

Αλλαγές στις θαλάσσιες  
βακτηριακές κοινότητες  
σε συνθήκες  
εμπλουτισμού με  
θρεπτικά

Διδακτορική διατριβή  
Στέλιος Φοδελιανάκης

2014



# Περιεχόμενα

Αντί προλόγου .....	3
Περίληψη.....	6
Abstract .....	7
Κεφάλαιο Α. Εισαγωγή .....	8
Α.1. Οι θαλάσσιοι προκαρυωτικοί οργανισμοί (βακτηριοπλαγκτόν) .....	8
Α.2. Οικολογία του βακτηριοπλαγκτού .....	13
Α.3. Μέθοδοι εξέτασης των αλλαγών στη δομή και τη σύσταση των κοινοτήτων του βακτηριοπλαγκτού .....	20
Α.4. Στόχος της παρούσας εργασίας .....	29
Κεφάλαιο Β. Αλλαγές στη δομή και τη σύσταση κοινοτήτων βακτηριοπλαγκτού της στήλης του νερού στην Ανατολική Μεσόγειο μετά από προσθήκη φώσφορου σε μεσόκοσμους .....	31
Β.1. Εισαγωγή .....	31
Β.2. Υλικά και μέθοδοι .....	33
Β.3. Αποτελέσματα .....	38
Σύνοψη.....	45
Κεφάλαιο Γ. Διερεύνηση της <i>in situ</i> δομής και σύστασης των κοινοτήτων του βακτηριοπλαγκτού σε τρεις διαφορετικές περιοχές με αυξημένα θρεπτικά στην Κρήτη.....	46
Γ.1. Εισαγωγή.....	46
Γ.2. Υλικά και μέθοδοι .....	49
Γ.3. Αποτελέσματα.....	54
Σύνοψη.....	64
Κεφάλαιο Δ. Αλλαγές στη δομή και τη σύσταση των κοινοτήτων του βακτηριοπλαγκτού διαφορετικών παράκτιων ιζημάτων μετά από επώαση σε ίδιες περιβαλλοντικές συνθήκες .....	65
Δ1. Εισαγωγή .....	65
Δ.2. Υλικά και μέθοδοι.....	68
Δ.3. Αποτελέσματα .....	76
Σύνοψη.....	86
Κεφάλαιο Ε. Συζήτηση .....	87
Αναφορές .....	97

# Αντί προλόγου

---

Η ενασχόλησή μου με τη μελέτη των βακτηριακών κοινοτήτων της θάλασσας άρχισε από το μεταπτυχιακό μου. Τότε, μετά από την επιτυχή συνεργασία των εργαστηρίων Πληθυσμιακής Γενετικής και Εξέλιξης του κ. Λαδουκάκη και Θαλάσσιας Οικολογίας του κ. Καρακάση, αρχίσαμε να μπαίνουμε στο χώρο αυτό για πρώτη φορά. Με το τέλος της μεταπτυχιακής μου διατριβής το 2009, βρεθήκαμε μπροστά σε μια μοναδική ευκαιρία: μας δίνονταν η δυνατότητα να εξετάσουμε ενδιαφέροντα οικολογικά ερωτήματα τα οποία μερικώς είχαν προκύψει και από το μεταπτυχιακό μου και ήταν πολύ δύσκολο να απαντηθούν με τις κλασσικές μεθόδους μοριακής βιολογίας, με τη χρήση αλληλούχισης νέας γενιάς. Η εξέταση αυτή γινόταν τότε για πρώτη φορά εφικτή, καθώς ήταν η εποχή που στο Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών στο Ηράκλειο ολοκληρώνονταν η αγορά της πρώτης πλατφόρμας αλληλούχισης νέας γενιάς στην Ελλάδα, του 454 GS FLX της Roche.

Πήρα λοιπόν το "ρίσκο" να ξεκινήσω την έρευνα σε έναν τομέα καινοτόμο και άκρως ανταγωνιστικό, χρησιμοποιώντας τεχνολογίες αιχμής οι οποίες δεν είχαν καν δοκιμαστεί ξανά στον ελληνικό χώρο. Οι δυσκολίες που αντιμετώπισα στη διάρκεια του διδακτορικού μου ήταν αρκετές, τόσο οικονομικής όσο και επιστημονικής φύσης. Όσον αφορά την έλλειψη χρηματοδότησης, ακόμα πιστεύω ότι απλά σταθήκαμε άτυχοι με τις προτάσεις που υποβλήθηκαν. Όσον αφορά τις επιστημονικές δυσκολίες, αυτό είναι αναμενόμενο όταν κάποιος ασχολείται με κάτι καινούριο. Παρόλα αυτά, η συνεργασία μας με το ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. μου έδωσε τη δυνατότητα να ακούσω από κοντά αυτά που διάβαζα σε δημοσιεύσεις από κορυφαίους στον τομέα αυτό ερευνητές και να τα εφαρμόσω στις μελέτες της διδακτορικής μου διατριβής. Παράλληλα, το ερευνητικό grant για αλληλούχιση που πήραμε από το Joint Genome Institute του Υπουργείου Ενέργειας των ΗΠΑ μου έδωσε τη δυνατότητα να τελειώσω το διδακτορικό μου με μια μελέτη πολύ μεγαλύτερης κλίμακας από τις προηγούμενες δύο, αποτελέσματα από την οποία θέλω να πιστεύω ότι θα συνεχίσουν να δημοσιεύονται για τα επόμενα 1-2 χρόνια.

Τελειώνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους τους ανθρώπους που με βοήθησαν στη διάρκεια του διδακτορικού μου. Καταρχήν τους γονείς μου, τον αδερφό μου και την κοπέλα μου για τη υλική και ψυχολογική υποστήριξη. Είναι πολύ δύσκολο, ειδικά στις μέρες μας, να βοηθάς κάποιον να σπουδάσει χωρίς να βλέπεις χειροπιαστό

αποτέλεσμα για τρία χρόνια και παράλληλα να του δίνεις κουράγιο να συνεχίσει. Από επιστημονικής πλευράς, αρχίζοντας με τη σειρά που γνώρισα τον καθένα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Λευτέρη Ζούρο, πρώτο μου επιβλέποντα καθηγητή κατά την πτυχιακή μου εργασία, ο οποίος προσπάθησε να με μάθει να σκέφτομαι επιστημονικά και του οποίου το πάθος για την Επιστήμη θα αποτελεί πάντα πηγή έμπνευσης για μένα. Κατόπιν το Μανώλη Λαδουκάκη, επιβλέποντά μου στη μεταπτυχιακή και διδακτορική μου διατριβή, ο οποίος στάθηκε δίπλα μου από την αρχή μέχρι το τέλος, συμβουλευόντάς με για θεωρητικά και πρακτικά θέματα εντός και εκτός του εργαστηρίου ανά πάσα ώρα και στιγμή. Τα παραπάνω δύσκολα βρίσκει κανείς στον επιστημονικό χώρο. Δύσκολα επίσης βρίσκει κανείς και προσωπικότητα σαν την κ. Μαρία Δραμουντάνη, εξ Ανωγείων ορμώμενη, την οποία ευχαριστώ για όλα μα προπαντός για τη συνεχή της υπενθύμιση ότι έπρεπε να απομακρυνθώ από το χώρο του εργαστηρίου το δυνατόν συντομότερα, το οποίο και έκανα. Στη συνέχεια τον κ. Γιάννη Καρακάση, από τον οποίο έμαθα να βλέπω πολυδιάστατα, μέσα από το πρίσμα της Οικολογίας, τα επιστημονικά δεδομένα και αποτελέσματα κι οποίος προσπάθησε να με μάθει να σκέφτομαι πάντα "στατιστικώς ορθά" (εκ του "πολιτικώς ορθά"!)). Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης και στην κ. Βιβή Πίττα, την οποία ακόμα και τώρα συνεχίζω να ταλαιπωρώ και με την οποία τις περισσότερες φορές συμφωνούμε στο ότι διαφωνούμε! Ακόμα, παρά το γεγονός ότι δεν ήταν άμεσα εμπλεκόμενος με το διδακτορικό μου, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Νίκο Καλογεράκη στου οποίου του εργαστήριο δουλεύω από το 2012 και χωρίς τη βοήθεια του οποίου τα πράγματα θα είχαν εξελιχτεί πολύ διαφορετικά. Δε νομίζω ότι έχω γνωρίσει άλλο άνθρωπο που να έχει τόσο πολύπλευρες γνώσεις και παράλληλα να είναι τόσο απλός και ευχάριστος. Πολλά ευχαριστώ επίσης στον Άρη Μουστάκα για το ενδιαφέρον και τη βοήθειά του και ελπίζω ότι η συνεργασία μας στα πλαίσια του διδακτορικού μου ήταν μόνο η αρχή μιας μεγαλύτερης και μακροχρόνιας. Ευχαριστώ, τέλος, την κυρία Κεντούρη, την κυρία Λύκα και τον κύριο Ηλιόπουλο, μέλη της επταμελούς μου εξεταστικής επιτροπής, για τη βοήθειά τους και συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή μου.

Εν κατακλείδι, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα παιδιά που με βοήθησαν στα πειράματα της διατριβής μου. Τη Ναυσικά Παπαγεωργίου με το αθάνατο Νίνα που μας πήγε παντού, το Μάνο Δοκιανάκη (έλα πού είσαι), την Ολυμπία Μανόλη, τον Arnaud

Pirault (κι ας τα έσπασε όλα), την Ειρήνη Τσικοπούλου, την Ιωάννα Καλατζή και την Αναστασία Τσιόλα.

# Περίληψη

---

Μια συχνή διαταραχή για τα θαλάσσια οικοσυστήματα είναι ο εμπλουτισμός με θρεπτικά. Η πρόβλεψη των επιπτώσεων του εμπλουτισμού σε επίπεδο οικοσυστήματος προϋποθέτει την κατανόηση των οικολογικών μηχανισμών των κοινοτήτων του βακτηριοπλαγκτού, λόγω της μεγάλης τους ικανότητας να απορροφούν θρεπτικά. Ο στόχος της παρούσας διατριβής ήταν να εξεταστούν αλλαγές στη δομή και στη σύσταση των κοινοτήτων του βακτηριοπλαγκτού της στήλης του νερού και του ιζήματος σε συνθήκες εμπλουτισμού με θρεπτικά. Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκαν τρεις μελέτες: δύο σε ελεγχόμενες πειραματικές συνθήκες και μία μελέτη εξέτασης των αλλαγών στο πεδίο (*in situ*). Στις δυο από τις τρεις μελέτες εξετάστηκαν οι αλλαγές στις κοινότητες της στήλης του νερού, μετά από προσθήκη ανόργανου φώσφορου και σε περιοχές με αυξημένα θρεπτικά, αντίστοιχα. Στην τρίτη μελέτη εξετάστηκαν οι αλλαγές στις κοινότητες του επιφανειακού ιζήματος της παράκτιας ζώνης με και χωρίς προσθήκη οργανικής ύλης και παροχής αερισμού στη στήλη του νερού. Τα κύρια συμπεράσματα από τα αποτελέσματα της διατριβής ήταν ότι:

α) Οι κοινότητες της στήλης του νερού στην Ανατολική Μεσόγειο, παρόλο που η βιομάζα και η παραγωγικότητά τους περιορίζεται από το φώσφορο, παρουσιάζουν μεγάλη ανθεκτικότητα στην προσθήκη φώσφορου, τουλάχιστον βραχυπρόθεσμα.

β) Πέντε ταξινομικές ομάδες, με μεγάλη αφθονία, παρουσίασαν παρόμοιο πρότυπο αλλαγής στις συχνότητές τους σε τρεις περιοχές εμπλουτισμένες με θρεπτικά. Οι ομάδες αυτές θα μπορούσαν πιθανώς να χρησιμοποιηθούν σαν οικολογικοί δείκτες για την παρακολούθηση του εμπλουτισμού με θρεπτικά στη στήλη του νερού της θάλασσας.

γ) Μετά από επώαση υπό συνθήκες οργανικού εμπλουτισμού, κοινότητες του ιζήματος από διαφορετικές περιοχές ομαδοποιήθηκαν με βάση τις συνθήκες επώασης κι όχι την περιοχή προέλευσης. Το φαινόμενο αυτό πραγματοποιήθηκε ταχύτερα για δυο περιοχές στις οποίες το ίζημα αρχικά είχε υψηλότερο ποσοστό οργανικής ύλης και βακτηριακές κοινότητες με μικρότερη ποικιλότητα. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν έμμεσα τη θεωρία του Baas-Becking ότι "τα πάντα είναι παντού αλλά το περιβάλλον επιλέγει" και τη θετική συσχέτιση μεταξύ ποικιλότητας και σταθερότητας των κοινοτήτων.

# Abstract

---

Nutrient enrichment is a common source of disturbance for marine ecosystems. A prerequisite for the prediction of the effects of nutrient enrichment at the ecosystem level is the understanding of the ecological mechanisms governing bacterioplankton communities, due to their high affinity with nutrients. The aim of this thesis was to examine changes in the composition and structure of bacterioplankton communities of the water column and coastal sediment under nutrient enrichment. Three studies were conducted for that purpose: two in closed experimental conditions and one examining changes *in situ*. In the first two studies, changes in the water column bacterioplankton communities were examined after P addition and in nutrient enriched habitats, respectively. In the third study, changes in the communities of coastal sediment were examined with and without the addition of organic matter and aeration of the water column. The main conclusions from the results of this thesis were:

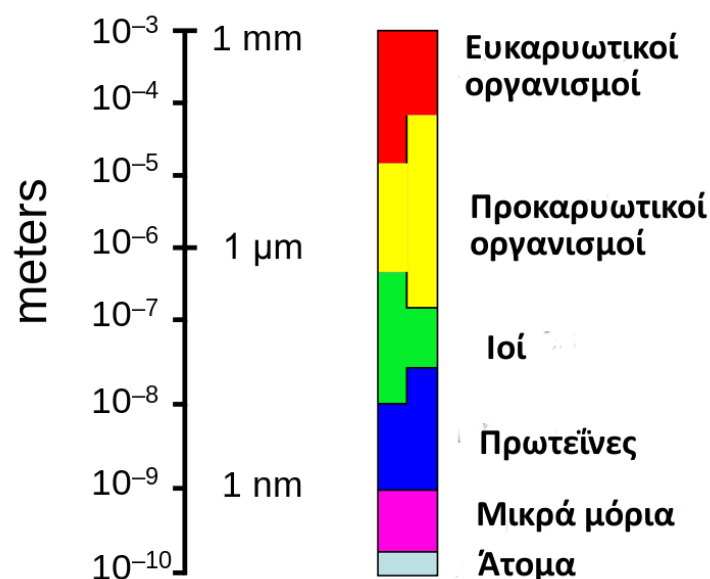
- a) Bacterioplankton communities of the Eastern Mediterranean show a high degree of resistance to short-term P addition, although their biomass and production is limited by P.
- b) Five abundant taxonomic groups showed a similar pattern of change across three different nutrient enriched habitats. These groups could be potentially used as indicators for monitoring nutrient enrichment at the water column.
- c) After incubation under presence or absence of organic enrichment, sediment bacterial communities originating from different habitats clustered based on the incubation conditions rather than on the area of origin. That occurred faster for two out of the three areas, where the amount of organic matter in the sediment was initially higher and bacterial community diversity was lower. These results indirectly support the theory of Baas-Becking that "everything is everywhere but the environment selects" and the positive correlation between diversity and community stability.



# Κεφάλαιο Α. Εισαγωγή

## Α.1. Οι θαλάσσιοι προκαρυωτικοί οργανισμοί (βακτηριοπλαγκτόν)

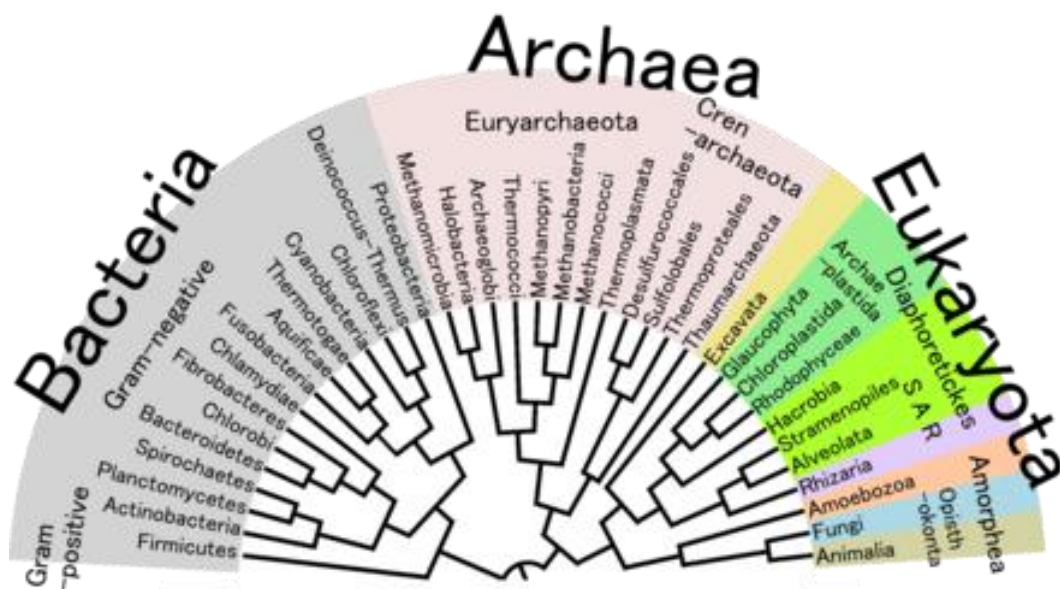
Πριν αρχίσουμε την διαδρομή μας "σε αυτόν τον κόσμο τον μικρό το μέγα", θεωρώ ότι είναι απαραίτητο να δοθούν κάποια βασικά στοιχεία βιολογίας για τους οργανισμούς εκείνους στους οποίους ο κόσμος γενικά αναφέρεται ως "μικρόβια", τους προκαρυωτικούς οργανισμούς. Προκαρυωτικοί ονομάζονται οι οργανισμοί εκείνοι που δε φέρουν πυρήνα, δηλαδή υποκυτταρική δομή μέσα στην οποία να είναι οργανωμένο το γενετικό τους υλικό. Οι οργανισμοί αυτοί είναι στην πλειονότητά τους μονοκύτταροι και έχουν παρόμοιο μέγεθος (Εικόνα Α.1.1).



**Εικόνα Α.1.1.** Το μέγεθος των προκαρυωτικών κυττάρων σε σχέση με τα κύτταρα των ευκαρυωτικών οργανισμών και τις χημικές ενώσεις (Παραλλαγή της πρωτότυπης εικόνας από: Tim Vickens, Wikimedia Commons)

Υπάρχουν όμως και προκαρυωτικοί οργανισμοί οι οποίοι μπορεί να χαρακτηριστούν ως πολυκύτταροι ανάλογα με το στάδιο του κύκλου ζωής τους, τα μυξοβακτήρια (Kaiser 2003). Οι προκαρυωτικοί οργανισμοί χωρίζονται σε δυο Βασίλεια (Kingdoms): τα Βακτήρια

(Bacteria) και τα Αρχαία (Archaea). Οι δυο αυτές κατηγορίες προκαρυωτικών οργανισμών, φέρουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά τα οποία έκαναν τους επιστήμονες μέχρι πρόσφατα να τις θεωρούν σαν μια ενιαία κατηγορία: κοινά μορφολογικά χαρακτηριστικά στο οπτικό μικροσκόπιο, παρόμοιο μέγεθος και φυσικά την απουσία πυρήνα. Τώρα όμως γνωρίζουμε ότι τα Αρχαία έχουν πολλές διαφορές από τα Βακτήρια. Ίσως η πιο σημαντική από όλες να βρίσκεται στη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταρικής μεμβράνης των Αρχαίων: το κυτταρικό τους τοίχωμα δεν περιέχει πεπτιδογλυκάνη όπως αυτό των Βακτηρίων και η κυτταρική τους μεμβράνη περιέχει κάποια χαρακτηριστικά λιπίδια που δεν περιέχονται στα Βακτήρια, γεγονός που τα κατατάσσει σε ξεχωριστό Βασίλειο, το οποίο μάλιστα είναι φυλογενετικά πλησιέστερο στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς από ότι τα Βακτήρια (Pace 2006) (Εικόνα Α.1.2).



