τυπικό ολιγοτροφικό στέλεχος (Rappe et al., 2002). Μάλιστα η υψηλή αφθονία της οικογένειας *Rhodobacteraceae* στους σταθμούς με υδατοκαλλιέργειες συνδυάστηκε με αυξημένη συγκέντρωση χλωροφύλλης στους MF (τα δεδομένα δεν παρουσιάστηκαν εδώ), μια σχέση που έχει βρεθεί σε ποικίλα άλλα συστήματα παγκοσμίως (Grossart et al., 2005; Pinhassi et al., 2004).

Τα πρότυπα της κοινότητας των προκαρυωτών που είναι προσκολλημένα σε σωματίδια στο ταξινομικό επίπεδο του είδους συσχετίστηκαν σημαντικά με τις συγκεντρώσεις των ανόργανων και οργανικών ενώσεων αζώτου (PON, NH<sub>4</sub>) όπως έγινε και με τους ελεύθερους προκαρυώτες, αλλά και με τη συγκέντρωση του POC. Η εξάρτηση της κοινότητας από τη συγκέντρωση του σωματιδιακού οργανικού άνθρακα πιθανά εξηγείται λόγω της ικανότητας αυτών των κυττάρων να προσκολλώνται και να αποδομούν οργανικό υλικό και μετέπειτα να απελευθερώνουν διαλυμένο οργανικό υλικό (López-Pérez et al., 2016).

#### *Σύνοψη αποτελεσμάτων για τους προκαρυώτες*

Από τα αποτελέσματα μας λοιπόν φαίνεται πως με την αύξηση της υδατοκαλλιεργητικής δραστηριότητας η σύνθεση των κοινοτήτων μπορεί να είναι διαφορετική, και συγκεκριμένα, να υπάρχουν ευκαιριακά στελέχη που «αντικαθιστούν» στελέχη που δεν είναι προσαρμοσμένα σε μεγάλες συγκεντρώσεις θρεπτικών (ολιγοτροφικά). Δεν βρέθηκε ημερήσια μεταβλητότητα στους ελεύθερους προκαρυώτες με τις αναλύσεις που έγιναν ως τώρα. Εν μέρει, μόνο για τον σταθμό μάρτυρα, αυτό μπορεί να σχετίζεται με τις ολιγοτροφικές συνθήκες που επικρατούν στην ανοιχτή θάλασσα του Αργολικού κόλπου, κάτι που ισχυρίστηκαν και οι Ghiglione et al. (2007) για την ολιγοτροφική δυτική Μεσόγειο. Παρόλα αυτά βρέθηκε ημερήσια μεταβλητότητα στους προκαρυώτες που είναι προσκολλημένοι σε σωματίδια, κάτι που πιθανά σχετίζεται με την άμεση

εξάρτησή τους από σωματιδιακή οργανική ύλη. Η αυξημένη συνεισφορά των *Synechococcales* στους σταθμούς OF από το πρωί ως το βράδυ παραλληλίζει αποτελέσματα σε ευτροφικά συστήματα.

## **4.2. Μεταβλητότητα στη σύνθεση των κοινοτήτων των ευκαρυωτών**

*Το μεσο-ζωοπλαγκτόν επηρεάστηκε από την ένταση της υδατοκαλλιεργητικής δραστηριότητας*

Η σύνθεση των κοινοτήτων μεσο-ζωοπλαγκτού φάνηκε να επηρεάζεται από τον τύπο υδατοκαλλιέργειας, δηλαδή ανάλογα με το αν οι σταθμοί ήταν C, είχαν έναν κλωβό (OF) ή πολλούς κλωβούς (MF). Επιπλέον, η ημέρα δειγματοληψίας διαφοροποίησε τις κοινότητες μεσο-ζωοπλαγκτού. Η ημερήσια κάθετη μετανάστευση του ζωοπλαγκτού είναι ένα ευρέως μελετημένο ημερήσιο πλαγκτονικό μοτίβο (Cohen and Forward, 2009). Στην παρούσα εργασία, η επίδραση της στιγμής της ημέρας δεν φάνηκε να είναι στατιστικά σημαντική για το σύνολο των κοινοτήτων μεσο-ζωοπλαγκτού. Ωστόσο, η επίδραση ήταν ορατή σε κάποια χαρακτηριστικά φύλα: η ποσοστιαία συνεισφορά των Arthropoda αυξήθηκε μόνο στους σταθμούς MF από το πρωί έως το βράδυ, των Mollusca από το πρωί ως έως το βράδυ μόνο στους C και OF, ενώ το ποσοστό των Chordata αυξανόταν σε όλους τους σταθμούς από το πρωί έως το βράδυ. Όλα τα παραπάνω φύλα εμπεριέχουν οργανισμούς που παρουσιάζουν ημερήσια κάθετη μετανάστευση, και συγκεκριμένα το βράδυ ανεβαίνουν σε επιφανειακά νερά (Marohn et al., 2021). Συνεπώς ήταν λογικό να βρεθεί υψηλότερη παρουσία αυτών των φύλων το βράδυ στους διάφορους σταθμούς.

Γενικότερα στο μεσο-ζωοπλαγκτόν το επικρατέστερο φύλο ήταν το Arthropoda σε όλους τους σταθμούς και στιγμές της ημέρας, αποτελούμενο αποκλειστικά από Crustacea. Εντός των Crustacea βρέθηκαν Maxillopoda, Malacostraca και Branchiopoda αλλά οι περισσότερες αλληλουχίες δεν ταξινομήθηκαν. Το αποτέλεσμα μας συμφωνεί με μελέτες στη Μεσόγειο Θάλασσα που έχουν δείξει ότι το μεγαλύτερο μέρος του ζωοπλαγκτού αποτελείται από κωπήποδα (Cabal et al., 2008).

Η ανάλυση έδειξε πως η τρίτη ημέρα της δειγματοληψίας διαφοροποιήθηκε σημαντικά από τις άλλες δύο. Υποθέτουμε πως κάποιες περιβαλλοντικές παράμετροι ήταν διαφορετικές την τρίτη ημέρα της δειγματοληψίας και οδήγησαν σε διαφορές στην κοινότητα του μεσο-ζωοπλαγκτού. Δεδομένα από το πρόγραμμα TAPAS έδειξαν όντως πως την τρίτη μέρα η θερμοκρασία του νερού ήταν περίπου 1°C υψηλότερη από τις προηγούμενες. Επίσης, η κατεύθυνση των ανέμων ήταν βορειοδυτική ενώ τις πρώτες δύο μέρες δειγματοληψίας ήταν βόρεια και αυτό επηρέασε την εξάπλωση των θρεπτικών στοιχείων (Κ. Τσιάρας, προσ. επικοινωνία). Είναι αξιοσημείωτο πάντως πως μόνο το ευκαρυωτικό πλαγκτόν (και το πικο- και νανο-πλαγκτόν που θα συζητηθεί παρακάτω) διαφοροποιήθηκε την τρίτη μέρα.

*Το πικο και νανο- ευκαρυωτικό πλαγκτόν επηρεάστηκε μόνο από την ένταση της υδατοκαλλιεργητικής δραστηριότητας*

Η σύνθεση των κοινοτήτων πικο- και νανο- πλαγκτού επίσης φάνηκε να επηρεάζεται από τον τύπο υδατοκαλλιέργειας, ενώ η επίδραση της στιγμής της ημέρας δεν ήταν σημαντική. Αυτό μπορεί να συμβαίνει καθώς οι διάφορες μεταβολές δεν ανιχνεύονται πάντα στο επίπεδο DNA. Πράγματι, μελέτη που αφορούσε τις ημερήσιες διακυμάνσεις στην ποικιλότητα των Πρωτίστων έδειξε ότι τα πρότυπα φανερώθηκαν μόνο με τη χρήση rRNA (Hu et al., 2018). Σε ορισμένα φύλα όμως βρέθηκαν διακυμάνσεις μέσα στην ημέρα, όπως για παράδειγμα στα Dinoflagellata (αφορά μικρά δινομαστιγωτά στους νανο-ευκαρυώτες) με το ποσοστό τους να μειώνεται από το πρωί ως το βράδυ, ιδιαίτερα στους σταθμούς C. Ο λόγος που τα Dinoflagellata παρουσίασαν αυτή την τάση μείωσης δεν είναι ξεκάθαρος καθώς τα δινομαστιγωτά παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία στην τροφική συμπεριφορά (αυτότροφοι, μικτότροφοι, ετερότροφοι).

Το σημαντικότερο ίσως εύρημα στην ομάδα πικο- και νανο- ευκαρυωτών ήταν πως τα Bacillariophyta, δηλαδή διάτομα (μικρά διάτομα στους νανο-ευκαρυώτες), παρουσίασαν μεγαλύτερη ποσοστιαία συνεισφορά στους σταθμούς C σε σχέση με τους σταθμούς Farm. Αυτό συμφωνεί με τους Tsagkaraki et al. (2013) που βρήκαν μείωση των Διατόμων κατάντη των κλωβών όπου υπήρχε συσσώρευση θρεπτικών, ενώ ανάντη (αντίστοιχα με τους σταθμούς C δηλαδή) η αφθονία των διατόμων αυξανόταν. Σχετικά με το υπόλοιπο φυτοπλαγκτόν δεν βρέθηκαν ιδιαίτερα πρότυπα σε επίπεδο φύλου ανάμεσα στους σταθμούς. Σε παλαιότερες μελέτες και με χρήση μικροσκοπίας δεν βρέθηκε να επηρεάζει η παρουσία υδατοκαλλιεργειών την αφθονία και ποικιλότητα των 3 μικρο-πλαγκτονικών ομάδων (διάτομα, δινομαστιγωτά, βλεφαριδωτά, Pitta et al. 1999, Yucel-Gier et al. 2008) ούτε όμως την αφθονία του πικο- και νανο-πλαγκτού (Pitta et al. 2005). Αυτό πιθανά σχετίζεται με το ότι συχνά δεν ανιχνεύονται σημαντικές αλλαγές στην συγκέντρωση της χλωροφύλλης στη στήλη του νερού παρά τη μεγάλη ποσότητα διαλυμένων θρεπτικών στοιχείων που απορρίπτονται κοντά σε μονάδες υδατοκαλλιέργειας (από τα οποία τουλάχιστον τα μισά είναι άμεσα διαθέσιμα από το φυτοπλαγκτόν) (Pitta et al., 1999; Karakassis et al., 2001). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η σύνθεση των κοινοτήτων φυτοπλαγκτού εμφανίζει πιο ήπιες μεταβολές σε σχέση με τις γύρω περιοχές, σε αντίθεση με τις βακτηριακές κοινότητες που είναι πολύ πιο ευαίσθητες σε περιβαλλοντικές μεταβολές (Xiong et al., 2015). Σε κάθε περίπτωση χρειάζεται περισσότερη διερεύνηση της μεταβλητότητας σε χαμηλά ταξινομικά επίπεδα.

Τόσο στο μεσο-ζωοπλαγκτόν όσο και στους πικο- και νανο- ευκαρυώτες ένα μεγάλο ποσοστό των OTUs δεν μπορούσαν να χαρακτηριστούν καν στο επίπεδο του φύλου, κάτι που δυσκόλεψε τις αναλύσεις. Παρόμοιο αποτέλεσμα συζητείται και σε μια προηγούμενη μελέτη στην Ανατολική Μεσόγειο (Santi et al., 2020) και οφείλεται καταρχάς στο ότι η Ανατολική Μεσόγειος είναι μεταξύ των λιγότερο εξερευνημένων θαλάσσιων περιοχών όσον αφορά τις ευκαρυωτικές πλαγκτονικές κοινότητες και δεύτερον, στο ότι η περιοχή μπορεί να φιλοξενεί μοναδικά ή σπάνια είδη πλαγκτού λόγω των διακριτών χημικών συνθηκών που επικρατούν (δηλαδή της εξαιρετικά χαμηλής περιεκτικότητας σε θρεπτικά και της υψηλής αναλογίας N:P, Krom et al., 2010). Συνεπώς,

ένα μεγάλο ποσοστό των «άγνωστων» ευκαρυωτών θα μπορούσε να αντιστοιχεί σε αχαρακτῆριστα μικροβιακά είδη (Santi et al., 2020).

