



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ
ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ



Διδρυματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών



Απόκριση διαφορετικών πλαγκτονικών κοινοτήτων σε προσθήκη διαλελυμένου οργανικού άνθρακα

Γεωργία Κτιστάκη



Μεταπτυχιακή Εργασία

Ηράκλειο, Απρίλιος 2022

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Παρασκευή Πήττα

Διευθύντρια Ερευνών, Ινστιτούτο Ωκεανογραφίας, Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών

Ιωάννης Καρακάσης

Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Κωνσταντία Λύκα

Αναπλ. Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης



UNIVERSITY OF CRETE
BIOLOGY DEPARTMENT

HELLENIC CENTER OF
MARINE RESEARCH



Environmental Biology



MSc Thesis

Response of different plankton communities to a single addition of dissolved organic carbon (DOC)

Georgia Ktistaki

Examination Committee:

Paraskevi Pitta

Ioannis Karakassis

Konstantia Lika

Heraklion, April 2022

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εισροή διαλελυμένου οργανικού άνθρακα (DOC) από τα χερσαία στα παράκτια, θαλάσσια ή γλυκού νερού, οικοσυστήματα χρωματίζει το νερό κίτρινο-καφέ. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται «χρωματισμός των νερών» (brownification) και προκαλεί σκίαση, επηρεάζοντας την πρωτογενή παραγωγή. Επιπλέον, η αύξηση της συγκέντρωσης του οργανικού άνθρακα μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της παραγωγής και βιομάζας των ετερότροφων οργανισμών, με πιθανές συνέπειες στο τροφικό πλέγμα. Η παρούσα μελέτη εστίασε στην επίδραση του φαινομένου στις θαλάσσιες πλαγκτονικές ομάδες. Πραγματοποιήθηκε προσομοίωση του φαινομένου σε πείραμα μεσοκόσμων μέσω της προσθήκης του σκευάσματος HuminFeed στο θαλασσινό νερό. Το πείραμα μεσοκόσμων έλαβε χώρα στις εγκαταστάσεις CretaCosmos του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε τον Ιούνιο 2021 και είχε 2 πειραματικές συνθήκες: Control (C) και HuminFeed (HF) με 3 αντίγραφα σε κάθε συνθήκη. Στη συνθήκη C δεν έγινε κανένας χειρισμός ενώ στη συνθήκη HF έγινε προσθήκη HuminFeed (συγκέντρωση 2 mg L^{-1}). Το πείραμα διήρκησε 15 ημέρες στη διάρκεια των οποίων παρατηρήθηκε πως η προσθήκη HuminFeed προκάλεσε χρωματισμό του νερού και μείωση του φωτός προκαλώντας μείωση της αφθονίας των αυστηρά αυτότροφων οργανισμών (κυανοβακτήρια *Synechococcus* και διάτομα). Ωστόσο, δεν καταγράφηκε ξεκάθαρη επίδραση στα νανομαστιγωτά πιθανόν λόγω της μικτοτροφίας που παρατηρείται στη συγκεκριμένη ομάδα. Επιπλέον, το HuminFeed αποτέλεσε πηγή DOC για τη βακτηριακή κοινότητα. Αν και η αφθονία των βακτηρίων ήταν μεγαλύτερη κυρίως τις πρώτες μέρες του πειράματος, τα HNA (High Nucleic Acid) βακτήρια ήταν περισσότερα στη συνθήκη HF όλες τις μέρες του πειράματος, γεγονός που αντικατοπτρίζεται στην αυξημένη βακτηριακή παραγωγή. Στη συνθήκη HF, παρατηρήθηκε αυξημένη αφθονία δινομαστιγωτών, η οποία μπορεί να οφείλεται είτε σε επικράτηση μικτότροφων ειδών είτε στη μείωση της αφθονίας των θηρευτών τους, δηλαδή των κωπηπόδων. Ωστόσο, η μείωση της αφθονίας των βλεφαριδωτών που καταγράφηκε αμέσως μετά την προσθήκη HuminFeed στο νερό, πιθανόν δείχνει πως η προσθήκη του στο νερό ευθύνεται για τη μείωση των πληθυσμών και την αλλοιωμένη μορφή τους. Τέλος, το HuminFeed, φαίνεται να επηρέασε αρνητικά τα κωπήποδα.

ABSTRACT

The addition of dissolved organic carbon (DOC) from terrestrial to coastal, marine or freshwater ecosystems colors the water yellow-brown. This phenomenon is called “brownification” and causes shading, affecting primary production. In addition, increasing the concentration of organic carbon can lead to increased production and biomass of heterotrophic organisms, with potential consequences on the whole food web. The present study focused on the effect of this phenomenon on marine plankton groups. The effect was simulated in an mesocosm experiment by adding HuminFeed to seawater. The mesocosm experiment took place at CretaCosmos facility of H.C.M.R. in June 2021 and had 2 treatments: Control (C) and HuminFeed (HF) with 3 replicates for each treatment. No manipulation was performed in C while in HF, HuminFeed was added at a concentration of 2 mg L⁻¹. The experiment lasted 15 days during which it was observed that the addition of HuminFeed caused brownification and reduced light penetration causing a decrease in the abundance of strictly autotrophic organisms (*Synechococcus* cyanobacteria and diatoms). However, no clear effect on nanoflagellates was recorded, possibly due to the mixotrophy observed in this group. In addition, HuminFeed was a source of DOC for the bacterial community. Although the abundance of bacteria was greater, mainly during the first days of the experiment, the abundance of HNA (High Nucleic Acid) bacteria was higher in the HF condition during the whole experiment, which is reflected in the increased bacterial production. In the HF treatment, an increased abundance of dinoflagellates was observed, which may be due to either a dominance of mixotrophic species or to a decrease in the abundance of their predators (copepods). However, the decrease in ciliate abundance recorded immediately after the addition of HuminFeed to the seawater probably indicates that its addition to the water was responsible for their number reduction and their altered form. Finally, HuminFeed seems to have had a negative effect on the copepods, as well.

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Περιβαλλοντική Βιολογία» (Πανεπιστημίου Κρήτης σε συνεργασία με το Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών) και υλοποιήθηκε στο ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. στο Ινστιτούτο Ωκεανογραφίας από τον Απρίλιο του 2021 μέχρι τον Μάρτιο του 2022.

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω την ερευνήτρια Βιβή Πήττα, όχι μόνο για την επίβλεψη της παρούσας διπλωματικής εργασίας αλλά και για την καθοδήγηση και την υποστήριξη της καθ'όλη τη διάρκεια αυτού του μεταπτυχιακού.

Ακόμη, ευχαριστώ θερμά την Κατερίνα Συμιακάκη, τη Mena Romano και τον Ιορδάνη Μαγιόπουλο, για τη σημαντική τους βοήθεια όλο αυτόν τον καιρό και για τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Επίσης, ευχαριστώ την συμφοιτήτρια μου Ηλέκτρα Παπαχρήστου για την προετοιμασία των δειγμάτων του νανοπλαγκτού.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τους γονείς μου και τον θείο μου που με στηρίζουν όλα αυτά τα χρόνια για την εκπλήρωση των σπουδών μου.

Πίνακας περιεχομένων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Χρωματισμός των νερών	1
1.2 Χαρακτηριστικά Μεσογείου θάλασσας	3
1.3 Πλαγκτόν	4
1.4 Μικροβιακός βρόχος.....	5
2. ΣΚΟΠΟΣ	7
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	8
3.1 Συλλογή νερού και γέμισμα μεσοκόσμων	8
3.2 Πειραματικός σχεδιασμός και συχνότητα δειγματοληψιών.....	9
3.3 Αναλύσεις θρεπτικών και χλωροφύλλης	10
3.3.1 Ανόργανα και οργανικά θρεπτικά	10
3.3.2 Χλωροφύλλη.....	11
3.4 Αναλύσεις πλαγκτού	11
3.4.1 Πικοπλαγκτόν	11
3.4.2 Νανοπλαγκτόν	12
3.4.3 Μικροπλαγκτόν.....	13
3.4.4. Μεσοζωοπλαγκτόν.....	16
3.5 Στατιστική ανάλυση	16
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	17
4.1 Αβιοτικές μεταβλητές.....	17
4.2 Ανόργανα θρεπτικά	17
4.3 Οργανικά θρεπτικά	18
4.4 Χλωροφύλλη.....	19
4. 5 Πικοπλαγκτόν	20
4.6 Νανοπλαγκτόν	23
4.7 Μικροπλαγκτόν	26

4.8 Ζωοπλαγκτόν	31
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	33
5.1 Θρεπτικά.....	33
5.2 Το κατώτερο τμήμα του τροφικού πλέγματος	33
Αυτότροφοι οργανισμοί	33
Ετερότροφοι οργανισμοί	34
5.3 Τροφικό πλέγμα και τροφικές σχέσεις μεταξύ των μικροβιακών ομάδων οργανισμών	35
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	38
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	42

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Χρωματισμός των νερών

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, αυξημένες συγκεντρώσεις διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC) έχουν παρατηρηθεί σε επιφανειακά νερά σε μεγάλα τμήματα του βόρειου Ημισφαιρίου (Nydahl et al. 2019). Η επιφανειακή απορροή, που γίνεται εντονότερη λόγω των αυξημένων βροχοπτώσεων που συνδέονται με την κλιματική αλλαγή, μπορεί να είναι η βασική αιτία εισροής DOC, από τη χέρσο και τα ποτάμια στα παράκτια νερά (Fonseca et al. 2021). Άλλες αιτίες είναι η όξινη βροχή, οι αλλαγές στη χρήση γης, η αύξηση της θερμοκρασίας του πλανήτη και ο συνδυασμός όλων των παραπάνω (Graneli 2012, Lebret et al. 2018). Το DOC, μαζί με τις χουμικές οργανικές ενώσεις που εμπεριέχει, χρωματίζει το νερό κίτρινο-καφέ. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται «χρωματισμός των νερών» (brownification) (Εικόνα 1). Ωστόσο, κατά το φαινόμενο αυτό, η αλλαγή στο χρώμα του νερού δεν οφείλεται μόνο στην εισροή DOC και χουμικών οργανικών ενώσεων στο νερό αλλά και στην παρουσία σιδήρου (Lebret et al. 2018). Για παράδειγμα, οι Kritzberg & Ekström (2012) υποστήριξαν ότι η παρουσία σιδήρου ευθύνεται για ένα σημαντικό μέρος της διακύμανσης του χρώματος του νερού.



Εικόνα 1: Χρωματισμός των νερών στην παράκτια περιοχή του Ρίου (27/11/2021) μετά από κακοκαιρία (<https://www.iefimerida.gr>).

Το φαινόμενο του χρωματισμού των νερών μπορεί να έχει άμεσες και έμμεσες συνέπειες στην πλαγκτονική κοινότητα. Έχει μελετηθεί κυρίως μέσω πειραμάτων μεσοκόσμων στα γλυκά νερά (Lebret et al. 2018, Nydahl et al. 2019, Fonseca et al. 2021) ενώ ελάχιστες μελέτες έχουν γίνει για το θαλάσσιο περιβάλλον (Spilling personal communication). Οι πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στον χρωματισμό των νερών και στις φυσικές, χημικές και βιολογικές διεργασίες κάνουν

δύσκολη την πρόβλεψη της επίδρασής του, οπότε τα αποτελέσματά του μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με την αρχική κατάσταση του οικοσυστήματος (Spilling personal communication).

Άμεσα, ο χρωματισμός των νερών προκαλεί σκίαση, δηλαδή, μείωση του φωτός που εισχωρεί στη στήλη του νερού. Η σκίαση προκαλείται κυρίως από τις χρωμοφόρους αρωματικές δομές των χουμικών ενώσεων που υπάρχουν στο DOC και οι οποίες απορροφούν τη φωτοσυνθετικά ενεργή ακτινοβολία (PAR) (Nydahl et al. 2019). Έτσι, το φαινόμενο αυτό επηρεάζει την πρωτογενή παραγωγή που είναι φωτοεξαρτώμενη μέσω της μείωσης της PAR που είναι διαθέσιμη για τους οργανισμούς (Lebret et al. 2018). Ωστόσο, είναι πιθανό η σκίαση να έχει έμμεσα θετική επίδραση στους αυτότροφους οργανισμούς καθώς τους προστατεύει από την υπεριώδη (UV) ακτινοβολία (Graneli 2012). Η μείωση του διαθέσιμου φωτός αναμένεται να ευνοήσει τους μικτότροφους οργανισμούς, σε σχέση με τους αυστηρά αυτότροφους, επειδή οι μικτότροφοι οργανισμοί δεν εξαρτώνται τόσο από το φως, καθώς μπορούν να στραφούν στην ετεροτροφία. Επιπλέον, με τον τρόπο αυτό, δεν ανταγωνίζονται άμεσα με τα βακτήρια για τον ανόργανο φώσφορο (Jones 2000, Fonseca et al. 2021).

Επιπλέον, η αύξηση της συγκέντρωσης του άνθρακα στο σύστημα μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της δευτερογενούς παραγωγής και βιομάζας (Ask et al. 2009). Η αύξηση του DOC στο νερό οδηγεί σε αυξημένη βακτηριακή αναπνοή και μείωση του O_2 στο νερό, λόγω της βιολογικής διάσπασης του DOC (Fonseca et al. 2021). Επίσης, κάτω από συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης DOC, τα ετερότροφα βακτήρια μπορεί είναι πιο αποτελεσματικά στην πρόσληψη θρεπτικών συγκριτικά με το φυτοπλαγκτόν. Αυτό είναι πιθανό να οδηγήσει πέρα από την αύξηση της δευτερογενούς και σε μείωση της πρωτογενούς παραγωγής (Ask et al. 2009, Nydahl et al. 2019).

Ακόμα, η εισροή DOC, που αποτελείται εν μέρει από οργανικά οξέα, μπορεί να οδηγήσει και σε μείωση του pH. Αυτή η μείωση έμμεσα οδηγεί σε αύξηση του ελεύθερου διοξειδίου του άνθρακα (CO_2), καθώς η ισορροπία του ανθρακικού συστήματος μετατοπίζεται και η αναλογία μεταξύ του ελεύθερου CO_2 , των διττανθρακικών (HCO_3^-) και των ανθρακικών (CO_3^{2-}) ιόντων στο νερό αλλάζει (Nydahl et al. 2019). Το ελεύθερο CO_2 είναι η προτιμώμενη πηγή πρόσληψης άνθρακα για τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς, συνεπώς η αύξησή του στο νερό μπορεί να ευνοήσει τη φωτοσύνθεση, ειδικά όταν συνδυάζεται με αυξημένη διαθεσιμότητα θρεπτικών. Ωστόσο, η μείωση του φωτός λόγω του χρωματισμού των νερών μειώνει την ανάπτυξη των αυστηρά

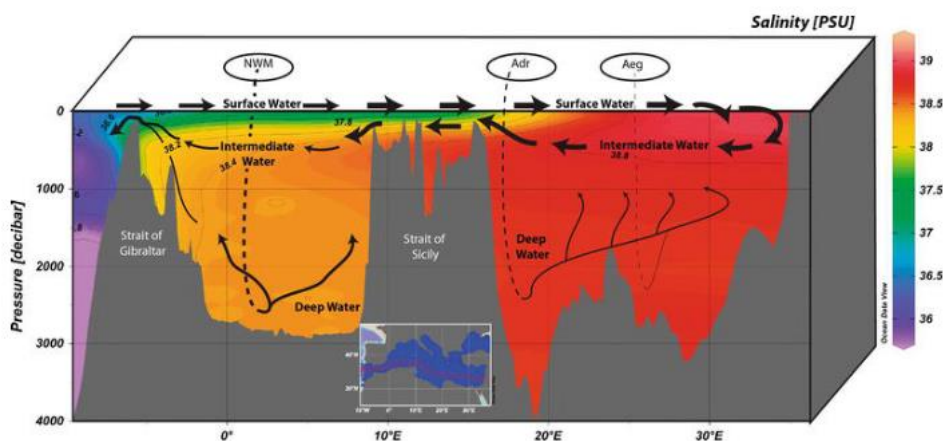
αυτότροφων, πιθανά αντισταθμίζοντας την επίδραση του ελεύθερου CO₂ και της διαθεσιμότητας θρεπτικών (Fonseca et al. 2021).

1.2 Χαρακτηριστικά Μεσογείου θάλασσας

Η Μεσόγειος είναι μια σχεδόν κλειστή θάλασσα. Στο Στενό της Σικελίας, μια υποθαλάσσια κορυφογραμμή χωρίζει τη Μεσόγειο σε δύο κύριες υποπεριοχές: τη δυτική περιοχή (0,85 εκατομμύρια km²) και την ανατολική περιοχή (1,65 εκατομμύρια km²) (Coll et al. 2010).

Η Μεσόγειος είναι γενικά ολιγοτροφική (δηλαδή με χαμηλή πρωτογενή παραγωγή) και το ανατολικό της άκρο είναι πιο ολιγοτροφικό από το δυτικό (Coll et al. 2010). Αντίστοιχα, οι συγκεντρώσεις των διαλελυμένων ανόργανων θρεπτικών (νιτρικό άλας, φωσφορικό άλας, πυριτικό οξύ) στα βαθιά νερά της Ανατολικής Μεσογείου είναι μικρότερες από της Δυτικής και είναι ιδιαίτερα μικρές όταν αυτές συγκρίνονται για παράδειγμα με τον βορειοδυτικό Ειρηνικό Ωκεανό (Powley et al. 2017). Ο φώσφορος αποτελεί το περιοριστικό θρεπτικό για τη Μεσόγειο (Thingstad et al. 2005). Λόγω της μειωμένης συγκέντρωσης θρεπτικών η πρωτογενής παραγωγή επίσης είναι μικρότερη στο ανατολικό της τμήμα (10–143 gC m⁻² γ⁻¹) σε σχέση με το δυτικό τμήμα (37–475 gC m⁻² γ⁻¹) (Powley et al, 2017).

Ο ολιγοτροφισμός της Μεσογείου οφείλεται κυρίως στην αντι-εκβολική κυκλοφορία των υδάτων της (anti-estuarine circulation) (Powley et al. 2017). Η κυκλοφορία του νερού που περιγράφηκε παραπάνω παρουσιάζεται σχηματικά στην Εικόνα 2 (από Powley et al. 2017).



