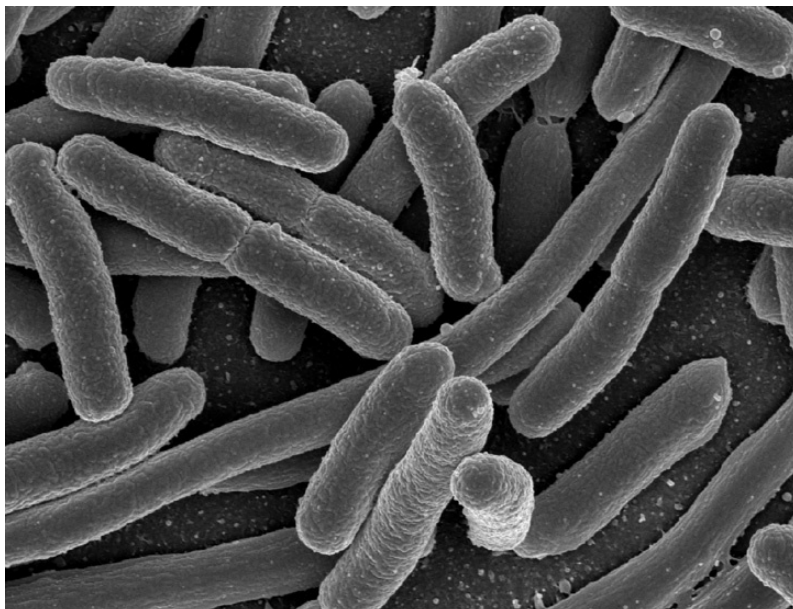


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΤΗΣ ΒΕΝΘΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ  
ΜΕ ΤΗΝ ΑΠΟΣΤΑΣΗ ΑΠΟ ΚΛΩΒΟΥΣ ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ**



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΦΟΔΕΛΙΑΝΑΚΗΣ ΣΤΕΛΙΟΣ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2009**

## **Περιεχόμενα**

<b>Αντί προλόγου.....</b>	<b>3</b>
<b>Περίληψη.....</b>	<b>4</b>
<b>A. Εισαγωγή</b>	
<b>A1. Τα βακτηριακά βενθικά οικοσυστήματα.....</b>	<b>6</b>
<b>A2. Ιχθυοκαλλιέργειες και περιβάλλον.....</b>	<b>7</b>
<b>A3. Μικροβιακή Οικολογία.....</b>	<b>9</b>
<b>A4. Στόχοι της εργασίας.....</b>	<b>12</b>
<b>B. Υλικά και Μέθοδοι</b>	
<b>B1. Οι Δειγματοληπτικές περιοχές.....</b>	<b>12</b>
<b>B2. Η δειγματοληψία.....</b>	<b>14</b>
<b>B3. Εξαγωγή και καθαρισμός ολικού DNA από βενθικά         δείγματα.....</b>	<b>15</b>
<b>B4. Πολλαπλασιασμός τμήματος του γενετικού τόπου 16SRNA         με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....</b>	<b>15</b>
<b>B5. Ανάλυση μέσω ηλεκτροφόρησης σε πολυακρυλαμίδα σε         διαβάθμιση αποδιατακτικών μέσων (DGGE).....</b>	<b>18</b>
<b>B6. Μετασχηματισμός και Κλωνοποίηση στελεχών <i>E.coli</i>,         αλληλούχιση επιλεγμένων κλώνων.....</b>	<b>23</b>
<b>B7. Στατιστικές αναλύσεις.....</b>	<b>25</b>
<b>Γ. Αποτελέσματα</b>	
<b>Γ1. Αλλαγές στις μικροβιακές κοινότητες ανάλογα με την         απόσταση από τους κλωβούς.....</b>	<b>25</b>
<b>Γ2. Συσχετίσεις με αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες.....</b>	<b>29</b>
<b>Γ3. Πολυμορφικά και κοινά μικροβιακά taxa.....</b>	<b>32</b>
<b>Δ. Συζήτηση.....</b>	<b>35</b>
<b>Ε. Βιβλιογραφία.....</b>	<b>40</b>
<b>Παράρτημα.....</b>	<b>43</b>

## **Αντί προλόγου**

**Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στα εργαστήρια Πληθυσμιακής Γενετικής και Εξέλιξης και Θαλάσσιας Οικολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Θα ήθελα καταρχήν λοιπόν να ευχαριστήσω τους υπεύθυνους των εργαστηρίων κ. Λαδουκάκη και κ. Καρακάση για όλη τη βοήθεια που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια της διατριβής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Ναυσικά Παπαγεωργίου και την Ιωάννα Καλαντζή που όχι μόνο μου προσέφεραν τα δείγματά τους αλλά με βοήθησαν και να κατανοήσω όσο μπορούσα τα περί ιζημάτων. Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στα παιδιά από το εργαστήριο της κ. Ρουμπελάκη που με βοήθησαν καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, όπως και στο φίλο μου Θανάση Κουσαθανά. Τέλος, λόγω τυπικότητας και μόνο (!) θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μαρία Δραμουντάνη για τις φωνές, τη γκρίνια, τις κατσάδες και γενικά όλη την όμορφη ατμόσφαιρα που δημιουργούμε στο εργαστήριο.**

## Περίληψη

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της μεταβολής της σύστασης της βενθικής μικροβιακής βιοκοινότητας εξαιτίας της επίδρασης της ιχθυοκαλλιέργειας με χρήση της ηλεκτροφόρησης σε διαβάθμιση αποδιατακτικών μέσων σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (Detergent Gradient Gel Electrophoresis ή DGGE) και ο συσχετισμός των δεδομένων αυτών με δεδομένα για βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες που υπήρχαν για τα ίδια δείγματα. Αρχικά έγινε εξαγωγή ολικού DNA από δείγματα ιζήματος του ανώτερου στρώματος (0-5 cm) σε συγκεκριμένες αποστάσεις από κλωβούς ιχθυοκαλλιέργειας από δυο διαφορετικές τοποθεσίες. Ακολούθησε PCR με διαειδικούς (universal) βακτηριακούς εκκινητές και nested PCR με άλλο ζεύγος εσωτερικών διαειδικών εκκινητών. Τα προϊόντα διαχωρίστηκαν με βάση την αλληλουχία τους μέσω DGEE έτσι ώστε να εκτιμηθεί η μικροβιακή βιοποικιλότητα του κάθε δείγματος και να κατασκευαστούν οι μήτρες παρουσίας-απουσίας για τα βακτηριακά taxa. Ο μέσος αριθμός των βακτηριακών τάξεων συσχετίστηκε με δεδομένα για τα ίδια δείγματα για τη συγκέντρωση των φωσφορικών ιόντων, της οργανικής ύλης, των δεικτών  $\Delta^*$  και ES(10) της ποικιλότητας της μακροπανίδας και τη διάμετρο των κόκκων του ιζήματος. Τέλος αλληλουχήθηκαν με κλωνοποίηση επιλεγμένες ζώνες μέσω DGGE, οι οποίες αντιπροσώπευαν taxa τα οποία είτε υπήρχαν μόνο στα δείγματα κοντά στους κλωβούς (πολυμορφικά), είτε υπήρχαν σε όλα τα δείγματα μιας περιοχής (κοινά). Τα αποτελέσματα της εργασίας δείχνουν:

- A) μια ομοιότητα στη σύσταση των βακτηριακών κοινοτήτων ανά δειγματοληπτική περιοχή
- B) μια τάση αύξησης του μέσου αριθμού των βακτηριακών τάξεων κοντά στους κλωβούς
- Γ) θετική συσχέτιση του μέσου αριθμού των βακτηριακών τάξεων με τα φωσφορικά ιόντα και την οργανική ύλη και αρνητική με τους δείκτες ποικιλότητας της μακροπανίδας και τη διάμετρο των κόκκων του ιζήματος
- Δ) παρουσία διαφορετικών βακτηριακών ομάδων ανά δειγματοληπτική περιοχή

## Abstract

In the present study we examined the effect of aquaculture on the microbial benthic community. Sediment samples were collected from different distances from the fish cages in two different aquaculture sites. Total DNA was extracted from sediments of the upper layer (0-5cm) and PCR was performed using universal bacterial primers. A nested PCR followed using universal internal bacterial primers and the products were separated according to their nucleotide sequence by Detergent Gradient Gel Electrophoresis (DGEE) in order to estimate the mean

bacterial taxa number of each sample and form the taxa presence-absence data matrixes. The mean bacterial taxa number was correlated with data for the same samples concerning the concentration of three forms of phosphorus, two forms of organic matter, two macrofauna diversity indexes ( ES10(10) and  $\Delta^*$ ) and median grain size of sediment. Finally, polymorphic or common bands were selected through DGGE, cloned and sequenced. The results of the study show that:

- a) a similarity to benthic bacterial communities according to sampling site
- b) an increase tendency of the mean bacterial taxa number near the cages
- c) a positive correlation of the mean bacterial taxa number with phosphorus and organic matter and a negative one with the macrofauna diversity indexes and median grain size
- d) presence of different bacterial groups per sampling site

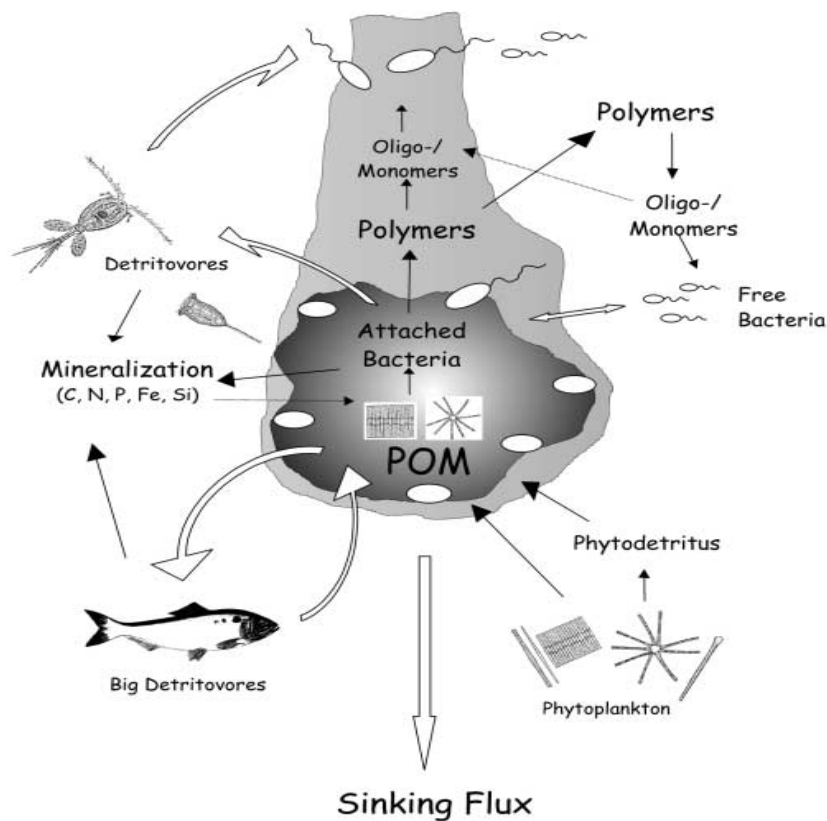
## **A. Εισαγωγή**

### **A1. Τα βενθικά βακτηριακά οικοσυστήματα**

Μεγάλο ποσοστό των υδάτινων κύκλων ενέργειας και ύλης συντελείται από μικροοργανισμούς οι οποίοι έχουν ποικίλες αλλά πολύ συγκεκριμένες μεταβολικές και περιβαλλοντικές απαιτήσεις όπως και επιπτώσεις. Οι στρατηγικές των μικροβίων για την παραγωγή και χρήση της ενέργειας καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τα τροφικά και βιοχημικά επίπεδα των οικοσυστημάτων. Στα υδάτινα οικοσυστήματα, η ισορροπία μεταξύ αυτοτροφίας και ετεροτροφίας κι οι συγκεντρώσεις οξυγόνου που προκύπτουν αντανακλούν τη μικροβιακή παραγωγή και τη δυναμική των βιογεωχημικών κύκλων. Στη γεωλογική χρονική κλίμακα ( $10^6$ - $10^9$  χρόνια), κύριες γεωχημικές και βιοσφαιρικές αλλαγές έχουν αποδοθεί στην εξέλιξη και διαδοχή συγκεκριμένων μικροβιακών διεργασιών μετατροπής ενέργειας. (Cloud,1976 ;Holland, 1978). Ίσως κανένα μοναδιαίο εξελικτικό γεγονός δεν ξεπέρασε σε μέγεθος και σημασία την ανάπτυξη της οξυγονικής φωτοσύνθεσης, διαδικασία η οποία αποδίδεται στην ανάπτυξη του κλάδου των κυανοβακτηρίων, 2.5 δισεκατομμύρια χρόνια πριν (Cloud,1976 ;Holland, 1978; Schopf and Walter,1982). Αυτό το «κβαντικό άλμα» στην εξέλιξη προώθησε τη διαφοροποίηση ειδών και μεταβολικών διεργασιών η οποία άλλαξε δραστικά τις συνθήκες της βιόσφαιρας (Margulis et al., 1982).

Τα θαλάσσια βενθικά οικοσυστήματα αποικούνται εντατικά από μικροοργανισμούς (βακτήρια, κυανοβακτήρια, μύκητες και φύκη σε μεγέθη <150 μm). Οι πιο πολλοί από τους παραπάνω οργανισμούς οργανώνονται στα λεγόμενα «βιοφίλμ», πολύπλοκες συναθροίσεις μικροβίων, ακινητοποιημένα σε εξωκυτταρικό οργανικό υλικό αποτελούμενο από εξωκυτταρικά πολυμερικά υποστρώματα (EPS) τα οποία εκκρίνονται από τα κύτταρα. Με αυτήν την οργάνωσή τους σε βιοφίλμ, τα μικρόβια δημιουργούν τα δικά τους μικροπεριβάλλοντα τα οποία χαρακτηρίζονται από σαφείς διαβαθμίσεις βιολογικών και χημικών παραμέτρων. Κατά μήκος των διαβαθμίσεων αυτών είναι εφικτή η αποτελεσματική χρήση υποστρωμάτων και ενέργειας (Meyer-Reil, 1994). Οι μικροοργανισμοί είναι παρόντες σε πολύ υψηλούς αριθμούς στους βυθούς (περίπου  $10^{10}$  κύτταρα/ γραμμάριο ξηρού βάρους). Η βιομάζα τους ξεπερνά τη βιομάζα όλων των άλλων βενθικών οργανισμών κι η κυτταρική επιφάνειά τους ξεπερνά αυτή όλων των άλλων οργανισμών. Τα μικρόβια κατέχουν έναν υψηλό λόγο επιφάνειας προς όγκο, γεγονός το οποίο ευνοεί τους υψηλούς μεταβολικούς τους ρυθμούς. Τα διαλυμένα ανόργανα και οργανικά

υποστρώματα μεταβολίζονται από τα μικρόβια με υψηλή συγγένεια και ειδικότητα. Η σωματιδιακή οργανική ύλη μπορεί να αποσυντεθεί σε στενή επαφή με το υπόστρωμα από υδρολυτικά ένζυμα (Εικόνα Α1). Εκτός από το οξυγόνο, τα μικρόβια μπορούν να χρησιμοποιήσουν εναλλακτικούς δέκτες ηλεκτρονίων (νιτρικά ιόντα, μαγγανικά ιόντα, σίδηρο, θειικά ιόντα και διοξείδιο του άνθρακα) για την οξειδωση του οργανικού υλικού. Οι παραπάνω ιδιότητές τους σε συνδυασμό με τη λογαριθμική ανάπτυξή τους και τους μικρούς τους χρόνους γενεών, προσδίδουν στα μικρόβια ένα πολύ υψηλό μεταβολικό δυναμικό.