**Εικόνα Α.1.2. Το "δέντρο της ζωής" με τα τρία διαφορετικά Βασίλεια, όπως αυτό παρουσιάζεται στην εργασία των (Ciccarelli et al. 2006).**

Η πλειονότητα του αζώτου (N) και φώσφορου (P), καθώς και περίπου το 50% του άνθρακα (C) που είναι αποθηκευμένα στους ζωντανούς οργανισμούς, περιέχονται στα Βακτήρια και στα Αρχαία (Whitman et al. 1998). Οι οργανισμοί αυτοί, μέσω του μεταβολισμού τους, επιτελούν την πλειονότητα της αποικοδόμησης της οργανικής ύλης και έχουν ενεργό ρόλο στους κύκλους των θρεπτικών στοιχείων (N, P, S) και στον κύκλο του άνθρακα (Allison and Martiny 2008). Αυτό φαίνεται απίθανο αν αναλογιστεί κανείς το πολύ μικρό τους μέγεθος, αλλά απολύτως λογικό αν ληφθούν υπ' όψιν οι τρομακτικά μεγάλοι

αριθμοί τους στη βιόσφαιρα - της τάξης του  $5 \times 10^{30}$  (Whitman et al. 1998) - και το υψηλό μεταβολικό τους δυναμικό. Το τελευταίο είναι αποτέλεσμα της μεγάλης σχέσης επιφάνειας/όγκου στα κύτταρα των προκαρυωτικών οργανισμών λόγω του μικρού τους μεγέθους: ο λόγος μειώνεται όσο αυξάνεται το μέγεθος ενός κυττάρου επειδή ο όγκος ( $4/3\pi r^3$ ) αυξάνεται περισσότερο από την επιφάνεια ( $4\pi r^2$ ). Έτσι, τα μικροσκοπικά κύτταρα των προκαρυωτικών οργανισμών είναι σε θέση να απορροφήσουν πολύ πιο αποτελεσματικά χημικές ενώσεις (π.χ. θρεπτικά) από το περιβάλλον, μέσω της κυτταρικής τους μεμβράνης, σε σχέση με μεγαλύτερους οργανισμούς.

Οι προκαρυωτικοί οργανισμοί είναι παρόντες σε όλα τα θαλάσσια οικοσυστήματα, από αρκετά χιλιόμετρα κάτω από την επιφάνεια της θάλασσας έως το πρώτο εκατοστό της στήλης του νερού. Έχουν την ικανότητα να αποικίσουν επιτυχώς οικοσυστήματα που άλλοι οργανισμοί δεν μπορούν, από πολύ ψυχρά κανάλια υφάλμυρου νερού στην Αρκτική [π.χ. (Rysgaard et al. 2008)] έως και στα -σχεδόν- βραστά νερά των υποθαλάσσιων υδροθερμικών αναβλύσεων (hydrothermal vents) [π.χ. (Huber et al. 2007)]. Οι προκαρυωτικοί οργανισμοί της θάλασσας αναφέρονται ως βακτηριοπλαγκτόν (bacterioplankton) στη διεθνή βιβλιογραφία κι αυτός ο όρος θα ακολουθηθεί στην εργασία αυτή. Η αφθονία τους στους ωκεανούς είναι αρκετά μεγάλη, τόσο ώστε η βιομάζα τους να ξεπερνά πολλές φορές τη βιομάζα των ευκαρυωτικών αυτότροφων μικροοργανισμών (φυτοπλαγκτόν), ειδικά σε πολύ олиγοτροφικές θάλασσες (Kirchman 2008). Στις περισσότερες θάλασσες, τα Βακτήρια είναι πιο πολυπληθή από τα Αρχαία, με τα τελευταία να υπερτερούν σε πληθυσμούς στις πολύ βαθιές θάλασσες (>500 m βάθος) και σε ακραίες τιμές αλατότητας (Falb et al. 2008) και θερμοκρασίας νερού (Reed et al. 2013).

Οι διεργασίες που επιτελεί το βακτηριοπλαγκτόν σε σχέση με τους κύκλους των θρεπτικών και του άνθρακα είναι αρκετές και διαφοροποιούνται ανάλογα με τον τύπο του μικροοργανισμού, το οικοσύστημα, τις περιβαλλοντικές συνθήκες, την εποχή και τη διαθεσιμότητα θρεπτικών και οργανικής ύλης. Ανάλογα λοιπόν με τη λειτουργικότητά τους σε ένα σύστημα, οι μικροοργανισμοί του βακτηριοπλαγκτού μπορεί να ανήκουν σε μια ή παραπάνω από τις παρακάτω ομάδες:

- Αυτότροφοι (φωτοαυτότροφοι και χημειοαυτότροφοι): Στην ομάδα αυτή ανήκουν οι οργανισμοί οι οποίοι είναι σε θέση να συνθέσουν οργανικό άνθρακα

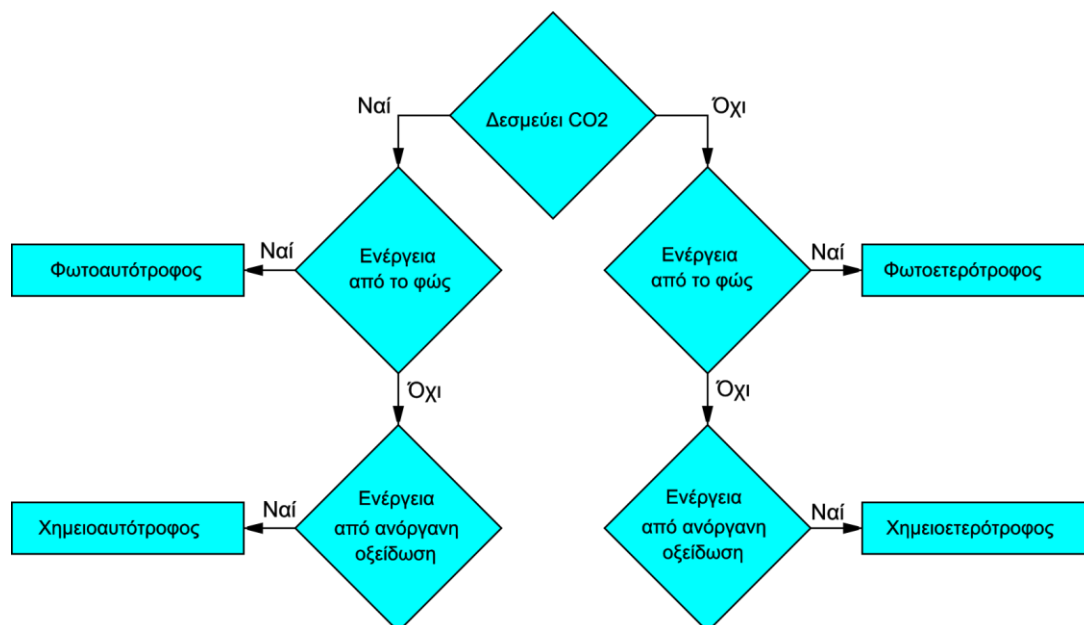
χρησιμοποιώντας το CO<sub>2</sub> και ως πηγή ενέργειας την ηλιακή ακτινοβολία (φωτοαυτότροφοι) ή τη χημική ενέργεια από οξείδωση ανόργανων ενώσεων (χημειοαυτότροφοι). Το φωτοαυτότροφο βακτηριοπλαγκτόν στις θάλασσες και τους ωκεανούς είναι κυρίως τα κυανοβακτήρια (*Cyanobacteria*), χωρίς να σημαίνει ότι όλα τα κυανοβακτήρια είναι υποχρεωτικά φωτοαυτότροφα ανά πάσα στιγμή και σε όλα τα οικοσυστήματα. Τα κυανοβακτήρια ευθύνονται για ένα πολύ μεγάλο ποσοστό της συνολικής πρωτογενούς παραγωγής στους ωκεανούς, ειδικότερα στις φτωχές σε θρεπτικά θάλασσες (Kirchman 2008). Οι κυριότερες δυο ομάδες κυανοβακτηρίων στους ωκεανούς είναι οι *Synechococcus* και *Prochlorococcus*. Οι ομάδες αυτές έχουν κύτταρα παρόμοιου μεγέθους αλλά φέρουν διαφορετικές χρωστικές (η κύρια διαφορά είναι ότι τα κύτταρα του *Prochlorococcus* δε φέρουν χλωροφύλλη-α) και έχουν διαφορετική γεωγραφική κατανομή, με τον *Prochlorococcus* να απαντάται κυρίως στα κύρια ωκεάνια κυκλωνικά συστήματα (oceanic gyres) ενώ τον *Synechococcus* σχεδόν παντού. Αξίζει να σημειωθεί εδώ ότι τα κυανοβακτήρια ευθύνονται και για το μεγαλύτερο ποσό δέσμευσης ανόργανου αζώτου από την ατμόσφαιρα στη θάλασσα, είναι δηλαδή και οι κύριοι θαλάσσιοι αζωτοδεσμευτικοί (diazotrophs) οργανισμοί. Το χημειοαυτότροφο θαλάσσιο βακτηριοπλαγκτόν αποτελείται από Βακτήρια ή Αρχαία τα οποία ζουν σε αφιλόξενα περιβάλλοντα, στα οποία συνήθως απουσιάζει το φως, όπως στις υδροθερμικές αναβλύσεις, παίζοντας το ρόλο των παραγωγών. Επιγραμματικά, οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορεί να ανήκουν στις παρακάτω κατηγορίες: μεθανογενή (methanogens), οξειδωτές του θείου (sulfur oxidizers), βακτήρια που ανάγουν το θείο (sulfur reducing bacteria-SRB), νιτροποιητές (nitrifiers), αναερόβιοι οξειδωτές του αμμωνίου (ANAerobic AMMonium OXidizers - annamox) και θερμοοξεόφιλα (thermoacidophiles). Στην παρούσα φάση δεν κρίνεται σκόπιμο να εστιάσουμε σε καθεμία από αυτές τις κατηγορίες. Στο Κεφάλαιο Δ θα δοθεί η ευκαιρία να ασχοληθούμε με κάποια από τα SRB του θαλάσσιου ιζήματος.

- Φωτοετερότροφοι: Οι φωτοετερότροφοι οργανισμοί χρησιμοποιούν την ηλιακή ακτινοβολία ως πηγή ενέργειας, αλλά δεν χρησιμοποιούν το CO<sub>2</sub> ως πηγή άνθρακα. Αντί αυτού χρησιμοποιούν οργανικές ενώσεις τις οποίες προσλαμβάνουν από το περιβάλλον, όπως υδρογονάνθρακες, αμινοξέα και

λιπαρά οξέα. Φωτοετερότροφοι της θάλασσας είναι τα βακτήρια του Φύλου *Chloroflexi* και της οικογένειας *Rhodospirillaceae* (*Proteobacteria*; *Alphaproteobacteria*) και τα κυανοβακτήρια (προαιρετικά φωτοετερότροφοι). Αν και αρχικά υπήρχε η εντύπωση ότι οι οργανισμοί αυτοί είχαν περιορισμένη κατανομή στη θάλασσα, μελέτες έδειξαν ότι είναι ευρέως διαδεδομένα και αποτελούν ~10% του βακτηριοπλαγκτού της εύφωτης ζώνης των ωκεανών (Kolber et al. 2000; Kolber et al. 2001).

- Χημειοετερότροφοι: Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι "πραγματικά" ετερότροφοι προκαρυωτικοί οργανισμοί, εκείνοι δηλαδή που χρησιμοποιούν οργανικές ενώσεις ως πηγή άνθρακα και οξυγόνο ως δέκτη ηλεκτρονίων. Οι οργανισμοί αυτοί προσλαμβάνουν το μεγαλύτερο ποσοστό της διαλυμένης οργανικής ύλης (dissolved organic matter -DOM-) στη θάλασσα λόγω του μικρού τους μεγέθους (βλέπε παραπάνω) και είναι στην πλειονότητά τους βακτήρια. Η διατριβή αυτή εξετάζει τις αλλαγές στις κοινότητες κυρίως των χημειοετερότροφων βακτηρίων και στοιχεία για τη δομή και τη σύσταση των κοινοτήτων αυτών θα δοθούν αναλυτικά στις παραγράφους Α.2 και Α.3.

Στην Εικόνα Α.1.3. παρουσιάζεται ένα διάγραμμα κατάταξης των οργανισμών ανάλογα με την ικανότητα δέσμευσης CO<sub>2</sub> και της ενεργειακής τους πηγής.



**Εικόνα Α.1.3. Διάγραμμα κατάταξης οργανισμών ανάλογα με την πηγή ενέργειας και C**

## A.2. Οικολογία του βακτηριοπλαγκτού

Η οικολογία του βακτηριοπλαγκτού είναι κομμάτι της Θαλάσσιας Μικροβιακής Οικολογίας. Τι εννοούμε όμως με τον όρο αυτόν; Κατ' αντιστοιχία με τον γενικότερο ορισμό της Οικολογίας, η Θαλάσσια Μικροβιακή Οικολογία είναι η επιστήμη η οποία μελετά τις σχέσεις μεταξύ: α) οργανισμών-περιβάλλοντος και β) οργανισμών-οργανισμών, για τα "μικρόβια" της θάλασσας. Με τον όρο "μικρόβια" εννοούμε όλους τους οργανισμούς οι οποίοι είναι μικρότεροι σε μέγεθος από 100  $\mu\text{m}$  και μπορούν να παρατηρηθούν μόνο με μικροσκόπιο. Τα θαλάσσια "μικρόβια" δεν είναι μόνο το βακτηριοπλαγκτόν, αλλά και τα Πρώτιστα, τα οποία είναι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί, αυτότροφοι ή ετερότροφοι. Οι οργανισμοί αυτοί είναι στενά συνδεδεμένοι με το βακτηριοπλαγκτόν καθώς είναι τόσο θηρευτές όσο και "τροφή" για αυτό, μέσω ενός περίπλοκου μονοπατιού ανακύκλωσης της οργανικής ύλης στους ωκεανούς το οποίο ονομάζεται "μικροβιακός βρόχος" (microbial loop) (Azam et al. 1983). Από την πρώτη αναφορά του μονοπατιού αυτού (το 1983) μέχρι και σήμερα, έχουν γραφεί δεκάδες εργασίες που έχουν να κάνουν με αυτό και η μορφή του έχει εμπλουτιστεί για να συμπεριλάβει όσο το δυνατόν περισσότερους οργανισμούς (Fenchel 2008). Παρόλο λοιπόν που το μονοπάτι αυτό είναι ένα πολύ σημαντικό κομμάτι της Θαλάσσιας Μικροβιακής Οικολογίας, σκοπίμως δεν θα γίνει εκτενής αναφορά σε αυτό αφού η παρούσα εργασία επικεντρώνεται μόνο στην εξέταση των αλλαγών στις κοινότητες του βακτηριοπλαγκτού.

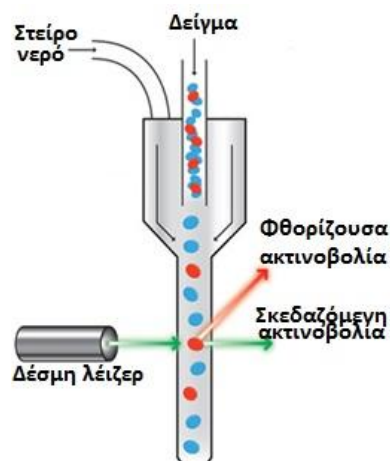
Για την αποτελεσματική περιγραφή μιας κοινότητας στην Οικολογία, απαιτούνται κάποιες παράμετροι. Όσο περισσότερες παράμετροι είναι γνωστές για μια κοινότητα, τόσο πιο αποτελεσματική είναι η περιγραφή της, ή πιο συγκεκριμένα, η εξήγηση της μεταβλητότητας μέσα σε αυτήν. Από την κλασική Οικολογία είναι γνωστό ότι αυτές οι παράμετροι μπορεί να είναι βιοτικές, δηλαδή να έχουν σχέση με τους ζωντανούς οργανισμούς της κοινότητας, ή αβιοτικές, δηλαδή να έχουν σχέση με το περιβάλλον. Παραδείγματα βιοτικών παραμέτρων είναι η βιομάζα (η μάζα των ζωντανών οργανισμών της κοινότητας) και η αφθονία (το σύνολο των ατόμων μιας κοινότητας), ενώ αβιοτικών η θερμοκρασία και οι συγκεντρώσεις διαφόρων θρεπτικών στοιχείων (N,P,S κ.τ.λ.). Εύκολα μπορεί κάποιος να καταλάβει ότι αυτές οι παράμετροι είναι πάρα πολλές. Δεν είναι λοιπόν δυνατόν όταν μελετάται μια κοινότητα να μετρώνται όλες οι βιοτικές και αβιοτικές παράμετροι. Αντί αυτού, ανάλογα με τον σκοπό της εκάστοτε μελέτης και τις

προηγούμενες μελέτες, εξετάζονται οι μεταβλητές εκείνες οι οποίες είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι σχετίζονται σημαντικά με το αντικείμενο της μελέτης μας ή αυτές που εμείς εξετάζουμε αν σχετίζονται.

Στις μελέτες που εξετάζουν τις μεταβολές των βιοτικών παραμέτρων των βακτηριοπλαγκτονικών κοινοτήτων ως αποτέλεσμα μεταβολών των αβιοτικών, οι βιοτικές μεταβλητές που συνήθως μετρώνται είναι: α) η αφθονία (abundance) β) η δραστηριότητα (ή μεταβολική δραστηριότητα) (activity or metabolic activity) και γ) η δομή και η σύσταση της κοινότητας (community structure and composition). Παρακάτω παρουσιάζονται εν συντομία οι πρώτες δυο μεταβλητές, ενώ η δομή και η σύσταση των κοινοτήτων του βακτηριοπλαγκτού θα εξεταστούν διεξοδικά εφόσον σε αυτές εστιάζει η παρούσα μελέτη.