Εικόνα 2: Κατανομή της αλατότητας (χρώμα) και της γενικής κυκλοφορίας της Μεσογείου (βέλη). Το πάχος των βελών υποδεικνύει τους σχετικούς ρυθμούς ροής του νερού (από Powley et al. 2017).

Επιπλέον, στην Ανατολική Μεσόγειο δεν παρατηρείται σχεδόν καθόλου ανάβλυση στην επιφάνεια ψυχρού, και πλούσιου σε θρεπτικά συστατικά, βαθιού νερού, ενώ στη Δυτική Μεσόγειο το φαινόμενο αυτό παρατηρείται σε ορισμένες περιοχές (Powley et al. 2017). Τέλος, εκτός από την κυκλοφορία των υδάτων, άλλοι παράγοντες, όπως οι μεταβαλλόμενοι άνεμοι, τα εποχιακά θερμοκλίνη, τα θαλάσσια ρεύματα και φερτά υλικά, όπως λάσπη από ποτάμια και αστικά λύματα, εμπλουτίζουν τις παράκτιες περιοχές με θρεπτικά τόσο στην Ανατολική όσο και στη Δυτική Μεσόγειο (Coll et al. 2010).

1.3 Πλαγκτόν

Το πλαγκτόν ταξινομικά αποτελείται από φυτά, ζώα, βακτήρια, μύκητες και ιούς (Brierley, 2017, Sieburth et al. 1978). Ανάλογα με το μέγεθος των οργανισμών κατά τους Sieburth et al. (1978), οι πλαγκτονικοί οργανισμοί μπορούν να ομαδοποιηθούν σε: φεμτοπλαγκτόν (<0,2 μm) στο οποίο ανήκουν οι ιοί, πικοπλαγκτόν (0,2-2 μm) το οποίο αποτελείται κυρίως από βακτήρια, νανοπλαγκτόν (2-20 μm) που αποτελείται κυρίως από μαστιγωτά, μικροπλαγκτόν (20-200 μm) στο οποίο ανήκουν βλεφαριδωτά, δινομαστιγωτά και διάτομα, μεσοπλαγκτόν (200-2000 μm) στο οποίο ανήκουν τα κωπήποδα και τέλος μακροπλαγκτόν (2-20 mm). Στα ολιγοτροφικά συστήματα, όπως είναι η Μεσόγειος θάλασσα, όσον αφορά το μέγεθος, κυριαρχούν οι μικρότεροι οργανισμοί, με το πικοπλαγκτόν και το νανοπλαγκτόν να είναι τα κυρίαρχα όσον αφορά τη βιομάζα και την συμμετοχή τους στην πρωτογενή παραγωγή (Pitta et al. 2001).

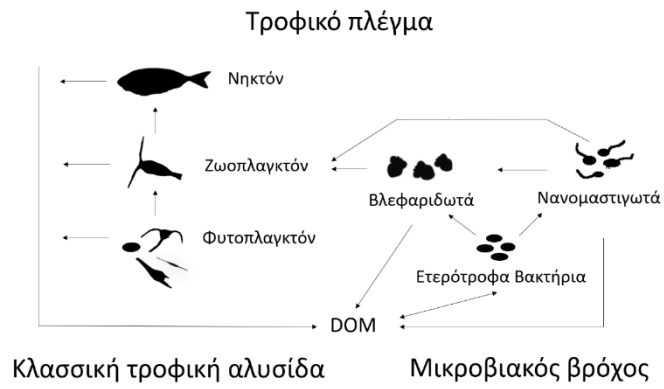
Ακόμα, με βάση τον τρόπο πρόσληψης άνθρακα, οι πλαγκτονικοί οργανισμοί μπορούν να διαχωριστούν σε αυτότροφους, ετερότροφους και μικτότροφους. Στους αποκλειστικά αυτότροφους ανήκουν οι οργανισμοί που φωτοσυνθέτουν και βασίζονται μόνο στο φως και στα ανόργανα θρεπτικά, τέτοιοι οργανισμοί είναι τα διάτομα και τα κυανοβακτήρια (Flynn et al. 2013). Στους ετερότροφους ανήκουν τα ετερότροφα βακτήρια που προσλαμβάνουν διαλελυμένο οργανικό άνθρακα και αποτελούν τροφή για άλλους οργανισμούς, ετερότροφα μαστιγωτά που βασίζονται αποκλειστικά στην κατανάλωση βακτηρίων (Crane & Grover 2010) και μεγαλύτεροι οργανισμοί, όπως βλεφαριδωτά κλπ που τρέφονται με μικρότερους οργανισμούς. Τέλος, οι μικτότροφοι οργανισμοί εμφανίζουν συνδυασμό αυτοτροφίας και ετεροτροφίας, με την ετεροτροφία να περιλαμβάνει οσμωτροφία (χρήση διαλελυμένων οργανικών υποστρωμάτων) ή/και φαγοτροφία. Μικτοτροφία παρατηρείται σε μαστιγωτά, βλεφαριδωτά και δινομαστιγωτά (Flynn et al. 2013). Η εναλλαγή μεταξύ των δύο μεθόδων πρόσληψης άνθρακα εξαρτάται από την παρουσία συνθηκών που ευνοούν τη μία ή την άλλη, ή και τις δύο, διατροφικές οδούς (Flynn et al.

2013). Στα oligοτροφικά συστήματα όπως είναι η Μεσόγειος θάλασσα, έχει παρατηρηθεί πως η γενική τάση είναι να κυριαρχούν οι ετερότροφοι οργανισμοί ενώ οι αυτότροφοι να κυριαρχούν στα εύτροφα συστήματα (Biddanda et al. 2001). Οι μικτότροφοι οργανισμοί αναμένεται να εμφανίσουν μέγιστη αφθονία σε περιβάλλοντα που τους επιτρέπουν να είναι κυρίως φωτοσυνθετικοί και να συμπληρώνουν τις διατροφικές τους ανάγκες καταναλώνοντας βακτήρια (Crane & Grover 2010).

1.4 Μικροβιακός βρόχος

Μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1980, το πελαγικό τροφικό πλέγμα είχε την εξής γραμμική μορφή: Θρεπτικά→Φυτοπλαγκτόν→Ζωοπλαγκτόν→Νηκτόν. Όμως, με τη βοήθεια νέων τεχνικών δειγματοληψίας και καταμέτρησης της αφθονίας των οργανισμών στο νερό, ιδιαίτερα των μικρότερων σε μέγεθος, η εικόνα του τροφικού πλέγματος άλλαξε σε μεγάλο βαθμό, καθώς βρέθηκε ότι η κλασική αυτή μορφή της τροφικής αλυσίδας δεν απεικονίζει ρεαλιστικά τη ροή του άνθρακα και όλες τις βιολογικές διεργασίες που συμβαίνουν στην πραγματικότητα (Azam et al. 1983).

Ο όρος «μικροβιακός βρόχος» (microbial loop) εισήχθη ως έννοια πρώτη φορά από τους Azam et al. (1983). Το διαλυμένο οργανικό υλικό (DOM) που είναι πλούσιο σε DOC χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας από τα ετερότροφα βακτήρια, τα οποία καταναλώνονται έπειτα, από ετερότροφα νανομαστιγωτά, που καταναλώνονται στη συνέχεια από βλεφαριδωτά (Εικόνα 3). Φαίνεται λοιπόν πως τα ετερότροφα νανομαστιγωτά και κυρίως τα βλεφαριδωτά αποτελούν τον συνδετικό κρίκο, ανάμεσα στη συμβατική τροφική αλυσίδα και τον μικροβιακό βρόχο, για τη μεταφορά της βακτηριακής βιομάζας στα ανώτερα τροφικά επίπεδα (Azam et al. 1983). Μέσω του μικροβιακού βρόχου, ένα μέρος της ενέργειας, με τη μορφή διαλυμένης οργανικής ύλης (DOM) που θα χανόταν από το οικοσύστημα, επιστρέφει στο τροφικό πλέγμα και γίνεται εκμεταλλεύσιμο από τους υπόλοιπους οργανισμούς.



Εικόνα 3: Αναπαράσταση της κλασσικής τροφικής αλυσίδας και του μικροβιακού βρόχου.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του Διδρυματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Περιβαλλοντική Βιολογία» του Πανεπιστημίου Κρήτης και του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε). Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να ερευνηθεί η επίδραση του χρωματισμού των νερών και της προσθήκης διαλελυμένου οργανικού άνθρακα στις πλαγκτονικές ομάδες του μικροβιακού τροφικού πλέγματος. Το φαινόμενο μελετήθηκε μέσω πειράματος μεσοκόσμων στις εγκαταστάσεις CretaCosmos του ΕΛΚΕΘΕ στην Κρήτη. Στο πείραμα έγινε προσομοίωση της προσθήκης διαλελυμένου οργανικού άνθρακα μέσω προσθήκης του σκευάσματος HuminFeed στο νερό. Το παρόν πείραμα αποτελεί μέρος μιας σειράς πειραμάτων με το ίδιο θέμα που έγιναν σε διαφορετικά περιβάλλοντα αλατότητας και σε διαφορετικά γεωγραφικά πλάτη, στο πλαίσιο του προγράμματος AQUACOSM. Στο πείραμα ελέγξαμε τις ακόλουθες υποθέσεις: 1) Η προσθήκη HuminFeed στο θαλασσινό νερό θα μειώσει το φως και κατά συνέπεια θα επηρεάσει τους αυτότροφους οργανισμούς, και 2) Η προσθήκη HuminFeed θα αυξήσει την αφθονία και παραγωγή των ετερότροφων οργανισμών και ειδικά των ετερότροφων βακτηρίων.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Συλλογή νερού και γέμισμα μεσοκόσμων

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις CretaCosmos (Εικόνα 4) του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. στο Ηράκλειο Κρήτης, τον Ιούνιο 2021.



Εικόνα 4: Η εγκατάσταση CretaCosmos.

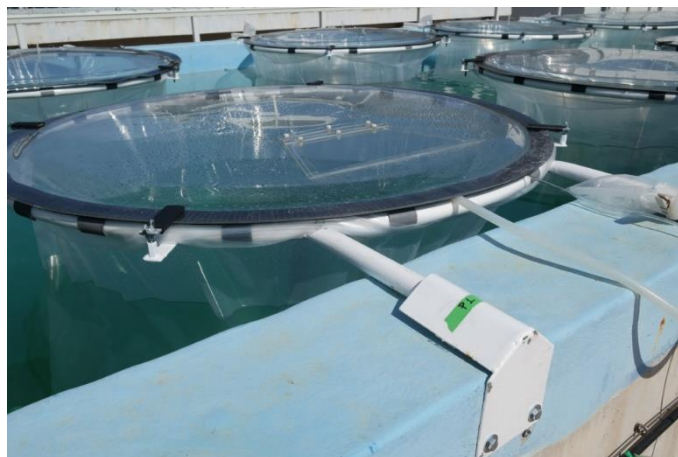
Πριν από την έναρξη του πειράματος, όλος ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα πλύθηκε σχολαστικά με HCL 5% και ξεπλύθηκε τρεις φορές με απιονισμένο νερό (Εικόνα 5) ώστε να αποφευχθούν πιθανές επιμολύνσεις του νερού.



Εικόνα 5: Πλύσιμο των διάφανων καλυμμάτων των μεσοκόσμων με HCL 5% και απιονισμένο νερό πριν την έναρξη του πειράματος.

Για το γέμισμα των μεσοκόσμων, αντλήθηκαν 36 m³ παράκτιου νερού, από βάθος 1,5 m μέσω μιας αντλίας, σε βυτία με χωρητικότητα 1 m³ το καθένα. Η συλλογή του νερού έγινε από τη βόρεια

πλευρά του λιμενοβραχίονα του λιμανιού που βρίσκεται μπροστά από τις εγκαταστάσεις του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε., στις Γούρνες Ηρακλείου Κρήτης. Στη συνέχεια, τα γεμάτα βυτία μεταφέρθηκαν με φορτηγό στις εγκαταστάσεις των μεσοκόσμων. Το νερό μεταφέρθηκε σε 6 μεσοκόσμους, που ήταν βυθισμένοι μέσα σε μεγάλη τσιμεντένια δεξαμενή, όγκου 150 m³. Το νερό από το καθένα από τα βυτία μοιράστηκε ισόποσα στους μεσόκοσμους έτσι ώστε να διασφαλιστεί η ομοιογένεια των αρχικών συνθηκών. Οι μεσόκοσμοι ήταν σάκοι από διάφανο πολυαιθυλένιο και είχαν χωρητικότητα 3 m³ ο καθένας. Τρεχούμενο νερό στη δεξαμενή διατήρησε σταθερή τη θερμοκρασία καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Μέσα σε κάθε μεσόκοσμο, τοποθετήθηκε ένας αισθητήρας HOBO για την καταγραφή της θερμοκρασίας και της μέσης έντασης φωτός. Κάθε μεσόκοσμος συγκρατούνταν στο χείλος της τσιμεντένιας δεξαμενής με σιδερένιους δακτυλίους που ήταν στερεωμένοι στα τοιχώματα της δεξαμενής. Επιπλέον, κάθε μεσόκοσμος καλυπτόταν με ένα διάφανο κάλυμμα ώστε να επιτρέπεται η διέλευση του φωτός και να προστατεύεται από πιθανές ατμοσφαιρικές επιμολύνσεις (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Το κάλυμμα ενός μεσοκόσμου και ο δακτύλιος στήριξης.

3.2 Πειραματικός σχεδιασμός και συχνότητα δειγματοληψιών

Το πείραμα περιλάμβανε 2 πειραματικές συνθήκες: Control (C) και HuminFeed (HF). Κάθε συνθήκη είχε τρία αντίγραφα. Στο C δεν έγινε κανένας χειρισμός και στο HF έγινε προσθήκη του σκευάσματος HuminFeed σε συγκέντρωση 2 mg L⁻¹. Το πείραμα διήρκησε 15 ημέρες (15- 29 Ιουνίου 2021).

Το HuminFeed είναι ένα αλκαλικό εκχύλισμα λεοναρδίτη (οργανικής προελεύσεως ορυκτό, χρώματος καφέ ή μαύρο) που χρησιμοποιείται συνήθως ως ζωτροφή. Προέρχεται από την εξανθράκωση κυρίως φυτικών οργανισμών και αποτελεί πηγή χουμικών ουσιών (Lebret et al.

2018). Η πλήρης χημική σύσταση του HuminFeed περιγράφεται από τους Meinel et al. (2007) και Scharnweber et al. (2021). Η χρήση του HuminFeed στο παρόν πείραμα εξασφάλισε την ίδια πηγή DOC και χρώματος στους μεσόκοσμους με άλλα παρόμοια πειράματα που έγιναν σε πολλά διαφορετικά περιβάλλοντα, ωστόσο δεν είναι άμεσα συγκρίσιμο με τις φυσικές χουμικές ενώσεις (Scharnweber et al. 2021).

Οι δειγματοληψίες έγιναν από τις 14 Ιουνίου (Ημέρα 0) μέχρι τις 29 Ιουνίου (Ημέρα 15) 2021, καθημερινά το πρωί, μεταξύ 08:30 και 09:00 (Εικόνα 7). Την Ημέρα 0 έγινε δειγματοληψία νερού από τους μεσοκόσμους στις 9:00 πμ και τρεις ώρες μετά, στις 12:00, έγινε προσθήκη του HuminFeed στους HF μεσοκόσμους. Ακολούθησε δεύτερη δειγματοληψία νερού στις 17:00 (Ημέρα 0+3 ώρες). Τα δείγματα νερού λαμβάνονταν μέσω σωλήνων σιλικόνης, (που ήταν τοποθετημένοι, ένας σε κάθε μεσόκοσμο) με αναρρόφηση μέσω μιας σύριγγας. Πριν από κάθε δειγματοληψία χρησιμοποιούνταν ένας αναδευτήρας ώστε να ομοιογενοποιηθεί το νερό μέσα στους μεσοκόσμους. Οι σωλήνες, οι αναδευτήρες και τα δοχεία συλλογής του νερού, είχαν προηγουμένως πλυθεί σχολαστικά με HCl (5%) και ξεπλυθεί τρεις φορές με απιονισμένο νερό.



Εικόνα 7: Δειγματοληψία από τους μεσοκόσμους

3.3 Αναλύσεις θρεπτικών και χλωροφύλλης

3.3.1 Ανόργανα και οργανικά θρεπτικά

Τα δείγματα για την εκτίμηση της συγκέντρωσης των ανόργανων και οργανικών θρεπτικών συλλέγονταν μέρα παρά μέρα κατά τη διάρκεια του πειράματος. Πιο συγκεκριμένα, για τα ανόργανα θρεπτικά, η μέτρηση της συγκέντρωσης των φωσφορικών (PO_4^{3-}) έγινε με τη μέθοδο MAGIC (Rimmelin & Moutin, 2005), των πυριτικών, νιτρικών και νιτρικών σύμφωνα με τους Strickland & Parsons (1972) και των αμμωνιακών ιόντων με τη μέθοδο των Ivancic & Degobbis

(1984). Τα όρια ανίχνευσης για το φωσφορικό άλας ήταν 0,8 nM, για τα νιτρικά 0,017 μM, για το αμμώνιο 0,019 μM και για το πυριτικό άλας 0,025 μM. Όλες οι ανόργανες ενώσεις του αζώτου παρουσιάζονται μαζί ως ολικό ανόργανο άζωτο (DIN).

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των οργανικών θρεπτικών, μετρήθηκε η συγκέντρωση του συνολικού οργανικού άνθρακα (TOC) σύμφωνα με τους Sempéré et al. (2002) και του σωματιδιακού οργανικού άνθρακα (POC) σύμφωνα με τους Hedges & Stern (1984). Ο υπολογισμός του διαλελυμένου οργανικού άνθρακα (DOC) έγινε με αφαίρεση του POC από τον TOC.