**Εικόνα Α1. Μικροβιακά αποσυνθετικά μονοπάτια των μακροσκοπικών οργανικών συμπλόκων. POM: Σωματιδιακή Οργανική Ύλη. Πηγή: Simon et al., 2002**

## **A2. Ιχθυοκαλλιέργειες και περιβάλλον**

Η σημαντική ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών σε παγκόσμιο επίπεδο τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχει δημιουργήσει σοβαρές ανησυχίες όσον αφορά στις περιβαλλοντικές επιδράσεις που μπορεί να έχει στις παράκτιες περιοχές, τόσο στη στήλη του νερού όσο και στα θαλάσσια ιζήματα. Η Ελλάδα εμφανίζει το μεγαλύτερο αριθμό ιχθυοτροφείων στη νότια Ευρώπη και τη μεγαλύτερη παραγωγή τσιπούρας

(*Sparus aurata*) και λαυρακιού (*Dicentrarchus labrax*). Η ανάπτυξη αυτή επιφέρει περιβαλλοντικές, οικονομικές και κοινωνικές επιπτώσεις, ενώ αναμένεται να αυξηθεί στο μέλλον, εξαιτίας των συνεχώς μειούμενων αλιευτικών αποθεμάτων. Είναι γνωστό ότι τα ιχθυοτροφεία απελευθερώνουν διαλυμένα και σωματιδιακά απόβλητα, τα οποία επηρεάζουν την ποιότητα του νερού και θεωρούνται ως μια πιθανή αιτία ευτροφισμού στα παράκτια οικοσυστήματα (Hall et al. 1990, Holby & Hall 1991).

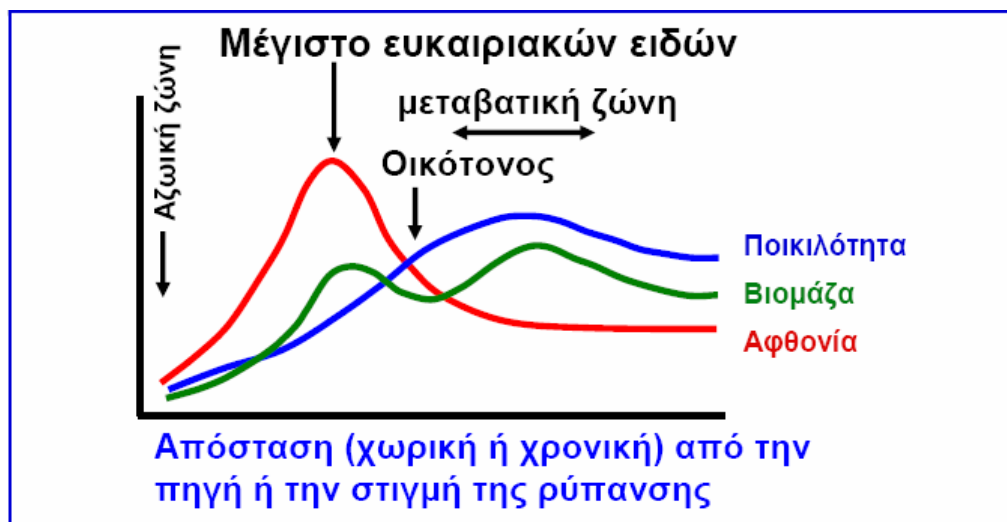
Η πλέον διαδεδομένη επίπτωση των ιχθυοκαλλιεργειών αφορά τον οργανικό εμπλουτισμό των ιζημάτων που είναι αποτέλεσμα της καθίζησης αχρησιμοποίητης τροφής και περιττωμάτων των ψαριών. Η συσσώρευση υλικού κάτω από τους κλωβούς έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός χαλαρού μαύρου στρώματος ιζήματος κάτω από τους κλωβούς (Holmer 1991). Αυτό χαρακτηρίζεται από χαμηλές τιμές οξειδοαναγωγικού δυναμικού (Hargrave et al.1993), υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικό υλικό και συσσώρευση ενώσεων αζώτου και φωσφόρου (Hall et al. 1990, Holby & Hall 1991, Karakassis et al.1998). Αυτές οι αλλαγές στα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά του ιζήματος επάγουν αλλαγές στα βενθικά ενδιαιτήματα και στη δομή των βενθικών κοινοτήτων (Brown et al. 1987, Karakassis et al. 1998, 1999, 2000).

Σημαντικά ενδιαιτήματα όπως τα λιβάδια *Posidonia oceanica* στη Μεσόγειο επηρεάζονται σε σημαντικό βαθμό από την απελευθέρωση θρεπτικών, τη συσσώρευση οργανικού υλικού και τη μεταβολή των οπτικών ιδιοτήτων του νερού (μείωση της διείσδυσης του φωτός στη στήλη του νερού). Οι επιδράσεις σε αυτά τα λιβάδια μπορεί να είναι σημαντικές για το θαλάσσιο οικοσύστημα καθώς αποτελούν στρατηγικά ενδιαιτήματα που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γαμετοκία και «στρατολόγηση» διαφόρων θαλάσσιων οργανισμών. Υπάρχουν ενδείξεις πως οι λειμώνες φανερόγαμων έχουν προσβληθεί σοβαρά ή έχουν εξαλειφθεί ολοκληρωτικά σε κάποιες περιοχές ως αποτέλεσμα ιχθυοκαλλιεργητικών δραστηριοτήτων (Delgado et al. 1999) ενώ δεν υπήρξαν συνθήκες ανάκαμψης του συστήματος για τουλάχιστον 3 χρόνια μετά την παύση των δραστηριοτήτων αυτών.

Η μακροπανίδα (κυρίως η ενδοπανίδα) αντανακλά με μεγάλη ευαισθησία τις αλλαγές που επέρχονται στο περιβάλλον από τον οργανικό εμπλουτισμό του ιζήματος από απόβλητα ιχθυοτροφείων και η εικόνα που παρουσιάζει είναι σε μεγάλο βαθμό παρόμοια με εκείνη που έχει περιγραφεί από τους Pearson & Rosenberg (1978) γενικά για τον οργανικό εμπλουτισμό (Εικόνα A2). Στις κοντινότερες αποστάσεις από



την πηγή του οργανικού εμπλουτισμού παρατηρείται μια αζωική ζώνη, όπου τόσο η ποικιλότητα όσο και η βιομάζα κι η αφθονία τείνουν στο μηδέν. Στη συνέχεια παρατηρείται σταδιακή αύξηση των τριών όσο απομακρυνόμαστε από την πηγή, με την αφθονία να παρουσιάζει ένα χαρακτηριστικό μέγιστο στην απόσταση όπου τα ευκαιριακά είδη εκμεταλλεύονται στο έπακρο τις συνθήκες που δημιουργεί η πηγή του οργανικού εμπλουτισμού. Σταδιακά, κι όσο οι περιβαλλοντικές παράμετροι επανέρχονται προς τις φυσιολογικές, τα επίπεδα της αφθονίας μειώνονται με παράλληλη αύξηση της ποικιλότητας. Αυτό αντικατοπτρίζει τη σταδιακή αντικατάσταση των ευκαιριακών ειδών. Το σημείο εκείνο όπου συναντώνται ταυτόχρονα οι υψηλότερες τιμές αφθονίας και ποικιλότητας, ονομάζεται «οικότονος». Με περαιτέρω αύξηση της απόστασης η αφθονία μειώνεται ακόμα περισσότερο με παράλληλη αύξηση της ποικιλότητας.



Εικόνα Α2. Μοντέλο διαδοχής του μακροβένθους συναρτήσει της απόστασης από την πηγή του οργανικού εμπλουτισμού (Pearson & Rosenberg, 1978). (α) διάγραμμα μεταβολής των κυριότερων παραμέτρων της βιοκοινότητας και (β) διαγραμματική απεικόνιση των κυριότερων ζωνών διαδοχής.

Ο οργανικός εμπλουτισμός των ιζημάτων έχει δείχτει ότι επηρεάζει τόσο τις βιογεωχημικές διεργασίες, όσο και τη σύσταση των βενθικών μικροβιακών κοινοτήτων. Έχουν αναφερθεί επιταχύνσεις στον κύκλο του θείου σε βυθούς κάτω από παράκτιες υδατοκαλλιέργειες (Asami et al., 2005), αλλαγές στον κύκλο του αζώτου και της υποομάδας των β-πρωτεοβακτηρίων σε όμοια υποστρώματα (McCaig et al, 1999) αλλά και αύξηση των επιπέδων αναπνοής και του αριθμού των βακτηρίων (Bissett et al, 2007, Findlay et al., 1995, Rysgaard et al., 1998, Vezzulli et al., 2002). Όσον αφορά τη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας, έχουν αναφερθεί αύξηση του συνολικού αριθμού των βακτηριακών ειδών κάτω από τους κλωβούς (Bissett et al, 2007) , αλλά και αλλαγές στις συχνότητες των διαφορετικών βακτηριακών υποομάδων στα δείγματα κάτω από τους κλωβούς (Kawahara et al., 2009).

Η επίδραση των ιχθυοκαλλιεργειών στις βιοτικές και αβιοτικές παραμέτρους, δηλαδή η ένταση του φαινομένου του οργανικού εμπλουτισμού εξαρτάται από τις πρακτικές εκτροφής καθώς και από τα φυσικά (βαθυμετρία, γεωγραφικό πλάτος, απόσταση από τους κλωβούς), χημικά και βιολογικά χαρακτηριστικά της περιοχής (Kalantzi & Karakassis 2006). Σε περιοχές υψηλού υδροδυναμισμού ή με αδρά ιζήματα γίνεται γρήγορη ανανέωση νερού και απομάκρυνση των οργανικών ουσιών επομένως εμφανίζουν σημαντικά μικρότερο βαθμό συσσώρευσης αποβλήτων από ότι κλειστοί ρηχοί κόλποι (Karakassis 2001). Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι η ζώνη του βυθού που επηρεάζεται σε σχέση με τη μακροπανίδα εκτείνεται σε απόσταση 10-25 μέτρα από τα όρια των κλωβών (Karakassis 2001, Lampadariou et al. 2005). Αντίθετα η επίδραση των ιχθυοκαλλιεργειών στη συγκέντρωση του άνθρακα και αζώτου των ιζημάτων για πυθμένες 25 μέτρων βάθους μπορεί να ανιχνευτεί σε μια ευρύτερη περιοχή γύρω στα 1000 μέτρα από τους κλωβούς (Sara et al. 2004). Τέλος είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι επιδράσεις στο περιβάλλον υπόκεινται σε σημαντικές εποχικές αλλαγές και είναι λιγότερο σοβαρές το χειμώνα όταν η παροχή τροφής είναι μικρότερη και η επαναιώρηση και οξυγόνωση του ιζήματος μεγαλύτερες.

### **A3. Μικροβιακή Οικολογία**

Όπως και η γενική Οικολογία, η Μικροβιακή Οικολογία ασχολείται με το πώς οι οργανισμοί (στην προκειμένη περίπτωση οι μικροοργανισμοί) αλληλεπιδρούν μεταξύ τους αλλά και με το περιβάλλον. Εστιάζει σε δυο κύριους τομείς: α) Στον τομέα της βιοποικιλότητας ο οποίος περιλαμβάνει την απομόνωση και το χαρακτηρισμό

(ποσοτικό και ποιοτικό) των μικροοργανισμών σε διάφορα περιβάλλοντα και β) Στον τομέα της μικροβιακής δραστηριότητας, ο οποίος περιλαμβάνει το τι κάνουν οι μικροοργανισμοί στο φυσικό τους περιβάλλον.

Οι παραδοσιακές πρακτικές στη Μικροβιακή Οικολογία για την απομόνωση και το χαρακτηρισμό οργανισμών από διάφορα μέσα περιλαμβάνουν κατά κόρον τις υγρές καλλιέργειες μικροοργανισμών με εμπλουτισμό του μέσου. Οι τεχνικές αυτές χρησιμοποιούνται για πολλές δεκαετίες στο χώρο κι έχουν συνεισφέρει στο χαρακτηρισμό αρκετών μικροοργανισμών, αλλά στις μέρες μας θεωρούνται ξεπερασμένες διότι καταρχήν πολλές φορές η ανάπτυξη συγκεκριμένων οργανισμών είναι τυχαία (enrichment bias) κι επίσης κάποιοι μικροοργανισμοί είναι αδύνατον να αναπτυχθούν κάτω από εργαστηριακές συνθήκες. Επίσης με τις μεθόδους αυτές δεν μπορεί να ποσοτικοποιηθεί η παρουσία συγκεκριμένων μικροοργανισμών στο αρχικό δείγμα.

Για την απάντηση των ερωτημάτων αυτών, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί οι λεγόμενες μέθοδοι μοριακής ανάλυσης των μικροβιακών κοινοτήτων οι οποίες εμπίπτουν σε δυο μεγάλες κατηγορίες: α) τις τεχνικές χρώσης και β) τις τεχνικές ανάλυσης του 16S γενετικού τόπου.

Οι τεχνικές χρώσης είναι ίσως το καταλληλότερο εργαλείο για την ποσοτικοποίηση μικροοργανισμών σε φυσικά δείγματα. Περιλαμβάνουν τη χρώση των μικροοργανισμών με διάφορα σηματοδοτικά μόρια όπως DAPI, φωσφορίζοντα αντισώματα κι άλλες πρωτεΐνες και την καταμέτρηση κάτω από κατάλληλα μικροσκόπια. Μια πιο σύγχρονη παραλλαγή των μεθόδων αυτών είναι η λεγόμενη γενετική χρώση με κύριους αντιπροσώπους τις τεχνικές FISH, chromosome painting και ISRT στις οποίες χρησιμοποιούνται σεσημασμένα ολιγονουκλεοτίδια για την in situ πρόσδεση στους μικροοργανισμούς-στόχους.

Οι τεχνικές όμως της χρώσης παρέχουν ελάχιστη έως μηδενική πληροφορία για τη φυλογενετική και τη λειτουργική σύσταση των μικροβιακών κοινοτήτων. Απαντήσεις στα ερωτήματα αυτά καλούνται να δώσουν οι αναλύσεις μέσω ανάλυσης του 16S γενετικού τόπου. Μέσω τέτοιων μεθόδων υπάρχει η δυνατότητα εξέτασης της μικροβιακής ποικιλότητας χωρίς τη χρήση καλλιέργειας ή κάποιου είδους παρατήρησης των κυττάρων. Αρχικά, από το συνολικό γενετικό υλικό μιας βακτηριακής κοινότητας πολλαπλασιάζεται με διαειδικούς (universal) εκκινητές ο

γενετικός τόπος 16SRNA (ή τμήμα αυτού), ο οποίος χρησιμοποιείται ευρέως για φυλλογενετικές αναλύσεις. Στη συνέχεια οι διαφορετικές αλληλουχίες διαχωρίζονται είτε μέσω κλωνοποίησης και αλληλούχισης, είτε μέσω μεθόδων διαχωρισμού όπως το DGGE (βλ. ΚεφB5) , το TGGE, το SSCP ή ακόμα και μέσω RFLPs.

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι οι πιο σύγχρονες μελέτες γενετικής ανάλυσης των μικροβιακών κοινοτήτων είναι οι μεταγενωμικές αναλύσεις. Στις αναλύσεις αυτές, το συνολικό DNA μιας κοινότητας απομονώνεται αρχικά αλλά στη συνέχεια δεν πολλαπλασιάζεται, αλλά αλληλουχείται αυτούσιο με τη χρήση κατάλληλων μεθόδων (shotgun sequencing, pyrosequencing). Έτσι οι ερευνητές είναι σε θέση να απαντήσουν ερωτήματα σε γονιδιακό επίπεδο χωρίς να απαιτείται η ταυτοποίηση τάξεων, αλλά και ερωτήματα τα οποία έχουν να κάνουν με ποσοστά κατανομής γονιδίων τα οποία είναι αδύνατο να απαντηθούν όταν το ολικό DNA της μικροβιακής κοινότητας πολλαπλασιάζεται με PCR.