Οι μέθοδοι εκτίμησης της αφθονίας του βακτηριοπλαγκτού στη στήλη του νερού βασίζονται στην καταμέτρηση των βακτηριακών κυττάρων ανά μονάδα όγκου. Η καταμέτρηση αυτή στα πρώτα στάδια της γινόταν με καλλιέργεια θαλασσινού νερού σε θρεπτικά υλικά και καταμέτρηση των αποικιών που αναπτύσσονταν. Η λογική της μεθόδου ήταν ότι κάθε κύτταρο στο δείγμα του νερού θα δώσει μια ξεχωριστή αποικία μετά την καλλιέργειά του, οπότε καταμετρώντας τις αποικίες κάποιος μπορεί να εκτιμήσει τον αριθμό των κυττάρων στο αρχικό δείγμα. Με τον τρόπο αυτό οι αρχικές εκτιμήσεις της αφθονίας του βακτηριοπλαγκτού κυμαίνονταν σε  $10^2$ - $10^3$  κύτταρα ανά ml. Κατά το τέλος της δεκαετίας του '70 αναπτύχθηκαν μέθοδοι χρώσης των βακτηριακών κυττάρων και παρατήρησής τους σε μικροσκόπιο φθορισμού (Zimmermann and Meyer-Reil 1974; Hobbie et al. 1977; Porter and Feig 1980), οι οποίες άλλαξαν ριζικά τις μέχρι τότε εκτιμήσεις, εκτοξεύοντας τα νούμερα της αφθονίας σε  $10^5$ - $10^6$  κύτταρα ανά ml. Αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό από το σύνολο του βακτηριοπλαγκτού στη στήλη του νερού μπορεί να καλλιεργηθεί εργαστηριακά (Staley and Konopka 1985). Η πλέον σύγχρονη τεχνική για την εκτίμηση της αφθονίας του βακτηριοπλαγκτού είναι η κυτταρομετρία ροής (flow cytometry) (Εικόνα Α.2.1.). Η τεχνική αυτή βασίζεται στην καταμέτρηση σωματιδίων σε ρέον υγρό. Η αρχή της τεχνικής στηρίζεται σε μονοχρωματική ακτινοβολία (συνήθως δέσμη λέιζερ στα 488 nm) η οποία διαπερνά μια ροή δείγματος (π.χ. θαλασσινού νερού), στο οποίο συνήθως έχει γίνει χρώση με κάποια φθορίζουσα χρωστική. Για παράδειγμα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί το SybrGreen, φθορίζουσα χρωστική που προσδένεται με το DNA των βακτηριακών κυττάρων. Ένας αριθμός ανιχνευτών

περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού: ένας σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι άλλοι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Κάθε σωματίδιο μεταξύ 0.2 και 150  $\mu\text{m}$  αιωρούμενο στο υγρό που περνά διαμέσου της δέσμης σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση. Παράλληλα, η ουσία που έχει προσδεθεί στο κύτταρο ή το DNA του κυττάρου διεγείρεται και εκπέμπει φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές δίνοντας πληροφορίες για το μέγεθος και πληροφορίες που έχουν να κάνουν με τη χρώση. Για παράδειγμα, με τη χρώση με SybrGreen μπορούμε να έχουμε μια εκτίμηση της ποσότητας του DNA σε κάθε κύτταρο, διαχωρίζοντας τα κύτταρα του βακτηριοπλαγκτού σε "μικρές" και "μεγάλης" περιεκτικότητας σε DNA (high nucleic acid -HNA- and low nucleic acid -LNA-content), κι αυτό μπορεί να μας δώσει πληροφορίες και για τη λειτουργικότητα της κοινότητας [π.χ. (Nishimura et al. 2005)]. Αξίζει να σημειωθεί ότι μέσω της τεχνικής αυτής είναι δυνατόν να καταμετρηθούν απευθείας, χωρίς χρώση, τα κύτταρα των κυανοβακτηρίων και μάλιστα να γίνει διαχωρισμός των *Synechococcus* και *Prochlorococcus* επειδή τα πρώτα εκπέμπουν ακτινοβολία στο πορτοκαλί ενώ τα δεύτερα στο ερυθρό λόγω των διαφορετικών χρωστικών που περιέχουν.



**Εικόνα Α.2.1. Διάγραμμα αρχής λειτουργίας της κυτταρομετρίας ροής. (Παραλλαγή της πρωτότυπης εικόνας από [http://www.lodgestpatrick.co.nz/news/oncology\\_success.php](http://www.lodgestpatrick.co.nz/news/oncology_success.php))**

Η δραστηριότητα, ή αλλιώς μεταβολική δραστηριότητα του βακτηριοπλαγκτού, είναι ένα μέτρο της παραγωγής της βιομάζας στο χρόνο. Οι υπάρχουσες μέθοδοι μέτρησης της βακτηριακής δραστηριότητας στηρίζονται στη μέτρηση του ρυθμού πρόσληψης



ραδιοσημασμένων υποστρωμάτων από το βακτηριοπλαγκτόν. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι είναι η μέτρηση του ρυθμού πρόσληψης σημασμένης θυμιδίνης (tritium-labeled thymidine - TdR), ενός νουκλεοτιδίου το οποίο ενσωματώνεται στο DNA και καταβολίζεται ελάχιστα, και η μέτρηση του ρυθμού πρόσληψης σημασμένης λευκίνης, ενός πολύ κοινού αμινοξέος στις πρωτεΐνες. Ο ρυθμός πρόσληψης της θυμιδίνης χρησιμοποιείται για τον καθορισμό του ρυθμού παραγωγής βιομάζας, αφού η σύνθεση νέου DNA σηματοδοτεί και τον διπλασιασμό του κυττάρου (Fuhrman and Azam 1982), ενώ ο ρυθμός πρόσληψης λευκίνης για τον καθορισμό του ρυθμού σύνθεσης πρωτεϊνών (Kirchman et al. 1985). Οι παραπάνω μέθοδοι τα τελευταία χρόνια συνδυάζονται ευρέως με τεχνικές υβριδισμού φθορισμού (fluorescent *in situ* hybridization - FISH), με τις οποίες εντοπίζονται συγκεκριμένες ταξινομικές ομάδες του βακτηριοπλαγκτού (Pernthaler et al. 2002), για να μελετηθεί η δραστηριότητα των διαφορετικών πληθυσμών της κοινότητας [π.χ. (Sebastian et al. 2012)].

Η σύσταση μιας κοινότητας αναφέρεται στον χαρακτηρισμό των διαφορετικών τύπων οργανισμών που υπάρχουν στην κοινότητα (ταξινομική σύσταση - taxonomic composition), ενώ η δομή της κοινότητας αναφέρεται στην ποικιλομορφία της κοινότητας (από πόσα διαφορετικά είδη απαρτίζεται- species richness) και στην κατανομή των μελών της κοινότητας αυτής (species distribution). Οι παράμετροι αυτές είναι δύσκολο να καθοριστούν για τις κοινότητες του βακτηριοπλαγκτού (και γενικά για τις προκαρυωτικές κοινότητες ανεξαρτήτως οικοσυστήματος) επειδή οι κοινότητες αυτές έχουν κάποιες ιδιαιτερότητες σε σχέση με τις κοινότητες των φυτών και των ζώων που εξετάζονται συνήθως από την κλασσική Οικολογία.

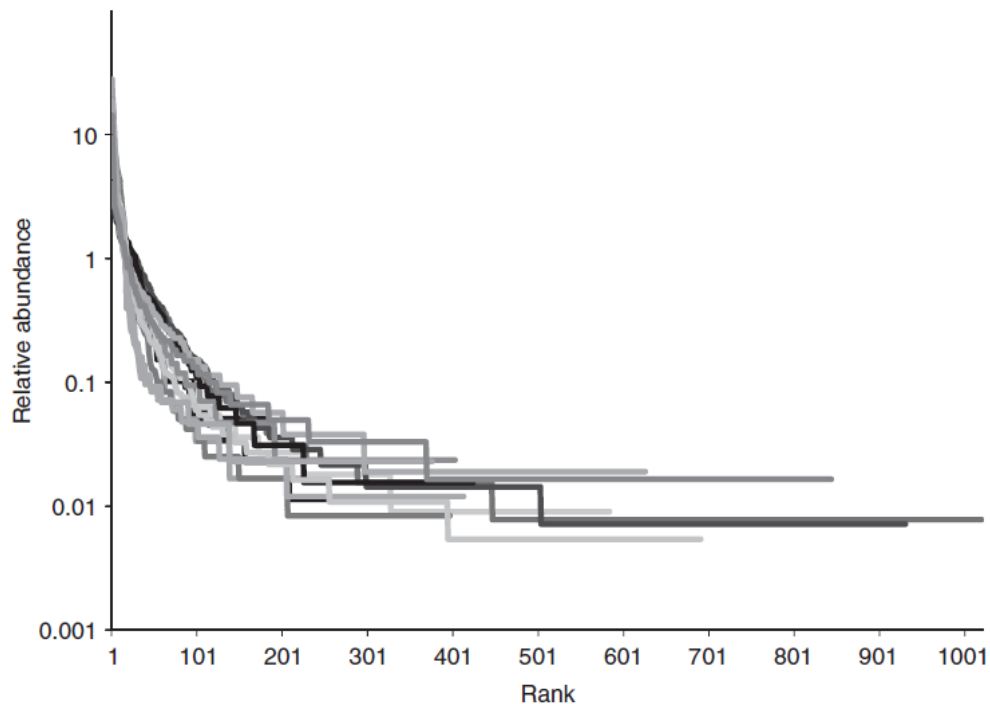
Κατ' αρχήν, σε αντιδιαστολή με τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ο ορισμός του είδους στα Βακτήρια είναι πολύ ασαφής. Ένα βακτηριακό είδος θεωρείται "μια συλλογή από στελέχη τα οποία είναι γενετικά διακριτά συγκρινόμενα με στελέχη άλλων ειδών βάσει κάποιων ανεξάρτητων χαρακτήρων και χαρακτηρίζονται από τουλάχιστον ένα διαγνωστικό φαινοτυπικό γνώρισμα" (Wayne 1988; Stackebrandt et al. 2002). Το αν πραγματικά τα βακτήρια σχηματίζουν τέτοιες διακριτές μονάδες έχει αμφισβητηθεί έντονα από πρόσφατα γενετικά δεδομένα, τα οποία έχουν αποκαλύψει ένα "γενετικό συνεχές" και μη-διακριτούς κλάδους μέσα σε αρκετά βακτηριακά Γένη (Hanage et al. 2005; Konstantinidis et al. 2006; Rusch et al. 2007). Επίσης, η οριζόντια μεταφορά γενετικού υλικού, δηλαδή η ανταλλαγή

γενετικού υλικού χωρίς αναπαραγωγή, είναι τόσο διάχυτη στους προκαρυωτικούς οργανισμούς που μπορεί να συνδέσει άμεσα γενετικά διακριτούς, κατά τα άλλα, πληθυσμούς (Lawrence 2002; Sheppard et al. 2008). Ο όρος του βακτηριακού είδους βρίσκεται διαρκώς υπό συζήτηση και γενικά αποφεύγεται να χρησιμοποιείται (Cargo-Quintero and Konstantinidis 2012). Για τους λόγους αυτούς, αλλά και για πρακτικούς λόγους που θα δούμε στη συνέχεια, αντί για "είδη" στην περιγραφή των κοινοτήτων του βακτηριοπλαγκτού τις περισσότερες φορές χρησιμοποιείται ο όρος "λειτουργική ταξινομική μονάδα" (operational taxonomic unit - OTU).

Ένας άλλος λόγος που κάνει τις κοινότητες του βακτηριοπλαγκτού δύσκολο να μελετηθούν είναι η τεράστια γενετική ποικιλομορφία τους. Όπως προαναφέρθηκε, ήδη από τα μέσα της δεκαετίας του '80, ήταν γνωστό ότι μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό (της τάξεως του 1%) από το σύνολο της κοινότητας του βακτηριοπλαγκτού ήταν σε θέση να καλλιεργηθεί εργαστηριακά σε κλασσικά πλούσια θρεπτικά μέσα (Ferguson et al. 1984). Η πρώτη αλλαγή ήρθε λίγο αργότερα, ακολουθώντας την ανάπτυξη του κλάδου της μοριακής φυλογένεσης. Μέσω της μοριακής φυλογένεσης οι οργανισμοί ταξινομούνται αναλόγως με την εξελικτική τους συσχέτιση η οποία υπολογίζεται μέσω της ομοιότητας σε επίπεδο αλληλουχίας DNA εξελικτικά "συντηρημένων" γονιδίων (δηλαδή γονιδίων που αλλάζουν με πολύ αργούς ρυθμούς στο χρόνο) (Woese 1987). Ο "βασιλιάς" των γονιδίων αυτών είναι το 16S rRNA, το γονίδιο που κωδικοποιεί την 16S υπομονάδα του ριβοσωμικού RNA στα Βακτήρια και τα Αρχαία εξαιτίας της ύπαρξης του γονιδίου αυτού σε όλους τους οργανισμούς και του υψηλού βαθμού συντήρησής του σε εξελικτικά πολύ απομακρυσμένους οργανισμούς. Η μέθοδος περιελάμβανε αρχικά την εξαγωγή DNA από καθαρά στελέχη, τον πολλαπλασιασμό με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction - PCR) του 16S rRNA, την αλληλούχιση (δηλαδή τον καθορισμό της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων) του γονιδίου και τη σύγκριση των αλληλουχιών των διαφορετικών στελεχών για τον καθορισμό των μεταξύ τους σχέσεων με βάση την ομοιότητα της αλληλουχίας. Η μεγάλη όμως αλλαγή επήλθε όταν έγινε γνωστό ότι η διαδικασία αυτή μπορεί να εφαρμοστεί και σε περιβαλλοντικά δείγματα, με απ' ευθείας εξαγωγή του DNA της κοινότητας, PCR για το 16S rRNA γονίδιο, κλωνοποίηση των πολλαπλασιασμένων μορίων σε πλασμίδια και αλληλούχισή τους (Olsen et al. 1986; Pace et al. 1986). Έτσι είναι δυνατή η απόκτηση συγκρίσιμων αλληλουχιών από βακτήρια τα

οποία δεν είναι δυνατόν να καλλιεργηθούν εργαστηριακά. Με τον τρόπο αυτό άρχισε να γίνεται μια πρώτη συστηματική καταγραφή της ποικιλότητας του βακτηριοπλαγκτού και μάλιστα δόθηκαν επιστημονικά ονόματα σε ταξινομικές ομάδες τα οποία παραμένουν μέχρι σήμερα, όπως οι ομάδες των SAR11 και SAR86 που πήραν το όνομά τους επειδή οι αλληλουχίες τους βρέθηκαν στους κλώνους με αριθμούς 11 και 86 από δυο από τις πρώτες μελέτες που έγιναν στη θάλασσα των Σαργασών (Giovannoni et al. 1990; Mullins et al. 1995). Από τις πολλές παρόμοιες μελέτες που ακολούθησαν, φαινόταν ολοένα και περισσότερο ότι ο πλούτος ειδών του βακτηριοπλαγκτού είναι τόσο μεγάλος που ήταν αδύνατον να εκτιμηθεί με τον τρόπο αυτό (Pedrós-Alió 2006). Στη συνέχεια, ο J. Craig Venter και η ομάδα του, σε μια τεράστια για την εποχή της μελέτη προσπάθησαν να αλληλουχίσουν όσο το δυνατόν περισσότερο DNA από δείγματα της στήλης του νερού, χωρίς τον ενδιάμεσο πολλαπλασιασμό με PCR (Venter et al. 2004). Από όλα τα γονίδια που αλληλουχήθηκαν όμως, μόνο 643 αλληλουχίες αντιστοιχούσαν σε 16S rRNA γονίδια (αριθμός συγκρίσιμος με αυτούς των προηγούμενων μελετών).

Το 2006 και 2007, δυο νέες μελέτες άνοιξαν νέους δρόμους για το χαρακτηρισμό της κοινότητας του βακτηριοπλαγκτού μέσω του 16S rRNA γονιδίου: ο Mitchell Sogin και η ομάδα του χρησιμοποίησαν την τότε πρωτοποριακή τεχνολογία του pyrosequencing για να αλληλουχίσουν περίπου 120.000 16S rRNA αντίγραφα από βαθιά νερά και υδροθερμικές αναβλύσεις στον Βόρειο Ατλαντικό (Sogin et al. 2006; Huber et al. 2007). Οι μελέτες αυτές, εκτός του ότι έδωσαν μια πολύ λεπτομερέστερη περιγραφή της κοινότητας του βακτηριοπλαγκτού της βαθιάς θάλασσας από τις μέχρι τότε μελέτες, αποκάλυψαν και μια επιπλέον ιδιομορφία των κοινοτήτων του βακτηριοπλαγκτού: η κατανομή των ατόμων στην κοινότητα έχει πολύ μεγάλη κυρτότητα προς τα αριστερά, πολύ μεγαλύτερη από αυτή που έδειχναν οι μέχρι τότε μελέτες βασισμένες σε clone libraries (Pedrós-Alió 2006). Δηλαδή, υπάρχουν πολύ λίγες κλάσεις (εδώ: ταξινομικές ομάδες) με πολλά άτομα και πάρα πολλές κλάσεις με πολύ λίγα άτομα (Εικόνα Α.2.2.). Μετέπειτα μελέτες, βέβαια, απέδειξαν ότι ένα μεγάλο μέρος του "σπάνιου" τμήματος της κοινότητας οφειλόταν σε "θόρυβο" που σχετίζεται με την μεθοδολογία (Huse et al. 2007; Quince et al. 2009; Kunin et al. 2010; Quince et al. 2011), χωρίς όμως αυτό να αλλάξει την εικόνα της κατανομής της κοινότητας.



**Εικόνα A.2.2.** Η κατανομή μιας τυπικής κοινότητας βακτηριοπλαγκτού. Στον οριζόντιο άξονα παρουσιάζεται ο αύξων αριθμός των παρατηρούμενων OTUs ενώ στον κάθετο άξονα η σχετική συχνότητα του κάθε OTU. Παρατηρείστε ότι στα συγκεκριμένα δείγματα, λιγότερα από 20 OTUs έχουν σχετική συχνότητα >1% ενώ η πλειονότητα κάτω από 0.1%. Από (On On et al. 2010).

Οι πρώτες αυτές εργασίες έδειξαν ότι χρειάζεται υπερβολικά μεγάλο μέγεθος δειγματοληψίας ακόμα και για τις νέας-γενιάς τεχνολογίες αλληλούχισης, της τάξεως των  $10^5$  αλληλουχιών ανά δείγμα (Quince et al. 2008), για να μπορέσει κανείς να χαρακτηρίσει πλήρως τις κοινότητες του βακτηριοπλαγκτού από ένα δείγμα νερού (~2 L). Κάτι τέτοιο θα καθιστούσε πολύ επίπονες και ακριβές τις μελέτες που στηρίζονται στην τεχνολογία αυτή και θα μείωνε σημαντικά τον αριθμό των δειγμάτων που μπορούν να αναλυθούν. Έτσι, οι σύγχρονες μελέτες εστιάζουν ως επί το πλείστον όχι στον πλήρη χαρακτηρισμό των κοινοτήτων των δειγμάτων, αλλά στην εξήγηση της μεταβλητότητας ανάμεσα σε κάποιες κοινότητες σε συνάρτηση με το χώρο, το χρόνο, την έκθεση σε κάποιου είδους πειραματική μεταχείριση ή διαταραχή.