*Η κοινότητα των μυκήτων περιείχε πολλές άγνωστες αλληλουχίες όμως βρέθηκε να επηρεάζεται από την ύπαρξη και την ένταση της υδατοκαλλιέργειας*

Το πρόβλημα των «άγνωστων» αλληλουχιών ήταν ακόμα μεγαλύτερο όσον αφορά την περιοχή ITS1-ITS2 όπου η συντριπτική πλειοψηφία παρέμεινε χωρίς ταξινομικό χαρακτηρισμό, ενώ ανακτήθηκαν και κάποιες αλληλουχίες από το ζωικό φύλο Cnidaria. Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν ευκαρυώτες και χρησιμοποιούν ανάλυση DNA μετακωδικοποίησης, κάνουν χρήση του γονιδίου της μικρής υπομονάδας 18S rRNA και του μιτοχονδριακού γονιδίου της υπομονάδας 1 της κυτοχρωμικής οξειδάσης (Loos and Nijland, 2020). Ωστόσο, το φύλο Cnidaria έχει μελετηθεί και με τη χρήση της περιοχής ITS1-ITS2 (Forsman et al., 2005) και είναι λογικό που ανακτήθηκε και στα δικά μας αποτελέσματα. Ως εκ τούτου, αυτό το τεράστιο ποσοστό των άγνωστων αλληλουχιών θα μπορούσε να ανήκει σε διάφορους ευκαρυώτες των οποίων η αλληλουχία της περιοχής ITS1-ITS2 δεν έχει γίνει γνωστή. Ακόμα, θα μπορούσε να ανήκει και σε μύκητες που δεν έχουν ταξινομηθεί. Αυτό θα ήταν απόλυτα αναμενόμενο καθώς οι πλαγκτονικοί μύκητες αποτελούν μια ομάδα οργανισμών εξαιρετικά υπομελετημένη σε παγκόσμιο επίπεδο (Wang et al., 2018;2019), και δη στην Ανατολική Μεσόγειο όπου αυτή είναι η πρώτη φορά που μελετώνται.

Συνοψολογίζοντας το ποσοστό των άγνωστων αλληλουχιών, η ανάλυση έδειξε πως η ποικιλότητα των μυκήτων επηρεάστηκε από την ύπαρξη υδατοκαλλιεργητικής δραστηριότητας, καθώς και από την ύπαρξη ενός ή πολλών κλωβών. Το πιο επικρατές φύλο ήταν το Ascomycota και το δεύτερο επικρατέστερο το Basidiomycota, ενώ στη συνέχεια ακολουθούσαν τα Chytridiomycota και Mucoromycota με πολύ μικρή ποσοστιαία συνεισφορά. Η αναλογία των φύλων των μυκήτων ήταν παρόμοια με την πρόσφατη περιγραφή των Wang et al. (2018). Οι ίδιοι συγγραφείς παρατήρησαν πως οι αλλαγές στα Ascomycota και Basidiomycota ήταν στενά συνδεδεμένες με τις αλλαγές σε διαλυμένο και σωματιδιακό φώσφορο, διαλυμένα νιτρικά και πυριτικά άλατα και ότι η αφθονία αυτών των φύλων ήταν μεγαλύτερη όταν η συγκέντρωση των παραπάνω θρεπτικών ήταν μεγαλύτερη. Επίσης, αρκετές μελέτες έχουν δείξει την άμεση εμπλοκή των μυκήτων στον μεταβολισμό του αζώτου, συμπεριλαμβανομένης της αφομοίωσης της αμμωνίας και της αμμωνιοποίησης των νιτρικών (Wegley et al., 2007). Επιπλέον οι μύκητες, όπως και τα προσκολλημένα σε σωματίδια βακτήρια, χρησιμοποιούν οργανικά υποστρώματα.

Έτσι λοιπόν, η ικανότητα των μυκήτων να μεταβολίζουν τις παραπάνω ενώσεις φάνηκε να αντικατοπτρίζεται στα πρότυπα της κοινότητά τους που συσχετίστηκαν σημαντικά με τις συγκεντρώσεις των POC, PON, NH<sub>4</sub> και NO<sub>2</sub>. Συνεπώς, οι διαφορετικές συγκεντρώσεις σωματιδιακών και ανόργανων θρεπτικών ανάμεσα στους σταθμούς FARM και C ή ακόμα και ανάμεσα στους C, OF και MF μπορεί να διαφοροποίησαν τις κοινότητες μυκήτων.



Εντός του φύλου Ascomycota, η πιο επικρατής κλάση ήταν η Saccharomycetes, και ακολουθούσαν οι κλάσεις Dothideomycetes, Eurotiomycetes και Leotiomycetes με το ποσοστό τους στην κοινότητα των μυκήτων να είναι υψηλότερο το μεσημέρι. Εφόσον το φύλο Ascomycota έχει συσχετιστεί θετικά με τα φωσφορικά και αμμωνιακά άλατα (Wang et al., 2018; 2019) τα οποία παίρνουν τις μέγιστες τιμές τους λίγες ώρες μετά το τάισμα των ψαριών (Pitta et al., 1999; Karakassis et al., 2001), η αύξηση της συνεισφοράς αυτών των κλάσεων και του φύλου συνολικά θα μπορούσε να σχετίζεται με τα θρεπτικά. Τέλος, ένα πολύ ενδιαφέρον εύρημα της παρούσας μελέτης είναι η ανίχνευση του φύλου Cryptomycota με το γονίδιο 18S rRNA, αλλά όχι με την περιοχή ITS1-ITS2. Το Cryptomycota είναι ένα σπάνιο φύλο που εντοπίστηκε πρώτη φορά σε παράκτιο οικοσύστημα από τους Wang et al. (2018). Αυτό το εύρημα μπορεί να δείχνει την ανάγκη μελέτης των μυκήτων με συνδυασμό του γονιδίου 18S rRNA και της περιοχής ITS1-ITS2.

### *Σύνοψη αποτελεσμάτων για τους ευκαρυώτες*

Όπως και για τους προκαρυώτες, βρέθηκε πως το μεσο-ζωοπλαγκτόν και οι πικο- και νανο-αυτότροφοι και ετερότροφοι ευκαρυώτες συμπεριλαμβανομένων των μυκήτων επηρεάστηκαν από την υδατοκαλλιέργεια, ενώ και η ημέρα δειγματοληψίας, δηλαδή περιβαλλοντικές παράμετροι που άλλαξαν (π.χ. η κυκλοφορία του νερού, η θερμοκρασία) επηρέασαν τις ευκαρυωτικές κοινότητες. Η ημερήσια μεταβλητότητα παρατηρήθηκε σε ορισμένα ζωοπλαγκτονικά φύλα που είναι γνωστά πως κάνουν κάθετη ημερήσια μετανάστευση και έχουν μέγιστη συνεισφορά στα επιφανειακά νερά το βράδυ. Τα μικρά διάτομα βρέθηκαν να συνεισφέρουν λιγότερο στους σταθμούς με υδατοκαλλιέργεια, ενώ τα δινομαστιγωτά συνεισέφεραν λιγότερο το βράδυ σε όλους τους σταθμούς. Τα αποτελέσματα χρειάζονται περαιτέρω διερεύνηση όμως, ώστε να ανιχνευθούν τυχόν διαφοροποιήσεις σε άλλα, χαμηλότερα ταξινομικά επίπεδα. Σε αυτήν την πρώτη μελέτη των μυκήτων στην Ανατολική Μεσόγειο βρέθηκε ένα μεγάλο ποσοστό μη χαρακτηρισμένων ειδών και μια συσχέτιση με τα ανόργανα και οργανικά θρεπτικά.

### **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Allers, E., Gómez-Consarnau, L., Pinhassi, J., Gasol, J. M., Šimek, K., & Pernthaler, J. (2007). *Response of Alteromonadaceae and Rhodobacteriaceae to glucose and phosphorus manipulation in marine mesocosms. Environmental Microbiology, 9(10), 2417–2429.* doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01360.x

Amaral-Zettler LA, McCliment EA, Ducklow HW, Huse SM. A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA genes. *PLoS One.* 2009 Jul 27;4(7):e6372. doi:10.1371/journal.pone.0006372. Erratum in: *PLoS One.* 2009;4(12). doi: 10.1371/annotation/50c43133-0df5-4b8b-8975-8cc37d4f2f26. PMID: 19633714; PMCID: PMC2711349.

Anderson, M. J., R. N. Gorley, and K. R. Clarke. 2008. PERMANOVA + for PRIMER: Guide to software and statistical methods, PRIMER-E: Plymouth, UK.

Arias, A., Saiz, E. & Calbet, A. Towards an Understanding of Diel Feeding Rhythms in Marine Protists : Consequences of Light Manipulation. *Microb. Ecol.* 64–72 (2020) doi:10.1007/s00248-019-01390-y.

Aylward, F. O., Eppley, J. M., Smith, J. M., Chavez, F. P. & Scholin, C. A. Microbial community transcriptional networks are conserved in three domains at ocean basin scales. *112, 5443–5448* (2015).

Aylward, F. O. et al. Diel cycling and long-term persistence of viruses in the ocean 's euphotic zone. (2017) doi:10.1073/pnas.1714821114.

Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A., & Thingstad, F. (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine ecology progress series*, 257-263.

- Azam, F. & Malfatti, F. Microbial structuring of marine ecosystems. 5, (2007).
- Banerji, A. *et al.* EPA Public Access. (2019) doi:10.1007/s10750-018-3593-0.Submit.
- Becker, K. W. *et al.* Combined pigment and metatranscriptomic analysis reveals highly synchronized diel patterns of phenotypic light response across domains in the open oligotrophic ocean. *ISME J.* (2020) doi:10.1038/s41396-020-00793-x.
- Bi, S., Lai, H., Guo, D. *et al.* Spatio-temporal variation of bacterioplankton community structure in the Pearl River: impacts of artificial fishery habitat and physicochemical factors. *BMC Ecol Evo* 22, 10 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12862-022-01965-3>
- Binder, B. J. & Durand, M. D. Diel cycles in surface waters of the equatorial Pacific. 49, 2601–2617 (2002).
- Blaalid, R., Kumar, S., Nilsson, R. H. & Gardens, R. B. ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. 218–224 (2013) doi:10.1111/1755-0998.12065.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, btu170.
- Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R. *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* 37, 852–857 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bratbak, G., Larsen, A., Pettersson, L. H., Sazhin, A. F. & Thyraug, R. The plankton community in Norwegian coastal waters — abundance , composition , spatial distribution and diel variation. 31, 1500–1514 (2011).
- Brunet, C., Casotti, R. & Vantrepotte, V. Phytoplankton diel and vertical variability in photobiological responses at a coastal station in the Mediterranean Sea. *J. Plankton Res.* 30, 645–654 (2008).
- Cabal, J., González-Nuevo, G., & Nogueira, E. (2008). *Mesozooplankton species distribution in the NW and N Iberian shelf during spring 2004: Relationship with frontal structures. Journal of Marine Systems, 72(1-4), 282–297.* doi:10.1016/j.jmarsys.2007.05.013
- Chen, F. *et al.* Diverse and dynamic populations of cyanobacterial podoviruses in the Chesapeake Bay unveiled through DNA polymerase gene sequences. *Environ. Microbiol.* 11, 2884–2892 (2009).
- Choi, A. *et al.* Effects of finfish aquaculture on biogeochemistry and bacterial communities associated with sulfur cycles in highly sulfidic sediments. 10, 413–427 (2018).
- Clarke, K. R., and M. Ainsworth. 1993. A method of linking multivariate community structure to environmental variable. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 92: 205–219. doi:10.3354/meps092205
- Coesel, S. N., Durham, B. P., Groussman, R. D., Hu, S. K. & Caron, D. A. Diel transcriptional oscillations of light-sensitive regulatory elements in open-ocean eukaryotic plankton communities. 118, 1–12 (2021).
- Cohen, J.H., & Forward, R.B. (2009). ZOOPLANKTON DIEL VERTICAL MIGRATION — A REVIEW OF PROXIMATE CONTROL. *Oceanography and Marine Biology, 47, 77-109.*
- Corte, D. De *et al.* Metagenomic insights into zooplankton-associated bacterial communities. 20, 492–505 (2018).
- Davis, C. *et al.* Diurnal variability in alkaline phosphatase activity and the potential role of zooplankton. 71–78 (2019) doi:10.1002/lol2.10104.
- D'Amore, R., Ijaz, U. Z., Schirmer, M., Kenny, J. G., Gregory, R., Darby, A. C., ... Hall, N. (2016). *A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16S rRNA community profiling. BMC Genomics, 17(1).* doi:10.1186/s12864-015-2194-9
- Dolan, J. R., Vidussi, F. & Fukai, E. Diel vertical distribution of planktonic ciliates within the surface layer of the NW Mediterranean ( May 1995 ). 47, 479–503 (2000).
- Duarte, C.M., Holmer, M., Olsen, Y., Soto, D., Marb`a, N., Guiu, J., Black, K. 2009. Will the oceans help feed humanity? *Bioscience* 59, 967–976. <https://doi.org/10.1525/bio.2009.59.11.8>.
- Duarte, L. N., Coelho, F. J. R. C., Cleary, D. F. R., Bonifácio, D., Martins, P., & Gomes, N. C. M. (2019). Bacterial and microeukaryotic plankton communities in a semi-intensive aquaculture system of sea bass (*Dicentrarchus labrax*): A seasonal survey. *Aquaculture*, 503, 59–69. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.12.066