#### **A4. Στόχοι της εργασίας**

Στην παρούσα εργασία οι στόχοι ήταν:

A) Να εξεταστεί αν υπάρχουν αλλαγές (και ποιες αλλαγές είναι αυτές) στη σύσταση των μικροβιακών κοινοτήτων ανάλογα με την απόσταση από κλωβούς ιχθυοκαλλιεργειών και του τύπου ιζήματος μέσω της τεχνικής DGGE.

B) Να συσχετισθεί ο μέσος αριθμός των βακτηριακών τάξεων κάθε δείγματος με δεδομένα για τα ίδια δείγματα για βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες, έτσι ώστε να εντοπιστούν σημαντικές αλληλεπιδράσεις της μικροβιακής κοινότητας με στοιχεία του περιβάλλοντός τους κάτω από συνθήκες οργανικού εμπλουτισμού.

## **B. Υλικά και Μέθοδοι**

### **B1. Οι δειγματοληπτικές περιοχές**

Η επίδραση των ιχθυοκαλλιεργειών ως πηγή οργανικού εμπλουτισμού στα θαλάσσια μικροβιακά βενθικά οικοσυστήματα, μελετήθηκε σε δυο ιχθυοτροφεία

(Σούνιο, Σητεία). Οι περιοχές δειγματοληψίας επιλέχθηκαν από μια μεγαλύτερη ομάδα περιοχών σε μια προσπάθεια ελαχιστοποίησης της μεταβλητότητας ως προς τον τύπο του ιζήματος και το βαθμό έκθεσης των περιοχών. Η πρώτη περιοχή βρίσκεται στην παράκτια θαλάσσια ζώνη του Σουνίου 300 m από τις νότιες ακτές της Αττικής. Οι κλωβοί (13-20 m βάθος) βρίσκονται σε ένα στενό πέρασμα ανάμεσα στην ακτή και τη νησίδα Πάτροκλος (Εικόνα B1). Το ιζημα είναι σχετικά αδρό και ένα μεγάλο μέρος του καλύπτεται από λιβάδια *Posidonia oceanica*, εκτός από μια γυμνή ζώνη που εκτείνεται 5-25 m από τους κλωβούς, όπου οι λειμώνες έχουν υποχωρήσει σημαντικά. Το δεύτερο ιχθυοτροφείο βρίσκεται στη βορειοανατολική Κρήτη κοντά στη Μονή Τοπλού στο νομό Λασιθίου (Εικόνα B2). Το ιζημα αποτελείται από λεπτόκοκκη άμμο και ένα κλάσμα ιλύος. Στην περιοχή υπάρχουν συστάδες *Posidonia*, εκτός από μια γυμνή ζώνη που εκτείνεται μέχρι απόσταση περίπου 80m από τους κλωβούς όπου οι λειμώνες έχουν εξαφανιστεί. Το βάθος στην περιοχή των κλωβών είναι 14-18 m. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν κατά τη θερινή περίοδο Ιουνίου-Ιουλίου 2006 (Σούνιο) και Ιουλίου 2007 (Σητεία).



**Εικόνα B1.** Χάρτης περιοχής δειγματοληψίας Σουνίου. Από το σημείο 1EA1-St1 μέχρι το σημείο 1EA1-St5 βρισκόταν όλα τα δείγματα , ενώ το δείγμα ελέγχου στο σημείο 1EA1-St6.



**Εικόνα Β2.** Χάρτης περιοχής δειγματοληψίας Σητείας. Από το σημείο 3EA3-St1 μέχρι το σημείο 3EA3-St5 βρισκόταν όλα τα δείγματα , ενώ το δείγμα ελέγχου στο σημείο 3EA3-St6.

## **B2. Η Δειγματοληψία**

Οι σταθμοί δειγματοληψίας επελέγησαν κάτω από τους κλωβούς (0 m) καθώς και σε αποστάσεις 5, 10, 25 και 50 μέτρων από τους κλωβούς, σε κατεύθυνση κατάντι του επικρατούντος ρεύματος σε κάθε περιοχή. Ένας σταθμός ελέγχου (Control) με παρόμοιο βάθος και υπόστρωμα επιλέχτηκε σε σημείο που δεν επηρεάζεται από τους κλωβούς και βρίσκεται ανάντι του ρεύματος σε 400-1000 m απόσταση από αυτούς. Τα δείγματα συλλέχθηκαν στη διάρκεια τεσσάρων αποστολών.

Η λήψη των δειγμάτων έγινε με δύτες που χρησιμοποίησαν πλαστικούς κυλινδρικούς πυρηνολήπτες (*cores*) με εσωτερική διάμετρο 9,4 cm (επιφάνεια δειγματοληψίας  $T=\pi r^2=0,007 \text{ m}^2$ ), οι οποίοι πιέστηκαν να διεισδύσουν στο ιζήμα μέχρι βάθους 5 εκατοστών από την επιφάνεια του ιζήματος. Σε κάθε σταθμό λαμβάνονταν 3 επαναληπτικά δείγματα. Τα δείγματα μετά τη μεταφορά τους στην ξηρά ψύχονταν απευθείας στους  $-80^\circ\text{C}$ .

### **B3. Εξαγωγή και καθαρισμός ολικού DNA από βενθικά δείγματα**

Η εξαγωγή του ολικού DNA από τα βενθικά δείγματα έγινε με το UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit της εταιρίας MoBio. Η μέθοδος της εξαγωγής με το kit αυτό βασίζεται στην διάσπαση των σωματιδίων του δείγματος μέσω γυάλινων σωματιδίων πολύ μικρής διαμέτρου.

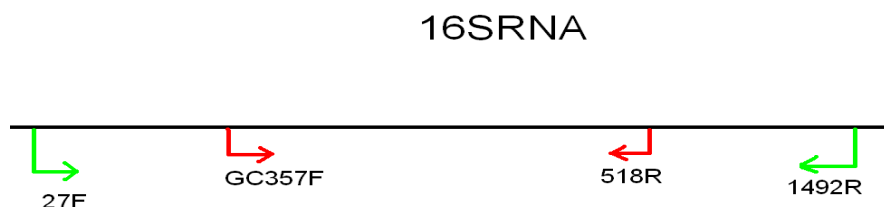
Αρχικά, 1 γραμμάριο από το δείγμα επωαζόταν για 10min υπό ισχυρή ανακίνηση (vortex) σε διάλυμα γυάλινων σωματιδίων σε ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο περιείχε SDS κι ένα μείγμα από ουσίες οι οποίες απομακρύνουν το χουμικό οξύ, το οποίο προέρχεται από τη διάσπαση των σωματιδίων του χώματος κι αποτελεί ισχυρό αναστολέα της PCR. Στη συνέχεια το μείγμα φυγοκεντρούνταν στα 10.000g για 30secs και το υπερκείμενο μεταφερόταν σε καθαρό σωλήνα. Ακολουθούσε επώαση του υπερκειμένου με ποσότητα διαλύματος που περιείχε παράγοντες κατακρήμνισης πρωτεϊνών στους 4°C για 5min. Μετά από φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο μεταφερόταν σε νέο tube και μετά την προσθήκη κορεσμένου διαλύματος αλάτων φορτώνονταν διαδοχικά σε ειδικό φίλτρο το οποίο προσδένει επιλεκτικά το DNA. Ακολουθούσε εκ νέου φυγοκέντρηση μέχρι όλο το δείγμα να περάσει από το φίλτρο. Ύστερα το φίλτρο το οποίο είχε πλέον το DNA προσδεμένο, φυγοκεντρούνταν μετά την προσθήκη αλκοολούχου διαλύματος για να καθαριστεί επιπλέον από κατάλοιπα αλάτων, πρωτεϊνών και χουμικού οξέος. Τέλος, το DNA καθαρό πλέον απελευθερώνονταν από την μεμβράνη με φυγοκέντρηση μετά από προσθήκη 50μl στείρου διαλύματος 10mM Tris pH 8. 2-3μl από το διάλυμα αυτό ηλεκτροφορούνταν σε 1%w/v gel αγαρόζης για να διαπιστωθεί η ποιότητα του εξαγόμενου DNA κι 1μl φωτομετρούνταν για να μετρηθεί η συγκέντρωση και η καθαρότητά του. Σε όλες τις περιπτώσεις, το DNA που εξαγονταν ήταν μεγαλομοριακό (~10kb) σε συγκέντρωση 100-200ng/λ.

### **B4. Πολλαπλασιασμός τμήματος του γενετικού τόπου 16SRNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**

#### **B4.1. Αρχικός πολλαπλασιασμός**

Αρχικά επιλέξαμε τους universal βακτηριακούς εκκινητές 27f και 1492r (βλ. Πίνακα B3, Εικόνα B3) , οι οποίοι πολλαπλασιάζουν επιτυχώς ποσοστό μεγαλύτερο του 92% του συνόλου των γνωστών βακτηριακών ταξινομικών ομάδων (Sanchez et.

al, 2007) , για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος ~1500bp του γενετικού τόπου 16SRNA. Η αντίδραση έγινε σύμφωνα με τους Webster et al. , 2006, αποτελούνταν από 30 κύκλους και οι συνθήκες της φαίνονται στον Πίνακα B1.



**Εικόνα B3. Σχηματική απεικόνιση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR. Με πράσινο χρώμα συμβολίζονται οι εκκινητές της αρχικής αντίδρασης ενώ με κόκκινο αυτοί της nested PCR.**

Κάθε αντίδραση είχε τελικό όγκο 20μl και περιείχε 0.5 pmol  $\mu\text{L}^{-1}$  από τους αντίστοιχους εκκινητές, 10-20ng από DNA μήτρα, 1 × Green GoTaq Flexi buffer (Promega), 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 U GoTaq Flexi DNA πολυμεράση (Promega) και 0.25 mM από κάθε dNTP.

**Πίνακας B1. Συνθήκες αρχικής αντίδρασης PCR**

<b>Βήμα</b>	<b>T(°C)</b>	<b>t</b>
1.Denaturation 1	95	2min
2.Denaturation 2	94	30secs
3.Annealing	52	30secs
4. Extension	72	90secs
5.Final Extension	72	5min

#### **B4.2. Nested PCR**

Για τις ανάγκες της ανάλυσης μέσω DGGE (βλ.Κεφ.Β5.2.) ήταν απαραίτητος ο πολλαπλασιασμός ενός μικρότερου κομματιού με μήτρα το αρχικό PCR προϊόν, χρησιμοποιώντας forward εκκινητή με ενσωματωμένη μια GC-πλούσια περιοχή στο 5' άκρο του (GC clamp). Ύστερα από βιβλιογραφική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές GC357f και 518r (βλ. Πίνακα B3, Εικόνα B3) για τον πολλαπλασιασμό



τμήματος ~200bp, εσωτερικό ως προς το αρχικό τμήμα (Sanchez et. al, 2007). Οι ποσότητες των αντιδρώντων ήταν ίδιες με την αρχική PCR σε τελικό όγκο 50μl, με τη διαφορά ότι στην αντίδραση αυτή το DNA μήτρα ήταν αραιωμένο αρχικό PCR προϊόν. Η αντίδραση είχε 35 κύκλους και οι συνθήκες της φαίνονται στον Πίνακα Β2.

**Πίνακας Β2. Συνθήκες Nested PCR**

<b>Βήμα</b>	<b>T(°C)</b>	<b>t</b>
1.Initial Denaturation	95	5min
2.Denaturation 1 (10 cycles)	94	30secs
3.Annealing 1 (10 cycles)	55	30secs
4. Extension 1 (10 cycles)	72	60secs
5. Denaturation 2 (25 cycles)	92	30secs
6. Annealing 2 (25 cycles)	52	30secs
7. Extension 2 (25 cycles)	72	60secs
5.Final Extension	72	10min

**Πίνακας Β3. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR**

<b>Primer name</b>	<b>Primer sequence</b>	<b>Size(bp)</b>
27f	5'- AGAGTTTGATC(AC)TGGCTCAG-3'	20
1492r	5'-ACGG(CT)TACCTTGTTACGACTT-3'	21
GC357f	5' CGCCCGCCGCGCGCGGGGGGGCGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG 3'	30+17
518r	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'	17

## **B5. Ανάλυση μέσω ηλεκτροφόρησης σε πολυακρυλαμίδη σε διαβάθμιση αποδιατακτικών μέσων (DGGE)**

### **B5.1.Εισαγωγικά**

Η ηλεκτροφόρηση σε πολυακρυλαμίδη σε διαβάθμιση αποδιατακτικών, Detergent Gradient Gel Electrophoresis ή DGGE εν συντομία, είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική στη Μοριακή Βιολογία και ειδικότερα στη Μικροβιακή Οικολογία, χρησιμοποιούμενη κατά κόρον για τον χαρακτηρισμό των μικροβιακών κοινοτήτων και της δυναμικής αυτών (Muyzer et al., 1993). Μέσω της μεθόδου αυτής, μπορεί να γίνει πολύ γρήγορος συγκριτικά με άλλες μεθόδους προσδιορισμός της ποικιλομορφίας και της δομής μιας κοινότητας, αλλά και των αλλαγών που τυχόν συντελούνται στην κοινότητα αυτή. Η ανάλυση μέσω DGGE χρησιμοποιείται επίσης στην Ιατρική Γενετική για τον εντοπισμό μεταλλαγών όπως τα SNPs. Τα πλεονεκτήματα όμως της μεθόδου αυτής, είναι συνδεδεμένα με ένα αριθμό από περιοριστικούς παράγοντες, οι οποίοι πρέπει να κατανοηθούν απολύτως πριν κάποιος κάνει χρήση της μεθόδου αυτής.

Η παρουσίαση αναλύσεων DGGE από μόνες τους σαν ένδειξη αλλαγής μιας μικροβιακής κοινότητας δε θεωρείται πλέον επαρκής. Γι αυτό τις περισσότερες φορές τέτοιου είδους αναλύσεις συνοδεύονται από αλληλούχιση συγκεκριμένων προϊόντων PCR, τα οποία έχουν διαχωριστεί με τη βοήθεια του DGGE. Η ποσότητα επίσης της γενετικής πληροφορίας που μπορεί να ανακτηθεί με τον τρόπο αυτό περιορίζεται από την ίδια τη μέθοδο DGGE, αφού το μήκος των προϊόντων που ηλεκτροφορούνται δεν ξεπερνά συνήθως τα 500-600 ζεύγη βάσεων. Παρόλα αυτά υπάρχουν δημοσιευμένες εργασίες στις οποίες πρότυπα από DGGE έχουν επεξεργαστεί με λογισμικά ανάλυσης εικόνας και έχουν χρησιμοποιηθεί για cluster αναλύσεις από μόνα τους.

### **B5.2. Αρχή λειτουργίας της μεθόδου (Muyzer et al., 1993)**

Η ανάλυση μέσω DGGE χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό δίκλωνων μορίων DNA, τα οποία μπορεί να είναι πανομοιότυπα σε μήκος αλλά διαφέρουν στην αλληλουχία. Στην πράξη, αυτό αναφέρεται στο διαχωρισμό προϊόντων PCR, μέσω ηλεκτροφόρησης σε gel πολυακρυλαμίδης στο οποίο υπάρχει κατά μήκος διαβάθμιση συγκέντρωσης δυο αποδιατακτικών μέσων: ουρίας και φορμαμιδίου. Ο διαχωρισμός στο DGGE βασίζεται στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα ενός μερικώς

αποδιατεταγμένου μορίου DNA σε ένα gel πολυακρυλαμίδης, η οποία είναι ελαττωμένη σε σχέση με αυτήν ενός μορίου που βρίσκεται σε εντελώς ελικοειδή μορφή. Η αποδιάταξη των μορίων συντελείται σε διακριτά τμήματα, τα οποία αποκαλούνται «αποδιατακτικά τμήματα» (melting domains).