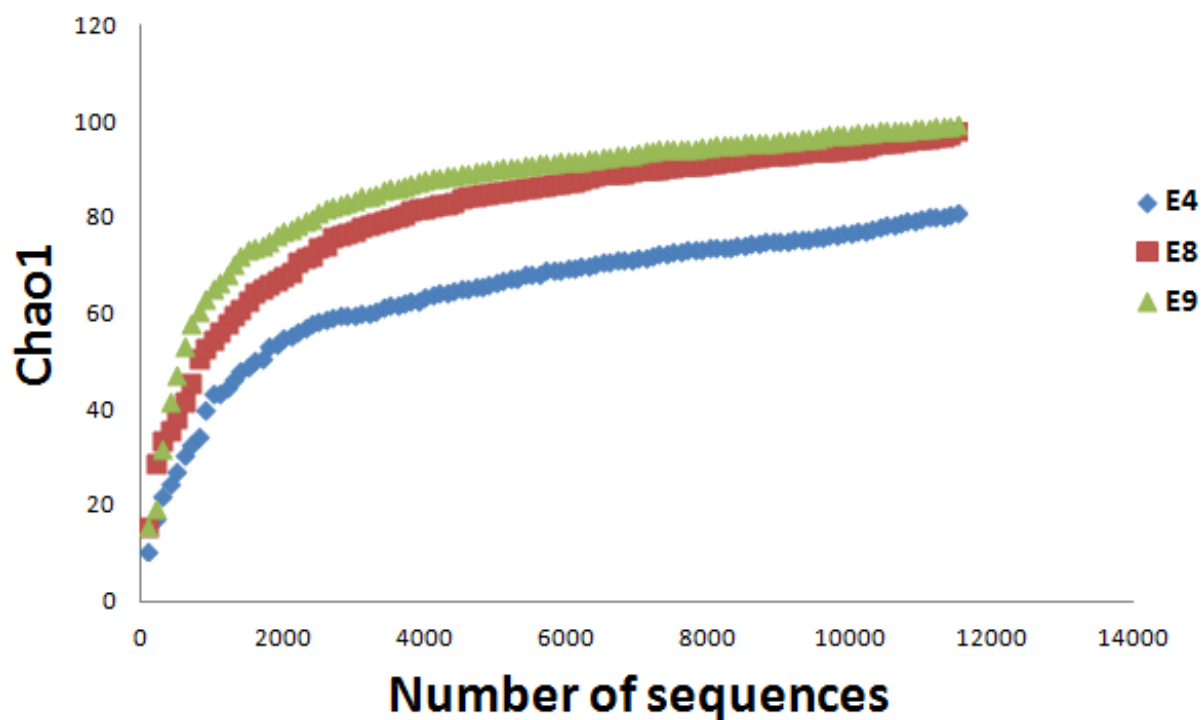
### **A.3. Μέθοδοι εξέτασης των αλλαγών στη δομή και τη σύσταση των κοινοτήτων του βακτηριοπλαγκτού**

Με δεδομένη την τεράστια ποικιλομορφία των κοινοτήτων του βακτηριοπλαγκτού όπως παρουσιάστηκε παραπάνω, για τις περισσότερες μελέτες το ζητούμενο είναι οι αλλαγές στη δομή και τη σύσταση των κοινοτήτων ως αποτέλεσμα κάποιας εξωτερικής μεταβολής κι όχι η λεπτομερής περιγραφή της κοινότητας μέχρι και την πιο σπάνια ταξινομική ομάδα. Ανάλογα όμως με την μελέτη, οι δειγματοληπτικές και στατιστικές μέθοδοι που θα χρησιμοποιηθούν πρέπει να έχουν τα κατάλληλα χαρακτηριστικά για τον επιτυχή εντοπισμό των αλλαγών αυτών (Kuczynski et al. 2010). Οι αλλαγές στις κοινότητες εξετάζονται κυρίως σε δυο επίπεδα: στο επίπεδο της α-ποικιλότητας ( $\alpha$ -diversity) και στο επίπεδο της β-ποικιλότητας ( $\beta$ -diversity).

Η α-ποικιλότητα, όρος που εισήχθη από τον Whittaker (Whittaker 1960), είναι το μέτρο της ποικιλομορφίας *μίας* κοινότητας, ανάλογα με το πώς ορίζεται αυτή η κοινότητα. Για παράδειγμα, για μια μελέτη που έγινε σε ένα σετ δεδομένων από τρία διαφορετικά οικοσυστήματα με τρία δείγματα από το κάθε οικοσύστημα, η α-ποικιλότητα μπορεί να εξεταστεί ανά δείγμα, ανά οικοσύστημα ή για ολόκληρη την μελέτη. Υπάρχουν πολλοί δείκτες μέτρησης της α-ποικιλότητας οι οποίοι στηρίζονται στην εκτίμηση του αριθμού των διαφορετικών ειδών (OTUs για τα βακτήρια) μιας κοινότητας (species richness), τις σχετικές συχνότητες των ειδών αυτών στην κοινότητα ή σε συνδυασμό των δύο. Οι δείκτες εκτίμησης του species richness (S) στηρίζονται είτε σε τυχαία δειγματοληψία ενός υποσυνόλου του δείγματος και καταγραφή των παρατηρούμενων ειδών (interpolation-based), όπως ο αριθμός των αναμενόμενων "ειδών" (ES - expected number of species) είτε σε εκτίμηση του συνολικού αριθμού των διαφορετικών "ειδών" (extrapolation-based), όπως ο δείκτης Chao1 (Chao and Shen 2003). Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι δείκτες εκτίμησης της κατανομής της κοινότητας είναι το J' (Pielou's evenness index) και το G (Gini coefficient- όπως χρησιμοποιείται από την οικολογία (Damgaard and Weiner 2000)), ενώ δύο διαδεδομένοι δείκτες που λαμβάνουν υπ' όψιν τους τόσο το species richness όσο και το evenness είναι οι δείκτες Shannon (Shannon 2001) και Simpson (Simpson 1949). Για τις περισσότερες μελέτες, οι παραπάνω κατηγορίες δεικτών δίνουν ποιοτικά όμοια αποτελέσματα (π.χ. μείωση του S μετά από κάποια πειραματική μεταχείριση), αλλά όπως είναι αναμενόμενο, οι απόλυτες τιμές μεταξύ των δεικτών διαφέρουν.

Η β-ποικιλότητα για τις κοινότητες του βακτηριοπλαγκτού αναφέρεται στην αλλαγή της δομής ή και της σύστασης μιας κοινότητας και νοείται μεταξύ *δυο* διαφορετικών κοινοτήτων (pair-wise), αν και γενικά στην Οικολογία υπάρχουν κι άλλες κατηγορίες μέτρησης της β-ποικιλότητας (Magurran 2004) οι οποίες όμως δε χρησιμοποιούνται στη μικροβιακή οικολογία κι επομένως δεν θα εξεταστούν. Το μέτρο της β-ποικιλότητας εκφράζεται συνήθως με κάποιο δείκτη ή ποσοστό ομοιότητας. Οι δείκτες μέτρησης της β-ποικιλότητας χωρίζονται σε δυο κατηγορίες: σε αυτούς που λαμβάνουν υπ' όψιν τους μόνο την παρουσία ή απουσία των "ειδών" ανάμεσα στις εξεταζόμενες κοινότητες (ποιοτικοί) και σε αυτούς που λαμβάνουν υπ' όψιν τους και τις διαφορές στη σχετική συχνότητα των ειδών μεταξύ των κοινοτήτων (ποσοτικοί). Οι πιο κοινοί ποιοτικοί είναι οι δείκτες Jaccard  $C_j = [a/(a+b+c)]$  και η βασισμένη σε αυτόν απόσταση Marczewski-Steinhaus  $C_{MS} = 1 - C_j$  και Sorensen  $C_s = 2a/(b+c)$  και η βασισμένη σε αυτόν απόσταση Bray-Curtis  $C_{BC} = 1 - C_s$ , όπου *a* ο συνολικός αριθμός "ειδών" μεταξύ των δυο κοινοτήτων, *b* ο αριθμός των "ειδών" που υπάρχουν μόνο στο πρώτο δείγμα και *c* ο αριθμός των "ειδών" που υπάρχουν μόνο στο δεύτερο δείγμα. Η σχετική συχνότητα όμως κάποιου είδους σε μια κοινότητα, η οποία δεν λαμβάνεται υπόψη από τους ποιοτικούς δείκτες, είναι πολλές φορές ενδεικτική του ρόλου του είδους στην κοινότητα αυτή. Έτσι, οι ποσοτικοί δείκτες προτιμώνται έναντι των ποιοτικών όταν η δειγματοληπτική μέθοδος επιτρέπει τη μέτρηση σχετικών συχνοτήτων. Οι πιο κοινά χρησιμοποιούμενοι ποσοτικοί δείκτες σε μελέτες βακτηριακών κοινοτήτων είναι οι ποσοτικές μορφές των δεικτών Jaccard και Bray-Curtis, ο δείκτης Morisita-Horn και ο δείκτης Gower (Kuczynski et al. 2010). Παράλληλα, σε αυτές τις μελέτες χρησιμοποιούνται και δείκτες οι οποίοι επιπλέον λαμβάνουν υπόψη τους και την φυλογενετική σύσταση των ειδών που είναι κοινά ή απουσιάζουν μεταξύ δυο κοινοτήτων για τον υπολογισμό της β-ποικιλότητας, όπως τον δείκτη Unifrac (Lozupone et al. 2011). Στα αρνητικά της χρήσης του δείκτη αυτού συγκαταλέγεται το γεγονός της μειωμένης φυλογενετικής πληροφορίας στις τεχνολογίες αλληλούχισης νέας γενιάς (δείτε παρακάτω). Όλοι οι ποσοτικοί δείκτες επηρεάζονται πολύ από τη σχετική συχνότητα του πιο πολυπληθούς είδους και για το λόγο αυτό προτείνεται ο μετασχηματισμός των συχνοτήτων, π.χ. η λογαρίθμησή τους, πριν τον υπολογισμό των δεικτών (Clarke and Warwick 2001). Όμως, υπερβολικός μετασχηματισμός μπορεί να μειώσει πολύ τη διαφοροποίηση μεταξύ των συχνοτήτων, μετατρέποντας τα δεδομένα σχεδόν σε ποιοτικά (δηλαδή παρουσία/απουσία ειδών).

Όλοι οι παραπάνω δείκτες της β-ποικιλότητας κάνουν την παραδοχή ότι οι κοινότητες που συγκρίνονται έχουν εξεταστεί *πλήρως*, δηλαδή ότι δεν υπάρχει κανένα είδος στις κοινότητες που να μην βρέθηκε στη δειγματοληψία έστω και μία φορά. Ήδη όμως είδαμε ότι αυτό, για τις μελέτες των κοινοτήτων του βακτηριοπλαγκτού, είναι πολύ δύσκολο. Επειδή λοιπόν η *πλήρης* δειγματοληψία δεν είναι τις περισσότερες φορές εφικτή, οι περισσότερες μελέτες αρκούνται στο να αποδείξουν ότι η δειγματοληψία ήταν τουλάχιστον *επαρκής*. Η επάρκεια της δειγματοληψίας στις μελέτες αυτές ελέγχεται με τα λεγόμενα "rarefaction curves", καμπύλες οι οποίες κατασκευάζονται όταν παρασταθεί γραφικά η αύξηση ενός δείκτη του species richness (π.χ. του Chao1) συναρτήσει της αύξησης του δειγματοληπτικού μεγέθους (N) (Εικόνα Α.3.1.).



**Εικόνα Α.3.1.** Η αύξηση του δείκτη Chao1 σε σχέση με την αύξηση του δειγματοληπτικού μεγέθους (εδώ: αλληλουχίες 16S rRNA) για τρεις διαφορετικές κοινότητες βακτηριοπλαγκτού που αναπτύσσονται παρουσία πετρελαίου (E4, E8 και E9). Χαρακτηριστικό γράφημα "επαρκούς" δειγματοληψίας. Από το προσωπικό μου αρχείο.

Αυτό πραγματοποιείται επιλέγοντας ολόένα και μεγαλύτερα τυχαία υποσύνολα από το στατιστικό δείγμα και υπολογίζοντας την τιμή του επιλεγμένου δείκτη σε κάθε βήμα. Η δειγματοληψία θεωρείται επαρκής όταν οι καμπύλες αρχίσουν να γίνονται παράλληλες με

τον άξονα Χ, γεγονός που υποδηλώνει ότι η τιμή του δείκτη δεν θα αυξανόταν σημαντικά αν το Ν συνέχιζε να αυξάνεται.

Η επιτυχία όμως της μελέτης μιας κοινότητας, εξαρτάται και από τον τρόπο της δειγματοληψίας. Σε αντιδιαστολή με τις περισσότερες κοινότητες των ευκαρυωτικών οργανισμών, η κατάταξη σε ταξινομικές ομάδες των ατόμων των κοινοτήτων του βακτηριοπλαγκτού δεν είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί με μακροσκοπική -ούτε καν με μικροσκοπική- παρατήρηση. Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο Α.2., η κατάταξη αυτή καθίσταται δυνατή μέσω της ομοιότητας σε επίπεδο αλληλουχίας του DNA μεταξύ των μελών μιας κοινότητας. Πέντε τεχνικές ανάλυσης που στηρίζονται σε αυτήν την μέθοδο χρησιμοποιούνται σήμερα: η ηλεκτροφόρηση σε διαβάθμιση αποδιατακτικών μέσων (Detergent Gradient Gel Electrophoresis - DGGE), η ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis), το T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) οι γονιδιωματικές βιβλιοθήκες (clone libraries) και η αλληλούχιση με τη χρήση τεχνολογίας νέας γενιάς (next generation sequencing).

Οι τεχνικές DGGE, ARISA και T-RFLP απαρτίζουν τις λεγόμενες "community fingerprinting" μεθόδους. Με τη χρήση τους, είναι δυνατή η (σχετικά) γρήγορη καταγραφή των αλλαγών στις βακτηριακές κοινότητες ανάμεσα σε αρκετά δείγματα (15-30 τη φορά ανάλογα με τον εξοπλισμό) με αρκετά μικρό κόστος (~\$10 ανά δείγμα) (van Dorst et al. 2014). Μέσω των τεχνικών αυτών δεν πραγματοποιείται φυλογενετική ταυτοποίηση των μελών της κοινότητας αλλά καταγραφή της διαφορετικότητας του 16S rRNA (για τα DGGE και T-RFLP) ή του DNA που παρεμβάλλεται μεταξύ των 16S και 23S γονιδίων (inter-transcribed region - ITS, για την ARISA) στην κοινότητα. Στις τεχνικές αυτές, τα OTUs ορίζονται ως διαφορετικές ζώνες σε πήκτωμα ακρυλαμίδης (για τα DGGE και T-RFLP) ή διακριτές κορυφές σε ηλεκτροφερόγραμμα (electropherogram - για την ARISA). Ο αριθμός των OTUs όμως που μπορεί να εντοπιστεί με τις μεθόδους αυτές είναι της τάξεως των 10-100. Οπότε, έχοντας υπόψη την τεράστια ποικιλότητα του βακτηριοπλαγκτού, είναι εμφανές ότι με τις μεθόδους αυτές μπορούν να εντοπιστούν αλλαγές μόνο στις πιο πολυπληθείς ομάδες (van Dorst et al. 2014). Αυτές οι μέθοδοι έχουν κι άλλα μειονεκτήματα, όπως μειωμένη επαναληψιμότητα και "θόρυβο" που εισάγεται από τη φύση των μεθόδων κι έτσι δεν ενδείκνυται η χρήση τους ως μοναδικό μέσο καταγραφής της ποικιλότητας μιας κοινότητας (Bent et al. 2007).

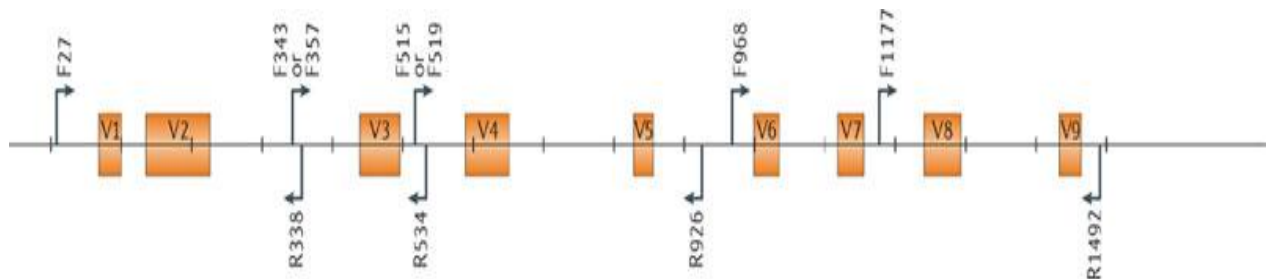


Αντιθέτως, με τα clone libraries και το next generation sequencing παρέχονται πληροφορίες για την ταξινομική σύσταση της κοινότητας επειδή αλληλουχούνται τα διαφορετικά 16S rRNA γονίδια. Η φύση της μεθόδου στα clone libraries (δείτε §A.2.) είναι τέτοια που επιτρέπει την αλληλούχιση ολόκληρου του 16S rRNA, μήκους περίπου 1500 ζευγών βάσεων (base pairs - bp). Έτσι, η πληροφορία για την φυλογενετική ταυτότητα του οργανισμού από τον οποίο προήλθε η αλληλουχία (με βάση πάντα το 16S rRNA) είναι η μέγιστη δυνατή. Όμως, ο αριθμός των αλληλουχιών που ανακτώνται με τη μέθοδο αυτή είναι περιορισμένος, επειδή η πειραματική διαδικασία είναι επίπονη και το κόστος ανά αλληλουχία αρκετά υψηλό (\$1-5). Ακόμα και στις εκτενέστερες εργασίες του είδους, ο αριθμός των αλληλουχιών ανά δείγμα κυμαίνεται από  $10^2$  μέχρι  $10^3$  (MacLean et al. 2009).

Η τεχνολογία του next generation sequencing άλλαξε ριζικά όχι μόνο την Μικροβιακή Οικολογία αλλά και όλη την σύγχρονη Μικροβιολογία (Parkhill 2013). Όταν πριν από μόλις μια δεκαετία η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος ενός στελέχους ήταν μια πολύ χρονοβόρα και ακριβή διαδικασία, σήμερα με τη χρήση της τεχνολογίας αυτής έχουμε φτάσει στο σημείο να αλληλουχούμε πολλαπλά γονιδιώματα από περιβαλλοντικά δείγματα σε πραγματικό χρόνο (Harris et al. 2013). Υπάρχουν αρκετές διαφορετικές πλατφόρμες next generation sequencing και δεν θα επικεντρωθούμε στην αρχή της μεθόδου κάθε πλατφόρμας. Οι δύο πιο διαδεδομένες πλατφόρμες, στις οποίες πραγματοποιήθηκαν και οι αναλύσεις αυτής της διατριβής, είναι η FLX της Roche (τώρα πλέον η titanium έκδοση) που στηρίζεται στην τεχνολογία του pyrosequencing και η Illumina (τώρα πλέον η έκδοση MiSeq) που στηρίζεται στην τεχνολογία των φθορίζοντων ολιγονουκλεοτιδίων. Το μεγάλο πλεονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι ότι προσφέρουν ένα τεράστιο αριθμό αλληλουχιών σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους όπως τα clone libraries, σε πολύ λιγότερο χρόνο και με πολύ μικρότερο κόστος ανά αλληλουχία. Οι δυνατότητες των πλατφορμών αυτών ανέρχονται σε  $\sim 10^6$  (για το FLX titanium) και  $\sim 1.5 \times 10^7$  (για το MiSeq) αλληλουχίες τη φορά και η διαδικασία στο μηχάνημα διαρκεί 7.5-9 ώρες. Με δεδομένο ότι στις μελέτες που βασίζονται στο 16S rRNA η κάθε διαφορετική αλληλουχία καταμετράται ως μια διαφορετική παρατήρηση, το δειγματοληπτικό μέγεθος N είναι ο αριθμός των αλληλουχιών, ο οποίος μπορεί να φτάσει στις  $10^6$ - $10^7$  αλληλουχίες. Τις περισσότερες φορές όμως, όπως είδαμε παραπάνω, μας ενδιαφέρει η δειγματοληψία να είναι απλά επαρκής. Οπότε με διάφορα "τρίκ" μπορούμε να φορτώσουμε πολλαπλά

δείγματα σε μια πλακέτα των παραπάνω πλατφορμών αυξάνοντας των αριθμό των δειγμάτων και μειώνοντας το N και φυσικά το κόστος ανά δείγμα. Για παράδειγμα, σε μια πλακέτα MiSeq μπορούν να "φορτωθούν" 50 διαφορετικά δείγματα, με κόστος \$3500 (Research and Testing Lab, Lubbock, Texas, USA). Το N σε αυτήν την περίπτωση θα μειωθεί στα  $3 \times 10^5$  και το κόστος στα \$70 ανά δείγμα. Το κόστος για την ίδια μελέτη αν γινόταν με clone libraries θα ήταν ~100 φορές μεγαλύτερο. Στα μειονεκτήματα των μεθόδων αυτών συγκαταλέγονται το σχετικά μικρό μέγεθος των αλληλουχιών που λαμβάνονται (450-500 bp για το FLX titanium και 250-300 bp για το MiSeq), γεγονός το οποίο περιορίζει τη διακριτική ικανότητα των μεθόδων αυτών σε φυλογενετικό επίπεδο, όπως και ο "θόρυβος" που εισάγεται από τη φύση των μεθόδων, ο οποίος μπορεί να οδηγήσει σε υπερεκτίμηση του species richness μιας κοινότητας δημιουργώντας "τεχνητά" OTUs (Quince et al. 2009).