3.3.2 Χλωροφύλλη

Τα δείγματα για τη μέτρηση της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης συλλέγονταν καθημερινά κατά τη διάρκεια του πειράματος. Η συγκέντρωση της χλωροφύλλης (Chla) προσδιορίστηκε με βάση τον φθορισμό της σε φθοριόμετρο σύμφωνα με τη μέθοδο των Holm-Hansen et al. (1965).

3.4 Αναλύσεις πλαγκτού

3.4.1 Πικοπλαγκτόν

Τα δείγματα συλλέγονταν καθημερινά κατά τη διάρκεια του πειράματος και η καταμέτρηση των κυανοβακτηρίων και των ετερότροφων βακτηρίων έγινε σε κυτταρομετρητή ροής FACSCalibur TM (Becton Dickinson), με αερόψυκτο λέιζερ αργού (488 nm), σύμφωνα με τη μέθοδο των Marie et al. (2000). Η ταχύτητα ροής του οργάνου μετρούνταν καθημερινά πριν και μετά την ανάλυση των δειγμάτων. Για τον υπολογισμό της αφθονίας των οργανισμών χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των δυο ταχυτήτων που καταγράφονταν για την εκάστοτε μέρα και ο καταγεγραμμένος αριθμός κυττάρων. Το λογισμικό καταμέτρησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το CellQuest Pro.

Τα δείγματα των κυανοβακτηρίων *Synechococcus* καταμετρήθηκαν δίχως να υποστούν κάποια επεξεργασία (χρώση ή μονιμοποίηση) χάρη στον φθορισμό τους που οφείλεται στις χρωστικές που περιέχουν. Η ανάλυση έγινε παράλληλα με το πείραμα. Στο όργανο, η καταμέτρηση των δειγμάτων αυτών διαρκούσε 5 λεπτά, στην υψηλή ταχύτητα. Η αφθονία των κυανοβακτηρίων *Synechococcus* μετατράπηκε σε βιομάζα, χρησιμοποιώντας τον συντελεστή μετατροπής: 250 fg C κύτταρο⁻¹ (Kana & Glibert 1987).

Τα δείγματα των ετερότροφων βακτηρίων και ιών αρχικά συντηρήθηκαν με γλουταραλδεΐδη (25%), διηθημένη σε φίλτρα πόρου 0.2 μm, και τοποθετήθηκαν σε κρουοφιαλίδια των 2 mL, σε τελική συγκέντρωση 0.5%. Έπειτα αναδεύτηκαν και τοποθετήθηκαν στο ψυγείο (4°C) για 30 λεπτά και στη συνέχεια βυθίστηκαν σε υγρό άζωτο (-196°C). Την επόμενη μέρα τα δείγματα

μεταφέρθηκαν στη βαθιά κατάψυξη (-80°C) μέχρι να γίνει η ανάλυση τους, περίπου 5 μήνες μετά το τέλος του πειράματος.

Πριν την ανάλυση, τα δείγματα ξεπάγωσαν σε θερμοκρασία δωματίου, ακολούθησε ανάδευση με vortex και σήμανση του γενετικού υλικού των ετερότροφων βακτηριών με SYBR Green I, σε τελική συγκέντρωση 5×10^{-4} του διαλύματος. Στη συνέχεια, τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι για 10 λεπτά. Πριν την ανάλυση των δειγμάτων στον κυτταρομετρητή γινόταν ξανά ανάδευσή τους με vortex. Στο όργανο, η καταμέτρηση των δειγμάτων, διαρκούσε 1 λεπτό, στη μεσαία ταχύτητα. Τα ετερότροφα βακτήρια στη συνέχεια κατηγοριοποιήθηκαν σε βακτήρια υψηλού (High Nucleic Acid - HNA) και χαμηλού (Low Nucleic Acid - LNA) νουκλεοτιδικού περιεχομένου. Αυτή η ταξινόμηση των δύο ομάδων βασίζεται στη διαφορετική ένταση φθορισμού FL1 και στα σήματα πλευρικής σκέδασης (sideward scatter: SSC) που ανιχνεύονται από τον κυτταρομετρητή, σε συνδυασμό με τη χρώση του νουκλεϊκού τους οξέος. Η ένταση φθορισμού χρησιμοποιείται ως δείκτης της κυτταρικής περιεκτικότητας σε νουκλεϊκό οξύ και τα σήματα SSC χρησιμοποιούνται ως ένδειξη του κυτταρικού μεγέθους τους (Lebaron et al. 2001).

Η αφθονία των ετερότροφων βακτηριών μετατράπηκε σε βιομάζα χρησιμοποιώντας τον ακόλουθο συντελεστή μετατροπής: $20 \text{ fg C κύτταρο}^{-1}$ (Lee & Fuhrman 1987).

Η βακτηριακή παραγωγή (BP) υπολογίστηκε με χρήση ^3H -λευκίνης, σύμφωνα με τη μέθοδο των Kirchman et al. (1986), όπως τροποποιήθηκε από τους Smith & Azam (1992).

3.4.2 Νανοπλαγκτόν

Τα δείγματα για την καταμέτρηση των αυτότροφων (Pigmented NanoFlagellates: PNF) και ετερότροφων μαστιγωτών (Heterotrophic NanoFlagellates: HNF) συλλέγονταν μέρα παρά μέρα. Η συλλογή γινόταν σε φιαλίδια των 50 mL και συντηρούνταν με φορμόλη σε τελική συγκέντρωση 5% στο ψυγείο (4°C).

Τα δείγματα προετοιμάστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Porter & Feig (1980). Αρχικά, μία μαύρη πολυανθρακική μεμβράνη διαμέτρου 25 mm και πόρου 0,8 μm, τοποθετήθηκε σε συσκευή φιλτραρίσματος Millipore. Στη συνέχεια, 20 ή 30 mL από κάθε δείγμα τοποθετούνταν στον κύλινδρο της συσκευής φιλτραρίσματος και διηθούνταν μέσω της μεμβράνης. Όταν έμεναν περίπου 2 mL πάνω από τη μεμβράνη, το δείγμα βαφόταν με 4-6-διαμιδινο-2- φαινυλινδόλη (DAPI), σε τελική συγκέντρωση $0,2 \text{ μg mL}^{-1}$. Το DAPI είναι μια φθορίζουσα χρώση που συνδέεται σε περιοχές του DNA, πλούσιες σε αδενίνη-θυμίνη (Karuscinski 1995). Έπειτα, η συσκευή καλυπτόταν

με αλουμινόχαρτο και τα δείγματα επωάζονταν για 10 λεπτά στο σκοτάδι και στη συνέχεια και το υπόλοιπο δείγμα που παρέμενε στον κύλινδρο συλλεγόταν στη μεμβράνη. Τέλος, οι μεμβράνες τοποθετούνταν σε αντικειμενοφόρες πλάκες, ανάμεσα σε δυο σταγόνες κεδρέλαιου (immersion oil) κατάλληλου για μικροσκοπία και τοποθετούνταν στην κατάψυξη (-20°C), μέχρι την ανάλυσή τους.

Πριν την καταμέτρηση, οι αντικειμενοφόροι πλάκες αφήνονταν να ξεπαγώσουν σε θερμοκρασία δωματίου, για περίπου 5 λεπτά τυλιγμένες με αλουμινόχαρτο. Μετά από προσθήκη σταγόνας κεδρέλαιου στην επιφάνεια της καλυπτρίδας, οι πλάκες τοποθετούνταν στο μικροσκόπιο επιφθορισμού. Τα PNF και HNF καταμετρήθηκαν σε μεγέθυνση $\times 1.000$, χρησιμοποιώντας υπεριώδεις και μπλε φως σε μικροσκόπιο Olympus BX60 επιφθορισμού. Ο διαχωρισμός PNF και HNF έγινε με τη χρήση του μπλε φωτός: όταν η χλωροφύλλη διεγερθεί με μπλε φως εκπέμπει κόκκινο, συνεπώς στα νανομαστιγωτά που είχαν κόκκινες περιοχές υπήρχε φωτοσυνθετική δραστηριότητα και χαρακτηρίζονταν ως PNF (Bolhàr-Nordenkamprf & Öquist, 1993).

Όλα τα κύτταρα χωρίστηκαν στις εξής κατηγορίες, ανάλογα με το μέγεθός τους: PNF $<1 \mu\text{m}$ και $>1 \mu\text{m}$ και HNF $<3 \mu\text{m}$, $3-5 \mu\text{m}$ και $>5 \mu\text{m}$. Η μέτρηση του μεγέθους κάθε κυττάρου έγινε χρησιμοποιώντας ενσωματωμένη μικρο-κλίμακα μέτρησης στον προσοφθάλμιο φακό. Γινόταν μέτρηση τριών διατομών (transect) για κάθε δείγμα και στη συνέχεια έγινε αναγωγή της αφθονίας των νανομαστιγωτών ανά mL.

Για τον υπολογισμό της βιομάζας των νανομαστιγωτών υπολογίστηκε αρχικά ο βιοόγκος τους,, μέσω του τύπου $V=(\pi \times \Pi^2 \times M)/6$, όπου τα M και Π είναι το μήκος και πλάτος του κυττάρου σε μm , αντίστοιχα. Τα κύτταρα θεωρήθηκε ότι έχουν ελλειψοειδές σχήμα. Ο βιοόγκος μετατράπηκε σε βιομάζα άνθρακα με τη χρήση του συντελεστή μετατροπής $183 \text{ fg C } \mu\text{m}^{-3}$ (Caron et al. 1995).

3.4.3 Μικροπλαγκτόν

Τα δείγματα του μικροπλαγκτού συλλέγονταν μέρα παρά μέρα. Τα δείγματα νερού μονιμοποιήθηκαν με όξινο διάλυμα Lugol το οποίο περιέχει I_2 , KI, CH_3COOH και απιονισμένο νερό σε τελική συγκέντρωση 0,4% στο δείγμα. Στη συνέχεια τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο (4°C) μέχρι την ανάλυσή τους.

Η καταμέτρηση των οργανισμών έγινε με τη μέθοδο που περιγράφηκε από τον Utermöhl (1958). Αρχικά, 100 mL από κάθε δείγμα, τοποθετήθηκαν σε σωλήνα καθίζησης για τουλάχιστον 18 ώρες (Εικόνα 8). Στη συνέχεια, οι οργανισμοί καταμετρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο Olympus

IX70, σε μεγέθυνση $\times 150$, στο οποίο υπήρχε ενσωματωμένη κάμερα BASLER. Η αναγνώριση των διατόμων, των δινομαστιγωτών και των βλεφαριδωτών έγινε σε επίπεδο γένους και μετρήθηκε η αφθονία τους. Κάθε οργανισμός φωτογραφιζόταν για τον μετέπειτα διαχωρισμό τους σε γένη. Έγινε μέτρηση της μισής πλάκας Utermöhl για τα πιο άφθονα γένη και ολόκληρης της πλάκας για τα πιο σπάνια, και ακολούθησε αναγωγή της αφθονίας τους ανά L.



Εικόνα 8: Κύλινδροι καθίζησης του μικροπλαγκτού.

Για τον υπολογισμό της βιομάζας των οργανισμών έγινε αρχικά υπολογισμός του βιοόγκου τους. Το μικροπλαγκτόν αποτελείται από τρεις κύριες ομάδες οργανισμών τα διάτομα, τα δινομαστιγωτά και τα βλεφαριδωτά. Οι ομάδες αυτές έχουν οργανισμούς με διαφορετικά μεγέθη και σχήματα, συνεπώς για τον υπολογισμό των διαστάσεων και την εκτίμηση του βιοόγκου χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ανάλυσης εικόνας. Αρχικά, οι φωτογραφίες των οργανισμών οργανώθηκαν σε γένη, έπειτα, υπολογίστηκαν οι διαστάσεις των οργανισμών, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας ImageJ. Κάθε μορφότυπος αποδόθηκε ανάλογα με τη μορφή του σε ένα γεωμετρικό σχήμα (κώνος, σφαίρα, κύλινδρος και ελλειψοειδές) του οποίου ο όγκος μπορεί να υπολογιστεί με δυο διαστάσεις. Για τον υπολογισμό του βιοόγκου κάθε μορφότυπου έγινε μέτρηση 5 τυχαίων φωτογραφιών. Η χρήση Lugol, εκτός από συντήρηση των κυττάρων, προκαλεί και συρρίκνωσή τους, γι' αυτό τον λόγο μέσω εξισώσεων έγινε υπολογισμός του πραγματικού όγκου (όπου χρειαζόταν) κάθε ομάδας, με βάση τον όγκο του συντηρημένου κυττάρου που εκτιμήθηκε από τις φωτογραφίες. Έπειτα εκτιμήθηκε η βιομάζα κάθε ομάδας με χρήση

συντελεστών μετατροπής. Οι τύποι υπολογισμού του πραγματικού όγκου και της βιομάζας για κάθε ομάδα ήταν οι εξής:

i. **Διάτομα:**

$$\text{Biomass (pg C cell}^{-1}\text{)} = 0,288 * \text{LugolDiatomVolume}^{0.811} \text{ (Davidson et al. 2002)}$$

όπου LugolDiatomVolume είναι ο βιοόγκος των διατόμων

ii. **Δινομαστιγωτά:**

χρειάστηκε αρχικά να υπολογιστεί ο πραγματικός βιοόγκος τους από τον όγκο των κυττάρων που έχουν μονιμοποιηθεί με Lugol.

Για την μετατροπή του βιοόγκου των γυμνών δινομαστιγωτών χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

$$\log(\text{LiveDinoVolume}) = 0,162 + 0,960 * \log(\text{LugolDinoVolume}) \text{ (Menden-Deuer \& Lessard, 2000)}$$

Για την μετατροπή του βιοόγκου των δινομαστιγωτών με θήκη χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

$$\log(\text{LiveDinoVolume}) = 0,025 + 0,98 * \log(\text{LugolDinoVolume}) \text{ (Menden-Deuer \& Lessard, 2000)}$$

Έπειτα, για τον υπολογισμό της βιομάζας χρησιμοποιήθηκε για τις δύο κατηγορίες δινομαστιγωτών ο τύπος:

$$\log(\text{Biomass cell}^{-1}\text{)} = 0,819 * \log(\text{LiveDinoVolume}) - 0,119 \text{ (Menden-Deuer \& Lessard, 2000)}$$

όπου LiveDinoVolume είναι ο πραγματικός βιοόγκος των δινομαστιγωτών και LugolDinoVolume είναι ο όγκος των κυττάρων που έχουν μονιμοποιηθεί με Lugol.

iii. **Γυμνά βλεφαριδωτά:**

$$\text{Biomass (pg C cell}^{-1}\text{)} = 0,19 * \text{LugolCiliateVolume (}\mu\text{m}^3\text{)} \text{ (Putt \& Stoecker 1989)}$$

όπου LugolCiliateVolume είναι ο βιοόγκος των γυμνών βλεφαριδωτών.

iv. **Κωδωνοειδή (Tintinnids):**

Ο πραγματικός όγκος τους διαφέρει από τον όγκο που υπολογίστηκε μέσω των φωτογραφιών έπειτα από την προσθήκη του Lugol συνεπώς για την μετατροπή του όγκου χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

$$\text{LugolTintinnidVolume } (\mu\text{m}^3) = (\text{LugolLoricaVolume} / 2,74)^{(1 / 1,03)} \text{ (Rychert 2011)}$$

Έπειτα, για τον υπολογισμό της βιομάζας του κυττάρου χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος τύπος με τα υπόλοιπα βλεφαριδωτά:

$$\text{Biomass } (\mu\text{g C cell}^{-1}) = 0,19 * \text{LugolTintinnidVolume } (\mu\text{m}^3) \text{ (Putt \& Stoecker, 1989)}$$

όπου LugolTintinnidVolume είναι ο όγκος του βλεφαριδωτού χωρίς τη lorica (κωδωνοειδής θήκη), LugolLoricaVolume είναι ο όγκος της lorica.

3.4.4. Μεσοζωοπλαγκτόν

Η συλλογή των δειγμάτων του ζωοπλαγκτού γινόταν μέρα παρά μέρα. Καταμετρήθηκαν τα ενήλικα άτομα, τα νεαρά άτομα, οι ναύπλιοι και τα αυγά με χρήση στερεοσκοπίου.

3.5 Στατιστική ανάλυση

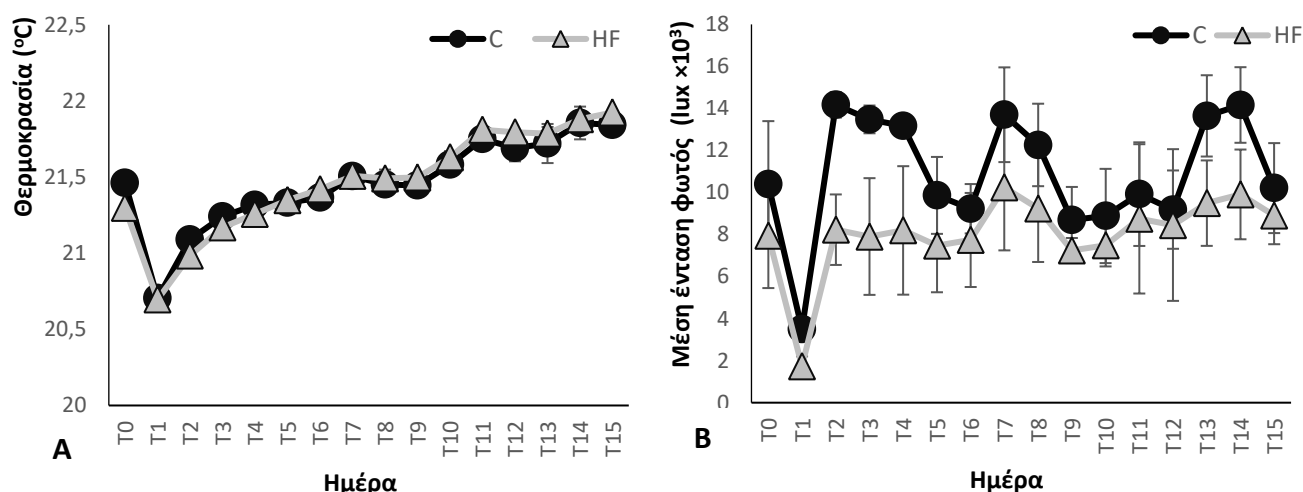
Όλες οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με χρήση της γλώσσας προγραμματισμού R. Αρχικά ελέγχθηκε αν τα δεδομένα τηρούν τις απαραίτητες προϋποθέσεις για να γίνουν οι κατάλληλες αναλύσεις. Πιο συγκεκριμένα, έγινε έλεγχος για το αν υπάρχουν ακραίες τιμές (outliers), αν παρουσιάζουν κανονική κατανομή (Shapiro-Wilk test) και αν έχουν ομοιογένεια διασπορών (Levene's test).