Τα τμήματα αυτά αποτελούνται από αλληλουχίες ζευγών βάσεων με πανομοιότυπες ενέργειες αποδιάταξης. Όταν κατά την ηλεκτροφόρηση το melting domain με τη μικρότερη ενέργεια αποδιάταξης βρεθεί σε ένα σημείο στο gel όπου η ενέργεια αυτή επιτευχθεί μέσω της δράσης των αποδιατακτικών παραγόντων, συντελείται μετάβαση από την ελικοειδή μορφή στη μερικώς αποδιατεταγμένη. Το αποτέλεσμα της μετάβασης αυτής είναι πρακτικά το μόριο να σταματήσει στο σημείο αυτό. Όταν οι αλληλουχίες δυο μορίων DNA διαφέρουν σε τέτοιου είδους τμήματα, διαφέρουν και οι ενέργειες αποδιάταξης των τμημάτων αυτών. Επομένως, μόρια DNA τα οποία διαφέρουν σε αλληλουχία θα σταματήσουν σε διαφορετικό σημείο κατά μήκος του διαβαθμισμένου σε αποδιατακτικά μέσα gel, με αποτέλεσμα να μπορούν να διαχωριστούν επιτυχώς από το DGGE. Για καλύτερο διαχωρισμό των μορίων μέσα σε ένα gel, εκκινήτες με GC-πλούσιες 5' περιοχές μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατά τον πολλαπλασιασμό μέσω PCR, έτσι ώστε να γίνει ομαλότερη η αποδιατακτική συμπεριφορά των μορίων.

### **B5.3 Η πειραματική διαδικασία**

#### **B5.3α. Εξοπλισμός και υλικά**

-τζάμια σε διαστάσεις 17,5 X 15,5 cm

-1mm spacers

-διάλυμα αγαρόζης 1% w/v

-πυκνό διάλυμα 8% ακρυλαμίδης 37.5:1, ουρίας/φορμαμίδιου (60% ως προς πρότυπο διάλυμα 7M ουρίας και 40%v/v φορμαμίδιου)

-αραιό διάλυμα 8% ακρυλαμίδης 37.5:1, ουρίας/φορμαμίδιου (40% ως προς πρότυπο διάλυμα 7M ουρίας και 40%v/v φορμαμίδιου)

-διάλυμα 8% ακρυλαμίδης 37.5:1 (stacking buffer)

-Ammonium peroxisulfide (APS) 10% w/v

- TEMED (N,N,N',N' -tetramethylenediamine)
- Gradient Former (σύστημα συγκοινωνούντων δοχείων με βαλβίδα - BioRad model 385)
- Περισταλτική αντλία (BioRad Econo Pump)
- «Χτένα» για σχηματισμό πηγαδιών
- TAE buffer 50X (242g Tris base; 57.1 ml glacial acetic acid; 100 ml 0.5M EDTA (pH 8) ανά λίτρο)
- Υδατόλουτρο
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης gel πολυακρυλαμίδης
- Παροχέας τάσης
- SybrGold<sup>®</sup> nucleic acid stain
- Gel Documentation system με κατάλληλο φίλτρο για SybrGold<sup>®</sup>

### **B5.3β. Πρωτόκολλο**

Αρχικά ετοιμάζουμε stocks από τα διαλύματα τα οποία θα χρησιμοποιήσουμε για την παρασκευή του gel και τα οποία είναι α) το αραιό μας διάλυμα β) το πυκνό μας διάλυμα γ) το stacking buffer δ) το διάλυμα αγαρόζης και ε) το APS. Τα υλικά και οι αναλογίες για το πυκνό, το αραιό και το stacking buffer φαίνονται στον Πίνακα B4. Ανάλογα με τα ποσοστά των διαλυμάτων μας, προσαρμόζουμε τις ποσότητες των συστατικών μας.

**Πίνακας B4 Αναλογίες για τα διαλύματα UF και το stacking buffer**

<b>Αντιδραστήριο</b>	<b>0% (stacking buffer)</b>	<b>40% UF</b>	<b>60% UF</b>
<b>Acrylamide 40%</b>	4ml	4ml	4ml
<b>TAE 50X</b>	200μl	200μl	200μl
<b>Formamide</b>	0	3,2ml	4,8ml
<b>Urea</b>	0	3,38gr	5,04gr
<b>Σύνολο</b>	20ml	20ml	20ml

Στη συνέχεια καθαρίζουμε προσεκτικά τα τζαμάκια με απιονισμένο νερό και σαπούνι αν χρειάζεται και με την βοήθεια των spacers φτιάχνουμε το «καλούπι» για το gel. Προσοχή χρειάζεται έτσι ώστε η κατώτερη επιφάνεια να είναι πλήρως οριζόντια για αποφυγή διαρροών. Εάν τα τζάμια μας δεν είναι πλήρως οριζοντιωμένα μπορούμε να τα λειάνουμε με τη χρήση γυαλόχαρτου. Τέλος, όταν έχουμε ετοιμάσει το καλούπι με τα τζαμάκια και τα spacers το τοποθετούμε όρθιο στην πλατφόρμα βάζοντας ένα κομμάτι parafilm από κάτω και στερεώνοντάς το σφίγγοντας τα πλαστικά «αυτάκια» της συσκευής. Τέλος, βράζουμε το διάλυμα της αγαρόζης και όπως είναι καυτό ακόμα χύνουμε 1ml με τη χρήση πιπέτας μέσα στο καλούπι από την άκρη αριστερά κανονίζοντας το μέτωπο που θα δημιουργηθεί κάτω να είναι οριζόντιο. Με τον τρόπο αυτό δημιουργούμε ένα μονωτικό στρώμα από αγαρόζη που περιορίζει τις διαρροές.

Μέχρι να στεγνώσει το στρώμα της αγαρόζης ανοίγουμε την περισταλτική αντλία, τη συνδέουμε με το gradient former το οποίο τοποθετούμε πάνω σε stirrer με δυο μαγνητάκια στη βάση των κυλίνδρων και ξεπλύνουμε το σύστημα με απιονισμένο νερό. Μόλις περάσει όλο το νερό από το σύστημα, κλείνουμε την αντλία και καθαρίζουμε τους κυλίνδρους από τα υπολείμματα του νερού.

Εν συνεχεία τοποθετούμε 8,5ml από το αραιό και το πυκνό μας διάλυμα UF στους δυο κυλίνδρους του gradient former στις κατάλληλες θέσεις προσέχοντας να είναι κλειστή η βαλβίδα που συνδέει τους κυλίνδρους και βάζουμε σε λειτουργία το stirrer. Σε κάθε κύλινδρο ρίχνουμε 80ml APS και 8ml TEMED, κι αφού έχουμε τοποθετήσει το σωληνάκι εξόδου της αντλίας με ένα tip στην άκρη του ακριβώς στη μέση κατά πλάτος του καλουπιού μας, ανοίγουμε την περισταλτική αντλία στα 6ml/min κι απευθείας ανοίγουμε τη βαλβίδα επικοινωνίας των δυο κυλίνδρων. Περιμένουμε μέχρι όλο το διάλυμα να περάσει από τους κυλίνδρους στο καλούπι και μόλις γίνει αυτό βάζουμε αμέσως στους κυλίνδρους απιονισμένο νερό κι αφήνουμε ανοικτή την αντλία για να ξεπλυθούν οι σωληνώσεις. Με ένα tip τέλος παίρνουμε γύρω στα 200ml απιονισμένο νερό και δημιουργούμε ένα στρώμα πάνω από το νεοσχηματισθέν gel μας έτσι ώστε να έχει οριζόντια επιφάνεια. Αφήνουμε το gel να στεγνώσει για μία περίπου ώρα.

Μόλις το gel στεγνώσει, αναμιγνύουμε 3ml stacking buffer με 30ml APS και 3ml TEMED σε ένα καθαρό falcon. Γεμίζουμε με τη χρήση πιπέτας το χώρο που έχει μείνει πάνω από το gel ανάμεσα στα τζαμάκια κι αμέσως τοποθετούμε τη «χτένα» για

να δημιουργήσουμε τα πηγαδάκια. Αφήνουμε το gel να στεγνώσει για περίπου μια ώρα κι ανάβουμε το υδατόλουτρο στους 65°C συμπληρώνοντας με όσο απιονισμένο νερό χρειάζεται. Από το stock με το 50x TAE φτιάχνουμε 5L TAE 1x.

Μόλις στεγνώσει και το stacking gel αφαιρούμε προσεκτικά τη «χτένα» έτσι ώστε να μη χαλάσουν τα πηγαδάκια κι εφαρμόζουμε το λάστιχο και στη συνέχεια το πλαστικό tank με τα ηλεκτρόδια στο πάνω μέρος του gel. Σφίγγουμε πολύ καλά για να μην υπάρχουν διαρροές κι εφαρμόζουμε βαζελίνη ανάμεσα στο λάστιχο και τα τοιχώματα του δοχείου. Ξεσφίγγουμε το gel από την πλατφόρμα στήριξης και τοποθετούμε το gel με το πάνω tank μέσα στο μεγάλο tank, αφού πρώτα έχουμε τοποθετήσει το δεύτερο ηλεκτρόδιο. Γεμίζουμε με TAE το 80% του πάνω και του κάτω ρεζερβουάρ και τοποθετούμε όλη τη συσκευή στο υδατόλουτρο. Τοποθετούμε εσωτερικά του κάτω ρεζερβουάρ θερμομέτρο για να βλέπουμε πότε θα αυξηθεί η θερμοκρασία κι ανακατεύουμε τακτικά για καλύτερη μετάδοση της θερμότητας. Όταν η θερμοκρασία του TAE στο κάτω ρεζερβουάρ φτάσει τους 55°C, φορτώνουμε τα δείγματά μας στα πηγαδάκια, κλείνουμε το πάνω ρεζερβουάρ με το καπάκι και ανοίγουμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Ανάλογα με το πείραμα, η τάση και ο χρόνος ηλεκτροφόρησης αλλάζουν. Στο συγκεκριμένο πείραμα η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 75V για 19h.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, ανοίγουμε προσεκτικά τα τζαμάκια κι όπως είναι κολλημένο το gel στο ένα από τα δυο το μεταφέρουμε σε δοχείο και το καλύπτουμε πλήρως με 200ml διαλύματος SybrGold® 1X, TAE 1X, το οποίο έχουμε φτιάξει φρέσκο. Ξεκολλάμε προσεκτικά το gel χωρίς να σπάσει από το τζάμι, και επωάζουμε για 20-30min στο σκοτάδι υπό ελαφριά ανακίνηση. Τέλος, φωτογραφίζουμε σε UV το gel, χρησιμοποιώντας το κατάλληλο φίλτρο για το SybrGold®.

**Πίνακας B5. Συνθήκες και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για το DGGE.**

Ακρυλαμιδη	Διαβάθμιση [UF]	Χρόνος/Τάση	Loading buffer	Product loaded	Staining method
37.5:1	40-60%	19h/75V	Promega Green®	20λ	SybrGold®

## **B6. Μετασχηματισμός και Κλωνοποίηση στελεχών *E.coli*, αλληλούχιση επιλεγμένων κλώνων.**

### **B6.1. Κατασκευή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων**

Για την κλωνοποίηση των προϊόντων της Nested PCR χρησιμοποιήθηκε ο φορέας κλωνοποίησης pGEM-T Easy vector (Promega). Το μίγμα της αντίδρασης της λιγάσης ετοιμαζόταν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή σε τελικό όγκο 10 μl και περιείχε:

5 μl ligation buffer (2X)

1 μl pGEM – T Easy vector (50 ng/μl)

1 μl T4 ligase

x μl καθαρό (ή μη) προϊόν PCR

10 – (7 + x) μl H<sub>2</sub>O

Το τελικό μίγμα επωζόταν στους 16°C για 8 – 10 h και αποθηκευόταν στους -20°C.

### **B6.2. Μετασχηματισμός κυττάρων *E.coli* DH5a**

Για την κλωνοποίηση των προϊόντων PCR χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από το στέλεχος *DH5a* του βακτηρίου *Escherichia coli*. Τα κύτταρα αυτά γίνονταν δεκτικά μετασχηματισμού (competent) και αποθηκεύονταν στους -80°C. 200 μl κυττάρων αφήνονταν να ξεπαγώσουν μέσα σε πάγο. Στα κύτταρα αυτά τοποθετούνταν 4 μl από το προϊόν της αντίδρασης της λιγάσης και ανακινούνταν ελαφρά. Ακολουθούσε επαναφορά στον πάγο για 20 min και στη συνέχεια θερμικό σοκ στους 42°C για 45 sec. Μετά το θερμικό σοκ βυθίζονταν αμέσως στον πάγο για 2 min και κατόπιν προστίθεντο 800 μl θρεπτικού μέσου (LB) σε κάθε σωλήνα. Οι σωλήνες με τα μετασχηματισμένα κύτταρα επωάζονταν υπό ανακίνηση στους 37°C για 45 - 60 min, φυγονεντρούνταν στις 2500 στροφές για 5 min και απλώνονταν σε τριβλία που περιείχαν στερεό θρεπτικό (LB + άγαρ) μαζί με αμπικιλίνη ως επιλεκτικό παράγοντα. Ο φορέας κλωνοποίησης (pGEM-T Easy vectror) εκτός από το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη εμπεριέχει και το γονίδιο μεταβολισμού της λακτόζης το οποίο διακόπτεται από το ένθεμα. Για το λόγο αυτό στα ίδια τριβλία είχε επιστρωθεί X-gal (Sigma) 40μl (20%). Αυτό δίνει τη δυνατότητα να ελεγχθούν οι αποικίες που περιέχουν το ένθεμα από εκείνες που περιέχουν μόνο το φορέα. Τα βακτήρια

αφήνονταν να αναπτυχθούν για 12 - 16 h και ακολουθούσε η συλλογή των λευκών αποικιών.

Η συλλογή των αποικιών γινόταν με αποστειρωμένα ακρορύγχια. Κάθε λευκή αποικία μεταφερόταν σε αριθμημένη θέση ενός νέου τριβλίου που περιείχε στερεό LB και αμπικιλίνη. Το νέο τριβλίο με τις αριθμημένες αποικίες επωζόταν για 12 – 16 h στους 37°C.

### **B6.3. Έλεγχος θετικών κλώνων**

Μικρή ποσότητα από την κάθε αριθμημένη αποικία μεταφερόταν σε αποστειρωμένο σωλήνα erpendorf 0,5 ml που περιείχε 20-100 µl STE buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8). Αφού ανακινούνταν ισχυρά για να διασπαστεί η μάζα των κυττάρων, οι σωλήνες τοποθετούνταν στους 95°C για 15 min. Στη συνέχεια αφήνονταν να κρυώσουν. 1µl από αυτό το μίγμα αποτελούσε τη DNA μήτρα για την PCR που θα ακολουθούσε. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι T7 (5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3') και SP6 (5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG- 3'), οι οποίοι ήταν εδικοί για το vector T-easy. Έτσι αποφεύγονταν ο πολλαπλασιασμός τμήματος DNA της E.Coli ο οποίος θα συνέβαινε εάν χρησιμοποιούσαμε τους εκκινητές GC357f και 518r. Για όσους κλώνους έδιναν PCR προϊόν ακολουθούσε εκ νέου nested PCR και το προϊόν αυτής αναλυόταν μέσω DGGE. Με τον τρόπο αυτό ανιχνεύονταν οι κλώνοι που περιείχαν διαφορετικά ενθέματα τα οποία έρχιζαν αλληλούχησης.