Το πρόβλημα του μικρού μεγέθους των αλληλουχιών στις μελέτες βασισμένες στο 16S rRNA αντισταθμίζεται κάπως από τη φύση του γενετικού τόπου αυτού, στον οποίον υπάρχουν διαδοχικά συντηρημένα και μεταβλητά τμήματα (Εικόνα A.3.2).

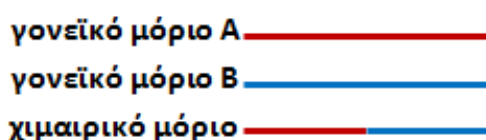


**Εικόνα A.3.2. Ο γενετικός τόπος 16S rRNA των βακτηρίων (5'-3'). Φαίνονται οι μεταβλητές περιοχές (V1-V9), τα σημεία πρόσδεσης και η κατεύθυνση των πιο διαδεδομένων διαειδικών εκκινητών. Πηγή: (Kuczynski et al. 2012)**

Τα συντηρημένα τμήματα, δηλαδή τα τμήματα των οποίων η αλληλουχία παραμένει αρκετά σταθερή στο χρόνο ανάμεσα στα διαφορετικά βακτηριακά είδη, δεν προσφέρουν φυλογενετική πληροφορία ακριβώς εξαιτίας αυτής της σταθερότητας. Προσφέρουν όμως πολύ καλές περιοχές για τον σχεδιασμό διαειδικών εκκινητών (universal primers) για την PCR οι οποίοι έχουν την ικανότητα να προσδένονται με επιτυχία και να πολλαπλασιάζουν το ενδιάμεσο τμήμα για την πλειονότητα των Βακτηρίων και σε πολλές περιπτώσεις και των Αρχαίων. Το ακριβώς αντίθετο ισχύει για τις μεταβαλλόμενες, ενδιάμεσες περιοχές. Έτσι, η πληροφορία από 1 ή 2 μεταβαλλόμενες περιοχές του 16S

rRNA είναι αρκετή για να προσδιοριστεί σε ικανοποιητικό βαθμό η ταξινομική σύσταση μιας κοινότητας και αυτό είναι στα πλαίσια των δυνατοτήτων του FLX και του MiSeq. Πρόσφατα μάλιστα, ανακοινώθηκε από την Roche η κυκλοφορία της έκδοσης FLX titanium XL+ το οποίο, όπως υποδηλώνει και το όνομά του, έχει την ικανότητα αλληλούχισης τμημάτων μέχρι και 1000 bp.

Το πρόβλημα του "θορύβου" στις μεθόδους αλληλούχισης νέας γενιάς είναι αρκετά σημαντικό. Πολλές φορές μέχρι και το 50% των αλληλουχιών που παραλαμβάνονται αρχικά μπορεί να απομακρυνθούν *in silico* (στον υπολογιστή) πριν την ανάλυση, λόγω "θορύβου". Οι κύριες πηγές "θορύβου" σε μια μελέτη next generation sequencing είναι δύο: τα λάθη που κάνει το ένζυμο που πολλαπλασιάζει το DNA κατά την PCR, η DNA πολυμεράση, τα οποία μπορεί να είναι τοπικά ή να επηρεάζουν μεγάλο μέρος του μορίου και τα λάθη που έχουν να κάνουν με την πλατφόρμα αλληλούχισης. Τα τοπικά λάθη της DNA πολυμεράσης είναι λανθασμένες τοποθετήσεις νουκλεοτιδίων που οδηγούν σε σημειακές αλλαγές της αλληλουχίας του DNA, ενώ λάθη που οδηγούν σε εκτενή αλλαγή της αλληλουχίας του μορίου είναι ο σχηματισμός "χμαιρικών" μορίων τα οποία προέρχονται από δυο διαφορετικά "γονικά" μόρια. Τα χμαιρικά μόρια δημιουργούνται όταν το μόριο της DNA πολυμεράσης, κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού ενός μορίου Α "μεταπηδήσει" σε ένα μόριο Β. Το προϊόν είναι ένα χμαιρικό μόριο το οποίο δεν υπήρχε αρχικά στο DNA της κοινότητας (Εικόνα Α.3.3).



**Εικόνα Α.3.3. Αναπαράσταση της αλληλουχίας ενός χμαιρικού μορίου σε σχέση με τις αλληλουχίες των μορίων από τα οποία προήλθε.**

Ο "θόρυβος" που προέρχεται από την πλατφόρμα αλληλούχισης είναι γνωστός για το FLX, όχι όμως για το MiSeq. Το FLX τείνει να κάνει λάθη συνήθως στον προσδιορισμό των ομοπολυμερών (homopolymers), δηλαδή όμοιων νουκλεοτιδίων στη σειρά (π.χ. AAAA) υπο- ή υπερ- εκτιμώντας τον ακριβή αριθμό των νουκλεοτιδίων μιας τέτοιας αλληλουχίας μέσα σε ένα μόριο. Για τον προσδιορισμό και την διόρθωση όλων των παραπάνω λαθών *in silico* έχουν αναπτυχθεί αρκετοί αλγόριθμοι (Huse et al. 2007; Quince et al. 2009; Kunin et

al. 2010; Quince et al. 2011), με το Ampliconise του Chris Quince να είναι ίσως το πιο ακριβές, αλλά παράλληλα το πιο απαιτητικό υπολογιστικά πακέτο αλγορίθμων.

Συνοψίζοντας, οι μέθοδοι αλληλούχισης νέας γενιάς υπερτερούν έναντι των clone libraries και των community fingerprinting μεθόδων για την εξέταση των αλλαγών στη δομή και τη σύσταση μιας κοινότητας βακτηριοπλαγκτού για πολλούς λόγους. Με δεδομένη την κατάλληλη προ-επεξεργασία για την απομάκρυνση του "θορύβου", οι μέθοδοι αυτές παρέχουν πολύ μεγάλα στατιστικά δείγματα από τα οποία μπορούν να γίνουν ασφαλείς υπολογισμοί της  $\alpha$  και  $\beta$ -ποικιλότητας, σε λιγότερο χρόνο αλλά με λίγο περισσότερα χρήματα (ανά δείγμα και όχι ανά παρατήρηση) από τις community fingerprinting μεθόδους. Μια καλή στρατηγική που έχει προταθεί πρόσφατα για την ελαχιστοποίηση των απαιτούμενων πόρων για τέτοιες μελέτες, είναι η διαλογή των δειγμάτων με την μεγαλύτερη μεταβλητότητα στην κοινότητα μέσω community fingerprinting και ακολούθως η λεπτομερής τους εξέταση με next generation sequencing (van Dorst et al. 2014). Στον Πίνακα A.3.1. παρουσιάζονται συνοπτικά οι μέθοδοι που εξετάστηκαν παραπάνω σε σχέση με τα δεδομένα που προσφέρουν όσον αφορά τη σύσταση και τη δομή μιας κοινότητας.

**Πίνακας A.3.1. Σύνοψη των χαρακτηριστικών των μεθόδων εξέτασης των αλλαγών στη δομή και τη σύσταση των κοινοτήτων του βακτηριοπλαγκτού**

Μέθοδος	Εξεταζόμενο γονίδιο	Μέσο κόστος ανά δείγμα	"Θόρυβος" / Επαναληψιμότητα	N	Εκτίμηση species richness	Εκτίμηση κατανομής	Εκτίμηση ταξινομικής σύστασης
<b>DGGE</b>	16S rRNA	\$10*	PCR, m.a., c.m., g.e. / όχι	10-50	Όχι	Όχι	Όχι**
<b>ARISA</b>	ITS	\$10	PCR, m.a., c.m. / μειωμένη	30-150	Όχι	Ναι	Όχι
<b>T-RFLP</b>	16S rRNA	\$10	PCR, m.a., c.m. / μειωμένη	30-150	Όχι	Ναι	Όχι
<b>Clone libraries</b>	16S rRNA	\$100-500***	PCR, s.e. / ναι	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>	Όχι	Όχι	Μερική
<b>Next generation sequencing</b>	16S rRNA	\$70-100	PCR, s.e. / ναι	10 <sup>3</sup> -10 <sup>7</sup>	Ναι <sup>#</sup>	Ναι <sup>#</sup>	Ναι <sup>#</sup>

PCR: λάθη επαγόμενα από την DNA πολυμεράση (αντικαταστάσεις και χίμαιρες) κατά τον πολλαπλασιασμό με PCR, m.a.: καταγραφή μόνο των πιο κοινών (most abundant) OTUs, c.m.: "θόρυβος" που οφείλεται στην καταγραφή δύο ή περισσότερων OTUs σαν ένα (co-mitigation), g.e.: απροσδιοριστία της ακριβούς διαβάθμισης στο πήκτωμα που οδηγεί σε μη επαναλήψιμα αποτελέσματα (gel effects), s.e.: λάθη που οφείλονται στην αλληλούχιση (sequencing errors)

\*αυξάνεται σε ~\$50 αν γίνει εξαγωγή και αλληλούχιση μπαντών από το gel

\*\*μερική αν γίνει εξαγωγή και αλληλούχιση ζωνών από το gel

\*\*\* για N=100

<sup>#</sup> εφόσον ο αριθμός των αλληλουχιών ανά δείγμα είναι επαρκής

#### **A.4.Στόχος της παρούσας εργασίας**

Πολλές από τις σημαντικότερες διεργασίες σε επίπεδο οικοσυστήματος επιτελούνται από τις κοινότητες των βακτηρίων, σε μια πληθώρα ενδιαιτημάτων από το ανθρώπινο σώμα μέχρι και τους ωκεανούς (Koparcka 2009). Επομένως, η μελέτη των κοινοτήτων αυτών αλλά και των αλλαγών σε αυτές σε επίπεδο δομής και λειτουργίας κάτω από συνθήκες κάποιας διαταραχής, είναι απαραίτητη για την πρόβλεψη των αλλαγών σε επίπεδο οικοσυστήματος.

Μια πολύ κοινή διαταραχή για τις βακτηριακές κοινότητες της θάλασσας και ιδιαίτερα για αυτές των παράκτιων περιοχών είναι ο εμπλουτισμός με θρεπτικά, αποτελώντας σημαντική απειλή για τη λειτουργικότητα των οικοσυστημάτων αυτών (Allgeier et al. 2011). Η μελέτη των βακτηριακών κοινοτήτων σε περιπτώσεις εμπλουτισμού με θρεπτικά είναι επομένως πολύ χρήσιμη. Μέχρι πρότινος όμως η μελέτη αυτή ήταν πολύ δύσκολη λόγω της πολυπλοκότητας των κοινοτήτων αυτών, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Με τη χρήση όμως μεθόδων αλληλούχισης νέας γενιάς, τόσο η δομή και σύσταση των κοινοτήτων αυτών όσο και οι αλλαγές στις κοινότητες μπορούν να αποτυπωθούν με μεγάλη ακρίβεια. Από οικολογικής σκοπιάς αυτό έχει μεγάλο ενδιαφέρον για πολλούς λόγους. Καταρχήν μπορεί με ακρίβεια να ποσοτικοποιηθεί η ανθεκτικότητα στον εμπλουτισμό με θρεπτικά σε επίπεδο κοινότητας. Με βάση αυτό είναι δυνατόν να εξεταστεί η ισχύς διαφορετικών οικολογικών θεωριών οι οποίες προβλέπουν διαφορετικές εκβάσεις για μια κοινότητα, όπως π.χ. η "υπόθεση ασφαλείας" (Yachi and Loreau 1999), η θεωρία της "ενδιάμεσης διαταραχής" [π.χ. (Tsagaraki et al. 2013)] ή ακόμα και η υπόθεση του Baas-Becking ότι "τα πάντα είναι παντού αλλά το περιβάλλον επιλέγει" (Becking 1934). Ακόμα, μέσα από τέτοιες μελέτες είναι δυνατόν να εντοπιστούν οι βακτηριακές ομάδες εκείνες (σε επίπεδο Τάξης, Οικογένειας ή ακόμα και συγκεκριμένα στελέχη) οι οποίες επηρεάζονται περισσότερο κάτω από συνθήκες εμπλουτισμού με θρεπτικά και να εξεταστεί η χρήση τους ως οικολογικοί δείκτες ή ακόμα και η χρήση τους για βιοτεχνολογικές εφαρμογές [π.χ. (Pedler et al. 2014)]. Τέλος, η εξέταση όλων των παραπάνω έχει αυξημένο ενδιαφέρον στην Ανατολική Μεσόγειο, καθώς η περιοχή αυτή είναι μια από τις πιο ολιγοτροφικές θαλάσσιες περιοχές στον κόσμο (Krom et al. 2004).

Ο στόχος της παρούσας διατριβής ήταν να εξεταστούν αλλαγές στη δομή και τη σύσταση των κοινοτήτων του βακτηριοπλαγκτού της στήλης του νερού και του ιζήματος της Ανατολικής Μεσογείου, με τη χρήση μεθόδων next generation sequencing, σε συνθήκες εμπλουτισμού με θρεπτικά.

Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν τρεις μελέτες: δυο σε ελεγχόμενες πειραματικές συνθήκες μεσοκόσμων (Κεφάλαιο Β) και μικρόκοσμων (Κεφάλαιο Δ) αντίστοιχα και μία μελέτη εξέτασης των αλλαγών *in situ* (Κεφάλαιο Γ). Στα Κεφάλαια Β και Γ εξετάζονται οι αλλαγές στις κοινότητες της στήλης του νερού ενώ στο Κεφάλαιο Δ οι αλλαγές στις κοινότητες του επιφανειακού ιζήματος της παράκτιας ζώνης.

# Κεφάλαιο Β. Αλλαγές στη δομή και τη σύσταση κοινοτήτων βακτηριοπλαγκτού της στήλης του νερού στην Ανατολική Μεσόγειο μετά από προσθήκη φώσφορου σε μεσόκοσμους

---

## Β.1. Εισαγωγή

Το βακτηριοπλαγκτόν κατέχει εξέχοντα ρόλο στο θαλάσσιο τροφικό πλέγμα διότι ευθύνεται σχεδόν αποκλειστικά για την πρόσληψη διαλυμένης οργανικής ύλης (dissolved organic matter -DOM) (Azam and Malfatti 2007). Η παραγωγικότητα και η βιομάζα του βακτηριοπλαγκτού "από κάτω προς τα πάνω" ελέγχονται από αρκετούς παράγοντες οι οποίοι συμπεριλαμβάνουν τις συγκεντρώσεις οργανικού άνθρακα και ανόργανων θρεπτικών όπως αζώτου, φώσφορου και ιχνοστοιχείων (Kirchman 2008). Διαφορετικά θρεπτικά μπορεί να λειτουργούν ως περιοριστικοί παράγοντες του ρυθμού αύξησης της βιομάζας του βακτηριοπλαγκτού ανάλογα την περιοχή, το γεωγραφικό πλάτος και την εποχή (Suratman et al. 2008; Wambeke et al. 2009; Martínez-García et al. 2010; Cuevas et al. 2011; Xia et al. 2011). Αρκετά πειράματα έχουν δείξει ότι η προσθήκη υποστρωμάτων οργανικού άνθρακα, όπως διαλυμένα ελεύθερα αμινοξέα και γλυκόζη, αύξησε την παραγωγικότητα του βακτηριοπλαγκτού (Cherrier and Bauer 2004; Kress et al. 2005; Sipura et al. 2005; Kuosa and Kaartokallio 2006).

Η Ανατολική Μεσόγειος είναι μία από τις πλέον oligοτροφικές θαλάσσιες περιοχές (Krom et al. 2004). Η παραγωγικότητα και η βιομάζα του βακτηριοπλαγκτού στην Ανατολική Μεσόγειο θεωρείται ότι περιορίζεται από το φώσφορο (Van Wambeke et al. 2002; Thingstad et al. 2005), του οποίου οι συγκεντρώσεις κυμαίνονται συνήθως από 20-90 nM (Zohary and Robarts 1998). Η προσθήκη ανόργανου φώσφορου κατά τη διάρκεια ενός *in situ* πειράματος στην Ανατολική Μεσόγειο έδειξε σημαντική αύξηση στην βακτηριακή παραγωγικότητα αλλά όχι στη βακτηριακή βιομάζα αυτή καθαυτή εντός τριών ημερών από την προσθήκη (Pitta et al. 2005). Παράλληλα, πειράματα σε μικροκόσμους έδειξαν ότι



ο φώσφορος και το άζωτο ήταν συν-περιοριστικά στοιχεία για το φυτοπλαγκτόν στην ίδια περιοχή (Zohary et al. 2005).

Το 2009, ένα άλλο πείραμα προσθήκης φώσφορου πραγματοποιήθηκε *ex situ* σε κλίμακα μεσοκόσμων στην Κρήτη. Τα πρώτα αποτελέσματα από το πείραμα αυτό έδειξαν ότι διαφορετικές ταξινομικές ομάδες του βακτηριοπλαγκτού παραλάμβαναν τον προστιθέμενο φώσφορο με διαφορετικούς ρυθμούς. Οι ανάγκες των ολιγοτροφικών SAR11 είχαν κορεστεί από την πρώτη μέρα μετά την προσθήκη του φώσφορου ενώ μέλη των *Gammaproteobacteria* και *Roseobacter* λάμβαναν ενεργά φώσφορο μέχρι την πειραματική ημέρα 4 (Sebastian et al. 2012). Επιπλέον, τόσο η βιομάζα όσο και η παραγωγή βιομάζας για το σύνολο του βακτηριοπλαγκτού ήταν αυξημένες κατά 65% και 44% αντίστοιχα κατά την τρίτη πειραματική ημέρα στους μεσόκοσμους που είχε γίνει προσθήκη P σε σχέση με τους μεσόκοσμους χωρίς προσθήκη.

Ο στόχος της δικιάς μας μελέτης ήταν να μελετηθούν οι αλλαγές στη δομή και τη σύσταση των κοινοτήτων του βακτηριοπλαγκτού από την αρχή έως και την τρίτη πειραματική ημέρα του ίδιου πειράματος, εξετάζοντας την ποικιλότητα του 16S rRNA της κοινότητας μέσω pyrosequencing για την V3 μεταβλητή περιοχή του γονιδίου.