Έπειτα, εφαρμόστηκε η μέθοδος Two way Repeated Measures Analysis Of Variance (Two Way RM-ANOVA) για τη σύγκριση της μεταβολής κάθε μεταβλητής τόσο στο χρόνο (ημέρα 0-15) όσο και μεταξύ των δύο πειραματικών συνθηκών. Ακολούθησε έλεγχος πολλαπλών συγκρίσεων (Tukey's Test) ώστε να εντοπιστεί συγκεκριμένα σε ποια μέρα υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις δύο συνθήκες C και HF.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Αβιοτικές μεταβλητές

Η θερμοκρασία παρουσίασε μεγάλη μείωση και στις δύο πειραματικές συνθήκες, C και HF την ημέρα 1 και στη συνέχεια αυξήθηκε σταδιακά μέχρι το τέλος του πειράματος, την ημέρα 15 (Εικόνα 9-A). Δεν παρατηρήθηκε διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ των δύο συνθηκών. Η μέση ένταση φωτός μειώθηκε απότομα την ημέρα 1 και στις δυο πειραματικές συνθήκες, έπειτα αυξήθηκε και αυξομειωνόταν μέχρι το τέλος του πειράματος (Εικόνα 9-B). Η μέση ένταση φωτός ήταν σημαντικά μικρότερη στη συνθήκη HF συγκριτικά με τον μάρτυρα C ($F=14,393$ και $p<0,01$), όλες τις μέρες του πειράματος.

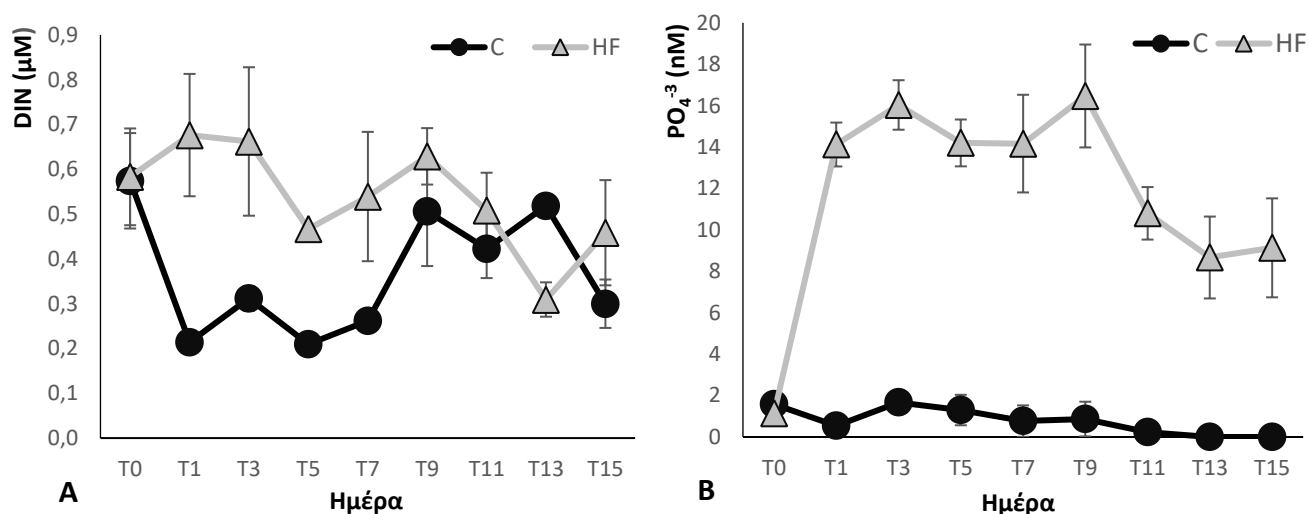


Εικόνα 9: Μεταβολή της θερμοκρασίας (A) και της μέσης έντασης του φωτός (B) στις δύο πειραματικές συνθήκες (C και HF), κατά τη διάρκεια του πειράματος. C: μεσόκοσμοι-μάρτυρες, καμία προσθήκη, HF: μεσόκοσμοι όπου προστέθηκε HuminFeed. Τα σημεία (κύκλοι για το C και τρίγωνα για το HF) απεικονίζουν τη μέση τιμή και την τυπική απόκλιση (\pm SD) των τριών μεσοκόσμων-αντιγράφων σε κάθε πειραματική συνθήκη.

4.2 Ανόργανα θρεπτικά

Στη συνθήκη HF, η συγκέντρωση του διαλελυμένου ανόργανου αζώτου (DIN) ήταν μεγαλύτερη από το C, από την ημέρα 1 μέχρι την ημέρα 7. Αρχικά παρουσίασε μικρή αύξηση κατά την ημέρα 1 και στη συνέχεια μειώθηκε σταδιακά (Εικόνα 10-A). Στον μάρτυρα C, καταγράφηκε απότομη μείωση την ημέρα 1 και στη συνέχεια, η συγκέντρωση αυξήθηκε σταδιακά φτάνοντας σε παρόμοια επίπεδα με τη συνθήκη HF, μέχρι το τέλος του πειράματος.

Η συγκέντρωση των φωσφορικών ιόντων (PO_4^{-3}) ήταν υψηλότερη στο HF από τον μάρτυρα C, από την ημέρα 1 μέχρι το τέλος του πειράματος (Εικόνα 10-B). Εμφάνισε απότομη αύξηση στη συνθήκη HF, μία μέρα μετά την προσθήκη του HuminFeed στο νερό και παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα τις πρώτες 9 μέρες του πειράματος (μέγιστη τιμή την ημέρα 9, 16,47 nM), ενώ στη συνέχεια μειώθηκε σταδιακά. Στον μάρτυρα C, η συγκέντρωση των PO_4^{-3} παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα σε όλη τη διάρκεια του πειράματος και δεν εμφάνισε έντονη αλλαγή μέχρι τις δυο τελευταίες ημέρες του πειράματος, οπότε μηδενίστηκε. Η μέγιστη καταγραφή στον μάρτυρα C ήταν 1,67 nM, την ημέρα 3.

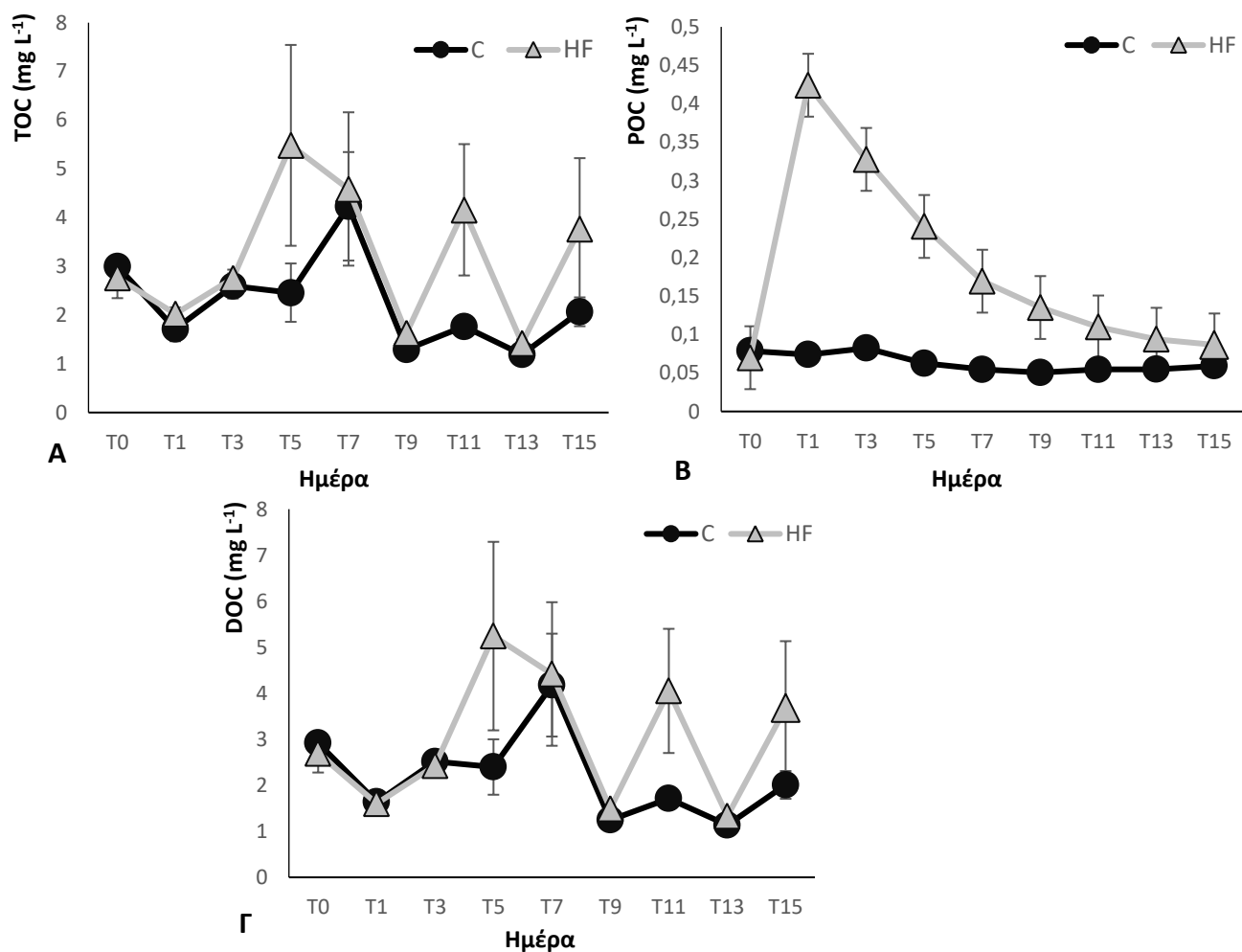


Εικόνα 10: Μεταβολή του διαλελυμένου ανόργανου αζώτου (DIN) (A) και των φωσφορικών ιόντων (PO_4^{-3}) (B), στις δύο πειραματικές συνθήκες (C και HF) κατά τη διάρκεια του πειράματος. Για λεπτομέρειες, βλέπε Εικόνα 9.

4.3 Οργανικά θρεπτικά

Ο συνολικός οργανικός άνθρακας (TOC) παρουσίασε αυξομειώσεις και στις δυο πειραματικές συνθήκες κατά τη διάρκεια του πειράματος μεσοκόσμων (Εικόνα 11-A). Η συγκέντρωσή του παρουσίασε διαφορές σε συγκεκριμένες ημέρες (π.χ. τις ημέρες 5 και 11, οι τιμές ήταν υψηλότερες στο HF). Η μεγαλύτερη συγκέντρωση TOC στη συνθήκη HF καταγράφηκε την ημέρα 5 και ήταν $5,48 \text{ mg L}^{-1}$ ενώ στον μάρτυρα C, την ημέρα 7 και ήταν $4,23 \text{ mg L}^{-1}$. Ο σωματιδιακός οργανικός άνθρακας (POC) παρουσίασε απότομη αύξηση στη συνθήκη HF (από $0,07 \text{ mg L}^{-1}$ έφτασε σε $0,42 \text{ mg L}^{-1}$) μία μέρα μετά την προσθήκη του HuminFeed στο νερό (Εικόνα 11-B) και παρέμεινε σε υψηλότερα επίπεδα από τον μάρτυρα, από την ημέρα 1 μέχρι το τέλος του πειράματος. Μετά την ημέρα 1, ακολούθησε σταδιακή μείωση και την τελευταία ημέρα του πειράματος η

συγκέντρωση ήταν $0,09 \text{ mg L}^{-1}$. Τέλος, ο διαλελυμένος οργανικός άνθρακας (DOC) παρουσίασε αυξομειώσεις (παρόμοιες με τον TOC) και στις δυο πειραματικές συνθήκες καθόλη τη διάρκεια του πειράματος (Εικόνα 11-Γ). Η μεγαλύτερη συγκέντρωση DOC στη συνθήκη HF καταγράφηκε την ημέρα 5 και ήταν $5,24 \text{ mg L}^{-1}$, ενώ στον μάρτυρα C, την ημέρα 7 και ήταν $4,17 \text{ mg L}^{-1}$.

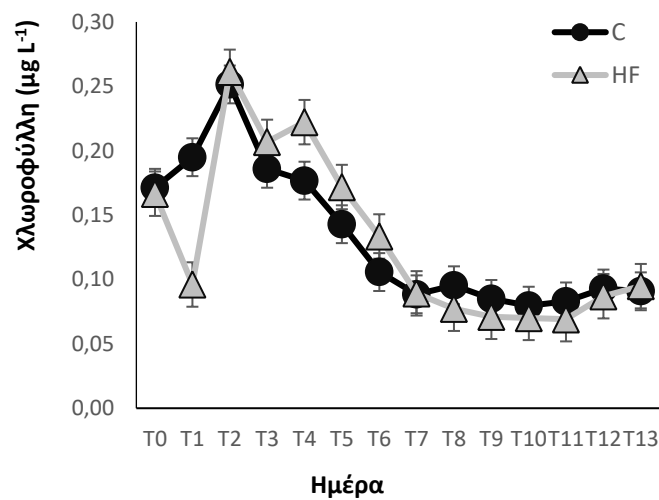


Εικόνα 11: Μεταβολή του συνολικού οργανικού άνθρακα (TOC) (Α), του σωματιδιακού οργανικού άνθρακα (POC) (Β), και του διαλελυμένου οργανικού άνθρακα (DOC) (Γ) στις δύο πειραματικές συνθήκες (C και HF) κατά τη διάρκεια του πειράματος. Για λεπτομέρειες, βλέπε Εικόνα 9.

4.4 Χλωροφύλλη

Στον μάρτυρα C, η χλωροφύλλη αυξήθηκε τις πρώτες δύο μέρες του πειράματος (Εικόνα 12), η μέγιστη τιμή ήταν $0,251 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ και καταγράφηκε την ημέρα 2. Στη συνέχεια, παρατηρήθηκε απότομη μείωση μέχρι την ημέρα 7 και παρέμεινε σε σταθερά αλλά χαμηλά σχετικά επίπεδα μέχρι το τέλος του πειράματος. Στη συνθήκη HF, η χλωροφύλλη παρουσίασε σημαντική απότομη μείωση

την ημέρα 1 ($p < 0,01$) και στη συνέχεια αυξήθηκε απότομα, με τη μέγιστη τιμή στα $0,261 \mu\text{g L}^{-1}$ να καταγράφεται την ημέρα 2. Έπειτα, καταγράφηκε μικρή μείωση την ημέρα 3 και μικρή αύξηση την επομένη μέρα, ημέρα 4. Στη συνέχεια, παρατηρήθηκε απότομη μείωση μέχρι την ημέρα 11 και παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα μέχρι το τέλος του πειράματος. Γενικά, δεν παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές ανάμεσα στις δύο πειραματικές συνθήκες C και HF με εξαίρεση την ημέρα 1.

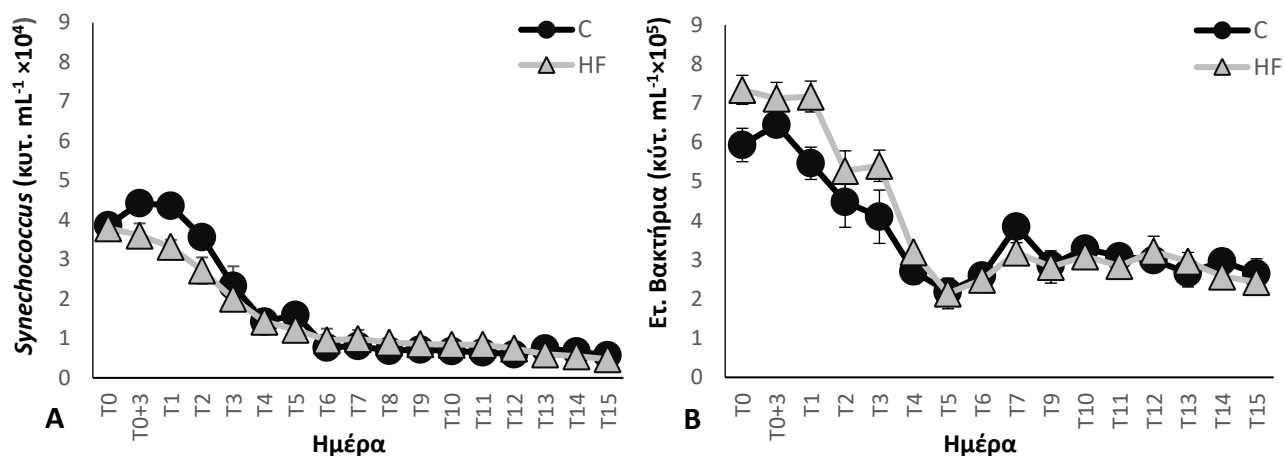


Εικόνα 12: Μεταβολή της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης α στις δύο πειραματικές συνθήκες (C και HF) κατά τη διάρκεια του πειράματος. Για λεπτομέρειες, βλέπε Εικόνα 9.