### **B6.4. Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA και αλληλούχηση**

Τα κύτταρα των κλώνων που επιλέγονταν καλλιεργούνταν για 12 – 16 h σε 5 ml υγρού θρεπτικού (LB) και κατόπιν χρησιμοποιούνταν για την παραλαβή καθαρού πλασμιδιακού DNA. Το πλασμιδιακό DNA καθαριζόταν με το High Pure Plasmid Isolation kit της Roche σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. 500ng από το καθαρισμένο πλασμιδιακό DNA στάλθηκαν για αλληλούχηση για καθένα από τους κλώνους. Η αλληλούχηση έγινε στο DNA Analysis Facility του Yale University μέσω του Applied Biosystems 3730x/ DNA Genetic Analyzer. Για την ανάγνωση των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής T7. Οι αλληλουχίες που ανακτήθηκαν συγκρίθηκαν με γνωστές αλληλουχίες της βάσης δεδομένων NCBI μέσω του αλγορίθμου BLAST για να ταυτοποιηθούν τα βακτηριακά τάξα με όριο εμπιστοσύνης το 96% ομοιότητα στην αλληλουχία..



## **B7. Στατιστικές αναλύσεις**

Για τις πολυμεταβλητές αναλύσεις των μικροβιακών τάξεων, η μήτρα ομοιότητας για κάθε σετ δεδομένων δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας το Bray-Curtis similarity index (εδώ ως μέτρο της  $\beta$ - diversity). Μια μη μετρική πολυδιάστατη χωροταξική κλίμακα (nMDS) δημιουργήθηκε από κάθε τριγωνική μήτρα ομοιότητας. Η συνάρτηση correlate του Microsoft Excel χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ομοιότητας μεταξύ των πειραματικών επαναλήψεων. Όλες οι γραμμικές συσχετίσεις υπολογίστηκαν με τη χρήση του Microsoft Excel, ενώ οι τιμές του  $p$  υπολογίστηκαν από πίνακες με βάση το  $R$  και το  $n$ .

## **Γ. Αποτελέσματα**

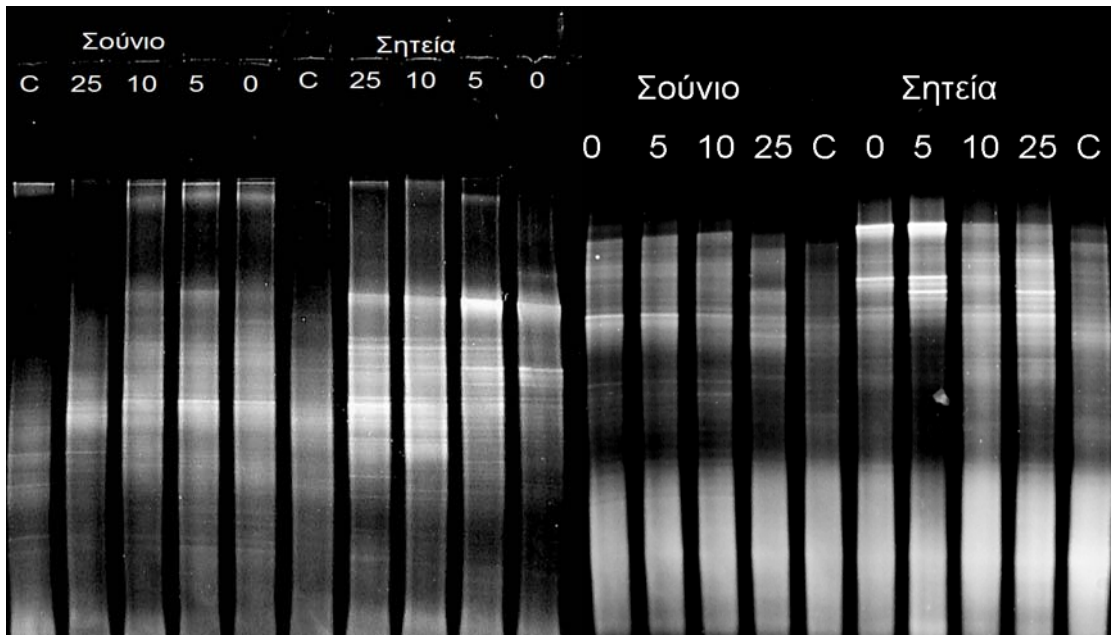
### **Γ1. Αλλαγές στις μικροβιακές κοινότητες ανάλογα με την απόσταση από τους κλωβούς**

Στις εικόνες που προκύπτουν στην ανάλυση μέσω DGGE, θεωρούμε ότι κάθε διαφορετική ζώνη αντιστοιχεί και σε διαφορετικό βακτηριακό taxon (βλ. B5.2.). Ο όρος «είδος» σε τέτοιου είδους αναλύσεις αποφεύγεται να χρησιμοποιείται για δυο λόγους. Καταρχήν ο ορισμός του είδους στα βακτήρια αποφεύγεται να χρησιμοποιείται γενικά λόγω της δυσκολίας που υπάρχει στην ταξινομική τους διάκριση μέχρι το επίπεδο αυτό. Επίσης η διακριτική ικανότητα της μεθόδου, έχει δείξει ότι φτάνει μέχρι και το 1% διαφορά στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (Muyzer et. al, 1993). Πολλές φορές όμως, ειδικά αν το μήκος των αλληλουχιών είναι μικρό, η διακριτική αυτή ικανότητα δεν είναι σίγουρο ότι φτάνει εως το επίπεδο του είδους. Έτσι χρησιμοποιείται ο όρος taxon (OTU, Operational Taxonomic Unit) για να εκφραστούν οι διαφορετικές μονάδες που προκύπτουν από τις αναλύσεις αυτές. Σε κάθε τέτοια ανάλυση, γινόταν καταμέτρηση των ζωνών κάθετα (ανά δείγμα) για να υπολογιστεί ο αριθμός των συνολικών μικροβιακών ταξινομικών ομάδων στο δείγμα, αλλά και οριζόντια έτσι ώστε να διαπιστωθεί η παρουσία/απουσία ενός συγκεκριμένου OTU στο σύνολο των δειγμάτων. Με τον τρόπο αυτό κατασκευάστηκαν οι μήτρες παρουσίας/απουσίας οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για την ανάλυση μέσω MDS.

Στις Εικόνες Γ1,Γ2,Γ3 φαίνονται τα αποτελέσματα των αναλύσεων DGGE για κάθε μια επανάληψη. Οι εικόνες αυτές είναι ουσιαστικά οι φωτογραφίες σε υπεριώδη ακτινοβολία των gel πολυακρυλαμίδης με διαβάθμιση αποδιατακτικών που προέκυψαν μετά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων και τη χρώση με SybrGold. Η φορά της ηλεκτροφόρησης είναι κάθετη από πάνω προς τα κάτω. Έτσι κάθε κάθετη γραμμή αντιστοιχεί σε ένα δείγμα.

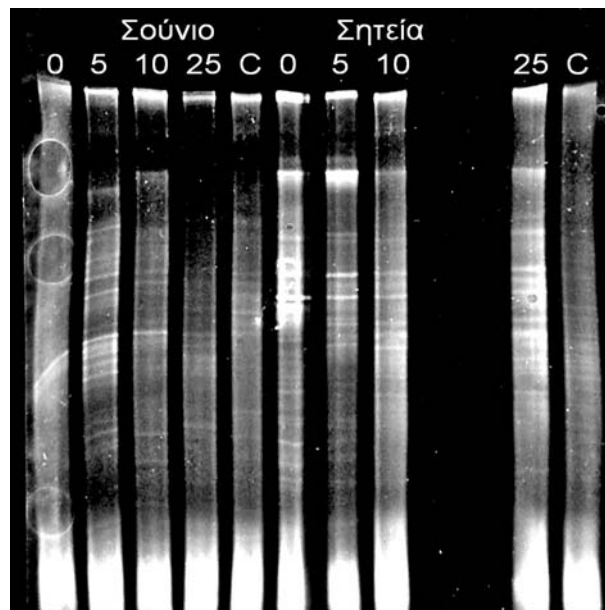
Από την ανάλυση των εικόνων διαπιστώθηκε μια τάση μείωσης των ζωνών στα δείγματα ελέγχου, η οποία παρατηρείται και στις τρεις επαναλήψεις (Πίνακας Γ1). Συγκεκριμένα, οι ανώτερες ομάδες ζωνών στον κατακόρυφο άξονα είναι αυτές οι οποίες σημειώνουν τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων κοντά στους κλωβούς και των δειγμάτων ελέγχου. Επίσης, από τις τριγωνικές μήτρες ομοιότητας παρατηρήθηκε μεγάλη ομοιότητα των δειγμάτων ανά δειγματοληπτική περιοχή (βλ. Παράρτημα).

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων μέσω DGGE (Εικόνες Γ1,Γ2,Γ3) μετά από επεξεργασία με nMDS (Εικόνα Γ4), έδειξαν όντως μια ξεκάθαρη ομαδοποίηση των δειγμάτων σύμφωνα με την τοποθεσία από την οποία προέρχονταν για δυο από το σύνολο των τριών επαναλήψεων. Για τη δεύτερη επανάληψη, η οποία αποτελούσε την εξαίρεση, η ομαδοποίηση αυτή δεν παρατηρείται λόγω του δείγματος στα 25 μέτρα απόσταση από τον κλωβό του Σουνίου το οποίο συμπεριφέρεται σαν outlier. Για την επανάληψη αυτή, η ομαδοποίηση υπάρχει μεταξύ των δειγμάτων κοντά στους κλωβούς και των δειγμάτων ελέγχου.

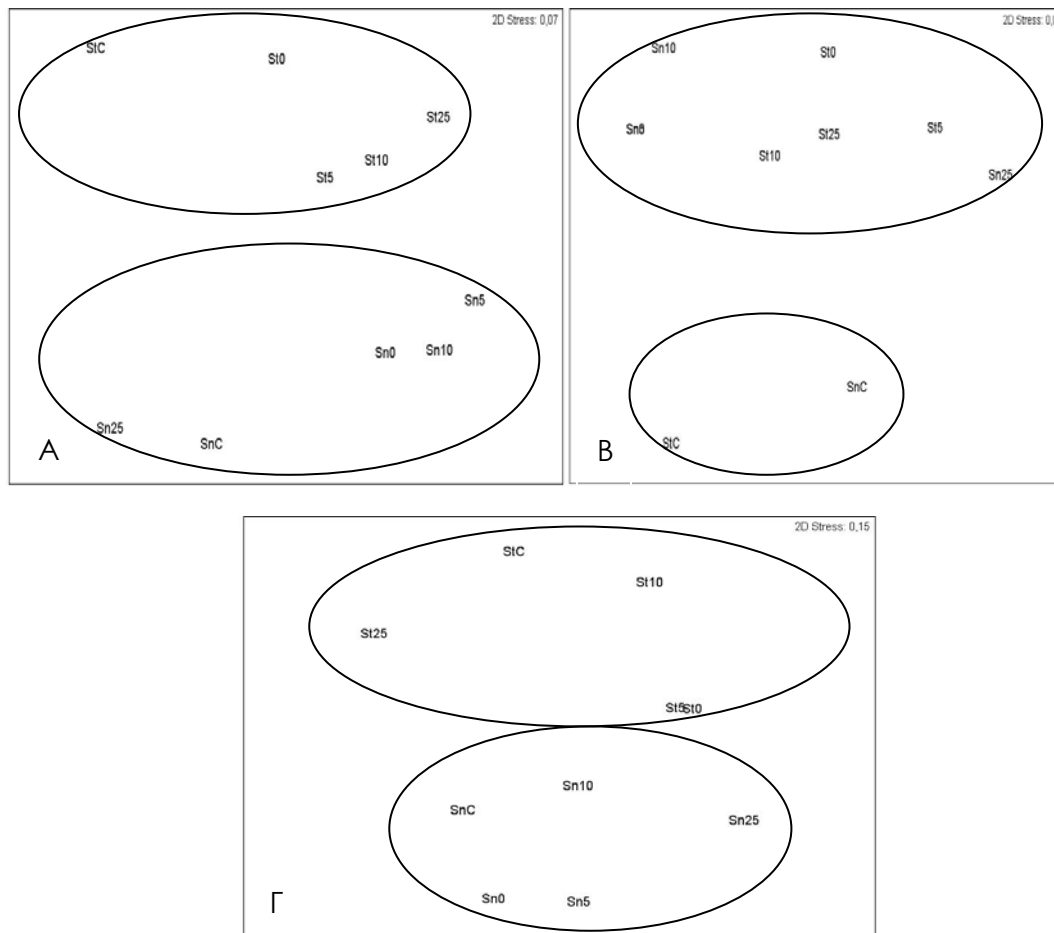


Εικόνα Γ1. DGGE για την πρώτη επανάληψη

Εικόνα Γ2. DGGE για τη δεύτερη επανάληψη



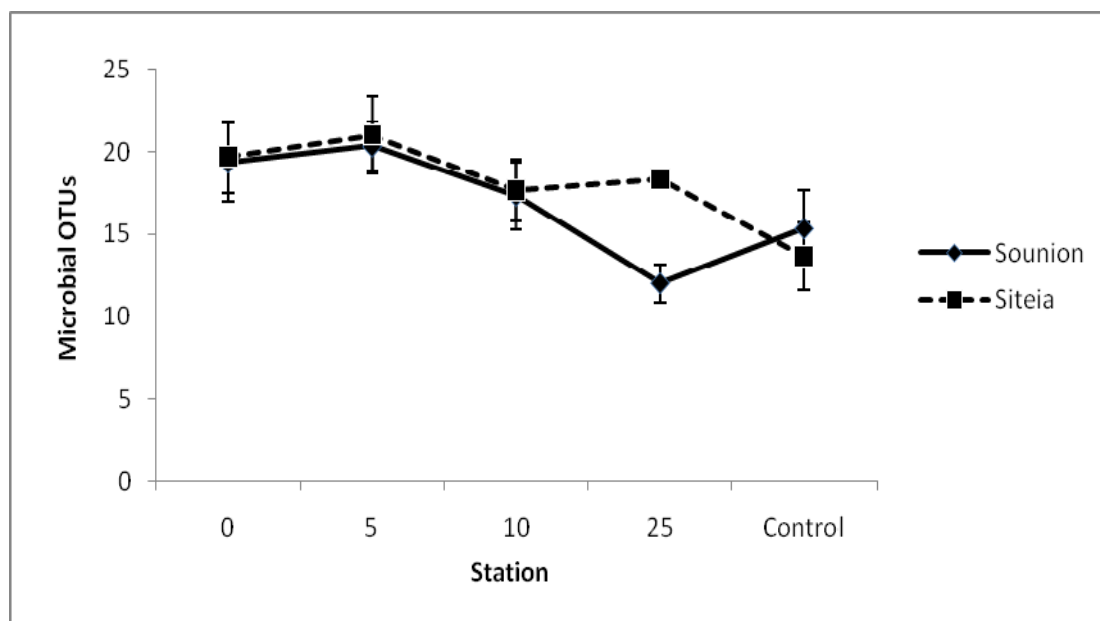
Εικόνα Γ3. DGGE για την τρίτη επανάληψη



**Εικόνα Γ4. Αναλύσεις MDS από τις μήτρες παρουσίας-απουσίας των τριών επαναλήψεων. Τα δείγματα από το Σούνιο συμβολίζονται με Sn, ενώ τα δείγματα από τη Σητεία με St. Το C υποδεικνύει δείγματα ελέγχου. A: Πρώτη επανάληψη B: Δεύτερη επανάληψη Γ: Τρίτη επανάληψη**

Ο μέσος αριθμός των βακτηριακών τάξεων υπολογίστηκε για κάθε δείγμα, από τις τρεις επαναλήψεις (Πίνακας Γ1, Εικόνα Γ5). Υπάρχει μια φανερή τάση μείωσης του αριθμού των βακτηριακών τάξεων με την αύξηση της απόστασης από τον κλωβό, χωρίς όμως ο αριθμός αυτός να διαφέρει στατιστικά μεταξύ των δυο κλωβών, εκτός από το δείγμα στα 25 μέτρα απόσταση από τον κλωβό στο Σούνιο. Τα γεγονότα αυτά μπορούν να ερμηνευθούν εάν λάβουμε υπόψη μας τη διαφορετική σύσταση του βυθού στη συγκεκριμένη απόσταση. Ενώ όλα τα άλλα δείγματα ήταν όμοια όσον αφορά τη σύσταση του βυθού, στα 25 μέτρα απόσταση από τον κλωβό του Σουνίου ο βυθός ήταν πολύ διαφορετικός όσον αφορά την κοκκομετρική του σύσταση και το ποσοστό ιλύος/αργίλου. Ως αποτέλεσμα, όλες οι βιογεωχημικές διεργασίες μεταβλήθηκαν και η μικροβιακή κοινότητα διέφερε κατά πολύ. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται επίσης από την αρνητική συσχέτιση του μέσου αριθμού των

μικροβιακών τάξεων με το μέσο μέγεθος των κόκκων (βλ. Κεφ.Γ2), εξηγώντας τη μεγάλη μείωση του μέσου αριθμού των μικροβιακών τάξεων στο δείγμα που βρισκόταν στα 25 μέτρα απόσταση από τον κλωβό του Σούνιου.