- Dufresne, Y., Lejzerowicz, F., Perret-Gentil, L.A. *et al.* SLIM: a flexible web application for the reproducible processing of environmental DNA metabarcoding data. *BMC Bioinformatics* **20**, 88 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2663-2>
- Fenchel, T. The microbial loop - 25 years later. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **366**, 99–103 (2008).
- Fernández-Gómez B, Richter M, Schüller M, Pinhassi J, Acinas SG, González JM, Pedrós-Alió C. Ecology of marine Bacteroidetes: a comparative genomics approach. *ISME J.* 2013 May;7(5):1026-37. doi: 10.1038/ismej.2012.169. Epub 2013 Jan 10. PMID: 23303374; PMCID: PMC3635232.
- Fodelianakis, Stilianos & Papageorgiou, Nafsika & Pitta, Paraskevi & Kasapidis, Panagiotis & Karakassis, Ioannis & Ladoukakis, Manolis. (2014). The Pattern of Change in the Abundances of Specific Bacterioplankton Groups Is Consistent across Different Nutrient-Enriched Habitats in Crete. *Applied and environmental microbiology.* **80**. 10.1128/AEM.00088-14.
- Forsman, Z. H., Guzman, H. M., Chen, C. A., Fox, G. E., & Wellington, G. M. (2005). *An ITS region phylogeny of Siderastrea (Cnidaria: Anthozoa): is S. glynni endangered or introduced? Coral Reefs, 24(2), 343–347.* doi:10.1007/s00338-005-0497-z
- Frade, P.R., Glasl, B., Matthews, S.A. *et al.* Spatial patterns of microbial communities across surface waters of the Great Barrier Reef. *Commun Biol* **3**, 442 (2020). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01166-y>
- Freitas, S., Hatosy, S., Fuhrman, J. *et al.* Global distribution and diversity of marine *Verrucomicrobia*. *ISME J* **6**, 1499–1505 (2012). <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.3>
- Gao, Z., Johnson, Z. I. & Wang, G. Molecular characterization of the spatial diversity and novel lineages of mycoplankton in Hawaiian coastal waters. *ISME J.* **4**, 111–120 (2009).
- Gasol, J. M. *et al.* Diel variations in bacterial heterotrophic activity and growth in the northwestern Mediterranean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **164**, 107–124 (1998).
- Ghiglione JF, Mevel G, Pujo-Pay M, Mousseau L, Lebaron P, Goutx M. Diel and seasonal variations in abundance, activity, and community structure of particle-attached and free-living bacteria in NW Mediterranean Sea. *Microb Ecol.* 2007 Aug;54(2):217-31. doi: 10.1007/s00248-006-9189-7. Epub 2007 Mar 8. PMID: 17345139.
- Gilbert, J. A. *et al.* The taxonomic and functional diversity of microbes at a temperate coastal site: A ‘multi-omic’ study of seasonal and diel temporal variation. *PLoS One* **5**, (2010).
- Gong, W. & Marchetti, A. Estimation of 18S Gene Copy Number in Marine Eukaryotic Plankton Using a Next-Generation Sequencing Approach. **6**, 1–5 (2019).
- Gowen and Bradbury. The ecological impact of salmonid farming in coastal waters: a review. (1987). *Deep Sea Research Part B. Oceanographic Literature Review*, **35(6)**, 572. doi:10.1016/0198-0254(88)92716-1
- Grossart, H.-P., Levold, F., Allgaier, M., Simon, M., & Brinkhoff, T. (2005). *Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. Environmental Microbiology, 7(6), 860–873.* doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00759.x
- Guinder, V. A. *et al.* Microbial plankton configuration in the epipelagic realm from the Beagle Channel to the Burdwood Bank, a Marine Protected Area in Sub-Antarctic waters. *PLoS One* **15**, 1–23 (2020).
- Guzel Yucel-Gier, Orhan Uslu & Nihayet Bizsel, 2008. Effects of marine fish farming on nutrient composition and plankton communities in the Eastern Aegean Sea (Turkey). *Aquaculture Research*, **39**, 181-194
- Gutiérrez, Marcelo & Pantoja, Silvio & Tejos, E. & Quinones, Renato. (2011). Role of fungi in processing marine organic matter in the upwelling ecosystem off Chile. *Marine Biology.* **158**. 205-219. 10.1007/s00227-010-1552-z.
- Haris Zafeiropoulos, Anastasia Gioti, Stelios Ninidakis, Antonis Potirakis, Savvas Paragkamian, Nelina Angelova, Aglaia Antoniou, Theodoros Danis, Eliza Kaitetzidou, Panagiotis Kasapidis, Jon Bent Kristoffersen, Vasileios Papadogiannis, Christina Pavloudi, Quoc Viet Ha, Jacques Lagnel, Nikos Pattakos, Giorgos Perantinos, Dimitris Sidirokastritis, Panagiotis Vavilis, Georgios Kotoulas, Tereza Manousaki, Elena Sarropoulou, Costas S Tsigenopoulos, Christos Arvanitidis, Antonios Magoulas, Evangelos Pafilis, **0s and 1s in marine molecular research: a regional HPC perspective**, *GigaScience*, Volume 10, Issue 8, August 2021, giab053, <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab053>
- Heeger, F. *et al.* Long - read DNA metabarcoding of ribosomal RNA in the analysis of fungi from aquatic environments. 1500–1514 (2018) doi:10.1111/1755-0998.12937.

Hingamp, P. *et al.* Exploring nucleo-cytoplasmic large DNA viruses in Tara Oceans microbial metagenomes. *ISME J.* 7, 1678–1695 (2013).

Hou, W. *et al.* High Diversity of Myocyanophage in Various Aquatic Environments Revealed by High-Throughput Sequencing of Major Capsid Protein Gene With a New Set of Primers. 9, 1–11 (2018).

Hu, S. K., Connell, P. E., Mesrop, L. Y. & Caron, D. A. A Hard Day ' s Night : Diel Shifts in Microbial Eukaryotic Activity in the North Pacific Subtropical Gyre. 5, 1–17 (2018).

Jacobsen, A. & Veldhuis, M. J. W. Growth characteristics of flagellated cells of *Phaeocystis pouchetii* revealed by diel changes in cellular DNA content. 4, 811–821 (2005).

Kalantzi, I. & Karakassis, I. Benthic impacts of fish farming: Meta-analysis of community and geochemical data. *Mar. Pollut. Bull.* 52, 484–493 (2006).

Karakassis, I., Tsapakis, M., Hatziyanni, E., Papadopoulou, K. N. & Plaiti, W. Impact of cage farming of fish on the seabed in three Mediterranean coastal areas. *ICES J. Mar. Sci.* 57, 1462–1471 (2000).

Karakassis, Ioannis & Tsapakis, Manolis & Hatziyanni, Eleni & Pitta, Paraskevi. (2001). Diel variation of nutrients and chlorophyll in sea bream and sea bass cages in the Mediterranean. *Fresenius Environmental Bulletin.* 10. 278-283.

Karl, D. M. Microbial oceanography: Paradigms, processes and promise. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 759–769 (2007).

Klindworth, A. *et al.* Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 41, 1–11 (2013).

Koblizek, M. & Ston, J. Diel changes in bacteriochlorophyll a concentration suggest rapid bacterioplankton cycling in the Baltic Sea. 51, 353–361 (2005).

Koid, A., Nelson, W. C., Mraz, A. & Heidelberg, K. B. Comparative Analysis of Eukaryotic Marine Microbial Assemblages from 18S rRNA Gene and Gene Transcript Clone Libraries by Using. (2009) doi:10.1128/AEM.06941-11.

Kolody, B. C. *et al.* Diel transcriptional response of a California Current plankton microbiome to light , low iron , and enduring viral infection. *ISME J.* 2817–2833 (2019) doi:10.1038/s41396-019-0472-2.

Krom, M.D., K-C Emeis, P. Van Cappellen, Why is the Eastern Mediterranean phosphorus limited?, *Progress in Oceanography*, Volume 85, Issues 3–4, 2010, Pages 236-244, ISSN 0079-6611, <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2010.03.003>.

Kuipers, B., Noort, G. J. Van, Vosjan, J. & Herndl, G. J. Diel periodicity of bacterioplankton in the euphotic zone of the subtropical Atlantic Ocean. 201, 13–25 (2000).

Loos, L. M. Van Der. Biases in bulk : DNA metabarcoding of marine communities and the methodology involved. 1–19 (2020) doi:10.1111/mec.15592.

López-Pérez, M., Kimes, N. E., Haro-Moreno, J. M. & Rodríguez-Valera, F. Not all particles are equal: The selective enrichment of particle-associated bacteria from the mediterranean sea. *Front. Microbiol.* 7, (2016).

Mahé F, Rognes T, Quince C, de Vargas C, Dunthorn M. (2015) Swarm v2: highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. *PeerJ* 3:e1420 <<https://doi.org/10.7717/peerj.1420>>

Marohn, L., Schaber, M., Freese, M. *et al.* Distribution and diel vertical migration of mesopelagic fishes in the Southern Sargasso Sea — observations through hydroacoustics and stratified catches. *Mar. Biodivers.* 51, 87 (2021). <https://doi.org/10.1007/s12526-021-01216-6>

Maldonado, M. & Carmona, Æ. M. C. The environmental impact of Mediterranean cage fish farms at semi-exposed locations : does it need a re-assessment ? (2005) doi:10.1007/s10152-004-0211-5.

Mary, I. *et al.* Diel rhythmicity in amino acid uptake by *Prochlorococcus*. 10, 2124–2131 (2008).

Mestre, M., Borrull, E., Sala, M. & Gasol, J. M. Patterns of bacterial diversity in the marine planktonic particulate matter continuum. *ISME J.* 11, 999–1010 (2017).

Needham, D. M. *et al.* Short-term observations of marine bacterial and viral communities : patterns , connections and resilience. *ISME J.* 7, 1274–1285 (2013).