4.5 Πικοπλαγκτόν

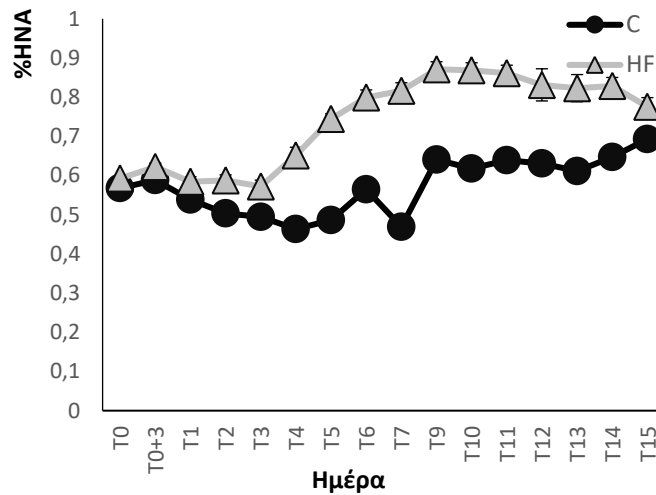
Τα βακτήρια του γένους *Synechococcus* είχαν μεγαλύτερη αφθονία στον μάρτυρα C, και από την ημέρα 1 μέχρι την ημέρα 3 είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,01$, Εικόνα 13-A). Στη συνέχεια, δεν παρουσίασαν ιδιαίτερες διαφορές στις δύο πειραματικές συνθήκες, μέχρι το τέλος του πειράματος. Στον μάρτυρα C αυξήθηκαν τις πρώτες μέρες του πειράματος και η μέγιστη τιμή που καταγράφηκε ήταν 4×10^4 κύτταρα mL^{-1} . Στη συνέχεια, παρουσίασαν σταδιακή μείωση μέχρι την ημέρα 6 και παρέμειναν σε χαμηλά επίπεδα μέχρι το τέλος του πειράματος. Στη συνθήκη HF, μετά την προσθήκη του HuminFeed στο νερό καταγράφηκε σταδιακή μείωση αμέσως μετά την έναρξη του πειράματος μέχρι την ημέρα 6 και παρέμειναν σε χαμηλά επίπεδα μέχρι το τέλος του πειράματος.

Η αφθονία των ετερότροφων βακτηρίων ήταν μεγαλύτερη μέχρι την ημέρα 5 στη συνθήκη HF και παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά την ημέρα 1 ($p < 0,01$, Εικόνα 13-B), ενώ στη συνέχεια παρουσίασε παρόμοιες αφθονίες στις δύο συνθήκες. Παρόμοιες αυξομειώσεις της αφθονίας των ετερότροφων βακτηρίων παρατηρήθηκαν στις δύο διατάξεις, αρχικά η αφθονία τους μειώθηκε σταδιακά και στις δύο πειραματικές συνθήκες μέχρι την ημέρα 5, στη συνέχεια αυξήθηκε μέχρι την ημέρα 8 και έπειτα παρουσίασε μικρή μείωση μέχρι το τέλος του πειράματος.



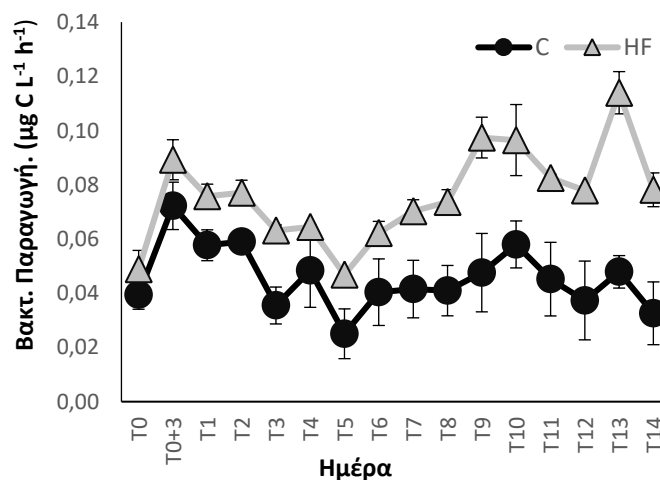
Εικόνα 13: Μεταβολή της αφθονίας των βακτηρίων *Synechococcus* (A) και των ετερότροφων βακτηρίων (B) στις δύο πειραματικές συνθήκες (C και HF) κατά τη διάρκεια του πειράματος. Για λεπτομέρειες, βλέπε Εικόνα 9.

Το ποσοστό των HNA (High Nucleic Acid) ετερότροφων βακτηρίων ήταν μεγαλύτερο στη συνθήκη HF, από την ημέρα 2 έως το τέλος του πειράματος (Εικόνα 14), και κατά πολύ μεγαλύτερο από τον μάρτυρα από την ημέρα 3 και μετά. Αρχικά, στο HF το ποσοστό ήταν σταθερό μέχρι την ημέρα 3 και στη συνέχεια αυξήθηκε μέχρι την ημέρα 9, μετά την οποία διατηρήθηκε σταθερό. Στον μάρτυρα C, παρατηρήθηκε σταδιακή μικρή μείωση του ποσοστού μέχρι την ημέρα 8, και στη συνέχεια απότομη αύξηση την ημέρα 9 και σταθερές τιμές μέχρι το τέλος του πειράματος.



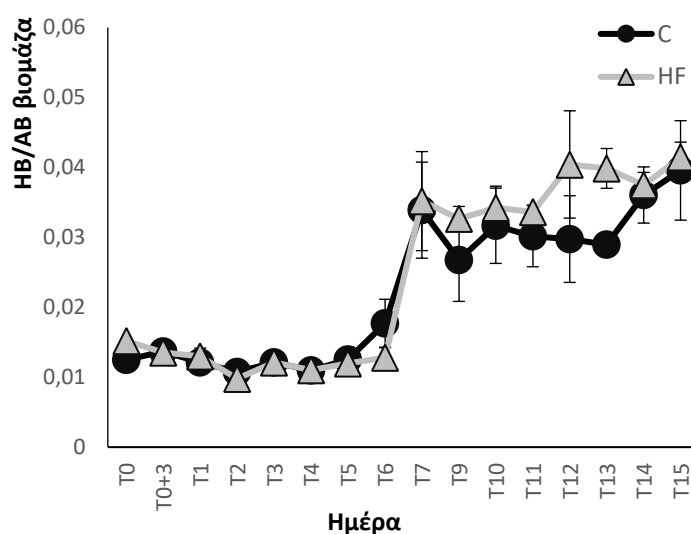
Εικόνα 14: Μεταβολή του ποσοστού των HNA (High Nucleic Acid – Υψηλού Νουκλεοτιδικού Περιεχομένου) ετερότροφων βακτηρίων στις δύο πειραματικές συνθήκες (C και HF) κατά τη διάρκεια του πειράματος. Για λεπτομέρειες, βλέπε Εικόνα 9.

Η βακτηριακή παραγωγή παρουσίασε αυξομειώσεις και στις δυο πειραματικές συνθήκες κατά τη διάρκεια του πειράματος μεσοκόσμων (Εικόνα 15). Όλες τις μέρες ήταν μικρότερη στον μάρτυρα C σε σχέση με τη συνθήκη HF αλλά παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά την ημέρα 3 ($p < 0,05$), τις ημέρες 7 και 8 ($p < 0,05$) και τις ημέρες 9 έως 14 ($p < 0,01$). Σε γενικές γραμμές, και στις δύο συνθήκες εμφανίστηκε αύξηση μετά την προσθήκη HF και ακολούθησε σημαντική μείωση μέχρι την ημέρα 5. Στη συνέχεια, οι τιμές παρέμειναν σταθερές στον μάρτυρα ενώ στη συνθήκη HF σημειώθηκε σταδιακή αύξηση μέχρι τις ημέρες 9-10 και μετά αυξομειώσεις.



Εικόνα 15: Μεταβολή της βακτηριακής παραγωγής στις δύο πειραματικές συνθήκες (C και HF) κατά τη διάρκεια του πειράματος. Για λεπτομέρειες, βλέπε Εικόνα 9.

Ο λόγος της βιομάζας των ετερότροφων βακτηρίων προς τα αυτότροφα βακτήρια *Synechococcus*, έδειξε μεγάλη επικράτηση της ετερότροφης συνιστώσας και δεν παρουσίασε ιδιαίτερες διαφορές ανάμεσα στις δύο πειραματικές συνθήκες (Εικόνα 16). Ο λόγος ήταν σχεδόν σταθερός μέχρι την ημέρα 6 και στη συνέχεια παρουσίασε απότομη αύξηση. Έπειτα, τόσο στον μάρτυρα όσο και στην συνθήκη HF, παρουσίασε μικρή αύξηση μέχρι το τέλος του πειράματος, ενώ μη σημαντικές διαφορές ($p > 0,05$) ανάμεσα στις δύο συνθήκες καταγράφηκαν τις ημέρες 12 και 13, στις οποίες ο λόγος ήταν μεγαλύτερος στη συνθήκη HF.



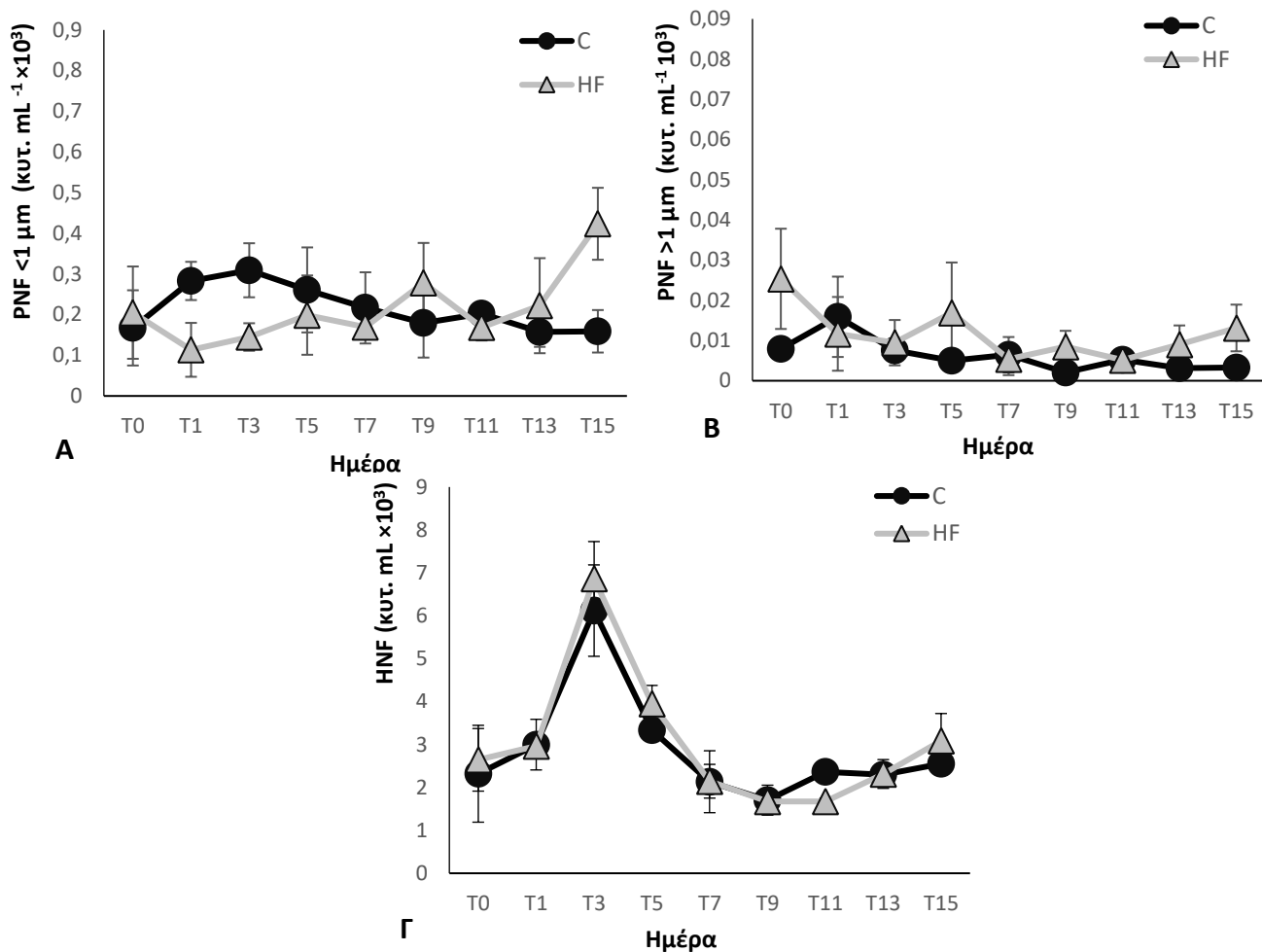
Εικόνα 16: Λόγος της βιομάζας των ετερότροφων (HB) προς τα αυτότροφα βακτήρια (AB) στις δύο πειραματικές συνθήκες (C και HF) κατά τη διάρκεια του πειράματος. Για λεπτομέρειες, βλέπε Εικόνα 9.

4.6 Νανοπλαγκτόν

Τα PNF (Pigmented NanoFlagellates – Αυτότροφα Νανομαστιγωτά) με μέγεθος $< 1 \mu\text{m}$ είχαν υψηλότερη αφθονία στον μάρτυρα μέχρι την ημέρα 7, ωστόσο στη συνέχεια παρατηρήθηκε υψηλότερη αφθονία στη συνθήκη HF ($p > 0,05$, Εικόνα 17-A). Στον μάρτυρα C, παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση μέχρι την ημέρα 3, οπότε καταγράφηκε η μεγαλύτερη αφθονία $309 \text{ κύτταρα mL}^{-1}$ και στη συνέχεια καταγράφηκε σταδιακή μείωση έως το τέλος του πειράματος. Στη συνθήκη HF, τα PNF $< 1 \mu\text{m}$ παρουσίασαν μείωση την πρώτη μέρα του πειράματος και έπειτα αυξήθηκαν σταδιακά μέχρι την ημέρα 9. Στη συνέχεια καταγράφηκε μικρή μείωση του αριθμού τους και εκ νέου αύξησή τους τις τελευταίες μέρες του πειράματος, ενώ την ημέρα 15 καταγράφηκε η μέγιστη αφθονία τους: $423 \text{ κύτταρα mL}^{-1}$.

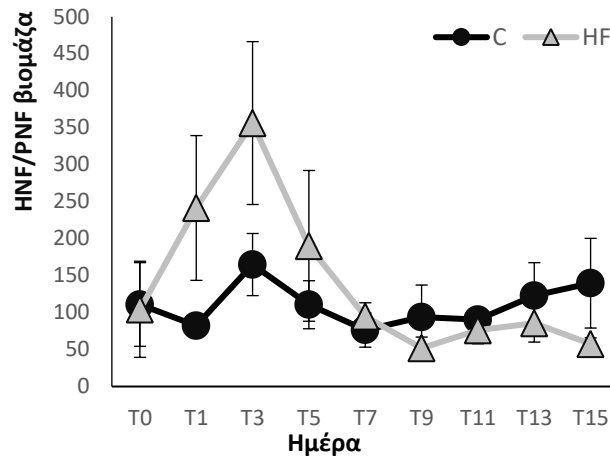
Τα PNF με μέγεθος >1 μm (λιγότερα από τα PNF <1 μm κατά 1-2 τάξεις μεγέθους), τις περισσότερες μέρες του πειράματος είχαν σημαντικά μεγαλύτερη αφθονία στη συνθήκη HF (F= 6,426 $p < 0,05$, Εικόνα 17-B). Στον μάρτυρα C αυξήθηκαν την ημέρα 1, οπότε καταγράφηκε η μέγιστη τιμή τους: 16 κύτταρα mL^{-1} . Έπειτα καταγράφηκε σταδιακή μείωσή τους και παρέμειναν σε χαμηλά επίπεδα μέχρι το τέλος του πειράματος. Στη συνθήκη HF, η αφθονία τους εμφάνισε αυξομειώσεις κατά την διάρκεια του πειράματος. Η μέγιστη αφθονία τους καταγράφηκε την ημέρα 0, 25 κύτταρα mL^{-1} .

Τα HNF (Heterotrophic NanoFlagellates – Ετερότροφα Νανομαστιγωτά) δεν παρουσίασαν διαφορές στις δύο πειραματικές συνθήκες ($p > 0,05$, Εικόνα 17-Γ). Στον μάρτυρα C και στη συνθήκη HF η αφθονία τους αυξήθηκε μέχρι την ημέρα 3, οπότε καταγράφηκε η μέγιστη τιμή 6119 κύτταρα mL^{-1} και 6866 κύτταρα mL^{-1} αντίστοιχα. Στη συνέχεια, η αφθονία τους υποχώρησε μέχρι την ημέρα 9, ενώ ακολούθησε μικρή αύξηση μέχρι την ημέρα 15.



Εικόνα 17: Μεταβολή της αφθονίας των PNF (Pigmented NanoFlagellates) <1 μm (A), PNF >1 μm (B) και HNF (Heterotrophic NanoFlagellates) (Γ) στις δύο πειραματικές συνθήκες (C και HF) κατά τη διάρκεια του πειράματος. Για λεπτομέρειες, βλέπε Εικόνα 9.

Ο λόγος της βιομάζας των ετερότροφων (HNF) προς των συνολικών αυτότροφων νανομαστιγιωτών (PNF <1 μm και PNF >1 μm) έδειξε επικράτηση της ετερότροφης συνιστώσας σε όλη τη διάρκεια του πειράματος και στις δύο συνθήκες. Επίσης, παρουσίασε μη σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο πειραματικές συνθήκες ($p > 0,05$, Εικόνα 18). Μέχρι την ημέρα 7, ο λόγος ήταν μεγαλύτερος στη συνθήκη HF ενώ στη συνέχεια ήταν μικρότερος σε σχέση με τον μάρτυρα C. Ο λόγος ήταν σχετικά σταθερός στον μάρτυρα C στη διάρκεια του πειράματος.



Εικόνα 18: Λόγος της βιομάζας των ετερότροφων νανομαστιγωτών (HNF) προς των αυτότροφων νανομαστιγωτών (PNF) στις δύο πειραματικές συνθήκες (C και HF) κατά τη διάρκεια του πειράματος. Για λεπτομέρειες, βλέπε Εικόνα 9.