**Εικόνα Γ5.** Ο μέσος αριθμός των βακτηριακών OTUs για κάθε σταθμό, με τα τυπικά σφάλματα. Με τετράγωνα συμβολίζονται τα δείγματα από τη Σητεία ενώ με κύκλους εκείνα από το Σούνιο.

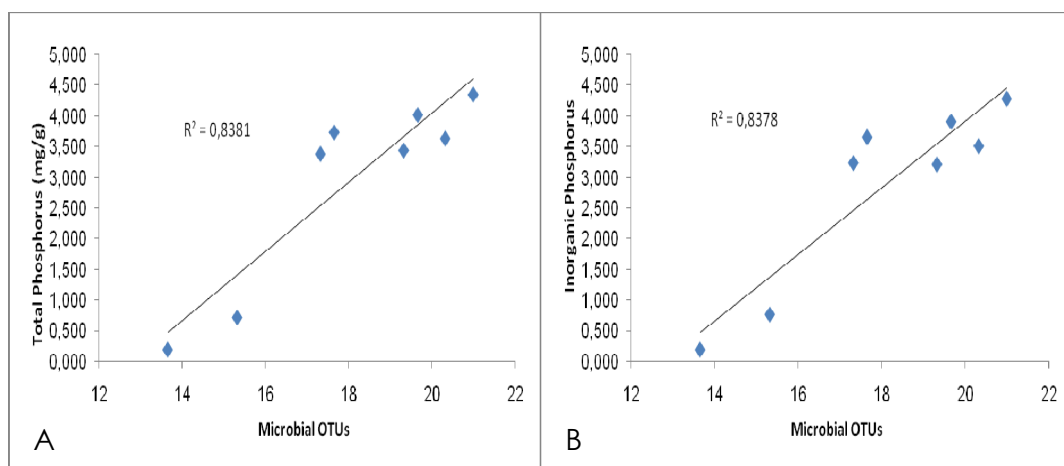
## Γ2. Συσχετίσεις με αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες

Ο μέσος αριθμός βακτηριακών τάξεων, όπως αυτός προέκυψε από την ανάλυση μέσω DGGE, για κάθε δείγμα (βλ. Εικόνα Γ5) συσχετίστηκε γραμμικά με ένα σύνολο αβιοτικών και βιοτικών παραγόντων για τους οποίους υπήρχαν μετρήσεις για τα ίδια δείγματα (Παπαγεωργίου 2009, διδακτορική διατριβή), για να εξεταστεί ποιοι από τους παράγοντες αυτούς επηρεάζουν σημαντικά και πώς τον αριθμό αυτό.

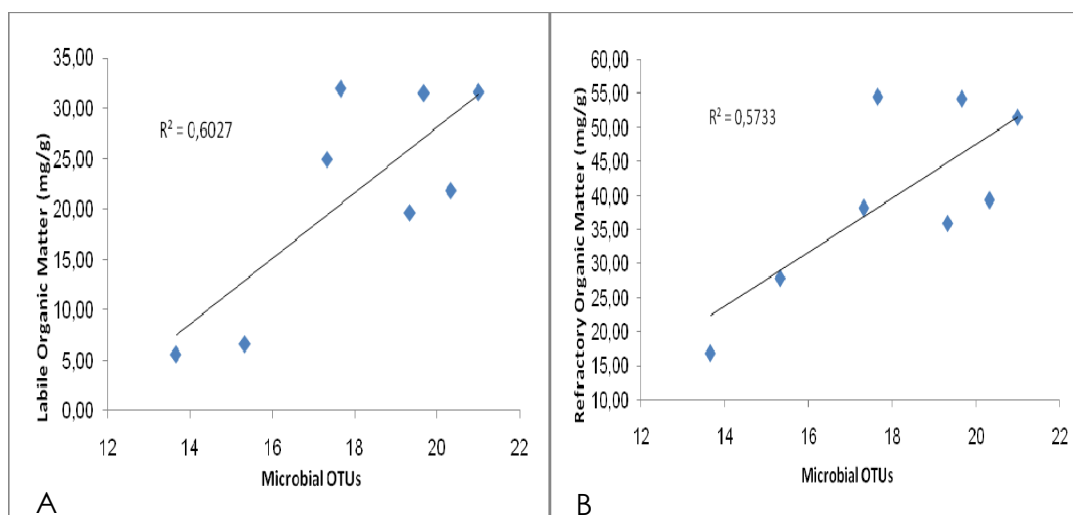
	<b>Sn0</b>	<b>Sn5</b>	<b>Sn10</b>	<b>Sn25</b>	<b>SnC</b>	<b>St0</b>	<b>St5</b>	<b>St10</b>	<b>St25</b>	<b>StC</b>
<b>RepA</b>	18	18	17	12	19	18	17	20	19	17
<b>RepB</b>	16	20	14	10	11	24	21	14	18	14
<b>Rep0</b>	24	23	21	14	16	17	25	19	18	10
<b>Average</b>	19	20	17.3	12	15	20	21	17.7	18.3	14
<b>Standard Error</b>	2.4	1.5	2.03	1.15	2.3	2.2	2.3	1.86	0.33	2

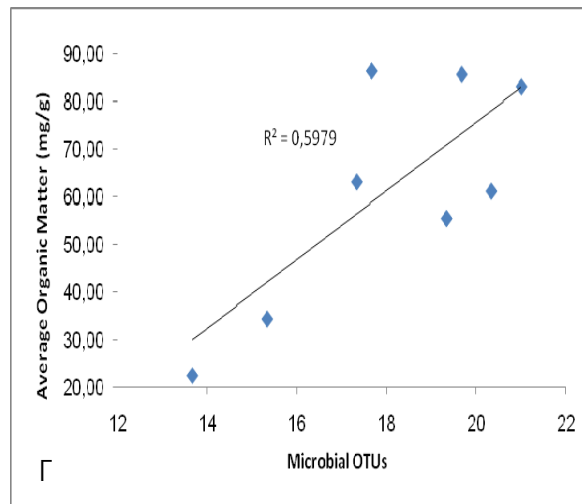
**Πίνακας Γ1.** Ο αριθμός των βακτηριακών τάξεων για κάθε δείγμα κάθε επανάληψης, ο μέσος όρος ανά δείγμα και τα τυπικά σφάλματα.

Οι αβιοτικοί παράγοντες περιελάμβαναν δυο μορφές φωσφορικών ιόντων (συνολικά και ανόργανα), τρεις μορφές οργανικού υλικού (συνολικό, βιοδιαθέσιμο και μη βιοδιαθέσιμο) και τη διάμετρο των κόκκων. Οι βιοτικοί παράγοντες περιελάμβαναν τους δείκτες ποικιλότητας ES10 και  $\Delta^*$  για τη μακροπανίδα. Οι γραμμικές συσχετίσεις φαίνονται στις Εικόνες Γ6,Γ7,Γ8 και Γ9.

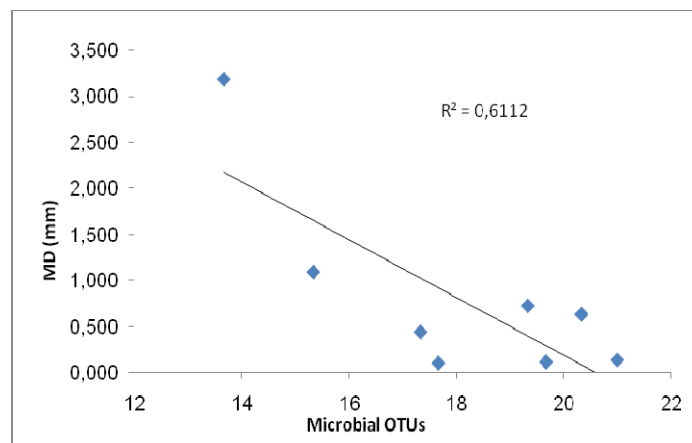


**Εικόνα Γ6. Γραμμική συσχέτιση του μέσου αριθμού μικροβιακών τάξεων με τα συνολικά (A) και τα ανόργανα (B) φωσφορικά.**

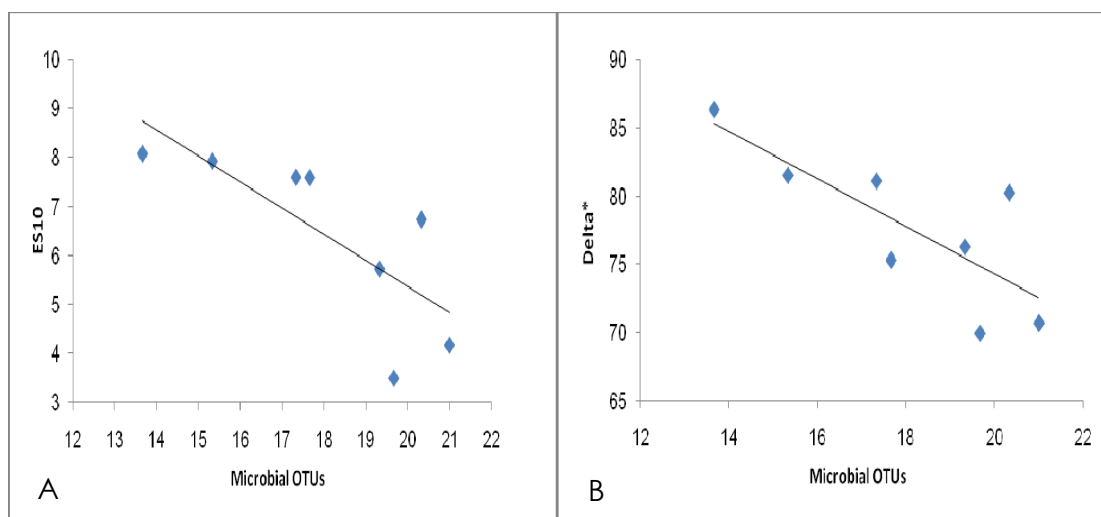




**Εικόνα Γ7. Γραμμική συσχέτιση του μέσου αριθμού των μικροβιακών τάξων με το βιοδιαθέσιμο (Α), το μη βιοδιαθέσιμο (Β) και το συνολικό (Γ) οργανικό υλικό.**



**Εικόνα Γ8. Γραμμική συσχέτιση του μέσου αριθμού των μικροβιακών τάξων με τη μέση διάμετρο των κόκκων του ιζήματος.**



**Εικόνα Γ9. Γραμμική συσχέτιση του μέσου αριθμού των μικροβιακών τάξων με τους δείκτες ποικιλότητας για τη μακροπανίδα ES10 και Δ\*.**

Όλες οι συσχετίσεις ήταν στατιστικά σημαντικές ( $P < 0,05$ ) και για όλες τις συσχετίσεις τα δείγματα σε απόσταση 25 μέτρων από τους κλωβούς δε λήφθηκαν υπόψη καθώς παρουσίαζαν σημαντικές πλην εξηγήσιμες (βλ. Κεφ.Γ1) αποκλίσεις, αλλοιώνοντας τα αποτελέσματα των αναλύσεων. Ο μέσος αριθμός των βακτηριακών τάξεων εμφανίζει πολύ έντονη ( $R^2=0,838$ ) θετική γραμμική συσχέτιση με τα φωσφορικά ιόντα και στις δυο μορφές (Εικόνα Γ6). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι ο φώσφορος αποτελεί πολύ σημαντικό περιοριστικό παράγοντα για τη μικροβιακή ποικιλότητα στις Μεσογειακές μικροβιακές βενθικές κοινότητες, αφού αποτελεί κύριο μεταβολικό στοιχείο και απορροφάται είτε άμεσα (αυτότροφοι) είτε έμμεσα (ετερότροφοι) από το σύνολο της μικροβιακής κοινότητας. Έντονη όμως ( $R^2= 0,6$  0,57 και 0,59) είναι κι η θετική γραμμική συσχέτιση με το οργανικό υλικό και στις τρεις μορφές του, γεγονός που αντικατοπτρίζει την ολιγοτροφική κατάσταση της κοινότητας (Εικόνα Γ7). Αντιθέτως, αρνητική γραμμική συσχέτιση παρατηρείται με τη διάμετρο των κόκκων του ιζήματος (Εικόνα Γ8). Αυτό σημαίνει ότι όσο πιο αδρόκοκκο είναι το ίζημα, τόσο λιγότερα μικροβιακά τάξα περιμένει κανείς να συναντήσει. Τέλος, αρνητική είναι η γραμμική συσχέτιση του μέσου αριθμού των μικροβιακών τάξεων και με τους δυο δείκτες ποικιλότητας της μακροπανίδας, ES10 και  $\Delta^*$  (Εικόνα Γ9). Με την αύξηση δηλαδή των ειδών της μακροπανίδας, ο αριθμός των μικροβιακών τάξεων μειώνεται, γεγονός που υποδηλώνει τις ανταγωνιστικές ή/και σχέσεις θηράματος-θηρευτή μεταξύ των ειδών της μακροπανίδας και των μικροβιακών ειδών.

### **Γ3. Πολυμορφικά και κοινά μικροβιακά taxa**

Τα nested PCR προϊόντα για τα δείγματα Σ5, Σc, S0 και Sc από την πρώτη επανάληψη ( επιλέχτηκαν λόγω καλύτερης ποιότητας εξαγωγής DNA) κλωνοποιήσαμε σε πλασμίδιο έκφρασης (βλ Κεφ. Β6.1.) και στη συνέχεια μετασχηματίσαμε κύτταρα *E.coli* (βλ. Κεφ. Β6.2.). Μετά τον έλεγχο με PCR, ακολουθούσε εκ νέου nested PCR στους θετικούς κλώνους και το προϊόν αναλυόταν μέσω DGGE μαζί με το προϊόν PCR του δείγματος από το οποίο προέρχονταν. Έτσι ήμασταν σε θέση να απομονώσουμε κατευθείαν κλωνοποιημένες ζώνες οι οποίες έχριζαν αλληλούχισης όπως πολυμορφικές ζώνες στα δείγματα κοντά στους κλωβούς αλλά και ζώνες οι οποίες ήταν παρούσες σε όλα τα δείγματα ενός κλωβού.