## **B.2. Υλικά και μέθοδοι**

### **Πειραματικός σχεδιασμός και δειγματοληψία**

Το πείραμα έλαβε χώρα το Σεπτέμβρη του 2009 στις εγκαταστάσεις CRETACOSMOS του Ελληνικού Ινστιτούτου Θαλασσίων Ερευνών (ΕΛΚΕΘΕ) στην Κρήτη. Θαλασσινό νερό για τις ανάγκες του πειράματος συλλέχθηκε την 14η Σεπτεμβρίου του 2009 από το σκάφος Φιλία του ΕΛΚΕΘΕ από περιοχή στην οποία το βάθος της θάλασσας φτάνει τα 170 m, περίπου πέντε ναυτικά μίλια βόρεια του Ηρακλείου Κρήτης (35° 24.957 N, 25° 14.441 E). Θαλασσινό νερό από βάθος περίπου 10 m αντλήθηκε σε δεξαμενές πολυαιθυλενίου όγκου 1 m<sup>3</sup> με τη χρήση βυθιζόμενης αντλίας. Όλος ο εξοπλισμός είχε εμβαπτιστεί σε νερό βρύσης τουλάχιστον μία εβδομάδα πριν από τη δειγματοληψία και οι δεξαμενές είχαν καθαριστεί με διάλυμα HCl 10% και στη συνέχεια με απιονισμένο νερό. Το νερό στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε έξι μεσόκοσμους (από διαφανές πολυαιθυλένιο με διάμετρο 1.32 m και βάθος 2.3 m) όγκου 3 m<sup>3</sup> ο καθένας. Οι μεσόκοσμοι επώαζονταν συνεχώς σε τσιμεντένια δεξαμενή χωρητικότητας 350 m<sup>3</sup> από την οποία περνούσε θαλασσινό νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25.6 °C - ίση με την περιοχή άντλησης του νερού), για την αποφυγή αύξησης της θερμοκρασίας του νερού στους μεσόκοσμους. Το νερό, μετά τη μεταφορά του, αφέθηκε για μια νύκτα και την επόμενη ημέρα (πειραματική ημέρα 0 - H0) προστέθηκε άπαξ ανόργανος φώσφορος στη μορφή δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) σε τρεις από τους μεσόκοσμους σε τελική συγκέντρωση 100 nM. Οι άλλοι τρεις μεσόκοσμοι αποτέλεσαν τους μεσόκοσμους ελέγχου. Τα δείγματα της παρούσας μελέτης συλλέχθηκαν στην πειραματική ημέρα 0, λίγες ώρες μετά την αρχική προσθήκη P και την τρίτη πειραματική ημέρα (H3). Έτσι για τη μελέτη αυτή έγινε ανάλυση συνολικά σε 12 δείγματα, έξι από την H0 και έξι από την H3. Δύο λίτρα νερού από κάθε μεσόκοσμο διηθήθηκαν με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας από Sterivex GP filters (0.22 μm pore size) κάτω από στείρες συνθήκες για την αποφυγή επιμόλυνσης. Τα φίλτρα αποθηκεύτηκαν απ' ευθείας στους -80 °C μέχρι την εξαγωγή DNA.

### **Απομόνωση DNA, PCR και αλληλούχιση**

Η απομόνωση του DNA της κοινότητας πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους (Massana et al. 1997), όπως τροποποιήθηκε από τους (Tzahor et al. 2009) με τις εξής επιπλέον τροποποιήσεις: Το ρυθμιστικό διάλυμα της λύσης των κυττάρων (lysis buffer) δεν προστέθηκε πριν την αποθήκευση των φίλτρων στους -80 °C. Η απομόνωση DNA ξεκίνησε με την προσθήκη 20  $\mu\text{l}$  από 100  $\text{mg ml}^{-1}$  φρέσκιας λυσοζύμης (τελική συγκέντρωση 2  $\text{mg ml}^{-1}$ ) και 1.7 ml lysis buffer στο φίλτρο ακολουθούμενη από επώαση στους 37 °C για 30 min. Πενήντα  $\mu\text{l}$  διαλύματος πρωτεϊνάσης K συγκέντρωσης 20  $\text{mg ml}^{-1}$  (τελική συγκέντρωση 1  $\text{mg ml}^{-1}$ ) και 100  $\mu\text{l}$  από διάλυμα 10% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) (τελική συγκέντρωση 0.5% (w/v)) προστέθηκαν στη συνέχεια και το φίλτρο επώαστηκε σε υδατόλουτρο με ανακίνηση στους 55 °C για 1 h. Στη συνέχεια, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των Tzahor et. al (2009), αλλά η τελική διάλυση της πελλέτας του DNA έγινε σε 100  $\mu\text{l}$  στείρου υπερκάθαρου (nanopure) νερού. Η ποσοτικοποίηση του DNA έγινε σε φωτόμετρο NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA) και η μέση ποσότητα DNA ανά δείγμα ήταν 5  $\mu\text{g}$ . Το DNA στη συνέχεια αποθηκεύτηκε στους 4 °C μέχρι τη χρήση του.

Η PCR πραγματοποιήθηκε σε Biometra Tpersonal Thermocycler (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Germany) σε στείρες συνθήκες εντός θαλάμου νηματικής ροής. Στείρο νερό χρησιμοποιήθηκε αντί για DNA για αρνητικό control σε όλες τις αντιδράσεις. Ένα κομμάτι ~150 bp της V3 μεταβλητής περιοχής του 16S rRNA πολλαπλασιάστηκε, χρησιμοποιώντας τους διαειδικούς εκκινητές 329f (5'-ACGGNCCAGACTCTCTAC-3') και 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (Sánchez et al. 2007) (όπου N οποιοδήποτε από τα 4 νουκλεοτίδια). Ο τελικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 50  $\mu\text{l}$ . Κάθε αντίδραση περιείχε 0.3 mM από κάθε εκκινητή, 50 ng DNA μήτρα, 1X KAPAHiFi Fidelity Buffer (KAPA), ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε  $\text{MgCl}_2$  σε συγκέντρωση 2 mM, 1 μονάδα ενζύμου KAPAHiFi HotStart DNA polymerase (KAPA) και 0.3 mM από κάθε dNTP. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν: 95 °C για 4 min ακολουθούμενο από 25 κύκλους στους 98 °C για 20 sec, 55 °C για 15 sec και 72 °C για 30 sec, με τελικό βήμα επιμήκυνσης για 5 min στους 72 °C.

Το pyrosequencing έγινε στην πλατφόρμα GS-FLX Titanium (Roche, Basel, Switzerland) του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας και Γενετικής (Institute of Marine Biology and Genetics - IMBG) του ΕΛΚΕΘΕ, χρησιμοποιώντας το 1/4 της πλακέτας. Επιπλέον, έξι διαφορετικά ολιγονουκλεοτίδια προσαρτήθηκαν στους εκκινητές για τον διαχωρισμό

των αλληλουχιών του κάθε δείγματος *in silico* μετά την αλληλούχιση. Το πολλαπλασιασμένο DNA καθαρίστηκε με AMPure beads (Agencourt®, Beckman Coulter, Switzerland) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας και ποσοτικοποιήθηκε σε φωτόμετρο QuantiFluor™-ST (Promega, Madison, USA) μέσω του κιτ Quant-iT PicoGreen dsDNA (Invitrogen). Στη συνέχεια δημιουργήθηκε ισομοριακό μίγμα από όλα τα δείγματα και ακολούθησε αλληλούχιση στην πλατφόρμα GS FLX και από τους δυο εκκινητές ακολουθώντας τις οδηγίες και χρησιμοποιώντας τα σχετικά υλικά του κατασκευαστή. Οι αλληλουχίες στην αρχική τους μορφή (.sff μορφή) υποβλήθηκαν στη βάση δεδομένων SRA της NCBI με αριθμό SRA059200.

### **Ανάλυση των αλληλουχιών *in silico***

Το πακέτο αλγορίθμων AmpliconNoise v1.4 (Quince et al. 2011) χρησιμοποιήθηκε για την διόρθωση των αλληλουχιών από λάθη κατά την αλληλούχιση (αλγόριθμος PyroNoise), αντικαταστάσεις βάσεων κατά την PCR (αλγόριθμος SeqNoise) και χημεικές αλληλουχίες (αλγόριθμος PerseusD). Οι καθαρές αλληλουχίες διαχωρίστηκαν σύμφωνα με το δείγμα από το οποίο προέρχονταν ανάλογα με το ειδικό ολιγονουκλεοτίδιο στον εκκινητή της αλληλουχίας. Στη συνέχεια, οι αλληλουχίες μετά από τους εκκινητές αφαιρέθηκαν και το "αντίστροφο και συμπληρωματικό" (reverse complement) των αλληλουχιών από τον "αντίστροφο" (reverse) εκκινητή σχηματίστηκε μέσω αλγορίθμου σε γλώσσα RealBasic (release 7, Real Software Inc., Austin, Texas, USA). Στη συνέχεια οι αλληλουχίες χωρίστηκαν σε OTUs με ομοιότητα 97% και άνω, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο complete linkage hierarchical clustering (αλγόριθμος FCluster του AmpliconNoise) και προσδιορίστηκαν οι "αντιπροσωπευτικές" αλληλουχίες του κάθε OTU, ως η πιο κοινή αλληλουχία ανάμεσα στις αλληλουχίες που απαρτίζουν το κάθε OTU. Τα OTUs τοποθετήθηκαν σε μήτρα δεδομένων στην οποία η κάθε στήλη αντιστοιχεί σε ένα διαφορετικό δείγμα και η κάθε γραμμή σε ένα διαφορετικό OTU. Οι αριθμοί σε κάθε ενδιάμεσο κελί συμβολίζουν το πόσες φορές βρέθηκε το κάθε OTU σε κάθε δείγμα και χρησιμοποιούνται ως συχνότητες της παρουσίας των OTUs αυτών στις κοινότητες. Τέτοιες μήτρες δεδομένων ονομάζονται OTU tables και ένα τμήμα του OTU table της παρούσας εργασίας φαίνεται στον Πίνακα B.2.1.

**Πίνακας B.2.1. Τμήμα του OTU table της παρούσας εργασίας.**

OTU ID	C1D3	C1D0	P2D0	P2D3	C2D3	P3D3	P1D3	C3D3	P1D0	P3D0	C2D0	C3D0
0	771	2047	1798	968	305	419	414	553	1292	798	1817	1482
1	22	92	34	15	52	10	30	11	37	58	69	47
2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
3	5	0	0	36	2	69	26	4	1	2	1	1
4	37	77	60	32	59	20	30	46	64	99	95	81
5	61	267	121	14	57	17	29	84	124	255	218	185
6	213	660	366	172	186	200	178	208	491	686	768	677
7	124	464	219	148	227	241	210	185	134	191	359	380

Τα δείγματα συμβολίζονται με P αν προέρχονται από μεσόκοσμο στον οποίο είχε γίνει προσθήκη P ή με C αν προέρχονται από μεσόκοσμο στον οποίο δεν είχε γίνει προσθήκη P και ακολουθεί ο αύξων αριθμός του μεσόκοσμου (1,2, ή 3). Τα δείγματα που συμβολίζονται με D0 προέρχονται από την πειραματική ημέρα 0 ενώ τα δείγματα που συμβολίζονται με D3 προέρχονται από την πειραματική ημέρα 3.

Η φυλογενετική ταξινόμηση των OTUs και η κατασκευή των rarefaction curves έγινε στο πρόγραμμα QIIME v1.4 (Caporaso et al. 2010b) (αλγόριθμοι assign\_taxonomy.py και single\_rarefaction.py) σε περιβάλλον Unix, συγκρίνοντας τις αντιπροσωπευτικές αλληλουχίες κάθε OTU με γνωστές αλληλουχίες από τη βάση δεδομένων αναφοράς RDP (Wang et al. 2007). Για μερικά OTUs, των οποίων η ταξινόμηση με τον τρόπο αυτό δεν ήταν ικανοποιητική, η αντιπροσωπευτική αλληλουχία συγκρινόταν μέσω του αλγόριθμου BLAST με την νουκλεοτιδική συλλογή "nr" και η φυλογενετική ταξινόμηση του OTU προσδιοριζόταν με βάση ποσοστό ομοιότητας 98-99%. Σημειώνεται εδώ ότι η νεότερη έκδοση του QIIME, 1.8, περιλαμβάνει και τους αλγορίθμους του πακέτου AmpliconNoise, οπότε ο χρήστης είναι σε θέση να πραγματοποιήσει ολόκληρη την ανάλυση των αλληλουχιών στο QIIME (δείτε την ιστοσελίδα <http://qiime.org/scripts/index.html>).

### Στατιστικές αναλύσεις

Για τον προσδιορισμό των αλλαγών στην α-ποικιλότητα, οι δείκτες Shannon (με βάση το  $2 - H'_{\log 2}$ ), J' (Piellou's evenness) και ES (expected number of species - για το μικρότερο N ανάμεσα στα δείγματα) υπολογίστηκαν με το πακέτο vegan (Oksanen et al. 2013) στο πρόγραμμα R για τα Windows (R Core Team 2012). Οι αναλύσεις cluster (group average hierarchical clustering) και similarity percentage (SIMPER) πραγματοποιήθηκαν στο πρόγραμμα PRIMER6 για τα Windows (PRIMER-E Ltd, Plymouth, UK) βασισμένες στην

ποσοτική μορφή του δείκτη β-ποικιλότητας Bray-Curtis (BC) μετά από μετασχηματισμό των συχνοτήτων των OTUs σε σχετικές συχνότητες (διαίρεση με το N κάθε δείγματος) έτσι ώστε να είναι συγκρίσιμες μεταξύ των δειγμάτων. Η ανάλυση διασποράς κατά μία κατεύθυνση (one-way ANOVA) πραγματοποιήθηκε στο QIIME (αλγόριθμος `otu_category_significance.py`). Τα μη-παραμετρικά t-tests και το Anderson-Darling τεστ πραγματοποιήθηκαν στο PAST v2.17c (Hammer et al. 2001). Η μέθοδος FDR (false discovery rate) (Benjamini and Hochberg 1995) χρησιμοποιήθηκε για τη διόρθωση των p-values όταν πραγματοποιούνταν πολλαπλές συγκρίσεις. Η γραφική αναπαράσταση των rarefaction curves και της ταξινομικής σύστασης του κάθε δείγματος έγινε στο Microsoft Excel.

### B.3. Αποτελέσματα

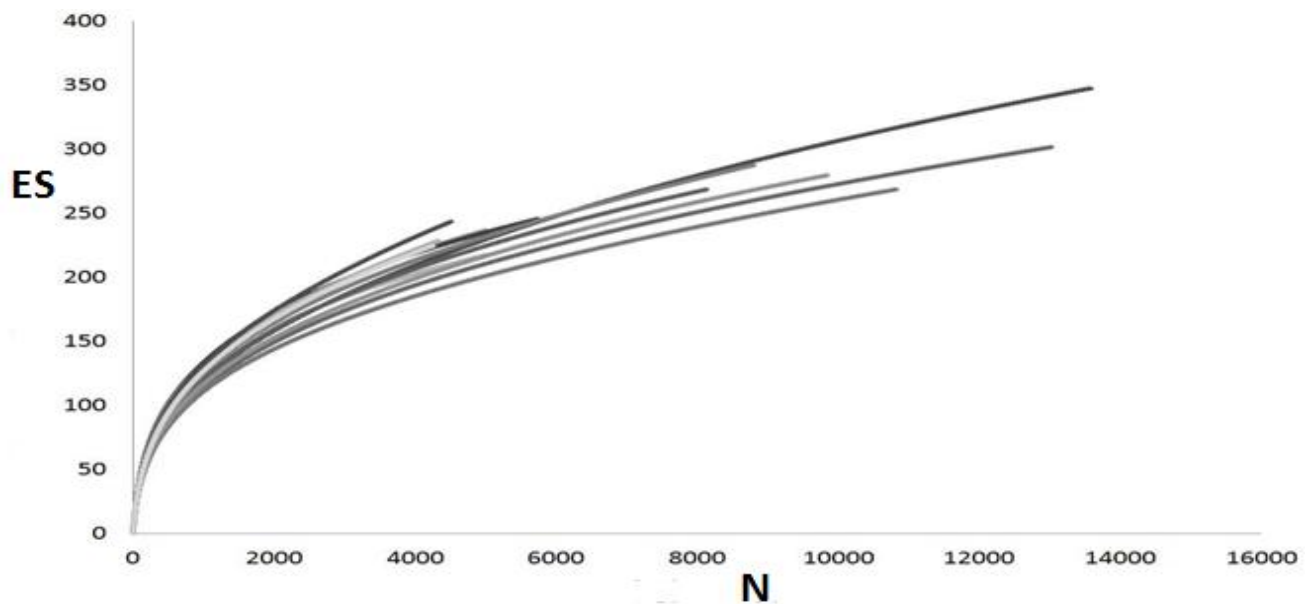
Ο αρχικός αριθμός των αλληλουχιών που ανακτήθηκαν ήταν 125,809. Μετά την απομάκρυνση των πολύ μικρών σε μέγεθος αλληλουχιών και των αλληλουχιών με πολύ "θόρυβο" (14.5% επί του συνόλου) αλλά και των χιμαιρικών αλληλουχιών (14.1% επί του συνόλου) καταλήξαμε σε 92,978 αλληλουχίες, οι οποίες κυμάνθηκαν ανά δείγμα από 4,250 ως 13,574 (Πίνακας B.3.1).

**Πίνακας B.3.1. Η κατανομή των αλληλουχιών ανά δείγμα και τα ποσοστά που αφαιρέθηκαν σε κάθε στάδιο διόρθωσης.**

Δείγμα	Αρχικές	Καθαρές (N)	%μικρών/θορύβου	%χιμαιρικών
P1D0	11029	8128	18.03	9.69
P2D0	11900	8795	16.69	13.32
P3D0	14024	9837	12.23	20.84
C1D0	18653	13574	13.59	18.11
C2D0	17382	13012	13.86	13.31
C3D0	14277	10812	13.89	12.89
P1D3	5810	4323	16.14	13.89
P2D3	6088	4507	16.38	13.12
P3D3	5694	4250	13.12	13.36
C1D3	6452	4995	12.73	13.78
C2D3	7906	5737	15.31	14.29
C3D3	6594	5008	12.66	12.83
<b>Total</b>	<b>125809</b>	<b>92978</b>	<b>14.55</b>	<b>14.12</b>

Τα δείγματα στην πρώτη στήλη συμβολίζονται όπως στον Πίνακα B.2.1. Στη δεύτερη στήλη αναγράφονται οι αρχικές αλληλουχίες ανά δείγμα, ενώ στην τρίτη στήλη οι αλληλουχίες μετά τον καθαρισμό, που αποτελούν και το N για κάθε δείγμα. Οι τελευταίες δυο στήλες παρουσιάζουν τα ποσοστά επί του συνόλου των αλληλουχιών του κάθε δείγματος, που αφαιρέθηκαν σε κάθε στάδιο.

Οι αλληλουχίες κατηγοριοποιήθηκαν σε OTUs από τα οποία 247 OTUs χαρακτηρίστηκαν ως "μη-μοναδικά" αν ήταν παρόντα σε τουλάχιστον δυο δείγματα και αποτελούνταν από 10 ή παραπάνω αλληλουχίες (0.02-0.18% σε σχετική συχνότητα επί του συνόλου των αλληλουχιών). Τα "μη-μοναδικά" OTUs αποτελούσαν το 96-99.4% των αλληλουχιών κάθε δείγματος. Τα υπόλοιπα 423 OTUs χαρακτηρίστηκαν ως "σπάνια". Τα rarefaction curves που κατασκευάστηκαν με βάση τον δείκτη ES (Εικόνα B.3.1) έδειξαν τάση παραλληλισμού με τον Χ άξονα, κι επομένως η δειγματοληψία μπορεί να χαρακτηριστεί ως επαρκής.