4.7 Μικροπλαγκτόν

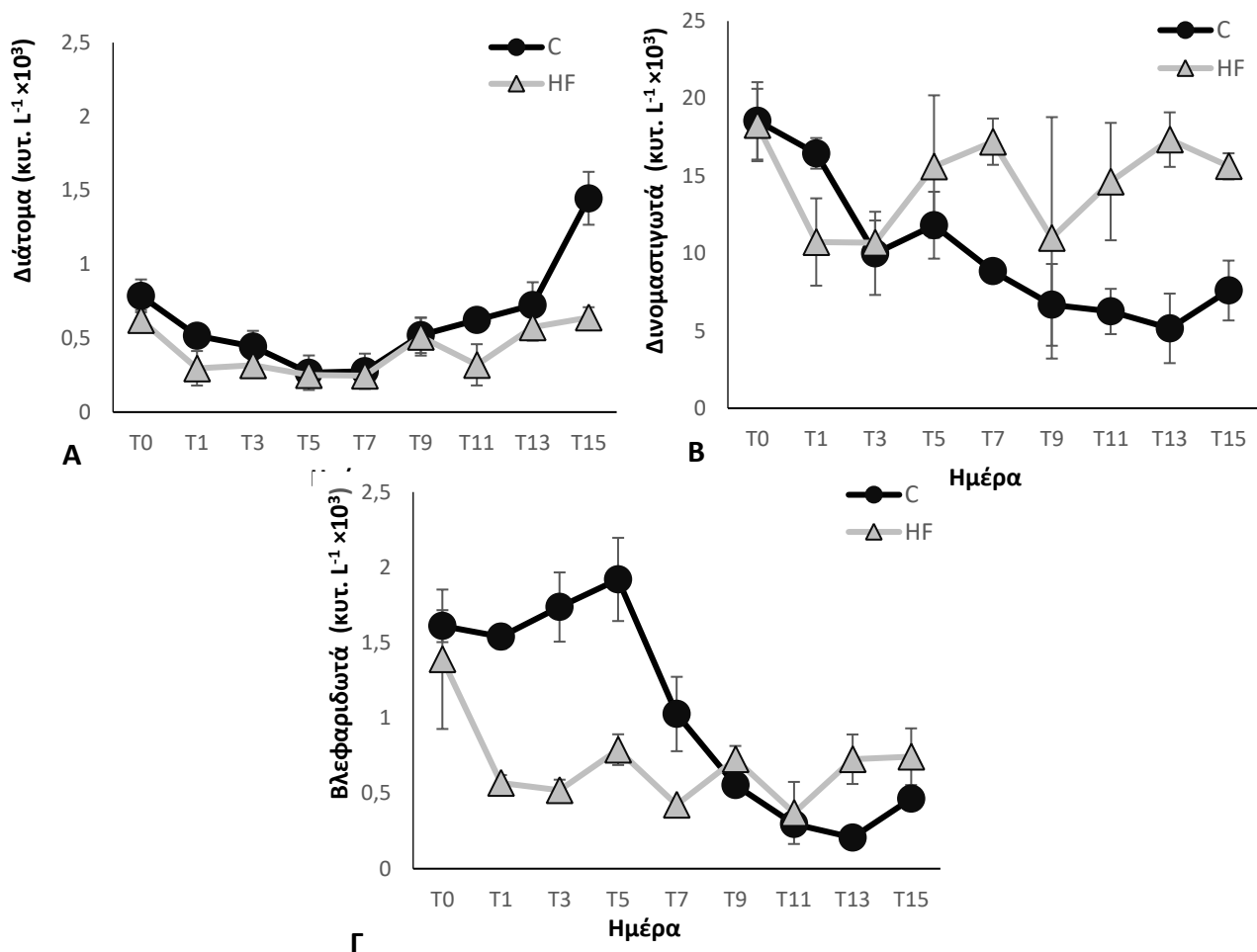
Η αφθονία των διατόμων παρουσίασε παρόμοια μεταβολή στις δύο πειραματικές συνθήκες κατά τη διάρκεια του πειράματος, αρχικά καταγράφηκε μείωση της αφθονίας μέχρι την ημέρα 7 και στη συνέχεια αύξηση μέχρι το τέλος του πειράματος (Εικόνα 19-A). Τα διάτομα στον μάρτυρα C είχαν μεγαλύτερη αφθονία όλες τις μέρες του πειράματος, ενώ την ημέρα 15 καταγράφηκε η μέγιστη αφθονία 1447 κύτταρα L^{-1} και στατιστικά σημαντική διαφορά με τη συνθήκη HF ($p < 0,01$). Η μέγιστη τιμή αφθονίας στην συνθήκη HF καταγράφηκε την ημέρα 0 και ήταν 787 κύτταρα L^{-1} . Τα πιο άφθονα γένη και στις δύο συνθήκες ήταν τα: *Nitzschia*, *Thalassionema* και *Navicula*.

Τα δινομαστιγωτά μειώθηκαν και στις δύο πειραματικές συνθήκες μέχρι την ημέρα 3 (Εικόνα 19-B). Στη συνέχεια, στον μάρτυρα C συνεχίστηκε η μείωσή τους ενώ στην συνθήκη HF παρατηρήθηκε αύξηση, απότομη μείωση την ημέρα 9 και στη συνέχεια εκ νέου αύξηση μέχρι το τέλος του πειράματος. Την ημέρα 13 καταγράφηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις δύο πειραματικές συνθήκες ($p < 0,05$). Οι ομάδες των γυμνών δινομαστιγωτών (Gymnodiniales) με μέγεθος $< 10\mu m$ και $> 10\mu m$ παρατηρήθηκε πως είχαν τη μεγαλύτερη αφθονία στις δύο πειραματικές συνθήκες. Τα αμέσως πιο άφθονα γένη ήταν τα: *Prorocentrum* και *Ceratium*.

Τα βλεφαριδωτά μέχρι την ημέρα 7 είχαν στατιστικά μεγαλύτερη αφθονία στον μάρτυρα C ($p < 0,01$), ενώ από την ημέρα 9 και έπειτα η αφθονία τους ήταν μεγαλύτερη στη συνθήκη HF, την ημέρα 13 παρατηρήθηκε και στατιστική διαφορά ($p < 0,01$) (Εικόνα 19-Γ). Στον μάρτυρα C μέχρι την ημέρα 5 τα βλεφαριδωτά αυξήθηκαν και στη συνέχεια η αφθονία τους μειώθηκε απότομα μέχρι το

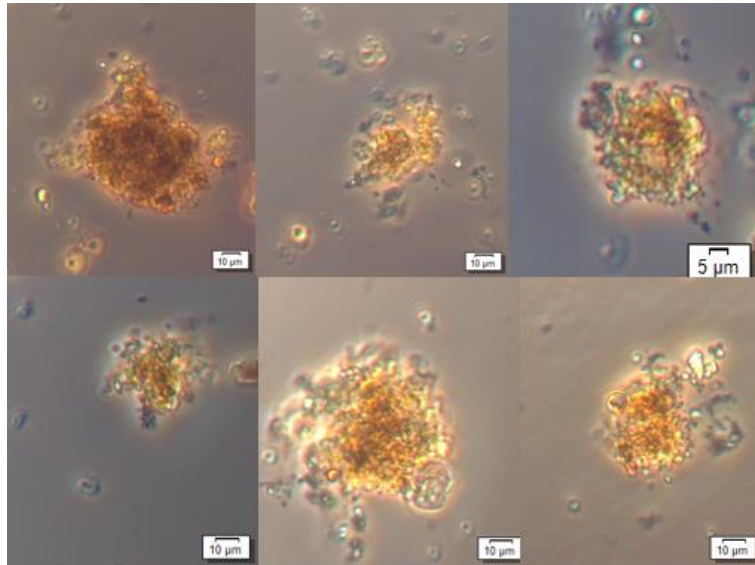
τέλος του πειράματος. Η αφθονία τους στη συνθήκη HF μειώθηκε απότομα από την ημέρα 0 στην ημέρα 1 και παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα μέχρι το τέλος του πειράματος. Τα πιο άφθονα γένη που παρατηρήθηκαν στις δύο συνθήκες ήταν τα *Strombidium* και *Strobilidium*.

Αναλυτικός πίνακας παρουσίας/απουσίας των γενών των τριών ομάδων του μικροπλαγκτού παρατίθεται στο Παράρτημα.



Εικόνα 19: Μεταβολή της αφθονίας των διατόμων (Α), των δινομαστιγωτών (Β) και των βλεφαριδωτών (Γ) στις δύο πειραματικές συνθήκες (C και HF) κατά τη διάρκεια του πειράματος. Για λεπτομέρειες, βλέπε Εικόνα 9.

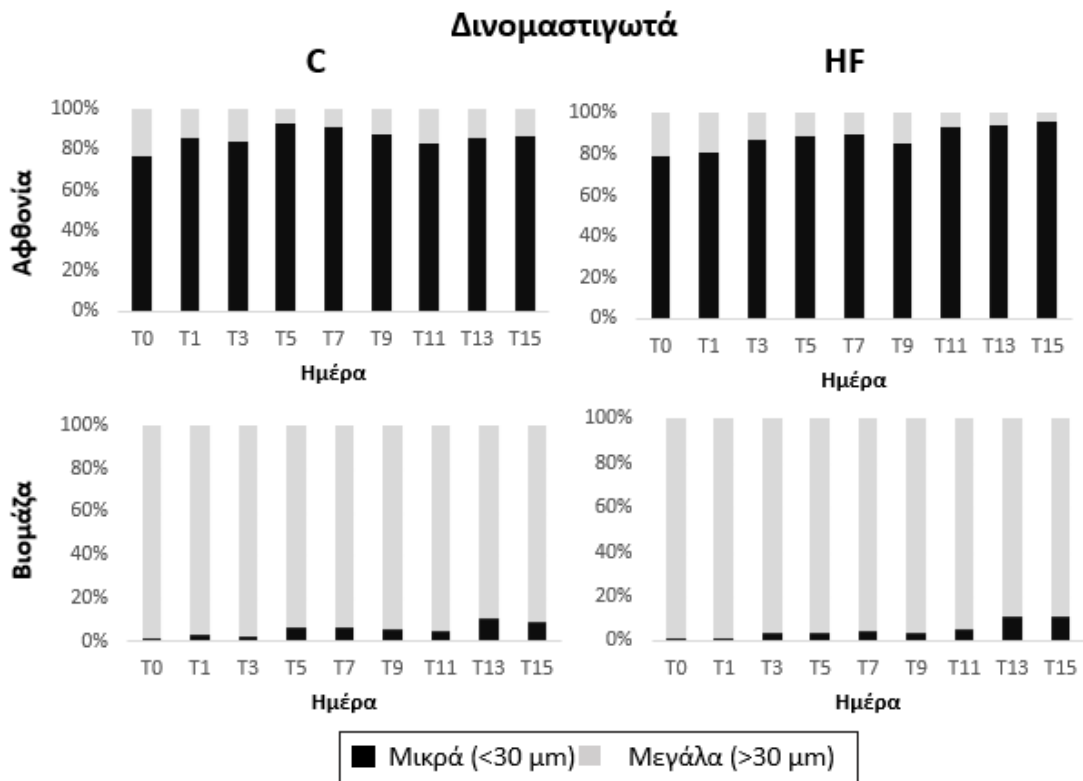
Τα βλεφαριδωτά τις τελευταίες μέρες του πειράματος παρουσίασαν διαφορετικά ποιοτικά χαρακτηριστικά στις δύο πειραματικές συνθήκες. Στη συνθήκη HF είχαν στην πλειονότητά τους αλλοιωμένη μορφή (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Φωτογραφίες βλεφαριδωτών από τους μεσοκόσμους της συνθήκης HF στο τέλος του πειράματος.

Σε σχέση με τα διαφορετικά μεγέθη δινομαστιγωτών, και στις δύο συνθήκες, μεγαλύτερη συνεισφορά στην αφθονία είχαν τα μικρά σε μέγεθος (<30 μm) είδη (Εικόνα 21), σε ποσοστό πάνω από 76% σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Στον μάρτυρα C, σημειώθηκε μικρή αύξηση του ποσοστού των μικρών ειδών τις πρώτες μέρες του πειράματος και το μέγιστο ποσοστό τους καταγράφηκε την ημέρα 5, ενώ ακολούθησε μικρή μείωση μέχρι το τέλος του πειράματος. Στη συνθήκη HF καταγράφηκε σταδιακή μικρή αύξηση του ποσοστού των μικρών δινομαστιγωτών κατά τη διάρκεια του πειράματος.

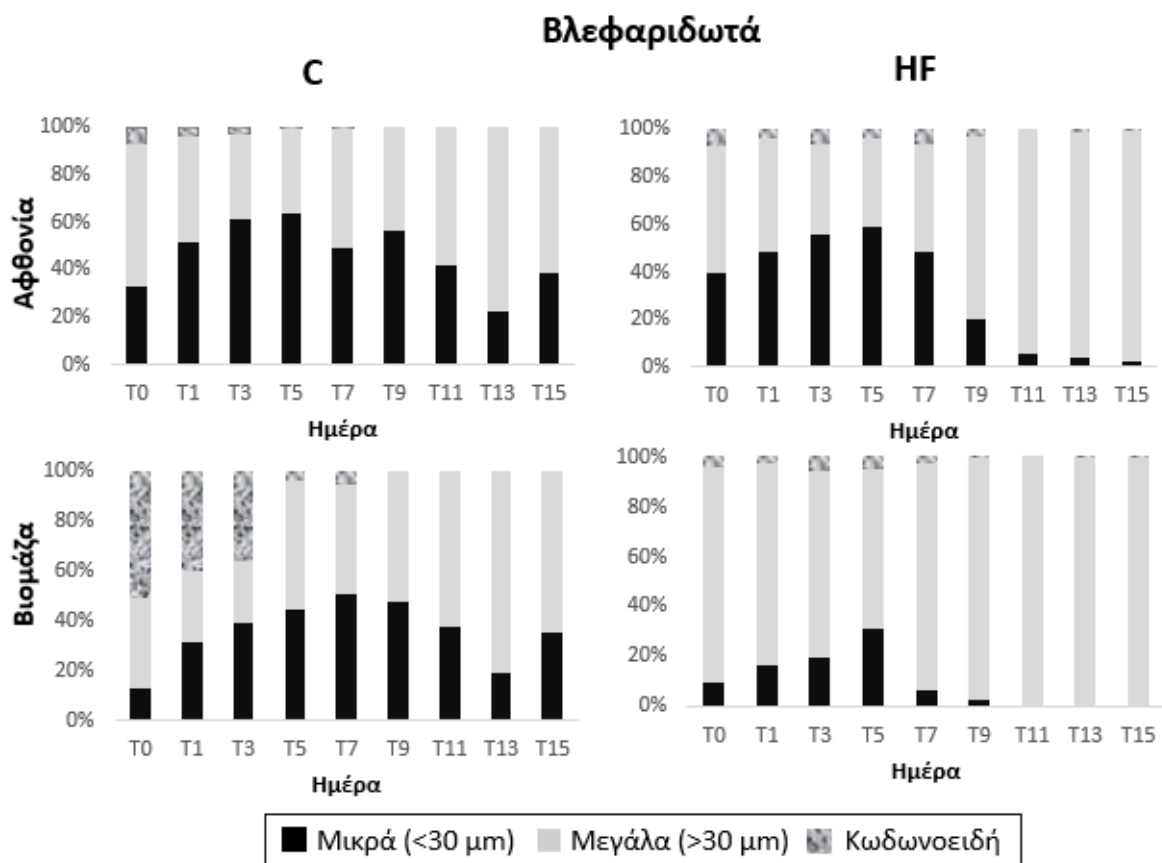
Αντίθετα με την αφθονία, μεγαλύτερη συνεισφορά στη βιομάζα είχαν τα μεγάλα σε μέγεθος δινομαστιγωτά (>30 μm) (Εικόνα 21). Όλες τις μέρες του πειράματος το ποσοστό αφθονίας του ήταν και στις δύο συνθήκες πάνω από 88% και το μέγιστο της βιομάζας τους καταγράφηκε και στις δύο συνθήκες την ημέρα 0, ενώ το μικρότερο ποσοστό την ημέρα 13. Και στις δύο συνθήκες παρατηρήθηκε σταδιακή μικρή μείωση της συνεισφοράς των μεγάλων δινομαστιγωτών στη βιομάζα.



Εικόνα 21: Μεταβολή της % σύνθεσης της αφθονίας και βιομάζας των μικρών (<30 μm) και μεγάλων (>30 μm) δινομαστιγωτών στις δύο πειραματικές συνθήκες (C και HF) κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Η συνεισφορά των μικρών ειδών (<30μm) στην αφθονία των βλεφαριδωτών στον μάρτυρα C και στη συνθήκη HF, αυξήθηκε τις πρώτες μέρες του πειράματος και ήταν μέγιστη την ημέρα 5 (Εικόνα 22). Στη συνέχεια, στον μάρτυρα C μειώθηκε μέχρι την ημέρα 13 και την ημέρα 15 καταγράφηκε ξανά αύξηση. Ωστόσο, στη συνθήκη HF μειώθηκε έως ότου σχεδόν μηδενίστηκε. Όσον αφορά τα Κωδωνοειδή (Tintinnids), αυτά είχαν πολύ μικρή συνεισφορά στην αφθονία συγκριτικά με τις άλλες δύο ομάδες, τόσο στον μάρτυρα C όσο και στη συνθήκη HF.