- Not, F. et al., 2016. Chapter 11 Photosymbiosis in Marine Pelagic Environments. Stal, Lucas J, and Mariana Silvia. *The Marine Microbiome. The Marine Microbiome*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-33000-6>.
- Pantoja, S. & Quinones, R. A. Role of fungi in processing marine organic matter in the upwelling ecosystem The role of fungi in processing marine organic matter in the upwelling ecosystem off Chile. 204–219 (2010) doi:10.1007/s00227-010-1552-z.
- Pérez, M. T., Dolan, J. R., Vidussi, F., & Fukai, E. (2000). *Diel vertical distribution of planktonic ciliates within the surface layer of the NW Mediterranean (May 1995)*. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 47(3), 479–503. doi:10.1016/s0967-0637(99)00099-0
- Peters, R. H. (1983). *Size Structure of the Plankton Community Along the Trophic Gradient of Lake Memphremagog*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 40(10), 1770–1778. doi:10.1139/f83-206
- Pinhassi, J., Sala, M. M., Havskum, H., Peters, F., Guadayol, O. s., Malits, A., & Marrase, C. (2004). *Changes in Bacterioplankton Composition under Different Phytoplankton Regimens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), 6753–6766. doi:10.1128/aem.70.11.6753-6766.2004
- Pitta, P., Karakassis, I., Tsapakis, M. & Zivanovic, S. Natural vs . mariculture induced variability in nutrients and plankton in the eastern Mediterranean. 181–194 (1999).
- Pitta, P., Apostolaki, E. T., Giannoulaki, M. & Karakassis, I. Mesoscale changes in the water column in response to fish farming zones in three coastal areas in the Eastern Mediterranean Sea. 65, (2005).
- Pitta, P. *et al.* ‘ Ghost nutrients ’ from fish farms are transferred up the food web by phytoplankton grazers. 374, 1–6 (2009).
- Pomeroy, L.R., P.J. leB. Williams, F. Azam, and J.E. Hobbie. 2007. The microbial loop. *Oceanography* 20(2):28–33, <https://doi.org/10.5670/oceanog.2007.45>.
- Potiris, E., Frangoulis, C., Kalampokis, A., Ntoumas, M. & Pettas, M. Acoustic Doppler current profiler observations of migration patterns of zooplankton in the Cretan Sea. 783–800 (2018).
- Rappé, M., Connon, S., Vergin, K. *et al.* Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* 418, 630–633 (2002). <https://doi.org/10.1038/nature00917>
- Richards, T. A., Jones, M. D. M., Leonard, G. & Bass, D. Marine Fungi : Their Ecology and Molecular Diversity. doi:10.1146/annurev-marine-120710-100802.
- Ruiz-gonzalez, C., Lefort, T., Massana, R., Simo, R. & Gasol, J. M. Diel changes in bulk and single-cell bacterial heterotrophic activity in winter surface waters of the northwestern Mediterranean Sea. 57, 29–42 (2012).
- Santi I, Kasapidis P, Psarra S, Assimakopoulou G and others (2020) Composition and distribution patterns of eukaryotic microbial plankton in the ultra-oligotrophic Eastern Mediterranean Sea. *Aquat Microb Ecol* 84:155-173. <https://doi.org/10.3354/ame01933>
- Sieburth, J. M., Smetacek, V., & Lenz, J. (1978). Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnology and oceanography*, 23(6), 1256-1263.
- Stal, L. J. & Silvia, M. *The Marine Microbiome. The Marine Microbiome* (2016). doi:10.1007/978-3-319-33000-6.
- Stirling, H. P., Dey, T. & Fk, S. Impact of intensive cage fish farming on the phytoplankton and periphyton of a Scottish freshwater loch. 193–214 (1990).;
- Suthers, I. M. & Rissik, D. *plankton*.(2009).Chapter 2. Plankton processes and the environment (Anna M. Redden et al.).
- Taniguchi A, Eguchi M (2020) Community structure of actively growing bacteria in a coastal fish-farming area. *PLoS ONE* 15(6): e0235336. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235336>
- Taylor, J. D. & Cunliffe, M. Multi-year assessment of coastal planktonic fungi reveals environmental drivers of diversity and abundance. *ISME J.* 1–11 (2016) doi:10.1038/ismej.2016.24.
- Tripp, H. J. (2013). *The unique metabolism of SAR11 aquatic bacteria*. *Journal of Microbiology*, 51(2), 147–153. doi:10.1007/s12275-013-2671-2
- Tsagaraki, T. M., Pitta, P., Frangoulis, C., Petihakis, G. & Karakassis, I. Plankton response to nutrient enrichment is maximized at intermediate distances from fish farms. 493, 31–42 (2013).

- Tsai, A. & Chang, J. Seasonal diel variations of picoplankton and nanoplankton in a subtropical western Pacific coastal ecosystem. *50*, 1221–1231 (2005).
- Tsakalakis, I., Pahlow, M., Oschlies, A., Blasius, B. & Ryabov, A. B. Diel light cycle as a key factor for modelling phytoplankton biogeography and diversity. *Ecol. Modell.* *384*, 241–248 (2018).
- Turner, J. T. & Turner, J. T. Zooplankton Fecal Pellets , Marine Snow , Phytodetritus and the Ocean ' s Biological Pump University of Massachusetts Dartmouth University of Massachusetts Dartmouth. *Prog. Oceanogr.* (2014) doi:10.1016/j.pocean.2014.08.005.
- Vangronsveld, J. & Colpaert, J. V. Comparison and Validation of Some ITS Primer Pairs Useful for Fungal Metabarcoding Studies. *9*, (2014).
- Van Haren, H. (2014). *Internal wave–zooplankton interactions in the Alboran Sea (W-Mediterranean)*. *Journal of Plankton Research*, *36*(4), 1124–1134. doi:10.1093/plankt/fbu031
- Vaulot, D. & Marie, D. Diel variability of photosynthetic picoplankton in the equatorial Pacific groups inducing uniform profiles for cell abundance fluorescence ., *104*, 3297–3310 (1999).
- Vislova, A. *et al.* Diel Oscillation of Microbial Gene Transcripts Declines With Depth in Oligotrophic Ocean Waters. *10*, (2019).
- Vlahos, N., Kormas, K.A., Pachiadaki, M.G. *et al.* Changes of bacterioplankton apparent species richness in two ornamental fish aquaria. *SpringerPlus* *2*, 66 (2013). <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-66>
- Wang, X. *et al.* Distribution and Diversity of Planktonic Fungi in the West Pacific Warm Pool. *9*, 1–7 (2014).
- Wang, Y., Sen, B., He, Y., Xie, N. & Wang, G. Spatiotemporal distribution and assemblages of planktonic fungi in the coastal waters of the Bohai Sea. *Front. Microbiol.* *9*, 1–14 (2018).
- Wang, Y., Sen, K., He, Y., Xie, Y. & Wang, G. Science of the Total Environment Impact of environmental gradients on the abundance and diversity of planktonic fungi across coastal habitats of contrasting trophic status. *Sci. Total Environ.* *683*, 822–833 (2019).
- Wegley, L., Edwards, R., Rodriguez-Brito, B., Liu, H., and Rohwer, F. (2007). Metagenomic analysis of the microbial community associated with the coral *Porites astreoides*. *Environ. Microbiol.* *9*, 2707–2719. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01383.x
- Winget, D. M. & Wommack, K. E. Diel and daily fluctuations in virioplankton production. *11*, 2904–2914 (2009).
- Winnepenninckx B, Backeljau T, De Wachter R. Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends Genet.* 1993 Dec;9(12):407. doi: 10.1016/0168-9525(93)90102-n. PMID: 8122306.
- Winter, C., Herndl, G. J. & Weinbauer, M. G. Diel cycles in viral infection of bacterioplankton in the North Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* *35*, 207–216 (2004).
- Xiong, J., Chen, H., Hu, C. *et al.* Evidence of bacterioplankton community adaptation in response to long-term mariculture disturbance. *Sci Rep* *5*, 15274 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep15274>
- Yoshida, T. *et al.* Locality and diel cycling of viral production revealed by a 24 h time course cross-omics analysis in a coastal region of Japan. *ISME J.* (2017) doi:10.1038/s41396-018-0052-x.
- Zafeiropoulos, H., Viet, H. Q., Vasileiadou, K., Potirakis, A., Arvanitidis, C., Topalis, P., ... Pafilis, E. (2020). *PEMA: a flexible Pipeline for Environmental DNA Metabarcoding Analysis of the 16S/18S ribosomal RNA, ITS, and COI marker genes*. *GigaScience*, *9*(3). doi:10.1093/gigascience/giaa022
- Zaneveld, J. R., Burkepile, D. E., Shantz, A. A., Pritchard, C. E., McMinds, R., Payet, J. P., ... Thurber, R. V. (2016). *Overfishing and nutrient pollution interact with temperature to disrupt coral reefs down to microbial scales*. *Nature Communications*, *7*, 11833. doi:10.1038/ncomms11833

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### 1. Το αρχείο των παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν στις βιοπληροφορικές αναλύσεις για το γονίδιο 16S rRNA

```
#####  
#####  
##### PEMA 's PARAMETERS  
#####  
#####  
#####  
#  
# for version 2.1.4  
#  
# In this file there are all the parameters that need to be assigned  
# every time PEMA is  
# about to run! The parameters we have here, are not the only parameters  
# of the tools  
# invoked by PEMA. Hence, we encourage you the most to study the manual  
# of each tool and  
# make them as good as possible for your specific experiment.  
#  
# ATTENTION!  
# From each variable you have to leave EXACTLY ONE (1) TAB and then fill  
# in the parameter.  
#  
#  
#####  
#####  
##### The parameter setting starts from here!  
#####  
#####  
#####  
#  
# Give in your each uniq experiment a NAME, so a single output file will  
# be created for each of them  
#  
outputFolderName 16S_vsearch098_t  
#  
#  
# PEMA needs the names of the samples to be as in ENA format (e.g  
# "ERR1021912") but  
# they are more like as the Illumina sequencer returned them (e.g  
# "FdCor_1.fast.gz")  
# In order to change the names of your samples as they should be.  
# Otherwise, you need to set the "EnaData" variable as 'No'.  
EnaData Yes  
#  
# Each sequencer has a special combination of letters with which all its  
# reads start with  
# For example MiSeq has "@M0". Please provide this pattern to PEMA to  
# convert your data to the ENA  
# format. If you do not know that, you can either google it or gunzip a  
# fastq.gz files of yours and provide
```

```

# the letatters between the "@" and the first ":" characters.
sequencerPrefix M0
#
#####
##### fastqc (v0.11.8) #####
#####
#
# No parameters here!
#
#
#####
##### trimmomatic (v.0.38) ##### //
http://www.usadellab.org/cms/uploads/supplementary/Trimmomatic/Trimmomati
cManual_V0.32.pdf
#####
#
# Performs an adaptive quality trim, balancing the benefits of retaining
longer reads against the costs of retaining bases with errors.
# It needs to be set either as 'Yes' or 'No'.
#
maxInfo Yes
#
#
##### for MAXINFO #####
# Specifies the read length which is likely to allow the location of the
read within the target sequence to be determined.
# It needs an integer to be set as a value.
#
targetLength 200
#
#
# This value, specifies the balance between preserving as much read
length as possible vs. removal of incorrect bases.
# It can take values between 0 and 1.
# A low value of this parameter (<0.2) favours longer reads, while a high
value (>0.8) favours read correctness.
#
strictness 0.6
#
#
##### for ILLUMINACLIP #####
# Specifies the path to a fasta file containing all the adapters, PCR
sequences etc.
# The naming of the various sequences within this file determines how
they are used.
#
adapters TruSeq3-PE.fa
#
#
# This parameter specifies the maximum mismatch count which will still
allow a full match to be performed.
# It needs an integer to be set as a value.
#
seedMismatches 2
#
#