**Εικόνα Β.3.1.** Τα rarefaction curves για κάθε δείγμα, το οποίο συμβολίζεται ως μια ξεχωριστή γραμμή. Τα ονόματα των δειγμάτων δεν παρουσιάζονται για λόγους ευκρίνειας

### **Αλλαγές στη φυλογενετική σύσταση των κοινοτήτων**

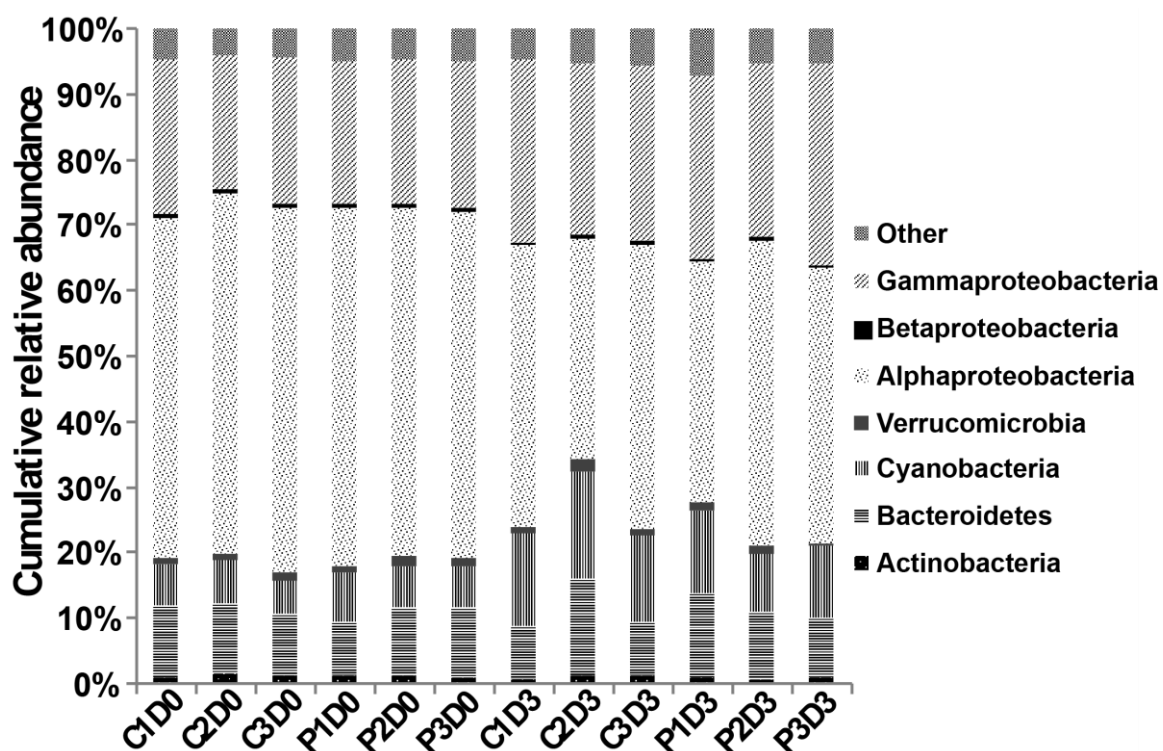
Για την ανάλυση αυτή, τα OTUs ομαδοποιήθηκαν στο επίπεδο του Φύλου ή της Κλάσης για τα *Proteobacteria*. Τέσσερις κύριες φυλογενετικές ομάδες αποτελούσαν το 90% περίπου των συνολικών αλληλουχιών κάθε δείγματος: τα *Alphaproteobacteria* (33.4-55.7% ανά δείγμα), αποτελούμενα κυρίως από SAR11 και *Rhodobacterales*, τα *Gammaproteobacteria* (20.4-30.7% ανά δείγμα), αποτελούμενα κυρίως από *Alteromonadales* και *Pseudomonadales*, τα *Bacteroidetes* (8.1-14.8% ανά δείγμα), αποτελούμενα κυρίως από *Flavobacteria* και *Sphingobacteria* και τα *Cyanobacteria* (5.1-16.4% ανά δείγμα), αποτελούμενα κυρίως από *Synechococcales*. Το υπόλοιπο της κάθε κοινότητας αποτελούνταν από τις εξής φυλογενετικές ομάδες σε χαμηλή σχετική συχνότητα (<5%): *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Tenericutes*, *Verrucomicrobia*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* και *Epsilonproteobacteria*. Η λεπτομερής ταξινομική σύσταση των μεσοκόσμων φαίνεται στον Πίνακα Β.3.2. ενώ οι σχετικές συχνότητες (συγκεντρωτικά) των κύριων ταξινομικών ομάδων στην Εικόνα Β.3.2.

**Πίνακας Β.3.2.** Οι σχετικές συχνότητες όλων των ταξινομικών ομάδων σε επίπεδο Φύλου και Κλάσης (για όσα από τα *Proteobacteria* ήταν δυνατό).



	CD0	PD0	CD3	PD3
<i>Actinobacteria</i>	0.0121	0.0115	0.0106	0.0079
<i>Bacteroidetes</i>	0.1045	0.0977	0.1039	0.1091
<i>Cyanobacteria</i>	0.0588	0.0668	0.1459	0.1077
<i>Firmicutes</i>	0.0007	0.0009	0.0006	0.0003
Unclassified Bacteria	0.0261	0.0292	0.0294	0.0291
Unclassified Proteobacteria	0.0179	0.0181	0.0219	0.0298
<i>Tenericutes</i>	3.0833E-06	0	0	0
<i>Verrucomicrobia</i>	0.0104	0.0124	0.0130	0.0090
<i>Alphaproteobacteria</i>	0.5423	0.5362	0.3993	0.4190
<i>Betaproteobacteria</i>	0.0060	0.0056	0.0058	0.0038
<i>Deltaproteobacteria</i>	0.0001	7.5817E-05	0.0010	0.0002
<i>Epsilonproteobacteria</i>	0	3.3892E-05	0	0
<i>Gammaproteobacteria</i>	0.2207	0.2209	0.2682	0.2836

Τα δείγματα συμβολίζονται όπως τον Πίνακα Β.2.1. με τη διαφορά ότι τα δείγματα από την ίδια πειραματική ημέρα και πειραματική μεταχείριση έχουν συμψηφιστεί. Η κατηγορία "Unclassified Bacteria" αντιστοιχεί σε αλληλουχίες χωρίς δυνατή φυλογενετική ταξινόμηση ενώ η κατηγορία "Unclassified Proteobacteria" σε αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε *Proteobacteria* αλλά η ταξινόμηση ήταν δυνατή μόνο μέχρι το επίπεδο του Φύλου



Εικόνα Β.3.2. Οι σχετικές συχνότητες, συγκεντρωτικά, για τις κύριες ταξινομικές ομάδες σε κάθε δείγμα. Η κατηγορία "Other" αντιστοιχεί σε μη-ταξινομημένες αλληλουχίες και μικρές ταξινομικές ομάδες.

Οι σχετικές συχνότητες των κύριων ομάδων δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των μεσοκόσμων με και χωρίς προσθήκη P ούτε στην ημέρα 0 αλλά ούτε και στην ημέρα 3 (μη-παραμετρικά t-tests,  $n=3$ ,  $p>0.1$ ). Διέφεραν όμως οι σχετικές συχνότητες των *Alphaproteobacteria*, *Gammaaproteobacteria* και *Cyanobacteria* μεταξύ των μεσοκόσμων από διαφορετική πειραματική ημέρα, ανεξαρτήτως μεταχείρισης (μη-παραμετρικό t-test,  $n=6$ ,  $p=0.001$ ,  $0.002$  και  $0.025$  αντίστοιχα).

### Αλλαγές στη δομή των κοινοτήτων

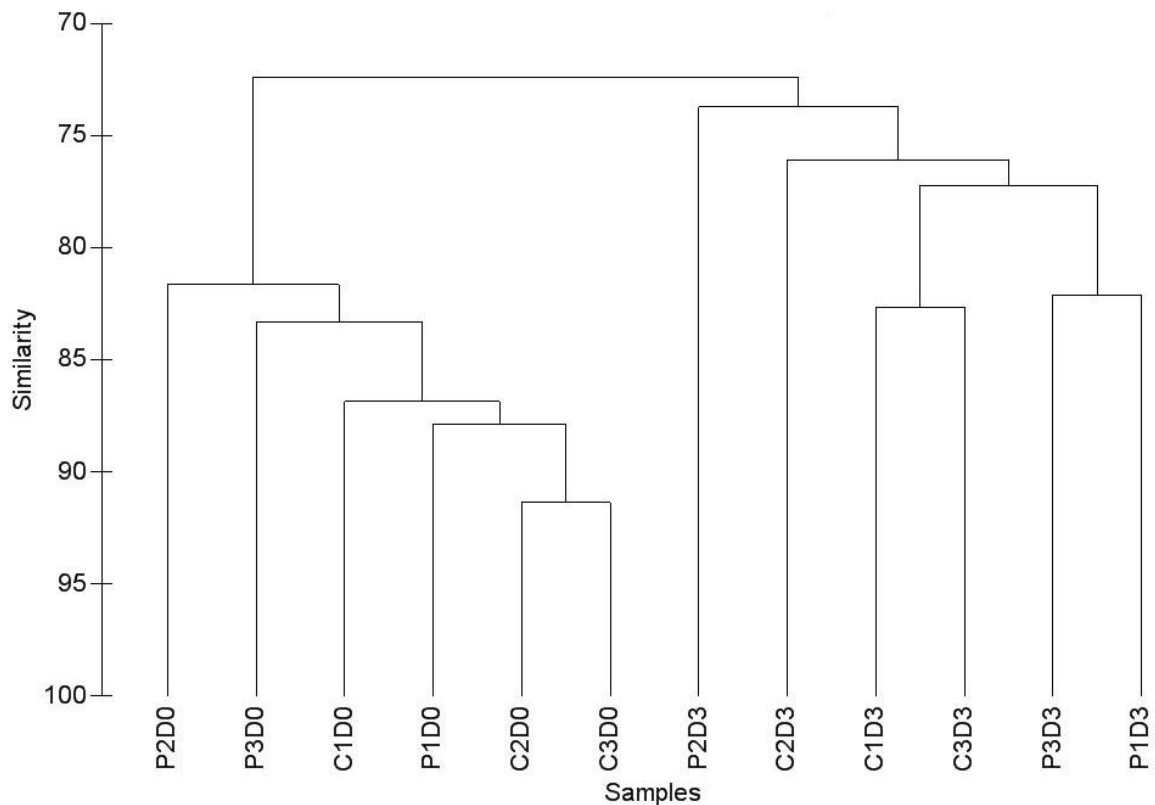
Οι επιπτώσεις της προσθήκης P στις κοινότητες εξετάστηκαν τόσο σε επίπεδο  $\alpha$ -όσο και σε επίπεδο  $\beta$ -ποικιλότητας. Όσον αφορά τις αλλαγές στην  $\alpha$ -ποικιλότητα, τα  $H'_{\log 2}$ ,  $ES_{4250}$  και  $J'$  δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ μεσοκόσμων με και χωρίς προσθήκη P (μη-παραμετρικό t-test  $p=0.936$ ,  $0.298$  and  $0.809$  αντίστοιχα,  $n=6$ ) αλλά ήταν σημαντικά αυξημένα στα δείγματα της ημέρας 3 (μη-παραμετρικά t-tests,  $p=0.001$ ,  $0.002$  και  $0.003$  αντίστοιχα,  $n=6$ )(Πίνακας B.3.3.).

**Πίνακας B.3.3. Οι μέσες τιμές του Piellou's evenness ( $J'$ ), του αναμενόμενου αριθμού ειδών (εδώ OTUs) ( $ES$ ) και του δείκτη Shannon  $\pm$  ένα τυπικό σφάλμα.**

	$J'$	$ES_{(4250)}$	$H'_{(\log 2)}$
<b>CD0</b>	$0.66 \pm 0.002$	$197.73 \pm 7.35$	$5.42 \pm 0.05$
<b>PD0</b>	$0.67 \pm 0.006$	$205.93 \pm 3.34$	$5.40 \pm 0.04$
<b>CD3</b>	$0.72 \pm 0.01$	$213.80 \pm 7.97$	$5.64 \pm 0.11$
<b>PD3</b>	$0.72 \pm 0.009$	$223.70 \pm 2.59$	$5.59 \pm 0.06$

Τα δείγματα συμβολίζονται όπως τον Πίνακα B.2.1. με τη διαφορά ότι τα δείγματα από την ίδια πειραματική ημέρα και πειραματική μεταχείριση έχουν συμψηφιστεί.

Για την εκτίμηση των αλλαγών στην  $\beta$ -ποικιλότητα, μετά από ανάλυση cluster βασισμένη στον δείκτη ομοιότητας Bray-Curtis, παρατηρήθηκε ομαδοποίηση των δειγμάτων σε δυο κύριες ομάδες με ομοιότητα 72.3% καθεμία από τις οποίες αποτελούνταν από δείγματα που προέρχονταν από την ίδια πειραματική ημέρα (Εικόνα B.3.3.)



**Εικόνα B.3.3. Γραφική αναπαράσταση της ομοιότητας στη δομή των κοινοτήτων των δειγμάτων, βασισμένη στο δείκτη ομοιότητας Bray-Curtis. Τα δείγματα συμβολίζονται όπως τον Πίνακα B.2.1.**

Επίσης, στην ομάδα των δειγμάτων από την ημέρα 3, υπήρχε μια ομαδοποίηση δυο εκ των τριών δειγμάτων με και χωρίς προσθήκη P (C1D3-C3D3 και P1D3-P3D3) (Εικόνα B.3.3.). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η προσθήκη P προκάλεσε κάποιες αλλαγές στη δομή των κοινοτήτων κατά την τρίτη πειραματική ημέρα αλλά οι αλλαγές αυτές ήταν ελάχιστες καθώς η ομοιότητα μεταξύ των δειγμάτων C1D3-C3D3 και P1D3-P3D3 ήταν μεγάλη (77.8%) και δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στην α-ποικιλότητα μεταξύ των δειγμάτων αυτών.

Για να διαπιστωθεί ποια OTUs συνέβαλαν στην διαφοροποίηση των κοινοτήτων C1D3-C3D3 και P1D3-P3D3 κατά την τρίτη πειραματική ημέρα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση SIMPER. Παρατηρήθηκε ότι η συμβολή των διαφορετικών OTUs στην διαφοροποίηση των κοινοτήτων ήταν αρκετά ομοιόμορφη ανάμεσα στα OTUs (Πίνακας B.3.4.). Αθροίζοντας τη συμβολή των "μη-μοναδικών" OTUs στη διαφοροποίηση των

κοινοτήτων με και χωρίς προσθήκη P κατά την τρίτη πειραματική ημέρα, βρέθηκε ότι το μεγαλύτερο μέρος της διαφοροποίησης οφείλονταν σε αλλαγές στις σχετικές συχνότητες αυτών των OTUs. Επίσης, οι αλλαγές στις σχετικές συχνότητες των OTUs ανάμεσα στις κοινότητες με και χωρίς προσθήκη P κατά την τρίτη ημέρα δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (ANOVA,  $p > 0.1$  για όλα τα OTUs,  $n=3$ ). Επομένως, οι διαφορές στη δομή των κοινοτήτων αυτών οφείλονταν πιθανώς σε μικρές αλλαγές στη σχετική συχνότητα πολλών διαφορετικών "μη-μοναδικών" OTUs.

**Πίνακας Β.3.4. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης SIMPER για τις διαφορές μεταξύ των κοινοτήτων P1D3-P3D3 και C1D3-C3D3.**

OTU ID	Αλλαγή σχετικής συχνότητας από C1D3-C3D3 σε P1D3-P3D3 (%)	Συμβολή%	Φυλογενετική ταξινόμηση
48	3.83	8.4	<i>Gammaproteobacteria</i>
0	-3.53	7.72	SAR11
27	-2.43	5.35	<i>Synechococcus</i> sp.
7	2.17	4.77	<i>Gammaproteobacteria</i>
26	-1.95	4.27	SAR11
12	1.52	3.35	<i>Alphaproteobacteria</i>
23	-1.11	2.43	<i>Marinobacter</i> sp.
49	1.02	2.25	<i>Flavobacteriaceae</i>
3	1.02	2.24	<i>Oceanospirillum</i> sp.
5	-0.91	2	<i>Oceanospirillales</i>
31	0.76	1.66	<i>Lutimonas</i> sp.
141	-0.65	1.51	<i>Alteromonas</i> sp.
20	-0.55	1.4	<i>Gammaproteobacteria</i>
74	-0.42	1.34	<i>Alphaproteobacteria</i>
11	0.58	1.29	SAR116
17	0.09	1.24	SAR116
21	0.54	1.18	<i>Alphaproteobacteria</i>
8	0.13	1.11	<i>Gammaproteobacteria</i>
61	-0.13	0.96	<i>Candidatus Actinomarina minuta</i>
40	-0.17	0.84	<i>Verrucomicrobia</i>
63	-0.31	0.83	<i>Alphaproteobacteria</i>
90	0.36	0.79	<i>Flavobacteriaceae</i>
77	0.35	0.77	<i>Flavobacteriaceae</i>
443	0.34	0.74	<i>Gammaproteobacteria</i>
267	0.15	0.71	<i>Gammaproteobacteria</i>
33	-0.21	0.7	<i>Pseudomonas</i> sp.
56	-0.31	0.68	<i>Oceanospirillales</i>
25	0.02	0.65	<i>Gammaproteobacteria</i>
67	-0.29	0.65	<i>Gammaproteobacteria</i>
6	0.2	0.64	SAR11
15	0.13	0.59	<i>Proteobacteria</i>

13	-0.15	0.57	<i>Gammaproteobacteria</i>
39	0.15	0.57	<i>Alphaproteobacteria</i>
30	-0.01	0.57	<i>Alphaproteobacteria</i>
413	0.26	0.57	<i>Oleibacter marinus</i>
10	-0.25	0.55	<i>Roseovarius sp.</i>
122	0.25	0.54	<i>Bacteroidetes</i>
4	-0.25	0.54	<i>Bacteroidetes</i>
142	-0.24	0.54	<i>Vibrio sp.</i>
1	0.13	0.52	<i>Bacteroidetes</i>
70	-0.23	0.5	<i>Flavobacteriaceae</i>
68	0.11	0.5	<i>Vibrio sp.</i>

Πρώτη στήλη: ο αύξων αριθμός του OTU. Δεύτερη στήλη: η αλλαγή στη σχετική συχνότητα του OTU από C1D3-C3D3 σε P1D3-P3D3. Τρίτη στήλη: η συμβολή (%) του OTU στη συνολική μεταβλητότητα μεταξύ των δυο ομάδων δειγμάτων. Τέταρτη στήλη: η φυλογενετική ταξινόμηση του κάθε OTU (στο μικρότερο δυνατό επίπεδο). Τα OTUs που συμβάλουν λιγότερο από 0.5% στη συνολική διαφοροποίηση δεν παρουσιάζονται.