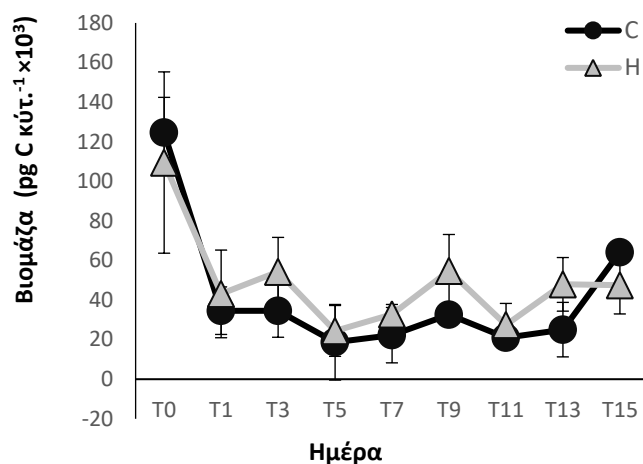
Αναφορικά με τη βιομάζα, στους μεσοκόσμους του μάρτυρα C, η συνεισφορά των μικρών βλεφαριδωτών (<30 μm) αρχικά αυξήθηκε και παρουσίασε μέγιστο την ημέρα 7, στη συνέχεια το ποσοστό τους μειώθηκε και την ημέρα 15 καταγράφηκε ξανά αύξηση (Εικόνα 22). Στη συνθήκη HF, τα ποσοστά βιομάζας των μικρών βλεφαριδωτών ήταν μικρότερα σε σχέση με τον μάρτυρα C. Στη συνθήκη HF, η συνεισφορά στη βιομάζα των μικρών βλεφαριδωτών αρχικά αυξήθηκε και παρουσίασε μέγιστο την ημέρα 5, στη συνέχεια το ποσοστό τους μειώθηκε και μηδενίστηκε από την ημέρα 11 μέχρι το τέλος του πειράματος. Όσον αφορά τα Tintinnids, το ποσοστό συμμετοχής τους στη συνολική βιομάζα ήταν μεγαλύτερο στον μάρτυρα C σε σχέση με τη συνθήκη HF, ειδικά μέχρι την ημέρα 7, στη συνέχεια μηδενίστηκε ενώ στη συνθήκη HF τις ημέρες 11,13 και 15 δεν συμμετείχαν καθόλου.



Εικόνα 22: Μεταβολή της % σύνθεσης της αφθονίας και βιομάζας των μικρών (<30 μm) και μεγάλων (>30 μm) βλεφαριδωτών και Κωδωνοειδών (Tintinnids) στις δύο πειραματικές συνθήκες (C και HF) κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Η βιομάζα των διατόμων μειώθηκε απότομα την πρώτη ημέρα του πειράματος και στη συνέχεια παρουσίασε μικρή αύξηση και στις δύο πειραματικές συνθήκες. Σε αντίθεση με την αφθονία

(Εικόνα 19-A) που ήταν μικρότερη, η βιομάζα των διατόμων στη συνθήκη HF ήταν λίγο μεγαλύτερη από τον μάρτυρα τις περισσότερες μέρες του πειράματος.

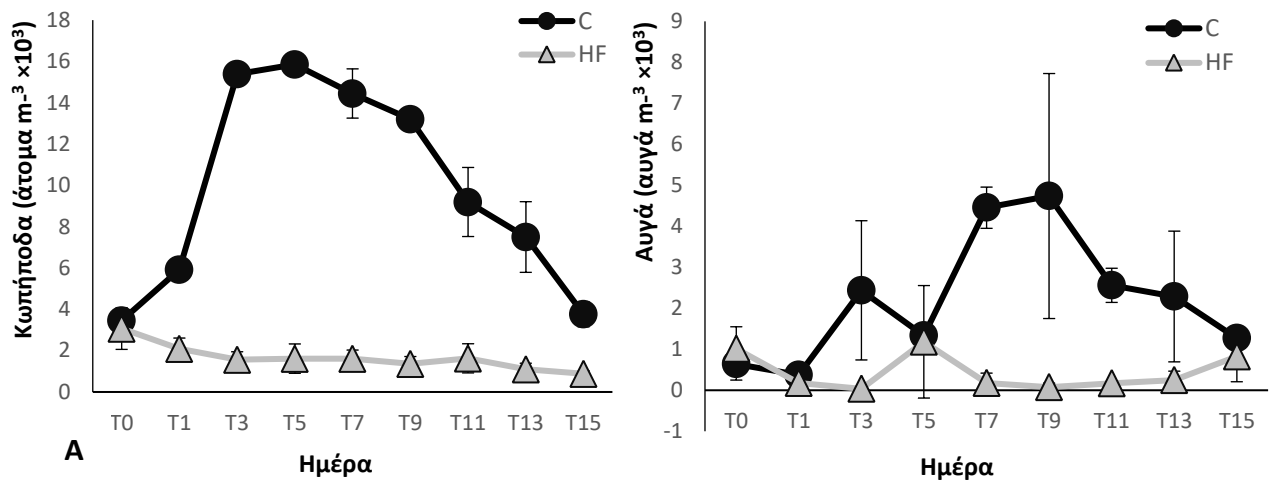


Εικόνα 23: Μεταβολή της βιομάζας των διατόμων στις δύο πειραματικές συνθήκες (C και HF) κατά τη διάρκεια του πειράματος. Για λεπτομέρειες, βλέπε Εικόνα 9.

4.8 Ζωοπλαγκτόν

Η αφθονία των κωπηπόδων παρουσίασε μεγάλη διαφορά στις δύο συνθήκες και ήταν στατιστικά μεγαλύτερη στον μάρτυρα C, όλες τις μέρες ($F= 4,507$ και $p<0,01$, Εικόνα 24-A). Στον μάρτυρα C αυξήθηκε απότομα τις πρώτες δύο ημέρες του πειράματος, εμφάνισε μέγιστο την ημέρα 5 (15855 άτομα m^{-3}) και στη συνέχεια μειώθηκε σταδιακά. Αντίθετα, η αφθονία των κωπηπόδων στη συνθήκη HF ξεκίνησε να μειώνεται αμέσως μετά την έναρξη του πειράματος και σχεδόν μηδενίστηκε μέχρι το τέλος του.

Ο αριθμός των αυγών των κωπηπόδων ήταν μεγαλύτερος στον μάρτυρα C και παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά τις ημέρες 7 και 9, που σημειώθηκε ο μέγιστος αριθμός, 4739 αυγά m^{-3} ($p<0,01$, Εικόνα 24-B). Ωστόσο, ο αριθμός των αυγών στη συνθήκη HF μειώθηκε αμέσως μετά την έναρξη του πειράματος, στη συνέχεια αυξήθηκε την ημέρα 5, μέγιστο 1183 αυγά m^{-3} , και στη συνέχεια μειώθηκε ξανά, παραμένοντας σε χαμηλά επίπεδα, μέχρι το τέλος του πειράματος.



Εικόνα 24: Μεταβολή της αφθονίας των κωπήπόδων (A) και των αυγών τους (B) στις δύο πειραματικές συνθήκες (C και HF) κατά τη διάρκεια του πειράματος. Για λεπτομέρειες, βλέπε Εικόνα 9.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Θρεπτικά

Η προσθήκη του HuminFeed στο νερό αύξησε τη συγκέντρωση των ανόργανων θρεπτικών N και P από την πρώτη ημέρα. Η εισαγωγή αζώτου και φωσφόρου στο σύστημα ήταν αναμενόμενη καθώς το σκεύασμα HuminFeed εμπεριέχει $7,8 \text{ mg g}^{-1}$ αζώτου (Meinelt et al. 2007) και $0,265 \text{ mg (mg προστιθέμενου C)}^{-1}$ (Scharnweber et al. 2021).

Το HuminFeed τόσο στην παρούσα έρευνα, όσο και στην έρευνα των Spilling (personal communication), δεν αύξησε την συγκέντρωση του διαλελυμένου οργανικού άνθρακα (DOC) από την αρχή του πειράματος, αλλά αύξησε απότομα τη συγκέντρωση του σωματιδιακού οργανικού άνθρακα (POC). Αύξηση του DOC καταγράφηκε από την ημέρα 3 και έπειτα συνεπώς δεν ήταν άμεσα διαθέσιμος για τα ετερότροφα βακτήρια. Στην παρούσα έρευνα παρατηρήθηκε πως ο DOC αν και τις περισσότερες μέρες του πειράματος είχε παρόμοια συγκέντρωση στις δύο συνθήκες, ορισμένες μέρες είχε μεγαλύτερη συγκέντρωση στη συνθήκη HF. Ωστόσο, κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε στην έρευνα των Fonsesca et al. (2021), σε αντίστοιχο πείραμα σε εύτροφη λίμνη, όπου η συγκέντρωση του DOC όλες τις μέρες του πειράματος ήταν μικρότερη στην συνθήκη που έγινε η προσθήκη του HuminFeed. Βέβαια, τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας δεν είναι άμεσα συγκρίσιμα με εκείνα των Fonsesca et al. (2021) καθώς αφορούν δύο πολύ διαφορετικά περιβάλλοντα. Για παράδειγμα, την ημέρα 0 στο παρόν πείραμα η συγκέντρωση του DOC στο νερό ήταν $2,8 \text{ mg L}^{-1}$ ενώ στο πείραμα των Fonsesca et al. (2021) ήταν $5,2 \text{ mg L}^{-1}$, δηλαδή σχεδόν διπλάσια.

5.2 Το κατώτερο τμήμα του τροφικού πλέγματος, βιομάζα και παραγωγή, ρύθμιση από τις πηγές Αυτότροφοι οργανισμοί

Η υπόθεση πως η προσθήκη HuminFeed θα μειώσει τη μέση ένταση φωτός στους μεσοκόσμους επιβεβαιώθηκε. Μείωση στην ένταση του φωτός παρατηρήθηκε και σε άλλα πειράματα μεσοκόσμων στα οποία έγινε προσθήκη HuminFeed σε συγκέντρωση 2 mg L^{-1} (Fonsesca et al. 2021, Spilling personal communication), καθώς και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (Lebret et al. 2018, Nydahl et al. 2019). Επίσης, όσον αφορά τους αυστηρά φωτο-αυτότροφους οργανισμούς, η αφθονία των κυανοβακτηρίων *Synechococcus* και των διατόμων ήταν λίγο μικρότερη στη συνθήκη HF. Η μείωση των αυτότροφων στη συνθήκη HF πιθανά δεν οφείλεται στη μείωση της συγκέντρωσης των θρεπτικών καθώς, αν και αυτά μειώνονται παραμένουν σε σχετικά υψηλά επίπεδα για το ολιγότροφο σύστημα. Είναι λοιπόν πιθανό, η μείωση της αφθονίας τους να

οφείλεται σε θήρευση, των κυανοβακτηρίων από τα ετερότροφα νανομαστιγωτά (HNF), και των διατόμων από τα δινομαστιγωτά.

Αντίθετα, η επίδραση της μείωσης του φωτός δεν ήταν τόσο ξεκάθαρη στα νανομαστιγωτά. Τα PNF (Pigmented NanoFlagellates – Αυτότροφα Νανομαστιγωτά) με μέγεθος <1μm είχαν μικρότερη αφθονία στο HF τις πρώτες μέρες του πειράματος, όμως η αφθονία τους στη συνέχεια αυξήθηκε. Ακόμα, τα PNF >1 μm δεν φαίνεται να επηρεάστηκαν από τη μείωση του φωτός καθώς η αφθονία τους ήταν μεγαλύτερη στη συνθήκη HF τις περισσότερες μέρες του πειράματος. Η μικτοτροφία (συνδυασμός φαγοτροφίας και φωτοσύνθεσης σε ένα κύτταρο) είναι συχνή στα PNF (Livanou et al. 2019), άρα είναι πιθανό η μείωση του φωτός να μην τα επηρέασε όσο έντονα επηρέασε τα κυανοβακτήρια και τα διάτομα που είναι αυστηρά αυτότροφοι οργανισμοί.

Συγκρίνοντας τη μεταβολή της συγκέντρωσης χλωροφύλλης κατά τη διάρκεια του πειράματος, παρατηρήθηκε πως τις ημέρες 2 με 6 ήταν λίγο μεγαλύτερη στη συνθήκη HF. Τις μέρες αυτές η αφθονία των κυανοβακτηρίων και των PNF <1μm ήταν μικρότερη στη συνθήκη HF. Αν και τα PNF >1 μm την ημέρα 5 είχαν μεγαλύτερη αφθονία στη συνθήκη HF, η αφθονία τους ήταν πολύ μικρή για να δικαιολογήσει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση χλωροφύλλης στη συνθήκη HF. Στη λίγο μεγαλύτερη συγκέντρωση χλωροφύλλης είναι επομένως πιθανό να συνέβαλαν τα διάτομα, των οποίων η βιομάζα ήταν λίγο μεγαλύτερη τις ημέρες εκείνες στη συνθήκη HF σε σχέση με τον μάρτυρα.

Η μείωση του φωτός που παρατηρήθηκε στη συνθήκη HF δεν είχε σημαντική επίδραση στην πρωτογενή παραγωγή. Ο Spilling (personal communication) αναφέρει πως σε παρόμοιο πείραμα μεσοκόσμων στη εύτροφη περιοχή της Βαλτικής θάλασσας, η επίδραση του χρωματισμού του νερού στην πρωτογενή παραγωγή ήταν μικρότερη από το αναμενόμενο. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζουν και οι Fonsesca et al. (2021) σε εύτροφη λίμνη. Στην παραπάνω δημοσίευση, αναφέρεται ότι η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε και η μία και μόνη προσθήκη HuminFeed πιθανόν δεν ήταν αρκετά για να επηρεάσουν σημαντικά τους αυτότροφους οργανισμούς.

Ετερότροφοι οργανισμοί

Η υπόθεση πως η προσθήκη HuminFeed θα αυξήσει την αφθονία και παραγωγή των ετερότροφων οργανισμών και ειδικά των ετερότροφων βακτηρίων επιβεβαιώθηκε. Παρατηρήθηκε πως η αφθονία των ετερότροφων βακτηρίων ήταν μεγαλύτερη στη συνθήκη HF τις πρώτες μέρες του πειράματος μέχρι την ημέρα 5, αν και αύξηση του DOC παρατηρήθηκε μετά την ημέρα 3.

Η βακτηριακή παραγωγή ήταν μεγαλύτερη στη συνθήκη HF όλες τις μέρες του πειράματος, όπως και η αφθονία των HNA (High Nucleic Acid), γεγονός που επιβεβαιώνει ότι τα HNA βακτήρια είναι υπεύθυνα για την παραγωγή. Αυξημένη βακτηριακή παραγωγή μετά την προσθήκη HuminFeed στο νερό παρατηρήθηκε και από τον Spilling (personal communication). Συνεπώς είναι λογικό να υποθέσουμε ότι τουλάχιστον ένα μέρος του HuminFeed ήταν διαθέσιμο για βακτηριακή αποσύνθεση και χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα από τα βακτήρια.

Από τον λόγο βιομάζας των ετερότροφων (HB) προς τα αυτότροφα βακτήρια (AB) στις δύο πειραματικές συνθήκες εξάγεται το συμπέρασμα πως το πικο-κλάσμα του τροφικού πλέγματος ήταν ετερότροφο. Οι αναλογίες βιομάζας δεν διέφεραν σημαντικά στις δύο πειραματικές συνθήκες, παρά την αυξημένη αφθονία των ετερότροφων βακτηρίων στη συνθήκη HF, γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στις παρόμοιες αυξομειώσεις που εμφάνισαν τα ετερότροφα και τα αυτότροφα βακτήρια κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Αν και η αφθονία των ετερότροφων βακτηρίων ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στη συνθήκη HF κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε στην αφθονία των ετερότροφων μαστιγωτών, η οποία ήταν παρόμοια στις δύο συνθήκες. Αντίθετα, αν και το νανο-κλάσμα του τροφικού πλέγματος ήταν και αυτό ετερότροφο και στις δύο συνθήκες, ο λόγος βιομάζας των ετερότροφων νανομαστιγωτών (HNF: Heterotrophic NanoFlagellates) προς των αυτότροφων νανομαστιγωτών (PNF) διέφερε αρκετά μεταξύ των δύο συνθηκών. Η μεγάλη διαφορά που παρατηρήθηκε τις ημέρες 1 έως 7 πιθανόν δεν οφείλεται στην αφθονία των ετερότροφων νανομαστιγωτών, που ήταν παρόμοια στις δύο συνθήκες, αλλά στην αφθονία των PNF <1 μm. Η αφθονία της ομάδας αυτής ήταν μικρότερη τις συγκεκριμένες ημέρες στη συνθήκη HF, αυξάνοντας τον λόγο ετερότροφων νανομαστιγωτών (HNF) προς των αυτότροφων νανομαστιγωτών (PNF) στη συνθήκη HF.

5.3 Τροφικό πλέγμα και τροφικές σχέσεις μεταξύ των μικροβιακών ομάδων οργανισμών

Η μείωση των κυανοβακτηρίων και των ετερότροφων βακτηρίων και στις δυο συνθήκες παρατηρήθηκε πιθανότατα όχι μόνο εξαιτίας της κατανάλωσης των θρεπτικών, αλλά και λόγω της αύξησης της αφθονίας των θηρευτών τους, δηλαδή των ετερότροφων νανομαστιγωτών (HNF) και μικρών βλεφαριδωτών (<30 μm). Στη συνέχεια, η αφθονία των HNF πιθανά μειώθηκε από την θήρευση που τους άσκησαν τα μεγαλύτερα σε μέγεθος βλεφαριδωτά (>30 μm) και τα δινομαστιγωτά. Παρατηρήθηκε πως η αύξηση της αφθονίας των μεγάλων βλεφαριδωτών ακολούθησε χρονικά την αύξηση της αφθονίας των HNF που επικράτησαν στα νανομαστιγωτά

(έναντι των PNF) και στις δύο πειραματικές συνθήκες. Τα HNF από την ημέρα 9 και έπειτα εμφάνισαν μία μικρή αύξηση της αφθονίας τους, πιθανά καθώς η αφθονία των βλεφαριδωτών μειώθηκε και στις δύο συνθήκες και δεν υφίσταντο τόσο έντονη θηρευτική πίεση. Ωστόσο, η μείωση της θήρευσης δεν ήταν αρκετή για να φτάσουν την προηγούμενη μέγιστη αφθονία τους, πιθανόν λόγω της μειωμένης αφθονίας της λείας τους.