Συνολικά απομονώσαμε με τον τρόπο αυτό 31 κλώνους οι οποίοι στάλθηκαν για αλληλούχιση του ενθέματος του πλασμιδίου που εισαγάγαμε. Οι αλληλουχίες που ανακτήθηκαν, ταυτοποιήθηκαν ταξινομικά μέσω του BLAST της NCBI. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της ταξινόμησης παρουσιάζονται στον Πίνακα Γ2. Αναγράφονται από ποιο δείγμα προέρχεται η ζώνη που αλληλουχήθηκε, ο αύξων αριθμός του κλώνου ανά δείγμα, η φύση (πολυμορφική ή κοινή) και η θέση της μπάντας στο gel DGGE και η μέγιστη ταξινομική διακριτική ικανότητα που επιτεύχθηκε μέσω του BLAST.

Sample	Clone	DGGE position	Highest Resolution Taxonomy
Σ5	3	Σ5 polymorphic band, upper	Epsilon Proteobacterium
Σ5	4	Σ5 polymorphic band, upper	Epsilon Proteobacterium
Σ5	12	Σ5 polymorphic band, upper	Epsilon Proteobacterium
Σ5	15	Σ5 polymorphic band, upper	Epsilon Proteobacterium
Σ5	18	Σ5 polymorphic band, upper	Bacteroidetes
Σ5	20	Siteia common band, middle	Clostridia
Σc	1	Siteia common band, middle	Unclassified bacteria
Σc	4	Siteia common band, upper middle	Gamma Proteobacterium
Σc	17	Siteia common band, middle	Gamma Proteobacterium
Σc	18	Siteia common band, upper middle	Delta Proteobacterium
Σc	20	Siteia common band, lower	Bacteroidetes
Σc	21	Siteia common band, middle	Verrucomicrobiales
S0	3	S0 polymorphic band, upper	Bacteroidetes
S0	6	S0 polymorphic band, upper	Flavobacteriaceae
S0	7	Sounion common band, middle	Chloroflexi
S0	9	Sounion common band, lower	Uncultured bacterium
S0	20	S0 polymorphic band, upper	Delta Proteobacterium
S0	23	S0 polymorphic band, upper	Gamma Proteobacterium
S0	25	Sounion common band, lower	Acidobacteria
S0	26	Sounion common band, middle	Delta Proteobacterium
S0	28	S0 polymorphic band, upper	Gamma Proteobacterium
S0	29	Sounion common band, middle	Uncultured bacterium
S0	33	S0 polymorphic band, upper	Gamma Proteobacterium
S0	36	Sounion common band, lower middle	E.Coli
S0	37	S0 polymorphic band, upper	Uncultured marine bacterium
S0	38	S0 polymorphic band, upper	Bacteroidetes
Sc	2	Sounion common band, lower	Delta Proteobacterium
Sc	6	Sounion common band, lower	Actinobacterium
Sc	7	Sounion common band, middle	Delta Proteobacterium
Sc	9	Sounion common band, lower	Uncultured bacterium

Sc	10	Sounion common band, middle	E.Coli
----	----	-----------------------------	--------

**Πίνακας Γ2. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της ταξινόμησης μέσω BLAST της NCBI όλων των κλώνων που αλληλουχήθηκαν επιτυχώς. Από αριστερά προς τα δεξιά αναγράφονται το δείγμα από το οποίο προέρχεται ο κλώνος, το νούμερο του κλώνου, η θέση της μπάντας στο gel DGGE κι η μέγιστη ταξινομική διάκριση που επιτεύχθηκε μέσω του BLAST.**

Στη συνέχεια οι μπάντες κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με το δείγμα προέλευσης και τη φύση τους (πολυμορφικές ή κοινές) και υπολογίστηκε η αναλογία κάθε αντιπροσωπευτικού βακτηριακού φύλου σε κάθε ομάδα (Πίνακας Γ3). Όσον αφορά το φύλο των Πρωτεοβακτηρίων, η διάκριση έγινε ανάλογα με την κλάση (α-β-γ-δ- και ε Πρωτεοβακτήρια) όπως συνηθίζεται βιβλιογραφικά [19,20]. Από τους 31 κλώνους, οι 5 αλληλουχίες αντιστοιχούσαν σε μη χαρακτηρισμένα βακτήρια (γραμμένα στον Πίνακα Γ3 ως unclassified/uncultured bacteria). Στις πολυμορφικές ζώνες από τη Σητεία, η μεγαλύτερη αναλογία αντιστοιχεί στα ε-Πρωτεοβακτήρια τα οποία δεν βρέθηκαν σε καμία άλλη κατηγορία. Στις κοινές ζώνες από τη Σητεία αντιπροσωπεύονται πέντε διαφορετικές μικροβιακές ομάδες, στις πολυμορφικές ζώνες από το Σούνιο τρεις ομάδες ενώ στις κοινές ζώνες από το Σούνιο πέντε μικροβιακές ομάδες.

Cumulative DGGE bands	Ratio per Phylum/Class (for Proteobacteria)
Siteia impacted polymorphic bands	4/5 Epsilon Proteobacteria 1/5 Bacteroidetes
Siteia common bands	2/7 Gamma Proteobacteria 1/7 Delta Proteobacteria  1/7 Low G+C Gram positive bacteria  1/7 Bacteroidetes  1/7 Verrucomicrobia  1/7 Unclassified Bacteria
Sounion impacted polymorphic bands	3/8 Gamma Proteobacteria 3/8 Bacteroidetes  1/8 Delta Proteobacteria  1/8 Uncultured marine bacteria
Sounion common bands	3/11 Delta Proteobacteria  3/11 Uncultured Bacteria  2/11 Gamma Proteobacteria

	1/11 Acidobacteria
	1/11 high G+C Gram-positive bacteria
	1/11 Chloroflexi

**Πίνακας Γ3. Η αναλογία φύλων και τάξεων (για το φύλο των Πρωτεοβακτηρίων), συγκεντρωτικά για όλες τις πολυμορφικές και κοινές μπάντες από κάθε περιοχή.**

## **Δ. Συζήτηση**

Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων μέσω DGGE, παρουσιάζεται μια σταδιακή τάση για μείωση στον αριθμό των μικροβιακών τάξεων όσο απομακρυνόμαστε από τον κλωβό και για τις δυο περιοχές. Όπως φαίνεται και από την Εικόνα Γ5, η τάση αυτή για μείωση όντως συντελείται και τα μοτίβα για τους δυο κλωβούς συμβαδίζουν εκτός από το δείγμα στα 25 μέτρα απόσταση από τον κλωβό του Σουνίου, για το οποίο η διαφοροποίηση έχει εξηγηθεί (βλ. Κεφ. Γ1). Τα δείγματα μάλιστα στα 5 μέτρα απόσταση από τους κλωβούς έχουν ακόμα και στατιστικά μεγαλύτερο μέσο αριθμό βακτηριακών τάξεων από τα δείγματα ελέγχου. Είναι λοιπόν φανερό ότι οι κλωβοί ιχθυοκαλλιεργειών ως πηγή οργανικού εμπλουτισμού ευνόησαν την αύξηση της μικροβιακής βενθικής ποικιλότητας για τα δείγματά μας. Το γεγονός αυτό της αύξησης της μικροβιακής ποικιλότητας κοντά στους κλωβούς έρχεται σε συμφωνία και με ήδη δημοσιευμένες εργασίες (Bissett et al., 2007, Kawahara et al., 2009, Yoza et. al, 2005), στις οποίες παρατηρείται μια τέτοια αύξηση χωρίς όμως να υπάρχει η ακριβής απόσταση του μεγίστου της μικροβιακής ποικιλότητας το οποίο στη δική μας εργασία βρέθηκε στα 5 μέτρα απόσταση από τον κλωβό.

Η αύξηση του μέσου αριθμού των μικροβιακών τάξεων κοντά στους κλωβούς μπορεί να εξηγηθεί αν ληφθούν υπόψη οι γραμμικές συσχετίσεις στις Εικόνες Γ6 και Γ7 στις οποίες ο μέσος αριθμός των βακτηριακών τάξεων εμφανίζει έντονη γραμμική συσχέτιση τόσο με τα φωσφορικά ιόντα όσο και με το ποσό της οργανικής ύλης, σε όλες τους τις μορφές. Είναι γνωστό ότι κάτω από τους κλωβούς ιχθυοκαλλιεργειών υπάρχει συσσωρευμένη οργανική ύλη και αυξημένα επίπεδα φωσφορικών ιόντων ως αποτέλεσμα της καθίζησης της αχρησιμοποίητης τροφής και των περιττωμάτων των ψαριών (Hall et al. 1990, Holby & Hall 1991, Karakassis et al.1998). Άρα ένα πολύ μεγάλο ποσοστό της αύξησης του αριθμού των βακτηριακών τάξεων κοντά στους κλωβούς μπορεί να εξηγηθεί με την αύξηση των φωσφορικών ιόντων και της οργανικής ύλης. Παράλληλα, στις πολύ κοντινές αποστάσεις από τους κλωβούς παρατηρείται μια αζωική ζώνη για τη μακροπανίδα, όπως περιγράφεται από τους

Pearson & Rosenberg (1978). Δεδομένης λοιπόν της αρνητικής γραμμικής συσχέτισης του μέσου αριθμού των βακτηριακών τάξεων με τη μακροπανιδική ποικιλότητα, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα Γ9, μπορεί να εξηγηθεί μια επιπλέον αύξηση των μικροβιακών τάξεων κοντά στους κλωβούς.

Το ότι αυξάνεται όμως ο μέσος αριθμός των βακτηριακών τάξεων κοντά στους κλωβούς και για τις δυο δειγματοληπτικές περιοχές δε σημαίνει ότι η σύσταση των μικροβιακών κοινοτήτων στις δυο περιοχές είναι όμοια. Απεναντίας, όπως μπορεί να φανεί κι από την Εικόνα Γ4, στις αναλύσεις MDS τα δείγματα ομαδοποιούνται ανά περιοχή δειγματοληψίας κι όχι ανάλογα με την απόσταση σε δυο από το σύνολο των τριών επαναλήψεων. Για τη δεύτερη επανάληψη στην οποία το πρότυπο ομαδοποίησης είναι διαφορετικό, outlier αποτελούσε ουσιαστικά μόνο το δείγμα στα 25 μέτρα απόσταση από τον σταθμό του Σουνίου το οποίο διέφερε σημαντικά στα βιογεωχημικά του χαρακτηριστικά σαν δείγμα (βλ Κεφ. Γ1).

Η ομαδοποίηση αυτή ανά δειγματοληπτική περιοχή σημαίνει ότι οι παραπλήσιες μικροβιακές κοινότητες είναι περισσότερο όμοιες από ότι εκείνες οι οποίες έχουν δεχθεί παρόμοια επίπεδα οργανικού εμπλουτισμού, οι κοινότητες δηλαδή των δειγμάτων που βρισκόταν σε ίσες αποστάσεις από τους κλωβούς αλλά σε διαφορετική δειγματοληπτική τοποθεσία. Το παρατηρούμενο αυτό μοτίβο έρχεται σε αντιδιαστολή με παρόμοιες εργασίες που συναντώνται στη βιβλιογραφία (Bissett et al., 2007, Kawahara et al., 2009, Yoza et. al, 2005) και στις οποίες η ομαδοποίηση γίνεται σύμφωνα με το αν το δείγμα βρίσκεται ακριβώς κάτω από τον κλωβό ή είναι δείγμα ελέγχου παρά με την περιοχή δειγματοληψίας από την οποία προέρχεται.

Τα διαφορετικά αποτελέσματα των εργασιών από τη βιβλιογραφία σε σχέση με τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής αντικατοπτρίζουν τις δυο διαφορετικές θεωρίες που υπάρχουν στην επιστημονική κοινότητα σε σχέση με τη δομή των μικροβιακών κοινοτήτων σε μοντέλα οργανικής ρύπανσης όπως οι κλωβοί των ιχθυοκαλλιεργειών. Η πρώτη θεωρία υποστηρίζει ότι «τα πάντα είναι παντού», δηλαδή οι τοπικές βακτηριακές κοινότητες έχουν απεριόριστο δυναμικό προσαρμογής και ουσιαστικά καθορίζονται από το περιβάλλον τους (Bissett et al., 2007). Η φύση δηλαδή και η ένταση του οργανικού εμπλουτισμού είναι οι παράγοντες εκείνοι οι οποίοι θα καθορίσουν και τη δομή των μικροβιακών κοινοτήτων κοντά στους κλωβούς. Εάν ισχύει κάτι τέτοιο λοιπόν, θα πρέπει η σύσταση των μικροβιακών κοινοτήτων των οργανικά εμπλουτισμένων δειγμάτων κοντά στους κλωβούς να είναι

όμοια ανεξάρτητα από το πού προέρχεται το δείγμα και το ίδιο να ισχύει για τα δείγματα ελέγχου. Όντως κάτι τέτοιο έχει παρατηρηθεί σε δημοσιευμένες μελέτες όπως στη μελέτη των Bissett et al., 2007 και Yoza et. al, 2005.

Η δεύτερη θεωρία υποστηρίζει ότι η δομή της τοπικής μικροβιακής κοινότητας καθορίζεται από την ποικιλότητα της ευρύτερης κοινότητας (Bissett et al., 2007). Εάν κάτι τέτοιο ισχύει, θα έπρεπε να παρατηρείται ακόμα και μετά το γεγονός του οργανικού εμπλουτισμού μια ομαδοποίηση των δειγμάτων ανάλογα με την περιοχή δειγματοληψίας ανεξάρτητα με το αν το δείγμα βρίσκεται κοντά στην πηγή του οργανικού εμπλουτισμού ή είναι δείγμα ελέγχου. Αυτή φαίνεται να είναι η περίπτωση όσον αφορά τα δείγματά μας, αφού όπως ήδη έχει αναφερθεί ομαδοποιούνται ανάλογα με την περιοχή δειγματοληψίας κι όχι με τη θέση τους ως προς την πηγή του οργανικού εμπλουτισμού. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί το γεγονός ότι σε όλες τις εργασίες που έχουν αναφερθεί, υπήρχαν μόνο δυο δείγματα από κάθε δειγματοληπτική περιοχή: ένα δείγμα ακριβώς κάτω από τον κλωβό κι ένα δείγμα ελέγχου ανεπηρέαστο από τον κλωβό. Όσον αφορά όμως τη δική μας μελέτη υπήρχαν συνολικά πέντε δείγματα από κάθε δειγματοληπτική περιοχή (βλ. Κεφ. Β2). Το γεγονός αυτό κάνει τα αποτελέσματά μας ακόμη πιο σημαντικά εφόσον η περίπτωση η ομαδοποίηση των δειγμάτων να έγινε τυχαία μειώνεται αφού ο αριθμός των δειγμάτων αυξάνεται.

Το ότι οι μικροβιακές κοινότητες διαφέρουν κατά πολύ ακόμα και μετά τον οργανικό εμπλουτισμό μπορεί να φανεί ξεκάθαρα και από τα αποτελέσματα της αλληλούχισης των πολυμορφικών και κοινών μπαντών από τα δείγματά μας. Πρέπει να τονιστεί ότι η πειραματική διαδικασία αυτή (βλ. Κεφ. Γ3) δεν αποτελεί μια προσπάθεια φυλογενετικής ανάλυσης του συνόλου της μικροβιακής κοινότητας, αλλά μια προσπάθεια αποτύπωσης των αλλαγών που συντελούνται σε αυτήν. Αλληλουχώντας όσο το δυνατόν περισσότερες πολυμορφικές μπάντες ήμασταν σε θέση να εξάγουμε συμπεράσματα για το ποια από τα βακτηριακά τάξα ευνοήθηκαν σε κάθε περιοχή από τον οργανικό εμπλουτισμό. Παράλληλα, με την αποτύπωση των κυριότερων αντιπροσώπων από τα βακτηριακά τάξα τα οποία υπήρχαν σε όλα τα δείγματα μπορούμε να συγκρίνουμε τον «πυρήνα» της κάθε βακτηριακής κοινότητας με τις πολυμορφικές μπάντες.