```



```

# This parameter specifies how accurate the match between the two
'adapter ligated' reads must be for PE palindrome read alignment.
# It needs an integer to be set as a value.
#
palindromeClipThreshold    30
#
#
# It specifies how accurate the match between any adapter etc. sequence
must be against a read.
# It needs an integer to be set as a value.
#
simpleClipThreshold    15
#
#
##### for LEADING #####
# The LEADING module, removes low quality bases from the beginning.
# As long as a base has a value below this threshold (value of the
'leading' parameter) the base is removed and the next base will be
investigated.
# It needs an integer to be set as a value.
#
leading    10
#
#
##### for TRAILING #####
# This module of Trimmomatic removes low quality bases from the end.
# As long as a base has a value below this threshold (value of the
'trailing' parameter), the base is removed
# and the next base (which as trimmomatic is starting from the 3' prime
end, would be base preceding the just removed base) will be investigated.
# It needs an integer to be set as a value.
#
trailing    15
#
#
##### for MINLEN #####
# This module removes reads that fall below the specified minimal length.
If required, it should normally be after all other processing steps.
# Reads removed by this step will be counted and included in the "dropped
reads" count presented in the trimmomatic summary.
# It needs an integer to be set as a value.
#
minlen    100
#
#
# Finally, you need to set how many threads you want Trimmomatic to run
into.
#
threadsTrimmomatic    40
#
#
#####
##### BayesHammer (from SPAdes: v3.13.0) #####
#####
#

```

```

# This algorithm is part of the SPAdes tool package. You can find its
manual here: http://cab.spbu.ru/files/release3.10.1/manual.html#sec1
#
# no parameters here!
#
#####
#####          PANDAsq (v. 2.11)          ##### //
https://storage.googleapis.com/pandaseq/pandaseq.html
#####
#
# PANDAsq is the algorithm that PEMA uses in order to merge the paired-
end reads.
# PANDAsq has more than one merging algorithms.
#
# Here, we set the algorithm used for assembly. The most common of them
are:
# pear --> uses the formula described in the PEAR paper (Zhang 2013),
optionally with the probability of a random base (q) provide
# simple_bayesian --> uses the formula described in the original paper
(Masella 2012), optionally with an error estimation (Eμ) provided.
# other options are stich, flash and more that you can find in the above
link.
#
pandaseqAlgorithm      simple_bayesian
#
#
# PANDAsq is a I/O bound algorithm. That means that it needs severous
time in order to handle the input and output files
# while the process is quite fast. However, it does support
multithreading and here you can set the number of threads it is going to
use.
#
pandaseqThreads 40
#
#
# The 'minlen' parameter sets the minimum length for a sequence, after
primers are removed.
# By default, all sequences are kept. With this option, sequences shorter
than desired can be discarded.
# In case you need to use this parameter, be sure you leave a tab after
'minlen' and set it like this: '-l 80'
# If you do not want to use this parameter, please remove everything
after the 'minlen'
#
pandaseqMinlen  -l 150
#
#
# The 'minoverlap' parameter sets the minimum overlap between forward and
reverse reads.
# By default, this is at least one nucleotide of overlap.
# Raising this number does not generally increase the quality of the
output as alignments with small overlaps tend to score poorly and are
discarded anyway.
#
minoverlap 5

```

```

#
#
# The 'threshold' parameter sets the score, between zero and one, that a
sequence must meet to be kept in the output.
# Any alignments lower than this will be discarded as low quality.
# Increasing this number will not necessarily prevent uncalled bases (Ns)
from appearing in the final sequence.
# It is also used as the threshold to match primers, if primers are
supplied. The default value is 0.6.
#
threshold 0.6
#
#
# The '-N' parameter eliminates all sequences with uncalled nucleotides
in the output.
# Otherwise, during assembly, uncalled bases (Ns) from unpaired regions
may be emitted.
# If you need -N to be on your analysis, please add '-N' after
'elimination'. Please make sure you leave a tab.
# If you do not want the parameter to be on, please make sure there is
nothing after the 'elimination' parameter.
#
elimination      -N
#
#
## PEMA performs the PANDAseq algorithm, with the -a and the -B
parameters also on.
## That it for stripping the primers after assembly, rather than before
and allowing input sequences to lack a barcode/tag correspondingly.
#
#
#####
#####  obiuniq  (from OBITools: v1.2.12)  #####
#####
#
# This algorithm is part of the OBITools package. You can find more about
them here: https://pythonhosted.org/OBITools/
#
# no parameters here!
#
#
#####
#####  VSEARCH  (v2.9.1)  #####
#####
#
# VSEARCH is the main algorithm used for a lot of steps in the case of
the 16S marker gene.
# Set how many threads do you want PANDAseq to use.
# It needs an integer to be set as a value.
#
vsearchThreads 40
#
#
# Here you need to set a score about the clustering step of the VSEARCH
algorithm.

```

```

# Do not add a read into a certain cluster if the pairwise identity with
its centroid, is lower than the value of the 'vsearchId' parameter.
# The pairwise identity is defined as the number of (matching columns) /
(alignment length - terminal gaps).
# It needs a real number to be set as a value, ranging from 0.0 to 1.0 .
#
vsearchId 0.98
#
#
#####
#####
#####
#####
##### GENE - dependent parameters
#####
#####
#####
#####
#
# The marker gene you have is really important for both the clustering &
chimera removal procedure and the
# taxonomy assignment. By default, the pipeline runs for 16S. Substitute
with 'COI' if COI is your marker gene
# write it down after the underscore (_) - do not erase the udenrscore!!
#
gene gene_16S
#
#
#####
#####
# Here are some parameters needed when the the metabarcoding analysis is
about the 16S/18S marker genes #
#####
#####
#
#
# If your marker gene is 16S, you can choose between 2 different
approaches of taxonomy assignment (alignment & phylogenetic based)
# An alignment based taxonomy assignment - set as 'alignment' - which is
based on SILVA and CREST (version 3.0).
# However, you can also get a phylogenetic based assignment, by putting
'phylogeny' in this parameter. In that case, a reference tree we created
is being used as well as the RAXML
#
taxonomyAssignmentMethod alignment
#
#
# I you choose phylogeny based taxonomy assignment, then you ll need to
rum PaPaRa.
# Pleas fill in how many cores PaPaRa is able to use.
#
numberOfCoresForPapara 20
#
#

```

```

# When you use the alignment-based taxonomy assignment, then the
LCAClassifier from the CREST algorithm, uses a Silva version for the
assignment.
# PEMA allows you to choose between the two last version of Silva. Hence,
set the "silvaVersion" parameter either as 'silva_128' or as 'silva_132'
# depending on the version of your choice.
# In case you are running 18S rRNA data, you may also use the PR2
database, by setting the referenceDb parameter as 'pr2'.
#
referenceDb      silva_132
#
#
# As you may need a series of taxonomy assignment when you use the
alignment-based method, please give another name in your
# taxonomy output folder of the CREST algorithm, each time you are about
to use it.
# CREST creates an output folder every time and if a folder with the same
already exists, it is going to abort the task!
# You need to set the value of this parameter in case of 16S/18S rRNA and
ITS marker genes.
#
taxonomyFolderName  16S_taxon_assign
#
#
#####
#####
#####          For the case of the ITS marker gene
#####
#####
#####
#
# For the case of ITS there is an extra problem with respect to the
primes used.
# Please complete the next two variables with the primers you used
#
forwardITSPrimer GATGAAGAACGYAGYRAA
reverseITSPrimer CTBTTVCKCTTCACTCG
#
#
#####
#####
#####          Here are some parameters needed with respect to clustering
algorithms          #####
#####
#####
#
#
# For the case of the 16S and 18S rRNA marker genes, you can either get
an OTU-table using the VSEARCH algorithm
# or you can get an ASV-table by taking advantage of the SWARM algorithm.
# If your marker gene is COI or ITS, you can choose between 2 different
approaches of clustering.
# Depending on which of them you choose you get either a robust output in
a short time (Swarm) or a non-robust output (CROP) that requires quite
much more time.

```

```

# Please fill in according to your marker gene and needs (write "Swarm"
or "vsearch" or "CROP" after algo_).
#
clusteringAlgo  algo_vsearch
#
#
# In case of SWARM, the user needs to specify the value of "d"
parameter,
# maximum number of differences allowed between two amplicons, meaning
that two amplicons
# will be grouped if they have integer (or less) differences. This is
swarm's most important
# parameter
#
d      1
#
#
# when using the option --fastidious (-f), define the minimum mass of a
large ASV.
# By default, an ASV with a mass of 3 or more is considered large.
# Conversely, an ASV is small if it has a mass of less than 3, meaning
that it is composed of either one amplicon of abundance 2, or two
amplicons of abundance 1.
# Any positive value greater than 1 can be specified. Using higher
boundary values will speed up the second pass, but also reduce the
taxonomical resolution of swarm
# results. Default mass of a large OTU is 3.
#
boundary  3
#
#
# You also need to set the number of threads that Swarm is able to use
#
swarmThreads  20
#
#
## SWARM tends to create a great number of ASVs, especially when d takes
a low value.
## Would you like to remove the singletons (ASVs that appear only once
with abundance equal to 1) ?
#
removeSingletons Yes
#
#
# CROP is able to run on multiple CPUs. As PEMA needs to update an
environmental variable to do this
#
omp_num_threads 20
#
#
# PEMA invokes the UCHIME_DENOVO3 algorithm for the chimera removal in
the case of the COI marker gene.
# This is a quite common algorithm for that step, but you still need to
choose the minimum abundance skew value.
# By default this value is equal to 16. However, the only difference
between UCHIME_DENOVO2 and 3 is that in the second version,

```

```

# the abskew value used to be equal to 2. So, be my guest and pick your
value as I really have no clue about that.
# Probably, for environmental studies a low abskew is better, while in
more specific studies a larger one would fit most.
#
abskew      2
#
#
#####
#####
#
#           For the taxonomy assignment of the COI marker gene
#
#####
#####
#
# Since PEMA v.2.0 both Midori and Midori2 are supported. The second
version of Midori includes more than
# 180.000 unique species and expands beyond Metazoa. However, the
computational time needed increases to a
# a great extent when Midori2 is the one selected. Choose wisely,
especially in case you have a lot of query sequences
# If you want Midori2 for your analysis, replace "1" with "2" after the
"midori_" prefix.
#
midori_version  midori_1
#
#
#####
#####
#
#####
#####
#
#           In - house (local) reference database for the taxonomy
assignment step
#
#####
#####
# In case you would prefer to use a reference database of yours for the
taxonomy step, PEMA will ask you for the
# files necessary to train each of the two classifiers supported. You
need to provide those in the directory called
# `local_ref_db` and depending on which classifier will train, the files
have to be in a different format.
# More specifically, if you are working with COI, then PEMA uses the
RDPClassifier and you need to provide a taxonomy
# and a sequence file, as described here: https://john-
quensen.com/tutorials/training-the-rdp-classifier/
# If you are working with 16S, 18S or ITS then PEMA uses the CREST
classifier for the taxonomy step
# and you need to provide the corresponding two files as described at:
https://github.com/lanzen/CREST
# (see after the Output section).
# As containers are lost when exit from one, you will have to train the
classifier, every time you run a new PEMA container

```

```

# If you are about to use a custom ref db, set the following parameter as
'Yes'. Otherwise, it must be set as 'No'.
# The `name_of_custom_db` may be empty or no depending on whether you
will use a custom db or not.
#
custom_ref_db    No
name_of_custom_db    partialCustomdb
#
#####
#####
#
# In case you would like to link the OTU/ASV assignment to its closest
NCBI Taxonomy Id
# set the following parameter as `Yes`
#
getNCBITaxId    No
#
#####
#####
#
# The following parameters is only for the case that the Phyloseq R
package is about to run
#
#####
#####
#
# If wish to use Phyloseq in order to analyse your returned data then set
the following parameter 'phyloseq' with 'Yes'.
# In order to do that, PEMA needs an MSA that it is returned by the MAFFT
(v7.427) aligner and a phylogeny tree of the OTUs found which is built by
the RAxML-ng algorithm.
# Please remember that in order to use phyloseq a "metadata.tsv" file is
necessary to be part of your anaylis folder.
#
phyloseq    No
#
#
# The phyloseq object can handle phylogenetic trees as well. PEMA uses
RAxML-ng in order to build such trees.
# Do you want to create such a tree with your OTUs? In case you build
this once, you can use it as many times as you want.
#
tree    No
#
# In case you are about to use the phyloseq option, then a phylogeny tree
has to be built. Hence, PEMA invokes the RAxML-ng algorithm
# which is able to run in more than one threads. Please set the number of
threads RAxML is able to use.
#
raxmlThreads    20
#
#
# You can also set the number of the parsimony-based starting trees for
the RAxML-ng
#
parsTrees    1