Η αφθονία των δινομαστιγωτών, παρουσίασε αρχικά μείωση στις δύο πειραματικές συνθήκες, αλλά από την ημέρα 3 και μετά, η αφθονία τους αυξήθηκε στη συνθήκη HF ενώ συνέχισε να μειώνεται στον μάρτυρα C. Η μεγαλύτερη αφθονία των δινομαστιγωτών στη συνθήκη HF μπορεί να οφείλεται στην επικράτηση μικτότροφων ειδών που δεν επηρεάζονται έντονα από τη μείωση του φωτός. Ακόμα, η αυξημένη αυτή αφθονία μπορεί να οφείλεται στην πολύ χαμηλή αφθονία του ζωοπλαγκτού στη συνθήκη αυτή. Τα κωπήποδα, βασική συνιστώσα του μεσοζωοπλαγκτού, αποτελούν τους κύριους θηρευτές των δινομαστιγωτών. Αντίστοιχα, η μείωση των δινομαστιγωτών στον μάρτυρα C είναι πιθανόν να οφείλεται στην έντονη θηρευτική πίεση που άσκησαν τα κωπήποδα, των οποίων η αφθονία ήταν μεγαλύτερη, σε σχέση με τη συνθήκη HF.

Η μείωση της αφθονίας των βλεφαριδωτών στον μάρτυρα C επίσης μπορεί να εξηγηθεί με βάση τη θηρευτική πίεση που τους άσκησαν τα κωπήποδα, των οποίων η αφθονία ήταν αρκετά μεγάλη. Όσον αφορά όμως την αφθονία των βλεφαριδωτών στη συνθήκη HF, η αφθονία των κωπήποδων ήταν πολύ μικρή για να εξηγήσει τη μείωση της αφθονίας των βλεφαριδωτών μέσω της θήρευσης. Επίσης, η αφθονία των νανομαστιγωτών, που αποτελούν λεία των βλεφαριδωτών, παρουσίασε αύξηση τις πρώτες μέρες του πειράματος, γεγονός που επίσης δεν δικαιολογεί τη μείωση των βλεφαριδωτών. Απότομη μείωση της αφθονίας των βλεφαριδωτών καταγράφηκε αμέσως μετά την προσθήκη HuminFeed στο νερό, συνεπώς είναι πιθανόν η προσθήκη του HuminFeed στο νερό να ευθύνεται για τη μείωση των πληθυσμών των βλεφαριδωτών. Τα βλεφαριδωτά στη συνθήκη HF, εκτός από πολύ μικρή αφθονία, παρουσίασαν, στην πλειονότητα τους, την αλλοιωμένη μορφή της Εικόνας 20. Είναι πιθανό λοιπόν, η πραγματική αφθονία τους να είναι ακόμα μικρότερη από αυτή που παρουσιάζεται στο διάγραμμα καθώς δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι για τον βαθμό λειτουργικότητάς τους, όταν παρουσιάζουν αυτή την αλλοιωμένη εικόνα.

Τα κωπήποδα, που αποτέλεσαν την κύρια ομάδα του μεσοζωοπλαγκτού, επηρεάστηκαν αρνητικά από την προσθήκη του HuminFeed στο νερό. Η ίδια παρατήρηση έγινε και από τους Scharnweber et al. (2021), σε πείραμα μεσοκόσμων σε μεσο-εύτροφη λίμνη.

Σε γενικές γραμμές, η προσθήκη HuminFeed προκάλεσε χρωματισμό του νερού και μείωση του φωτός προκαλώντας μείωση της αφθονίας των αυστηρά αυτότροφων οργανισμών (κυανοβακτήρια *Synechococcus* και διάτομα). Ωστόσο, δεν καταγράφηκε ξεκάθαρη επίδραση στα νανομαστιγωτά πιθανόν λόγω της μικτοτροφίας που παρατηρείται συχνά στη συγκεκριμένη ομάδα. Επιπλέον το HuminFeed αποτέλεσε πηγή DOC για τη βακτηριακή κοινότητα. Αν και η αφθονία των βακτηριών ήταν μεγαλύτερη κυρίως τις πρώτες μέρες του πειράματος, τα HNA βακτήρια ήταν περισσότερα στη συνθήκη HF όλες τις μέρες του πειράματος, γεγονός που αντικατοπτρίζεται στην αυξημένη βακτηριακή παραγωγή. Στη συνθήκη HF, παρατηρήθηκε αυξημένη αφθονία δινομαστιγωτών, η οποία μπορεί να οφείλεται είτε σε επικράτηση μικτότροφων ειδών είτε στη μείωση της αφθονίας των θηρευτών τους, δηλαδή των κωπηπόδων. Ωστόσο, η μείωση της αφθονίας των βλεφαριδωτών που καταγράφηκε αμέσως μετά την προσθήκη HuminFeed στο νερό, πιθανόν δείχνει πως η προσθήκη του στο νερό ευθύνεται για τη μείωση των πληθυσμών και την αλλοιωμένη μορφή τους. Τέλος, το HuminFeed, φαίνεται να επηρέασε αρνητικά τα κωπήποδα.

Η χρήση ενός εμπορικά διαθέσιμου σκευάσματος για την πειραματική μίμηση του φαινομένου του χρωματισμού του νερού, κατά την εισροή διαλελυμένου οργανικού υλικού από τη χέρσο στο υδάτινο περιβάλλον, έχει το μεγάλο πλεονέκτημα ότι μπορεί να επιτρέψει τη μελέτη του φαινομένου σε διαφορετικά περιβάλλοντα και σε διαφορετικά γεωγραφικά πλάτη. Ωστόσο, δεν είναι άμεσα συγκρίσιμο με τις φυσικές χουμικές ενώσεις, οι οποίες εισέρχονται στο νερό στην πραγματικότητα. Συνεπώς για την πλήρη διερεύνηση του φαινομένου θα ήταν ενδιαφέρουσα η μελέτη της επίδρασης της προσθήκης φυσικής οργανικής ύλης από το κοντινό περιβάλλον του συστήματος που μελετάται.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ask, J., Karlsson, J., Persson, L., Ask, P., Byström, P., & Jansson, M. (2009). Terrestrial organic matter and light penetration: Effects on bacterial and primary production in lakes. *Limnology and Oceanography*, 54(6), 2034-2040.
- 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.
- Biddanda, B., Ogdahl, M., & Cotner, J. (2001). Dominance of bacterial metabolism in oligotrophic relative to eutrophic waters. *Limnology and oceanography*, 46(3), 730-739.
- Bolhàr-Nordenkamp, H. R., & Öquist, G. (1993). Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In *Photosynthesis and production in a changing environment*. Springer, 193-206.
- Caron, D. A., Dam, H. G., Kremer, P., Lessard, E. J., Madin, L. P., Malone, T. C., ... & Youngbluth, M. J. (1995). The contribution of microorganisms to particulate carbon and nitrogen in surface waters of the Sargasso Sea near Bermuda. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 42(6), 943-972.
- Coll, M., Piroddi, C., Steenbeek, J., Kaschner, K., Lasram, F. B. R., Aguzzi, J., ... & Voultsiadou, E. (2010). The biodiversity of the Mediterranean Sea: estimates, patterns, and threats. *PLOS One*, 5(8), 11842.
- Crane, K. W., & Grover, J. P. (2010). Coexistence of mixotrophs, autotrophs, and heterotrophs in planktonic microbial communities. *Journal of Theoretical Biology*, 262(3), 517-527.
- Davidson, K., Roberts, E. C., & Gilpin, L. C. (2002). The relationship between carbon and biovolume in marine microbial mesocosms under different nutrient regimes. *European Journal of Phycology*, 37(4), 501-507.
- Flynn, K. J., Stoecker, D. K., Mitra, A., Raven, J. A., Glibert, P. M., Hansen, P. J., ... & Burkholder, J. M. (2013). Misuse of the phytoplankton–zooplankton dichotomy: the need to assign organisms as mixotrophs within plankton functional types. *Journal of Plankton Research*, 35(1), 3-11.

- Fonseca, B. M., Levi, E. E., Jensen, L. W., Graeber, D., Søndergaard, M., Lauridsen, T. L., ... & Davidson, T. A. (2022). Effects of DOC addition from different sources on phytoplankton community in a temperate eutrophic lake: An experimental study exploring lake compartments. *Science of The Total Environment*, 803, 150049.
- Graneli, W. (2012). Brownification of lakes. *Encyclopedia of lakes and reservoirs*, 117-120.
- Hedges, J. I., & Stern, J. H. (1984). Carbon and nitrogen determinations of carbonate-containing solids. *Limnology and oceanography*, 29(3), 657-663.
- Holm-Hansen, O., Lorenzen, C. J., Holmes, R. W., & Strickland, J. D. (1965). Fluorometric determination of chlorophyll. *ICES Journal of Marine Science*, 30(1), 3-15.
- Ivančič, I., & Degobbis, D. (1984). An optimal manual procedure for ammonia analysis in natural waters by the indophenol blue method. *Water research*, 18(9), 1143-1147.
- Jones, R. I. (2000). Mixotrophy in planktonic protists: an overview. *Freshwater biology*, 45(2), 219-226.
- Kana, T. M., & Glibert, P. M. (1987). Effect of irradiances up to 2000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ on marine *Synechococcus* WH7803—I. Growth, pigmentation, and cell composition. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 34(4), 479-495.
- Kapuscinski, J. (1995). DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & histochemistry*, 70(5), 220-233.
- Kirchman, D. L., Newell, S. Y., and Hodson, R. E. (1986). Incorporation versus biosynthesis of leucine: implications for measuring rates of protein synthesis and biomass production by bacteria in marine systems. *Marine Ecology Progress Series*, 32, 47-59.
- Kritzberg, E. S., & Ekström, S. M. (2012). Increasing iron concentrations in surface waters—a factor behind brownification?. *Biogeosciences*, 9(4), 1465-1478.
- Lebaron, P., Servais, P., Agogué, H., Courties, C., & Joux, F. (2001). Does the high nucleic acid content of individual bacterial cells allow us to discriminate between active cells and inactive cells in aquatic systems?. *Applied and environmental microbiology*, 67(4), 1775-1782.

- Lebret, K., Langenheder, S., Colinas, N., Östman, Ö., & Lindström, E. S. (2018). Increased water colour affects freshwater plankton communities in a mesocosm study. *Aquatic microbial ecology*, 81(1), 1-17.
- Lee, S., & Fuhrman, J. A. (1987). Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. *Applied and environmental microbiology*, 53(6), 1298-1303.
- Livanou, E., Lagaria, A., Santi, I., Mandalakis, M., Pavlidou, A., Lika, K., & Psarra, S. (2019). Pigmented and heterotrophic nanoflagellates: Abundance and grazing on prokaryotic picoplankton in the ultra-oligotrophic Eastern Mediterranean Sea. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 164, 100-111.
- Marie, D., Simon, N., Guillou, L., Partensky, F., & Vaulot, D. (2000). Flow cytometry analysis of marine picoplankton. *In Living Color*, 421-454.
- Meinelt, T., Paul, A., Phan, T. M., Zwirnmann, E., Krüger, A., Wienke, A., & Steinberg, C. E. (2007). Reduction in vegetative growth of the water mold *Saprolegnia parasitica* (Coker) by humic substance of different qualities. *Aquatic Toxicology*, 83(2), 93-103.
- Menden-Deuer, S., & Lessard, E. J. (2000). Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. *Limnology and oceanography*, 45(3), 569-579.
- Nydahl, A. C., Wallin, M. B., Tranvik, L. J., Hiller, C., Attermeyer, K., Garrison, J. A., ... & Weyhenmeyer, G. A. (2019). Colored organic matter increases CO₂ in meso-eutrophic lake water through altered light climate and acidity. *Limnology and Oceanography*, 64(2), 744-756.
- Pitta, P., Giannakourou, A., & Christaki, U. (2001). Planktonic ciliates in the oligotrophic Mediterranean Sea: longitudinal trends of standing stocks, distributions and analysis of food vacuole contents. *Aquatic Microbial Ecology*, 24(3), 297-311.
- Porter, K. G., & Feig, Y. S. (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and oceanography*, 25(5), 943-948.
- Powley, H. R., Cappellen, P. V., & Krom, M. D. (2017). Nutrient Cycling in the Mediterranean Sea: The Key to Understanding How the Unique Marine Ecosystem Functions and Responds to Anthropogenic Pressures. *Mediterranean Identities - Environment, Society, Culture*, 47-77.

- Putt, M., & Stoecker, D. K. (1989). An experimentally determined carbon: volume ratio for marine "oligotrichous" ciliates from estuarine and coastal waters. *Limnology and Oceanography*, 34(6), 1097-1103.
- Rimmelin, P., & Moutin, T. (2005). Re-examination of the MAGIC method to determine low orthophosphate concentration in seawater. *Analytica Chimica Acta*, 548(1-2), 174-182.
- Rychert, K. (2011). Dependence between volumes of protoplast and lorica in Lugol-fixed tintinnid ciliates. *Protist*, 162(2), 249-252.
- Scharnweber, K., Peura, S., Attermeyer, K., Bertilsson, S., Bolender, L., Buck, M., ... & Székely, A. J. (2021). Comprehensive analysis of chemical and biological problems associated with browning agents used in aquatic studies. *Limnology and Oceanography: Methods*, 19(12), 818-835.
- Sempéré, R., Panagiotopoulos, C., Lafont, R., Marroni, B., and Van Wambeke, F. (2002). Total organic carbon dynamics in the Aegean Sea. *Journal of Marine Systems*, 33–34, 355–364.
- 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.
- Smith, D. C., & Azam, F. (1992). A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in seawater using ³H-leucine. *Marine Microbial Food Web*, 6(2), 107-114.
- Strickland, J. D., and Parsons, T. R. (1972). A practical handbook of seawater analysis. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 167, 71–76.
- Thingstad, T. F., Krom, M. D., Mantoura, R. F. C., Flaten, G. F., Groom, S., Herut, B., ... & Zohary, T. (2005). Nature of phosphorus limitation in the ultraoligotrophic eastern Mediterranean. *Science*, 309(5737), 1068-1071.
- Utermöhl, H. (1958). Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton-methodik: Mit 1 Tabelle und 15 abbildungen im Text und auf 1 Tafel. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Mitteilungen*, 9(1), 1-38.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1. Παρουσία/απουσία των γενών των 3 ομάδων του μικροπλαγκτού ανά ημέρα στον μάρτυρα C.

		T0	T1	T3	T5	T7	T9	T11	T13	T15
ΔΙΝΟΜΑΣΤΙΓΩΤΑ	<i>Gymnodiniales (<10μm)</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Gymnodiniales (>10μm)</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Peridinium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Protoperidinium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Podolampas</i>		+		+					
	<i>Prorocentrum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Dinophysis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Oxytoxum</i>	+		+	+		+			
	<i>Corythodinium</i>		+		+	+		+	+	
	<i>Noctiluca</i>		+	+	+					
	<i>Gonyaulax</i>	+	+		+	+		+		+
	<i>Ceratium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	'Round' Dinoflagellates spp.	+	+	+	+	+	+	+		+
ΔΙΑΤΟΜΑ	<i>Fragilariopsis</i>								+	
	<i>Pleurosigma</i>		+						+	+
	<i>Rhizosolenia</i>	+		+	+		+		+	+
	<i>Leptocylindrus</i>	+			+	+	+	+	+	+
	<i>Licmophora</i>	+	+	+	+		+			+
	<i>Thalassiosira</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Nitzschia</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Pseudonitzschia</i>	+	+	+			+		+	+
	<i>Navicula</i>	+	+		+	+			+	+
	<i>Bacteriastrum</i>	+							+	+
	<i>Chaetoceros</i>	+								
	<i>Thalassionema</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Hemiaulus</i>	+	+	+						
	<i>Coscinodiscus</i>							+		+
ΒΛΕΦΑΡΙΔΩΤΑ	Tintinnids	+	+	+	+	+	+			
	<i>Laboea</i>				+					
	<i>Strobilidium (<30μm)</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Strobilidium (>30μm)</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Lohmaniella</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Mesodinium</i>	+								
	<i>Mesodinium pulex</i>	+	+		+	+	+		+	+
	<i>Strombidium (<30μm)</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Strombidium (>30μm)</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Balanion</i>	+	+	+	+	+	+	+		+
	<i>Strombidinopsis</i>			+	+	+	+	+		
	<i>Tontonia</i>	+		+						
	<i>Tiarina</i>	+		+		+			+	
Other	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Πίνακας 2. Παρουσία/απουσία των γενών των 3 ομάδων του μικροπλαγκτού ανά ημέρα στη συνθήκη HF.

		T0	T1	T3	T5	T7	T9	T11	T13	T15
ΔΙΝΟΜΑΣΤΙΓΩΤΑ	<i>Gymnodiniales (<10μm)</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Gymnodiniales (>10μm)</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Peridinium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Protoperidinium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Podolampas</i>									
	<i>Prorocentrum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Dinophysis</i>	+		+	+	+	+		+	+
	<i>Oxytoxum</i>		+	+	+	+	+		+	
	<i>Corythodinium</i>		+	+	+	+	+	+		+
	<i>Noctiluca</i>		+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Gonyaulax</i>		+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Ceratium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	'Round' Dinoflagellates spp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ΔΙΑΤΟΜΑ	<i>Fragilariopsis</i>									
	<i>Pleurosigma</i>									
	<i>Rhizosolenia</i>	+	+	+		+		+	+	+
	<i>Leptocylindrus</i>	+	+	+						
	<i>Licmophora</i>	+	+	+		+	+		+	
	<i>Thalassiosira</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Nitzschia</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Pseudonitzschia</i>	+		+			+		+	+
	<i>Navicula</i>	+			+	+	+			+
	<i>Bacteriastrum</i>			+					+	+
	<i>Chaetoceros</i>	+	+				+			
	<i>Thalassionema</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Hemiaulus</i>	+	+	+			+			
	<i>Coscinodiscus</i>	+				+				
ΒΛΕΦΑΡΙΔΩΤΑ	Tintinnids	+	+	+	+	+	+		+	+
	<i>Laboea</i>		+							
	<i>Strobilidium (<30μm)</i>	+	+	+	+	+	+		+	+
	<i>Strobilidium (>30μm)</i>	+	+	+	+	+	+	+		
	<i>Lohmaniella</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	
	<i>Mesodinium</i>								+	
	<i>Mesodinium pulex</i>				+	+				
	<i>Strombidium (<30μm)</i>	+	+	+	+	+	+	+		+
	<i>Strombidium (>30μm)</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Balanion</i>	+	+	+	+	+	+	+		
	<i>Strombidinopsis</i>		+							
	<i>Tontonia</i>					+				
	<i>Tiarina</i>			+		+				
Other	+	+	+	+	+	+	+	+	+	