Η προσπάθειά μας αυτή από ότι φαίνεται ήταν επιτυχής. Με μόλις 31 κλώνους από σύνολο τεσσάρων δειγμάτων καταφέραμε να έχουμε σχεδόν απόλυτη

αντιπροσώπευση των κυρίαρχων βακτηριακών ομάδων που παρουσιάζονται σε εργασίες όπως αυτή των Kawahara et al. του 2009, στην οποία έγινε προσπάθεια αποτύπωσης της βακτηριακής κοινότητας κάτω από κλωβούς ιχθυοκαλλιεργειών μέσω κλωνοποίησης και αλληλούχησης του 16SRNA βακτηριακού γενετικού τόπου μετά από πολλαπλασιασμό με PCR του συνολικού εξαγόμενου DNA. Στην εργασία αυτή αλληλουχήθηκαν συνολικά 569 κλώνοι και όπως αναφέρουν οι συγγραφείς το μεγαλύτερο ποσοστό των αλληλουχιών ανήκε σε έξι βακτηριακές ταξινομικές ομάδες: γ-δ-ε-Πρωτεοβακτήρια, Bacteroidetes, Acidobacteria και Planctomycetes. Είναι πολύ σημαντικό το ότι στη μελέτη αυτή με μόλις το 5,4% των κλώνων καταφέραμε να έχουμε τις ίδιες κύριες αντιπροσωπευτικές ομάδες εκτός από την ομάδα των Planctomycetes. Έτσι είμαστε σε θέση να εξαγάγουμε συμπεράσματα όχι για το ποσοστό κάλυψης της βακτηριακής κοινότητας από μια ταξινομική ομάδα αλλά για την παρουσία/απουσία μιας τέτοιας ομάδας από την κοινότητα.

Όπως λοιπόν μπορεί να φανεί και από τον Πίνακα Γ3, οι δυο δειγματοληπτικές περιοχές μας διαφέρουν όχι μόνο ως προς τις πολυμορφικές μπάντες αλλά και ως προς τις κοινές. Καταρχήν είναι χαρακτηριστικό το γεγονός της παρουσίας της κλάσης των ε-Πρωτεοβακτηρίων μόνο στις πολυμορφικές μπάντες από την περιοχή της Σητείας και μάλιστα σε τέσσερις από τις πέντε αλληλουχίες. Η κλάση αυτή όχι μόνο δεν απαντάται στα δείγματα από το Σούνιο, αλλά δεν απαντάται ούτε καν στις κοινές μπάντες από την ίδια δειγματοληπτική περιοχή, στη Σητεία. Πρόκειται δηλαδή για μια ξεκάθαρη περίπτωση βακτηριακού τάξου του οποίου η ανάπτυξη ευνοήθηκε από τον οργανικό εμπλουτισμό τον οποίο προκάλεσε ο κλωβός. Η κλάση των ε-Πρωτεοβακτηρίων έχει βρεθεί ότι ευνοείται από τον οργανικό εμπλουτισμό και σε άλλες εργασίες (Bissett et al, 2006), ενώ υπάρχει πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη (Kawahara et al, 2009) στην οποία αναφέρεται ότι τα δ-Πρωτεοβακτήρια είναι αυτά που ευνοούνται περισσότερο από τον οργανικό εμπλουτισμό.

Όσον αφορά τώρα τη συνολική δομή των βακτηριακών κοινοτήτων από τις δυο τοποθεσίες, οι διαφορές παρουσιάζονται κυρίως στην αντιπροσώπευση τάξεων τα οποία για την περιοχή της Σητείας είναι αναερόβιοι αποικοδομητές οργανικών ενώσεων και σακχάρων (Clostridia & Verrucomicrobia) ενώ για την περιοχή του Σουνίου είναι αερόβιοι αποικοδομητές της κυτταρίνης και φωτοσυνθετικοί αυτότροφοι (Acidobacteria & Chloroflexi). Έμμεσα λοιπόν μπορούμε να εξαγάγουμε το συμπέρασμα ότι στην περιοχή της Σητείας επικρατούν περισσότερο ανοξικές

συνθήκες από ότι στο Σούνιο, στο οποίο φαίνεται οι μηχανισμοί αποικοδόμησης να συντελούνται αερόβια και το ποσοστό της φωτοσύνθεσης από μικροοργανισμούς να είναι αυξημένο (Παπαγεωργίου Ν., 2009, διδακτορική διατριβή).

Εν κατακλείδι πρέπει να επισημανθεί ότι τέτοιου είδους μελέτες που στηρίζονται στη φυλογενετική ανάλυση των βακτηριακών κοινοτήτων μέσω ανάλυσης του 16SRNA γενετικού τύπου κατηγοριοποιούν τη βακτηριακή κοινότητα όχι σε λειτουργικές αλλά σε ταξινομικές ομάδες. Οι ομάδες δηλαδή που προκύπτουν από τέτοιου είδους αναλύσεις είναι φυλογενετικά όμοιες χωρίς αυτό να σημαίνει ότι τα μέλη μιας τέτοιας ομάδας επιτελούν και τις ίδιες λειτουργίες σε μια φυσική κοινότητα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία εξαγωγής συμπερασμάτων όσον αφορά τις λειτουργίες μιας κοινότητας αλλά και διαφορών στα αποτελέσματα ανάλογα την εργασία όπως είδαμε παραπάνω, ακριβώς επειδή μπορεί ταξινομικά οι βακτηριακές ομάδες που αλλάζουν σε κάθε μελέτη να είναι διαφορετικές αλλά λειτουργικά να είναι όμοιες. Το πρόβλημα αυτό μπορεί πλέον να ξεπεραστεί μέσω της αλληλούχισης ολόκληρου του βακτηριακού μεταγονιδιώματος απευθείας μετά την εξαγωγή του από το υπόστρωμα με σύγχρονες μεθόδους pyrosequencing και shotgun sequencing. Έτσι μπορούν να απαντηθούν λειτουργικά ερωτήματα που έχουν να κάνουν με το ποσοστό χρήσης συγκεκριμένων μεταβολικών ή και μη γονιδιακών τύπων ανεξαρτήτως οργανισμού.

## **E. Βιβλιογραφία**

1. Cloud P.: Beginnings of biospheric evolution and their biogeochemical consequences, *Paleobiology*, vol.2 ,1976, pp 351-387
2. Holland JD, 1978: The chemistry of atmosphere and oceans, John Wiley & Sons publishing
3. JW Schopf, MR Walter, NG Carr, BA Whitton: The Biology of Cyanobacteria, 1982, Blackwell Scientific Publications Oxford
4. Margulis, 1982: Early life, Science Books International
5. Meyer-Reil, L.A.: Microbial life in sedimentary biofilms – the challenge to microbial ecologists; *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1994
6. LA Meyer-Reil, M Köster: Eutrophication of marine waters: effects on benthic microbial communities; *Marine Pollution Bulletin*, 2000 – Elsevier
7. Hall POJ, Anderson LH, Holby O, Kollberg S, Samuelson MJ (1990) Chemical fluxes and mass balances in a marine fish cage farm. I. Carbon. *Marine Ecology Progress Series* 61:61-73
8. Holby O, Hall POJ (1991) Chemical fluxes and mass balances in a marine fish cage farm. II. Phosphorus. *Marine Ecology Progress Series* 70:263-272
9. Holmer M (1991) Impacts of aquaculture on surrounding sediments: generation of organic rich sediments. Vol Special Publication 16. European Aquaculture Society, Ghent, Belgium
10. Hargrave BT, Duplisea DE, Pfeiffer E, Wildish DJ (1993) Seasonal changes in benthic fluxes of dissolved oxygen and ammonium associated with marine cultured Atlantic salmon. *Marine Ecology Progress Series* 96:249-257
11. Karakassis I, Tsapakis M, Hatziyanni E (1998) Seasonal variability in sediment profiles beneath fish farm cages in the Mediterranean. *Marine Ecology Progress Series* 162:243-252
12. Brown JR, Gowen RJ, McLusky DS (1987) The effect of salmon farming on the benthos of a Scottish sea loch. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 109:39-51
13. Karakassis I, Hatziyanni E, Tsapakis M, Plaiti W (1999) Benthic recovery following cessation of fish farming: a series of successes and catastrophes. *Marine Ecology Progress Series* 184:205-218



14. Karakassis I, Tsapakis M, Hatziyanni E, Papadopoulou KN, Plaiti W (2000) Impact of cage farming of fish on the seabed in three Mediterranean coastal areas. *ICES Journal of Marine Science* 57:1462-1471
15. Delgado O, Ruiz J, Perez M, Romero J, Ballestreros E (1999) Effects of fish farming on seagrass (*Posidonia oceanica*) in a Mediterranean bay: seagrass decline after loading cessation. *Oceanologica Acta* 22: 109-117
16. Pearson TH, Rosenberg R (1978) Macrobenthic succession in relation to organic enrichment and pollution of the marine environment. *Oceanography Marine Biology Annual Review* 16:229-311
17. Asami H, Aida M, Watanabe K.: Accelerated sulfur cycle in coastal marine sediment beneath areas of intensive shellfish aquaculture. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Jun;71(6):2925-33.
18. A.E. McCaig, C.J. Phillips, J.R. Stephen, G.A. Kowalchuk, S.M. Harvey, R.A. Herbert, T.M. Embley and J.I. Prosser: Nitrogen Cycling and Community Structure of Proteobacterial  $\beta$ -Subgroup Ammonia-Oxidizing Bacteria within Polluted Marine Fish Farm Sediments
19. A.Bissett, C. Burke, P.L.M. Cook and J.P. Bowman: Bacterial community shifts in organically perturbed sediments; *Environmental Microbiology Volume 9 Issue 1, Pages 46 – 60*
20. Findlay, R., Watling, L., and Mayer, L. (1995) : Environmental impact of salmon net-pen culture on marine benthic communities in Maine: a case study; *Estuaries* 18: 145-179
21. Rysgaard, S., Thamdrup, B., Risgaardpetersen, N., Fossing, H., Berg, P., Bondo Christensen P., and Dalsgaard, T. (1998): Seasonal carbon and nutrient mineralization in high-Arctic coastal marine sediment, Young Sound, Northeast Greenland; *Mar.Ecol.Prog Series* 175:261-276
22. Vezzulli, L., Chelossi, E., Riccardi, G., and Fabiano, M. (2002): Bacterial community structure and activity in fish farm sediments of the Ligurian Sea (Western Mediterranean); *Aquac. Int.* 10:123-141
23. Kawahara N., Shigematsu K., Miyadai T., Kondo R. (2009): Comparison of bacterial communities in fish farm sediments along an organic enrichment gradient; *Aquaculture* 287:107-113
24. Kalantzi I, Karakassis I (2006) Benthic impacts of fish farming: Meta-analysis of community and geochemical data; *Marine Pollution Bulletin* 52:479-483
25. Lampadariou N, Karakassis I, Pearson TH (2005) Cost/benefit analysis of a benthic monitoring programme of organic benthic enrichment using different sampling and analysis methods. *Marine Pollution Bulletin* 50:1606-1618

26. Sara G, Scilipoti D, Mazzola A, Modica A (2004) Effects of fish farming waste to sedimentary and particulate organic matter in a southern Mediterranean area (Gulf of Castellammare, Sicily): a multiple stable isotope study ( $\delta^{13}$  and  $\delta^{15}$  N). *Aquaculture* 234:199-213
27. O. Sánchez, J. M. Gasol, R. Massana, J. Mas, and C. Pedrós-Alió (2007): Comparison of different DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) primer sets for the study of marine bacterioplankton communities; *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.00817-07
28. G. Webster, R.J. Parkes, B.A. Cragg, C.J. Newberry, A.J. Weightmann and J.C. Fry (2006): Prokaryotic community composition and biogeochemical processes in deep seafloor sediments from the Peru Margin; *FEMS Microbiology Ecology*, 58(1): 65-85
29. G Muyzer, E C de Waal and A G Uitterlinden (1993): Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA; *Appl Environ Microbiol.* 1993 March; 59(3): 695-700
30. B.A. Yoza, R. E. Harada, G.C. Nihous, Q.X. Li and S.M. Masutani (2005): Impact of mariculture on microbial diversity in sediments near open ocean farming of *Polydactylus sexfilis*; *Ecological Indicators* Volume 7, Issue 1, January 2007, Pages 108-122
31. A. Bissett, J. Bowman and C. Burke (2006): Bacterial diversity in organically-enriched fish farm sediments; *FEMS Microbiology Ecology* Volume 55 Issue 1, Pages 48 – 56
32. H.W. Paerl, J.L. Pinckney (1996): A mini review on microbial consortia: Their roles in aquatic production and biogeochemical cycling; *Microb Ecol* (1996) 31:225-247
33. L.A. Meyer-Reil & M. Koster (2000): Eutrophication of marine waters: Effects on benthic microbial communities; *Marine Pollution Bulletin* Vol. 41, Nos. 1-6, pp. 255-263, 2000
34. M. Simon, H.P. Grossart, B. Schweitzer, H. Ploug (2002): Microbial Ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems; *Aquat. Microb. Ecol.* Vol. 28 175-211
35. Παπαγεωργίου Ν. (2009): Μελέτη των επιπτώσεων των ιχθυοκαλλιεργειών στην βενθική πανίδα και τις οικοσυστημικές λειτουργίες, διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας

## Παράρτημα

Οι τριγωνικές μήτρες ομοιότητας για κάθε επανάληψη

<b>Επανάληψη 1</b>	Sn0	Sn5	Sn10	Sn25	SnC	St0	St5	St10	St25	StC
Sn0										
Sn5	68.08511									
Sn10	66.66667	72.72727								
Sn25	42.10526	27.02703	34.28571							
SnC	60	41.02564	43.24324	73.33333						
St0	43.90244	40	36.84211	32.25806	36.36364					
St5	57.14286	54.16667	52.17391	35.89744	43.90244	76.19048				
St10	55.81395	52.38095	50	36.36364	40	61.11111	63.63636			
St25	61.90476	48.78049	46.15385	25	35.29412	62.85714	55.81395	75.67568		
StC	23.52941	30.30303	25.80645	41.66667	30.76923	44.44444	40	41.37931	35.71429	
<b>Επανάληψη 2</b>	St0	St5	St10	St25	Stc	Sn0	Sn5	Sn10	Sn25	SnC
St0										
St5	100									
St10	85.71429	85.71429								
St25	40	40	48.27586							
Stc	48.64865	48.64865	55.55556	58.06452						
Sn0	61.11111	61.11111	62.85714	60	59.45946					
Sn5	51.42857	51.42857	52.94118	75.86207	61.11111	74.28571				
Sn10	75.67568	75.67568	66.66667	58.06452	57.89474	81.08108	72.22222			
Sn25	59.45946	59.45946	72.22222	64.51613	68.42105	86.48649	72.22222	84.21053		
SnC	58.82353	58.82353	54.54545	42.85714	62.85714	47.05882	48.48485	62.85714	51.42857	
<b>Επανάληψη 3</b>	St0	St5	St10	St25	Stc	Sn0	Sn5	Sn10	Sn25	SnC
St0										
St5	88.88889									
St10	60	58.82353								
St25	30.76923	33.33333	50							
Stc	44.44444	51.6129	48	47.61905						
Sn0	45	45.45455	42.10526	41.17647	34.28571					
Sn5	43.24324	48.78049	45.71429	32.25806	37.5	75.55556				
Sn10	53.33333	52.94118	42.85714	50	48	57.89474	57.14286			
Sn25	60.60606	59.45946	32.25806	29.62963	42.85714	39.02439	47.36842	70.96774		
SnC	46.66667	47.05882	35.71429	50	32	52.63158	45.71429	57.14286	51.6129	