```



```

#
#
# And finally, the number of the bootstrap trees
#
bootstrapTrees 1
#
#####
#####
#
# Finally, do you want your raw data to be removed in another file and
empty the "rawData" file and all the checkpoints of PEMA to be also in an
extra folder
# Swich 'Yes' to 'No' if you wish so. Be very careful when you do that,
as you need to remember that if you want to analyze another dataset
through P.E.M.A
# you will have to remove the first one manually.
#
emptyRawDataFile Yes
emptyCheckpoints Yes
#
#
# Classifier to use, parameter values
("CREST","phylogeny","RDPClassifier")
# If you are about to use a version of Silva db, or Unite db or a custom
db that you have prepared
# the required files accordingly
# (see
https://hariszaf.github.io/pema\_documentation/training\_crest\_classifier/)
,
# you may set this parameter as "CREST".
# In case you are running 16S data and you would like a phylogeny based
taxonomy assignment,
# you may set this parameter as "phylogeny"
# In case you are about to use a version of Midori or a custom db for
which you have prepared the
# required files (see
https://hariszaf.github.io/pema\_documentation/training\_rdpclassifier/)
you
# may set this parameter as "RDPClassifier"
classifierAlgo CREST
#
#
#

```

## 2. Το αρχείο των παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν στις βιοπληροφορικές αναλύσεις για το γονίδιο 18S Rrna

```

#####
#####
##### PEMA 's PARAMETERS
#####
#####
#####
#####

```

```

#
#   for version 2.1.4
#
# In this file there are all the parameters that need to be assigned
every time PEMA is
# about to run! The parameters we have here, are not the only parameters
of the tools
# invoked by PEMA. Hence, we encourage you the most to study the manual
of each tool and
# make them as good as possible for your specific experiment.
#
# ATTENTION!
# From each variable you have to leave EXACTLY ONE (1) TAB and then fill
in the parameter.
#
#
#####
#####
##### The parameter setting starts from here!
#####
#####
#####
#
# Give in your each uniq experiment a NAME, so a single output file will
be created for each of them
#
outputFolderName 18S_vsearch_095
#
#
# PEMA needs the names of the samples to be as in ENA format (e.g
"ERR1021912") but
# they are more like as the Illumina sequencer returned them (e.g
"FdCor_1.fast.gz")
# In order to change the names of your samples as they should be.
# Otherwise, you need to set the "EnaData" variable as 'No'.
EnaData      Yes
#
# Each sequencer has a special combination of letters with which all its
reads start with
# For example MiSeq has "@M0". Please provide this pattern to PEMA to
convert your data to the ENA
# format. If you do not know that, you can either google it or gunzip a
fastq.gz files of yours and provide
# the letatters between the "@" and the first ":" characters.
sequencerPrefix M0
#
#####
##### fastqc (v0.11.8) #####
#####
#
# No parameters here!
#
#
#####

```

```

##### trimmomatic (v.0.38) ##### //
http://www.usadellab.org/cms/uploads/supplementary/Trimmomatic/TrimmomaticManual_V0.32.pdf
#####
#
# Performs an adaptive quality trim, balancing the benefits of retaining
longer reads against the costs of retaining bases with errors.
# It needs to be set either as 'Yes' or 'No'.
#
maxInfo      Yes
#
#
##### for MAXINFO #####
# Specifies the read length which is likely to allow the location of the
read within the target sequence to be determined.
# It needs an integer to be set as a value.
#
targetLength      200
#
#
# This value, specifies the balance between preserving as much read
length as possible vs. removal of incorrect bases.
# It can take values between 0 and 1.
# A low value of this parameter (<0.2) favours longer reads, while a high
value (>0.8) favours read correctness.
#
strictness 0.2
#
#
##### for ILLUMINACLIP #####
# Specifies the path to a fasta file containing all the adapters, PCR
sequences etc.
# The naming of the various sequences within this file determines how
they are used.
#
adapters      TruSeq2-PE.fa
#
#
# This parameter specifies the maximum mismatch count which will still
allow a full match to be performed.
# It needs an integer to be set as a value.
#
seedMismatches 0
#
#
# This parameter specifies how accurate the match between the two
'adapter ligated' reads must be for PE palindrome read alignment.
# It needs an integer to be set as a value.
#
palindromeClipThreshold      30
#
#
# It specifies how accurate the match between any adapter etc. sequence
must be against a read.
# It needs an integer to be set as a value.
#

```

```

simpleClipThreshold 15
#
#
##### for LEADING #####
# The LEADING module, removes low quality bases from the beginning.
# As long as a base has a value below this threshold (value of the
'leading' parameter) the base is removed and the next base will be
investigated.
# It needs an integer to be set as a value.
#
leading 20
#
#
##### for TRAILING #####
# This module of Trimmomatic removes low quality bases from the end.
# As long as a base has a value below this threshold (value of the
'trailing' parameter), the base is removed
# and the next base (which as trimmomatic is starting from the 3' prime
end, would be base preceding the just removed base) will be investigated.

# It needs an integer to be set as a value.
#
trailing 15
#
#
##### for MINLEN #####
# This module removes reads that fall below the specified minimal length.
If required, it should normally be after all other processing steps.
# Reads removed by this step will be counted and included in the "dropped
reads" count presented in the trimmomatic summary.
# It needs an integer to be set as a value.
#
minlen 100
#
#
# Finally, you need to set how many threads you want Trimmomatic to run
into.
#
threadsTrimmomatic 20
#
#
#####
##### BayesHammer (from SPAdes: v3.13.0) #####
#####
#
# This algorithm is part of the SPAdes tool package. You can find its
manual here: http://cab.spbu.ru/files/release3.10.1/manual.html#sec1
#
# no parameters here!
#
#
#####
##### PANDAsEq (v. 2.11) ##### //
https://storage.googleapis.com/pandaseq/pandaseq.html
#####
#

```

```

# PANDAsseq is the algorithm that PEMA uses in order to merge the paired-
end reads.
# PANDAsseq has more than one merging algorithms.
#
# Here, we set the algorithm used for assembly. The most common of them
are:
# pear --> uses the formula described in the PEAR paper (Zhang 2013),
optionally with the probability of a random base (q) provide
# simple_bayesian --> uses the formula described in the original paper
(Masella 2012), optionally with an error estimation ( $\epsilon$ ) provided.
# other options are stich, flash and more that you can find in the above
link.
#
pandaseqAlgorithm      simple_bayesian
#
#
# PANDAsseq is a I/O bound algorithm. That means that it needs severous
time in order to handle the input and output files
# while the process is quite fast. However, it does support
multithreading and here you can set the number of threads it is going to
use.
#
pandaseqThreads 20
#
#
# The 'minlen' parameter sets the minimum length for a sequence, after
primers are removed.
# By default, all sequences are kept. With this option, sequences shorter
than desired can be discarded.
# In case you need to use this parameter, be sure you leave a tab after
'minlen' and set it like this: '-l 80'
# If you do not want to use this parameter, please remove everything
after the 'minlen'
#
pandaseqMinlen  -l 150
#
#
# The 'minoverlap' parameter sets the minimum overlap between forward and
reverse reads.
# By default, this is at least one nucleotide of overlap.
# Raising this number does not generally increase the quality of the
output as alignments with small overlaps tend to score poorly and are
discarded anyway.
#
minoverlap 20
#
#
# The 'threshold' parameter sets the score, between zero and one, that a
sequence must meet to be kept in the output.
# Any alignments lower than this will be discarded as low quality.
# Increasing this number will not necessarily prevent uncalled bases (Ns)
from appearing in the final sequence.
# It is also used as the threshold to match primers, if primers are
supplied. The default value is 0.6.
#
threshold 0.6

```

```

#
#
# The '-N' parameter eliminates all sequences with uncalled nucleotides
in the output.
# Otherwise, during assembly, uncalled bases (Ns) from unpaired regions
may be emitted.
# If you need -N to be on your analysis, please add '-N' after
'elimination'. Please make sure you leave a tab.
# If you do not want the parameter to be on, please make sure there is
nothing after the 'elimination' parameter.
#
elimination      -N
#
#
## PEMA performs the PANDAseq algorithm, with the -a and the -B
parameters also on.
## That it for stripping the primers after assembly, rather than before
and allowing input sequences to lack a barcode/tag correspondingly.
#
#
#####
#####  obiuniq  (from OBITools: v1.2.12)  #####
#####
#
# This algorithm is part of the OBITools package. You can find more about
them here: https://pythonhosted.org/OBITools/
#
# no parameters here!
#
#
#####
#####      VSEARCH  (v2.9.1)      #####
#####
#
# VSEARCH is the main algorithm used for a lot of steps in the case of
the 16S marker gene.
# Set how many threads do you want PANDAseq to use.
# It needs an integer to be set as a value.
#
vsearchThreads  20
#
#
# Here you need to set a score about the clustering step of the VSEARCH
algorithm.
# Do not add a read into a certain cluster if the pairwise identity with
its centroid, is lower than the value of the 'vsearchId' parameter.
# The pairwise identity is defined as the number of (matching columns) /
(alignment length - terminal gaps).
# It needs a real number to be set as a value, ranging from 0.0 to 1.0 .
#
#
vsearchId  0.98
#
#
#####
#####

```

```

##### GENE - dependent parameters
#####
#####
#####
#
# The marker gene you have is really important for both the clustering &
chimera removal procedure and the
# taxonomy assignment. By default, the pipeline runs for 16S. Substitute
with 'COI' if COI is your marker gene
# write it down after the underscore (_) - do not erase the udenrscore!!

#
gene gene_18S
#
#
#####
#####
# Here are some parameters needed when the the metabarcoding analysis is
about the 16S/18S marker genes #
#####
#####
#
#
# If your marker gene is 16S, you can choose between 2 different
approaches of taxonomy assignment (alignment & phylogenetic based)
# An alignment based taxonomy assignment - set as 'alignment' - which is
based on SILVA and CREST (version 3.0).
# However, you can also get a phylogenetic based assignment, by putting
'phylogeny' in this parameter. In that case, a reference tree we created
is being used as well as the RAxML
#
taxonomyAssignmentMethod alignment
#
#
# I you choose phylogeny based taxonomy assignment, then you ll need to
rum PaPaRa.
# Pleas fill in how many cores PaPaRa is able to use.
#
numberOfCoresForPapara 7
#
#
# When you use the alignment-based taxonomy assignment, then the
LCAClassifier from the CREST algorithm, uses a Silva version for the
assignment.
# PEMA allows you to choose between the two last version of Silva. Hence,
set the "silvaVersion" parameter either as 'silva_128' or as 'silva_132'

# depending on the version of your choice.
# In case you are running 18S rRNA data, you may also use the PR2
database, by setting the referenceDb parametera as 'pr2'.
#
referenceDb pr2

```

```

#
#
# As you may need a series of taxonomy assignment when you use the
alignment-based method, please give another name in your
# taxonomy output folder of the CREST algorithm, each time you are about
to use it.
# CREST creates an output folder every time and if a folder with the same
already exists, it is going to abort the task!
# You need to set the value of this parameter in case of 16S/18S rRNA and
ITS marker genes.
#
taxonomyFolderName    my_taxon_assign_98
#
#
#####
#####
#####          For the case of the ITS marker gene
#####
#####
#####
#
# For the case of ITS there is an extra problem with respect to the
primes used.
# Please complete the next two variables with the primers you used
#
forwardITSPrimer GATGAAGAACGYAGYRAA
reverseITSPrimer CTBTTVCCKCTTCACTCG
#
#
#####
#####
#####          Here are some parameters needed with respect to clustering
algorithms          #####
#####
#####
#
#
# For the case of the 16S and 18S rRNA marker genes, you can either get
an OTU-table using the VSEARCH algorithm
# or you can get an ASV-table by taking advantage of the SWARM algorithm.

# If your marker gene is COI or ITS, you can choose between 2 different
approaches of clustering.
# Depending on which of them you choose you get either a robust output in
a short time (Swarm) or a non-robust output (CROP) that requires quite
much more time.
# Please fill in according to your marker gene and needs (write "Swarm"
or "vsearch" or "CROP" after algo_).
#
clusteringAlgo    algo_vsearch
#
#
# In case of SWARM, the user needs to specify the value of "d"
parameter,
# maximum number of differences allowed between two amplicons, meaning
that two amplicons

```



```

# will be grouped if they have integer (or less) differences. This is
# swarm's most important
# parameter
#
d      15
#
#
# when using the option --fastidious (-f), define the minimum mass of a
# large ASV.
# By default, an ASV with a mass of 3 or more is considered large.
# Conversely, an ASV is small if it has a mass of less than 3, meaning
# that it is composed of either one amplicon of abundance 2, or two
# amplicons of abundance 1.
# Any positive value greater than 1 can be specified. Using higher
# boundary values will speed up the second pass, but also reduce the
# taxonomical resolution of swarm
# results. Default mass of a large OTU is 3.
#
boundary  3
#
#
# You also need to set the number of threads that Swarm is able to use
#
swarmThreads  20
#
#
## SWARM tends to create a great number of ASVs, especially when d takes
# a low value.
## Would you like to remove the singletons (ASVs that appear only once
# with abundance equal to 1) ?
#
removeSingletons Yes
#
#
# CROP is able to run on multiple CPUs. As PEMA needs to update an
# environmental variable to do this$
#
omp_num_threads  20
#
#
# PEMA invokes the UCHIME_DENOVO3 algorithm for the chimera removal in
# the case of the COI marker gene.
# This is a quite common algorithm for that step, but you still need to
# choose the minimum abundance skew value.
# By default this value is equal to 16. However, the only difference
# between UCHIME_DENOVO2 and 3 is that in the second version,
# the abskew value used to be equal to 2. So, be my guest and pick your
# value as I really have no clue about that.
# Probably, for environmental studies a low abskew is better, while in
# more specific studies a larger one would fit most.
#
abskew      2
#
#
#####
#####

```

```

#
#           For the taxonomy assignment of the COI marker gene
#
#####
#####
#
# Since PEMA v.2.0 both Midori and Midori2 are supported. The second
# version of Midori includes more than
# 180.000 unique species and expands beyond Metazoa. However, the
# computational time needed increases to a
# a great extent when Midori2 is the one selected. Choose wisely,
# especially in case you have a lot of query sequences
# If you want Midori2 for your analysis, replace "1" with "2" after the
# "midori_" prefix.
#
midori_version  midori_1
#
#
#####
#####
#
#####
#####
#
#           In - house (local) reference database for the taxonoomy
# assignment step
#
#####
#####
# In case you would prefer to use a reference database of yours for the
# taxonomy step, PEMA will ask you for the
# files necessary to train each of the two classifiers supported. You
# need to provide those in the directory called
# `local_ref_db` and depending on which classifier will train, the files
# have to be in a different format.
# More specifically, if you are working with COI, then PEMA uses the
# RDPClassifier and you need to provide a taxonomy
# and a sequence file, as described here: https://john-
# quensen.com/tutorials/training-the-rdp-classifier/
# If you are working with 16S, 18S or ITS then PEMA uses the CREST
# classifier for the taxonomy step
# and you need to provide the corresponding two files as described at:
# https://github.com/lanzen/CREST
# (see after the Output section).
# As containers are lost when exit from one, you will have to train the
# classifier, every time you run a new PEMA container
# If you are about to use a custom ref db, set the following parameter as
# 'Yes'. Otherwise, it must be set as 'No'.
# The `name_of_custom_db` may be empty or no depending on whether you
# will use a custom db or not.
#
custom_ref_db    No
name_of_custom_db  partialCustomdb
#

```

```

#####
#####
#
# In case you would like to link the OTU/ASV assignment to its closest
NCBI Taxonomy Id
# set the following parameter as `Yes`
#
getNCBITaxId      No
#
#####
#####
#
# The following parameters is only for the case that the Phyloseq R
package is about to run
#
#####
#####
#
# If wish to use Phyloseq in order to analyse your returned data then set
the following parameter 'phyloseq' with 'Yes'.
# In order to do that, PEMA needs an MSA that it is returned by the MAFFT
(v7.427) aligner and a phylogeny tree of the OTUs found which is built by
the RAxML-ng algorithm.
# Please remember that in order to use phyloseq a "metadata.tsv" file is
necessary to be part of your anaylis folder.
#
phyloseq      No
#
#
# The phyloseq object can handle phylogenetic trees as well. PEMA uses
RAxML-ng in order to build such trees.
# Do you want to create such a tree with your OTUs? In case you build
this once, you can use it as many times as you want.
#
tree      Yes
#
# In case you are about to use the phyloseq option, then a phylogeny tree
has to be built. Hence, PEMA invokes the RAxML-ng algorithm
# which is able to run in more than one threads. Please set the number of
threads RAxML is able to use.
#
raxmlThreads      5
#
#
# You can also set the number of the parsimony-based starting trees for
the RAxML-ng
#
parsTrees      1
#
#
# And finally, the number of the bootstrap trees
#
bootstrapTrees      1
#
#####
#####

```

```

#
# Finally, do you want your raw data to be removed in another file and
empty the "rawData" file and all the checkpoints of PEMA to be also in an
extra folder
# Swich 'Yes' to 'No' if you wish so. Be very careful when you do that,
as you need to remember that if you want to analyze another dataset
through P.E.M.A
# you will have to remove the first one manually.
#
emptyRawDataFile Yes
emptyCheckpoints Yes
#
#
# Classifier to use, parameter values
("CREST","phylogeny","RDPClassifier")
# If you are about to use a version of Silva db, or Unite db or a custom
db that you have prepared
# the required files accordingly
# (see
https://hariszaf.github.io/pema\_documentation/training\_crest\_classifier/)
,
# you may set this parameter as "CREST".
# In case you are running 16S data and you would like a phylogeny based
taxonomy assignment,
# you may set this parameter as "phylogeny"
# In case you are about to use a version of Midori or a custom db for
which you have prepared the
# required files (see
https://hariszaf.github.io/pema\_documentation/training\_rdpclassifier/)
you
# may set this parameter as "RDPClassifier"
classifierAlgo  CREST
#
#
#

```

### 3. Το αρχείο των παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν στις βιοπληροφορικές αναλύσεις για το γονίδιο ITS

```

#####
#####
##### PEMA 's PARAMETERS
#####
#####
#
#   for version 2.1.4
#
# In this file there are all the parameters that need to be assigned
every time PEMA is
# about to run! The parameters we have here, are not the only parameters
of the tools

```

```

# invoked by PEMA. Hence, we encourage you the most to study the manual
of each tool and
# make them as good as possible for your specific experiment.
#
# ATTENTION!
# From each variable you have to leave EXACTLY ONE (1) TAB and then fill
in the parameter.
#
#
#####
#####
##### The parameter setting starts frome here!
#####
#####
#####
#
# Give in your each uniq experiment a NAME, so a single output file will
be created for each of them
#
outputFolderName swarm_d10
#
#
# PEMA needs the names of the samples to be as in ENA format (e.g
"ERR1021912") but
# they are more like as the Illumina sequencer returned them (e.g
"FdCor_1.fast.gz")
# In order to change the names of your samples as they should be.
# Otherwise, you need to set the "EnaData" variable as 'No'.
EnaData      No
#
# Each sequencer has a special combination of letters with which all its
reads start with
# For example MiSeq has "@M0". Please provide this pattern to PEMA to
convert your data to the ENA
# format. If you do not know that, you can either google it or gunzip a
fastq.gz files of yours and provide
# the letatters between the "@" and the first ":" characters.
sequencerPrefix M0
#
#####
##### fastqc (v0.11.8) #####
#####
#
# No parameters here!
#
#
#####
##### trimmomatic (v.0.38) ##### //
http://www.usadellab.org/cms/uploads/supplementary/Trimmomatic/Trimmomati
cManual_V0.32.pdf
#####
#
# Performs an adaptive quality trim, balancing the benefits of retaining
longer reads against the costs of retaining bases with errors.
# It needs to be set either as 'Yes' or 'No'.
#

```

```

maxInfo      Yes
#
#
##### for MAXINFO #####
# Specifies the read length which is likely to allow the location of the
# read within the target sequence to be determined.
# It needs an integer to be set as a value.
#
targetLength      150
#
#
# This value, specifies the balance between preserving as much read
# length as possible vs. removal of incorrect bases.
# It can take values between 0 and 1.
# A low value of this parameter (<0.2) favours longer reads, while a high
# value (>0.8) favours read correctness.
#
strictness 0.6
#
#
##### for ILLUMINA CLIP #####
# Specifies the path to a fasta file containing all the adapters, PCR
# sequences etc.
# The naming of the various sequences within this file determines how
# they are used.
#
adapters      TruSeq3-PE.fa
#
#
# This parameter specifies the maximum mismatch count which will still
# allow a full match to be performed.
# It needs an integer to be set as a value.
#
seedMismatches      2
#
#
# This parameter specifies how accurate the match between the two
# 'adapter ligated' reads must be for PE palindrome read alignment.
# It needs an integer to be set as a value.
#
palindromeClipThreshold      30
#
#
# It specifies how accurate the match between any adapter etc. sequence
# must be against a read.
# It needs an integer to be set as a value.
#
simpleClipThreshold      15
#
#
##### for LEADING #####
# The LEADING module, removes low quality bases from the beginning.
# As long as a base has a value below this threshold (value of the
# 'leading' parameter) the base is removed and the next base will be
# investigated.
# It needs an integer to be set as a value.

```

```

#
leading    10
#
#
##### for TRAILING #####
# This module of Trimmomatic removes low quality bases from the end.
# As long as a base has a value below this threshold (value of the
'trailing' parameter), the base is removed
# and the next base (which as trimmomatic is starting from the 3' prime
end, would be base preceding the just removed base) will be investigated.
# It needs an integer to be set as a value.
#
trailing   15
#
#
##### for MINLEN #####
# This module removes reads that fall below the specified minimal length.
If required, it should normally be after all other processing steps.
# Reads removed by this step will be counted and included in the "dropped
reads" count presented in the trimmomatic summary.
# It needs an integer to be set as a value.
#
minlen     100
#
#
# Finally, you need to set how many threads you want Trimmomatic to run
into.
#
threadsTrimmomatic    20
#
#
#####
##### BayesHammer (from SPAdes: v3.13.0) #####
#####
#
# This algorithm is part of the SPAdes tool package. You can find its
manual here: http://cab.spbu.ru/files/release3.10.1/manual.html#sec1
#
# no parameters here!
#
#
#####
##### PANDaseq (v. 2.11) ##### //
https://storage.googleapis.com/pandaseq/pandaseq.html
#####
#
# PANDaseq is the algorithm that PEMA uses in order to merge the paired-
end reads.
# PANDaseq has more than one merging algorithms.
#
# Here, we set the algorithm used for assembly. The most common of them
are:
# pear --> uses the formula described in the PEAR paper (Zhang 2013),
optionally with the probability of a random base (q) provide
# simple_bayesian --> uses the formula described in the original paper
(Masella 2012), optionally with an error estimation (Eμ) provided.

```

```

# other options are stich, flash and more that you can find in the above
link.
#
pandaseqAlgorithm      simple_bayesian
#
#
# PANDAsEq is a I/O bound algorithm. That means that it needs severous
time in order to handle the input and output files
# while the process is quite fast. However, it does support
multithreading and here you can set the number of threads it is going to
use.
#
pandaseqThreads 20
#
#
# The 'minlen' parameter sets the minimum length for a sequence, after
primers are removed.
# By default, all sequences are kept. With this option, sequences shorter
than desired can be discarded.
# In case you need to use this parameter, be sure you leave a tab after
'minlen' and set it like this: '-l 80'
# If you do not want to use this parameter, please remove everything
after the 'minlen'
#
pandaseqMinlen  -l 150
#
#
# The 'minoverlap' parameter sets the minimum overlap between forward and
reverse reads.
# By default, this is at least one nucleotide of overlap.
# Raising this number does not generally increase the quality of the
output as alignments with small overlaps tend to score poorly and are
discarded anyway.
#
minoverlap 10
#
#
# The 'threshold' parameter sets the score, between zero and one, that a
sequence must meet to be kept in the output.
# Any alignments lower than this will be discarded as low quality.
# Increasing this number will not necessarily prevent uncalled bases (Ns)
from appearing in the final sequence.
# It is also used as the threshold to match primers, if primers are
supplied. The default value is 0.6.
#
threshold 0.6
#
#
# The '-N' parameter eliminates all sequences with uncalled nucleotides
in the output.
# Otherwise, during assembly, uncalled bases (Ns) from unpaired regions
may be emitted.
# If you need -N to be on your analysis, please add '-N' after
'elimination'. Please make sure you leave a tab.
# If you do not want the parameter to be on, please make sure there is
nothing after the 'elimination' parameter.

```



```

#
elimination
#
#
## PEMA performs the PANDAsseq algorithm, with the -a and the -B
parameters also on.
## That it for striping the primers after assembly, rather than before
and allowing input sequences to lack a barcode/tag correspondingly.
#
#
#####
#####  obiuniq  (from OBITools: v1.2.12) #####
#####
#
# This algorithm is part of the OBITools package. You can find more about
them here: https://pythonhosted.org/OBITools/
#
# no parameters here!
#
#
#####
#####  VSEARCH  (v2.9.1) #####
#####
#
# VSEARCH is the main algorithm used for a lot of steps in the case of
the 16S marker gene.
# Set how many threads do you want PANDAsseq to use.
# It needs an integer to be set as a value.
#
vsearchThreads  20
#
#
# Here you need to set a score about the clustering step of the VSEARCH
algorithm.
# Do not add a read into a certain cluster if the pairwise identity with
its centroid, is lower than the value of the 'vsearchId' parameter.
# The pairwise identity is defined as the number of (matching columns) /
(alignment length - terminal gaps).
# It needs a real number to be set as a value, ranging from 0.0 to 1.0 .
#
vsearchId  0.90
#
#
#####
#####
#####
#####  GENE -  dependent parameters
#####
#####
#####
#####
#
# The marker gene you have is really important for both the clustering &
chimera removal procedure and the

```

```

# taxonomy assignment. By default, the pipeline runs for 16S. Substitute
with 'COI' if COI is your marker gene
# write it down after the underscore (_) - do not erase the udenrscore!!
#
gene gene_ITS
#
#
#####
#####
# Here are some parameters needed when the the metabarcoding analysis is
about the 16S/18S marker genes #
#####
#####
#
#
# If your marker gene is 16S, you can choose between 2 different
approaches of taxonomy assignment (alignment & phylogenetic based)
# An alignment based taxonomy assignment - set as 'alignment' - which is
based on SILVA and CREST (version 3.0).
# However, you can also get a phylogenetic based assignment, by putting
'phylogeny' in this parameter. In that case, a reference tree we created
is being used as well as the RAxML
#
taxonomyAssignmentMethod alignment
#
#
# I you choose phylogeny based taxonomy assignment, then you ll need to
rum PaPaRa.
# Pleas fill in how many cores PaPaRa is able to use.
#
numberOfCoresForPapara 7
#
#
# When you use the alignment-based taxonomy assignment, then the
LCAClassifier from the CREST algorithm, uses a Silva version for the
assignment.
# PEMA allows you to choose between the two last version of Silva. Hence,
set the "silvaVersion" parameter either as 'silva_128' or as 'silva_132'
# depending on the version of your choice.
# In case you are running 18S rRNA data, you may also use the PR2
database, by setting the referenceDb parametera as 'pr2'.
#
referenceDb pr2
#
#
# As you may need a series of taxonomy assignment when you use the
alignment-based method, please give another name in your
# taxonomy output folder of the CREST algorithm, each time you are about
to use it.
# CREST creates an output folder every time and if a folder with the same
already exists, it is going to abort the task!
# You need to set the value of this parameter in case of 16S/18S rRNA and
ITS marker genes.
#
taxonomyFolderName ITS_taxon_assign
#

```

```

#####
#####
#####          For the case of the ITS marker gene
#####
#####
#####
#
# For the case of ITS there is an extra problem with respect to the
primes used.
# Please complete the next two variables with the primers you used
#
forwardITSPrimer CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
reverseITSPrimer GCTGCGTTCTTCATCGATGC
#
#
#####
#####
#####          Here are some parameters needed with respect to clustering
algorithms          #####
#####
#####
#
#
# For the case of the 16S and 18S rRNA marker genes, you can either get
an OTU-table using the VSEARCH algorithm
# or you can get an ASV-table by taking advantage of the SWARM algorithm.
# If your marker gene is COI or ITS, you can choose between 2 different
approaches of clustering.
# Depending on which of them you choose you get either a robust output in
a short time (Swarm) or a non-robust output (CROP) that requires quite
much more time.
# Please fill in according to your marker gene and needs (write "Swarm"
or "vsearch" or "CROP" after algo_).
#
clusteringAlgo  algo_Swarm
#
#
# In case of SWARM, the user needs to specify the value of "d"
parameter,
# maximum number of differences allowed between two amplicons, meaning
that two amplicons
# will be grouped if they have integer (or less) differences. This is
swarm's most important
# parameter
#
d      10
#
#
# when using the option --fastidious (-f), define the minimum mass of a
large ASV.
# By default, an ASV with a mass of 3 or more is considered large.
# Conversely, an ASV is small if it has a mass of less than 3, meaning
that it is composed of either one amplicon of abundance 2, or two
amplicons of abundance 1.

```

```

# Any positive value greater than 1 can be specified. Using higher
boundary values will speed up the second pass, but also reduce the
taxonomical resolution of swarm
# results. Default mass of a large OTU is 3.
#
boundary    3
#
#
# You also need to set the number of threads that Swarm is able to use
#
swarmThreads    20
#
#
## SWARM tends to create a great numebr of ASVs, especially when d takes
a low value.
## Would you like to remove the singletons (ASVs that appear only once
with abundance equal to 1) ?
#
removeSingletons Yes
#
#
# CROP is able to run on multiple CPUs. As PEMA needs to update an
environmental variable to do thi$
#
omp_num_threads 20
#
#
# PEMA invokes the UCHIME_DENOVO3 algorithm for the chimera removal in
the case of the COI marker gene.
# This is a quite common algorithm for that step, but you still need to
choose the minimum abundance skew value.
# By default this value is equal to 16. However, the only difference
between UCHIME_DENOVO2 and 3 is that in the second version,
# the abskew value used to be equal to 2. So, be my guest and pick your
value as I really have no clue about that.
# Probably, for environmental studies a low abskew is better, while in
more specific studies a larger one would fit most.
#
abskew        2
#
#
#####
#####
#
#           For the taxonomy assignment of the COI marker gene
#
#####
#####
#
# Since PEMA v.2.0 both Midori and Midori2 are supported. The second
version of Midori includes more than
# 180.000 unique species and expands beyond Metazoa. However, the
computational time needed increases to a
# a great extent when Midori2 is the one selected. Choose wisely,
especially in case you have a lot of query sequencias

```

```

# If you want Midori2 for your analysis, replace "1" with "2" after the
"midori_" prefix.
#
midori_version  midori_2
#
#####
#####
#
#####
#####
#
#           In - house (local) refererence database for the taxonoomy
assignment step
#
#####
#####
# In case you would prefer to use a reference database of yours for the
taxonomy step, PEMA will ask you for the
# files necessary to train each of the two classifiers supported. You
need to provide those in the directory called
# `local_ref_db` and depending on which classifier will train, the files
have to be in a different format.
# More specifically, if you are working with COI, then PEMA uses thes
RDPClassifier and you need to provide a taxonomy
# and a sequence file, as described here: https://john-
quensen.com/tutorials/training-the-rdp-classifier/
# If you are working with 16S, 18S or ITS then PEMA uses the CREST
classifier for the taxonomy step
# and you need to provide the corresponding two files as described at:
https://github.com/lanzen/CREST
# (see after the Output section).
# As containers are lost when exit from one, you will have to train the
classifier, every time you run a new PEMA container
# If you are about to use a custom ref db, set the following parameter as
'Yes'. Otherwise, it must be set as 'No'.
# The `name_of_custom_db` may be empty or no depending on whether you
will use a custom db or not.
#
custom_ref_db      No
name_of_custom_db  partialCustomdb
#
#####
#####
#
# In case you would like to link the OTU/ASV assignment to its closest
NCBI Taxonomy Id
# set the following parameter as `Yes`
#
getNCBITaxId      Yes
#
#####
#####
#
# The following parameters is only for the case that the Phyloseq R
package is about to run

```

```

#####
#####
#
# If wish to use Phyloseq in order to analyse your returned data then set
the following parameter 'phyloseq' with 'Yes'.
# In order to do that, PEMA needs an MSA that it is returned by the MAFFT
(v7.427) aligner and a phylogeny tree of the OTUs found which is built by
the RAxML-ng algorithm.
# Please remember that in order to use phyloseq a "metadata.tsv" file is
necessary to be part of your anaylis folder.
#
phyloseq    No
#
#
# The phyloseq object can handle phylogenetic trees as well. PEMA uses
RAxML-ng in order to build such trees.
# Do you want to create such a tree with your OTUs? In case you build
this once, you can use it as many times as you want.
#
tree        No
#
# In case you are about to use the phyloseq option, then a phylogeny tree
has to be built. Hence, PEMA invokes the RAxML-ng algorithm
# which is able to run in more than one threads. Please set the number of
threads RAxML is able to use.
#
raxmlThreads    5
#
#
# You can also set the number of the parsimony-based starting trees for
the RAxML-ng
#
parsTrees    1
#
#
# And finally, the number of the bootstrap trees
#
bootstrapTrees    1
#
#####
#####
#
# Finally, do you want your raw data to be removed in another file and
empty the "rawData" file and all the checkpoints of PEMA to be also in an
extra folder
# Swich 'Yes' to 'No' if you wish so. Be very careful when you do that,
as you need to remember that if you want to analyze another dataset
through P.E.M.A
# you will have to remove the first one manually.
#
emptyRawDataFile    Yes
emptyCheckpoints    Yes
#
#

```

```
# Classifier to use, parameter values
("CREST","phylogeny","RDPClassifier")
# If you are about to use a version of Silva db, or Unite db or a custom
db that you have prepared
# the required files accordingly
# (see
https://hariszaf.github.io/pema\_documentation/training\_crest\_classifier/)
,
# you may set this parameter as "CREST".
# In case you are running 16S data and you would like a phylogeny based
taxonomy assignment,
# you may set this parameter as "phylogeny"
# In case you are about to use a version of Midori or a custom db for
which you have prepared the
# required files (see
https://hariszaf.github.io/pema\_documentation/training\_rdpclassifier/)
you
# may set this parameter as "RDPClassifier"
classifierAlgo  CREST
#
#
#
```