## Σύνοψη

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η βραχυπρόθεσμη επίδραση της προσθήκης φώσφορου στη δομή και τη σύσταση των κοινοτήτων του βακτηριοπλαγκτού της Ανατολικής Μεσογείου σε πειραματική διάταξη μεσοκόσμων, χρησιμοποιώντας pyrosequencing του 16S rRNA της κοινότητας, μέθοδος που προσφέρει μεγάλη διακριτική ικανότητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι αλλαγές ήταν ελάχιστες, παρά το γεγονός ότι η βιομάζα και παραγωγικότητα του βακτηριοπλαγκτού στην περιοχή αυτή της Μεσογείου περιορίζονται από τον φώσφορο.

# Κεφάλαιο Γ. Διερεύνηση της *in situ* δομής και σύστασης των κοινοτήτων του βακτηριοπλαγκτού σε τρεις διαφορετικές περιοχές με αυξημένα θρεπτικά στην Κρήτη

---

## Γ.1. Εισαγωγή

Όπως παρουσιάστηκε στην εισαγωγή του Β Κεφαλαίου, η Ανατολική Μεσόγειος είναι μια πολύ oligotroφική θάλασσα, με την πρωτογενή παραγωγή να κυμαίνεται από 20 έως 30  $\mu\text{mol C m}^{-3} \text{ day}^{-1}$  (Thingstad et al. 2005). Ενώ αυτός φαίνεται να είναι ο κανόνας σε ευρεία κλίμακα, σε μικρή κλίμακα και ειδικότερα στις παράκτιες περιοχές οι ανθρωπογενείς δραστηριότητες πολλές φορές αυξάνουν την παροχή θρεπτικών αλλάζοντας την "τροφική κατάσταση" (trophic status) του οικοσυστήματος.

Οι ιχθυοκαλλιέργειες είναι ο πιο ταχέως αναπτυσσόμενος τομέας παραγωγής τροφής στον κόσμο, με τις εγκαταστάσεις των ιχθυοκαλλιεργειών να καλύπτουν ένα μεγάλο ποσοστό των ρηχών και προστατευμένων από τα καιρικά φαινόμενα περιοχών στην Ελλάδα, την Κροατία και την Τουρκία καθώς η φύση των ακτογραμμών στις χώρες αυτές είναι ευνοϊκή για την εγκατάσταση μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας (Basurco and Larrazabal 2000; Bravo and Montanes 2001). Οι ιχθυοκαλλιέργειες δρουν ως πηγή θρεπτικών για τα παρακείμενα σε αυτές παράκτια οικοσυστήματα, μέσω της αποβολής οργανικών ρύπων (που περιέχουν οργανικό άνθρακα, φώσφορο και άζωτο) από αχρησιμοποίητη ιχθυοτροφή και περιττώματα ψαριών (Karakassis et al. 1998; Holmer et al. 2008). Λίγες εργασίες έχουν εξετάσει τις αλλαγές στις κοινότητες του βακτηριοπλαγκτού κοντά σε μονάδες ιχθυοκαλλιεργειών. Κάποιες εργασίες αναφέρουν αυξημένη βιομάζα του βακτηριοπλαγκτού στη στήλη του νερού και στο ίζημα κοντά σε ιχθυοκαλλιέργειες (Vezzulli et al. 2002; Bissett et al. 2007; Kawahara et al. 2009) ενώ άλλες εργασίες εστιάζουν σε αλλαγές στις βιογεωχημικές διεργασίες του ιζήματος σχετιζόμενες με την παρουσία ιχθυοκαλλιεργειών.

Τα λιμάνια μπορεί επίσης να είναι περιοχές με αυξημένα θρεπτικά. Τα παραπροϊόντα από τα καύσιμα στα λιμάνια τα οποία περιέχουν αλειφατικούς υδρογονάνθρακες αποτελούν πηγή άνθρακα για κάποια βακτηριακά στελέχη (Teramoto et al. 2013). Πολλές φορές επίσης τα λιμάνια αποτελούν χώρους εκβολής ακατέργαστων ή μερικά κατεργασμένων λυμάτων τα οποία είναι πλούσια σε θρεπτικά, όπως για παράδειγμα το λιμάνι της Βικτώρια στο Χονγκ-Κογκ (Zhang et al. 2007). Ακόμα, οι κινήσεις των πλοίων εντός των λιμανιών αναταράσσουν το βυθό αυξάνοντας τις συγκεντρώσεις των θρεπτικών στη στήλη του νερού, ιδιαίτερα στα ρηχότερα λιμάνια (Lindholm et al. 2001). Οι εργασίες που εξετάζουν αλλαγές στη δομή και τη σύσταση του βακτηριοπλαγκτού στα λιμάνια είναι λιγοστές και τα έως τώρα αποτελέσματα αντικρουόμενα (Ma et al. 2009; Cury et al. 2011; Iannelli et al. 2012).

Ένας άλλος τύπος ενδιαιτημάτων που επηρεάζονται από αύξηση στα επίπεδα των θρεπτικών και του οργανικού άνθρακα είναι οι παράκτιοι κόλποι και οι λιμνοθάλασσες. Η εξωτερική ροή θρεπτικών στα ενδιαιτήματα αυτά κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα με τα υπόλοιπα εκβολικά συστήματα αλλά οι σημαντικά μικρότερες λεκάνες απορροής τους και οι χαμηλοί ρυθμοί ανανέωσης των υδάτων κάνουν τα συγκεκριμένα συστήματα αρκετά ευάλωτα στον ευτροφισμό επειδή τα θρεπτικά συσσωρεύονται γρηγορότερα και η μίξη με τα νερά της ανοικτής θάλασσας είναι περιορισμένη (McGlathery et al. 2007). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη εμφάνιση επιβλαβών φυτοπλαγκτονικών ανθίσεων, το θάνατο μακροφυκών στον πυθμένα, αλλαγές στο τροφικό πλέγμα, μειωμένα επίπεδα οξυγόνου στο νερό και το ίζημα και μείωση του ρυθμού ανοργανοποίησης των θρεπτικών και του άνθρακα (Valette-Silver 1993; Boynton et al. 1996; Cloern 2001; McGlathery et al. 2007). Σε ενδιαιτήματα με αυξημένη στασιμότητα νερού, τα παραπάνω φαινόμενα αυξάνονται σε συχνότητα (Scavia et al. 2004; Scavia et al. 2006). Η δομή και σύσταση των κοινοτήτων του βακτηριοπλαγκτού έχει μελετηθεί αρκετά σε τέτοιου είδους ενδιαιτήματα. Εργασίες έχουν δείξει ότι οι κοινότητες αυτές χαρακτηρίζονται από εποχικότητα (Celussi et al. 2009), παροδική κυριαρχία της κοινότητας από συγκεκριμένες ταξινομικές ομάδες (Piccini et al. 2006), μειωμένη ποικιλότητα σε πολύ ρυπασμένες περιπτώσεις (Benlloch et al. 1995) ή αυξημένη ποικιλότητα που οφείλεται σε μίξη θαλασσινού και γλυκού νερού (Simonato et al. 2010; Taketani et al. 2010).

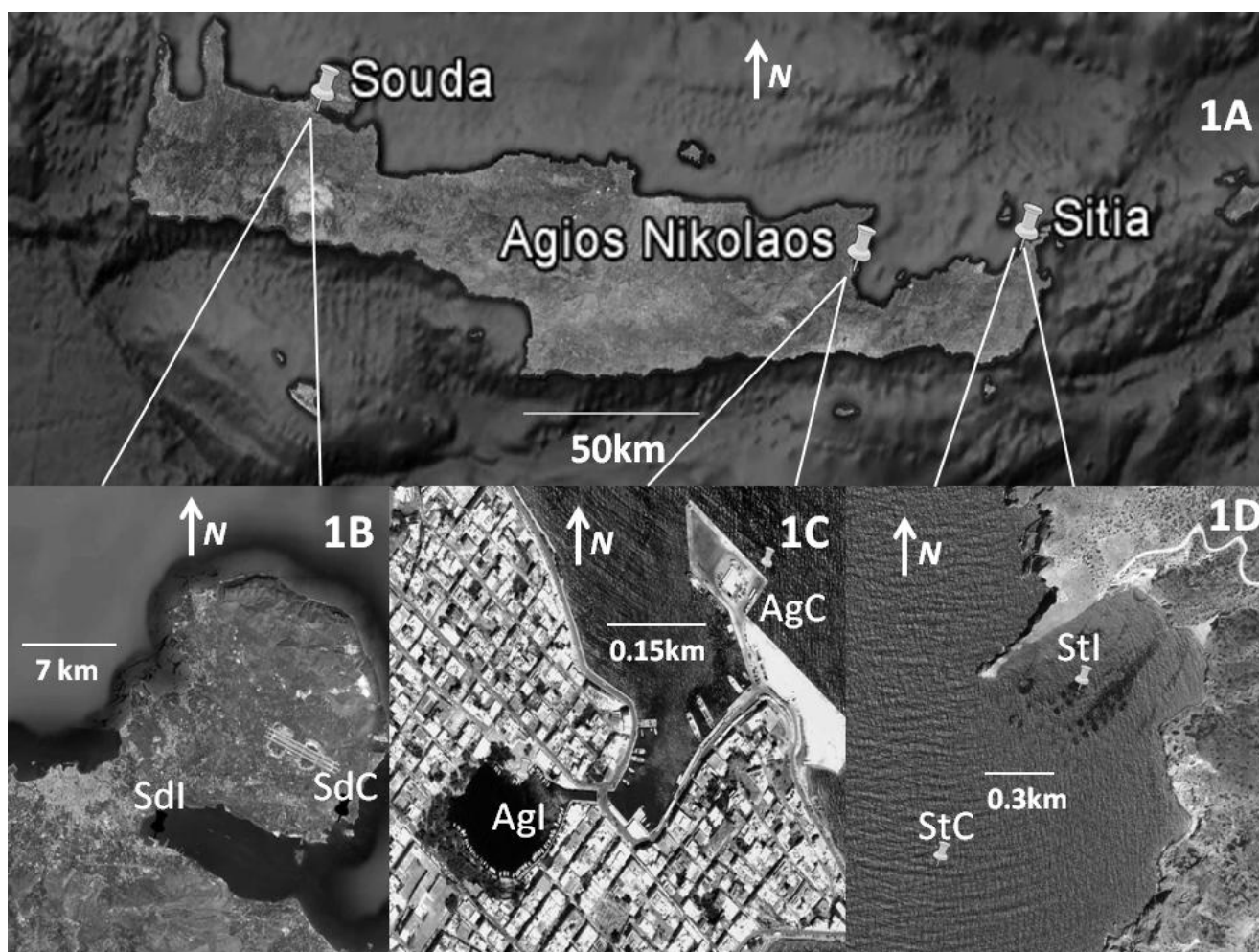


Στην εργασία αυτή εξετάσαμε την δομή και τη σύσταση του βακτηριοπλαγκτού σε τρεις περιοχές εμπλουτισμένες με θρεπτικά κατά μήκος της βόρειας ακτής της Κρήτης: μια μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας, ένα κλειστό κόλπο με μειωμένη ανανέωση νερού κι ένα αστικό λιμάνι. Συγκεκριμένα, εστιάσαμε στην ύπαρξη ή όχι κοινών προτύπων στις αλλαγές των συχνοτήτων συγκεκριμένων ταξινομικών μονάδων και στις αλλαγές των παραμέτρων της α-ποικιλότητας στις περιοχές αυτές, σε σχέση με παρακείμενες περιοχές χωρίς εμπλουτισμό.

## Γ.2. Υλικά και μέθοδοι

### Περιοχές και δειγματοληψία

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε από 27-29 Απριλίου, 2009, σε τρεις διαφορετικές περιοχές κατά μήκος της βόρειας ακτής της Κρήτης: α) στο λιμάνι της Σούδας (Sd) ( $35^{\circ}29'N$   $24^{\circ}4'E$ ), β) στη "λίμνη" του Αγίου Νικολάου (Ag) ( $35^{\circ}11'N$   $25^{\circ}43'E$ ) και γ) σε παράκτια μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας κοντά στη Σητεία (St) ( $35^{\circ}15'N$   $26^{\circ}13'E$ ) (Εικόνα Γ.2.1Α.).



Εικόνα Γ.2.1. Χάρτης δειγματοληψίας. 1Α: Οι τρεις περιοχές κατά μήκος της βόρειας ακτής της Κρήτης. 1Β: Επηρεασμένος σταθμός (SdI) και σταθμός ελέγχου (SdC) στη Σούδα. 1C: Επηρεασμένος σταθμός (AgI) και σταθμός ελέγχου (AgC) στον Άγιο Νικόλαο. 1D: Επηρεασμένος σταθμός (StI) και σταθμός ελέγχου (StC) στη Σητεία. Όλες οι εικόνες αποκτήθηκαν από το Google Earth™ και τροποποιήθηκαν.

Η πιο ανατολική περιοχή, η Σητεία, απέχει 197.05 km από την πιο δυτική, τη Σούδα, ενώ η ενδιάμεση περιοχή, ο Άγιος Νικόλαος, απέχει 49.95 και 153.54 km από τη Σητεία και τη Σούδα, αντίστοιχα. Σε κάθε περιοχή, η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σε δυο διαφορετικούς σταθμούς: στους "επηρεασμένους", δηλαδή εντός του λιμανιού της Σούδας, εντός της "λίμνης" του Αγίου Νικολάου και ακριβώς κάτω από τους κλωβούς της ιχθυοκαλλιέργειας στη Σητεία αφενός και στους σταθμούς ελέγχου αφετέρου, δηλαδή εκτός του λιμανιού στη Σούδα (κοντά στην παραλία Μαράθι), εκτός της "λίμνης" του Αγίου Νικολάου (εξωτερικά του λιμενοβραχίονα) και περίπου 500 m ανάντη των κλωβών στη Σητεία (Εικόνες Γ.2.1Α, 1Β, 1C). Δύο λίτρα νερού από βάθος τριών μέτρων συλλέχθηκαν εις τριπλούν σε κάθε σταθμό μέσω φιάλης Niskin για την εξαγωγή DNA και άλλο μισό λίτρο για τις μετρήσεις των περιβαλλοντικών παραμέτρων, 2 ml από το οποίο μονιμοποιήθηκε με γλουταραλδεϋδη για χρήση στην κυτταρομετρία ροής. Έτσι, το σύνολο των δειγμάτων ήταν 18: έξι δείγματα (τρία "επηρεασμένα" και τρία δείγματα ελέγχου) από κάθε περιοχή.

### **Εξαγωγή DNA και PCR**

Η εξαγωγή DNA και η PCR πραγματοποιήθηκαν όπως στο Κεφάλαιο Β.2.

### **Μέτρηση περιβαλλοντικών παραμέτρων**

Η θερμοκρασία του νερού μετρήθηκε κατά τη δειγματοληψία με θερμόμετρο υδραργύρου. Το pH, η αλατότητα και η αγωγιμότητα του νερού μετρήθηκαν μέσω του HQ40d Multi-parameter meter (Hach, Loveland, CO, USA) στο Εργαστήριο Υδρογεωχημικής Μηχανικής και αποκατάστασης εδαφών του τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης.

Ο συνολικός αριθμός των ετερότροφων βακτηρίων σε κάθε δείγμα μετρήθηκε με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας τον κυτταρομετρητή Becton & Dickinson FACSCalibur (Becton & Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) ο οποίος ήταν εξοπλισμένος με λέιζερ μήκους κύματος 488 nm και στάνταρντ φίλτρα, χρησιμοποιώντας milli-Q απεσταγμένο νερό για τη ροή. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε υψηλή ροή για 1 min. Η ακριβής ροή μετρούνταν ημερησίως και ο αριθμός των κυττάρων καταμετρήθηκε και αναλύθηκε με τα λογισμικά Cell Quest και Paint-A-Gate (Becton & Dickinson), αντίστοιχα. Τα δείγματα (2 ml) είχαν προηγουμένως μονιμοποιηθεί κατά τη δειγματοληψία σε στείρο διάλυμα

γλουταραλδεΐδης (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, τελικής συγκέντρωσης 5% v/v). Μετά τη μονιμοποίηση, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε υγρό άζωτο και κατόπιν στους -80 °C μέχρι τη μέτρηση. Μετά από ξεπάγωμα σε θερμοκρασία δωματίου, ακολούθησε χρώση των δειγμάτων με SybrGreen I (σε διάλυμα  $4 \times 10^{-4}$  της αρχικής συγκέντρωσης) και επώαση για 10 min στο σκοτάδι.

Για τη μέτρηση της χλωροφύλλης-α, δείγμα νερού (0.5 L) φιλτραρίστηκε από φίλτρα υαλωδών ινών (Whatman GF/F, διαμέτρου 47 mm και μέγεθος πόρου 0.7 μm) με αντλία κενού κατά τη δειγματοληψία. Τα φίλτρα κρατήθηκαν παγωμένα στους -20 °C μέχρι τη μέτρηση. Η συγκέντρωση της χλωροφύλλης-α μετρήθηκε με τη μέθοδο των Holm-Hansen et al. (1965) (Holm-Hansen et al. 1965) με τη χρήση φωτόμετρου Turner μετά από εξαγωγή σε διάλυμα ακετόνης 90% v/v στους 4 °C για 16 h.

Η μέτρηση του διαλυμένου αζώτου (dissolved nitrogen- DN) και φώσφορου (dissolved phosphorus -DP) στη στήλη του νερού έγινε με χώνευση κατά Kjeldahl, χρησιμοποιώντας τα πρωτόκολλα 8075, 8039 και 8048 και τα αντίστοιχα αντιδραστήρια της HACH. Οι μετρήσεις έγιναν σε φωτόμετρο DR 2800 (HACH) στο Εργαστήριο Υδρογεωχημικής Μηχανικής και αποκατάστασης εδαφών του τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης. Το DN μετρήθηκε ως το άθροισμα των νιτρικών και του συνολικού Kjeldahl αζώτου (total Kjeldahl nitrogen, TKN). Το DP μετρήθηκε με τη μέθοδο 8048 της HACH μετά από χώνευση κατά Kjeldahl. Το όριο ανίχνευσης και για τις δυο μετρήσεις ήταν  $0.02 \text{ mg L}^{-1}$  ενώ το όριο ποσοτικοποίησης ήταν  $0.07 \text{ mg L}^{-1}$  για το DN και  $0.05 \text{ mg L}^{-1}$  για το DP.

Ο διαλυμένος οργανικός άνθρακας (dissolved organic carbon - DOC) μετρήθηκε σε αναλυτή TOC-Vcpr (Shimadzu, Duisburg, Germany). Για την αφαίρεση του ανόργανου άνθρακα, τα δείγματα νερού αρχικά οξινίστηκαν με 2N HCl σε pH 2 και το παραγόμενο CO<sub>2</sub> αφαιρέθηκε με ροή αερίου N<sub>2</sub> στο υγρό για 10 min ανά δείγμα.

Όλες οι παραπάνω αναλύσεις έγιναν εις τριπλούν για την εκτίμηση των τυπικών σφαλμάτων. Για τον καθορισμό των DN, DP και DOC, το δείγμα νερού αρχικά φιλτραρίστηκε σε φίλτρο διαμέτρου 0.22 μm (Millipore, Billerica, MA, USA) για την αφαίρεση του κυτταρικού και σωματιδιακού N, P και C.

## Pyrosequencing

Το pyrosequencing έγινε όπως το Κεφάλαιο Β.2., στο ΕΛΚΕΘΕ και στο High-Throughput Sequencing and Genotyping Unit, R.J. Carver Biotechnology Center, Πανεπιστήμιο του Illinois. Οι αλληλουχίες στην αρχική τους μορφή (.sff αρχεία) μεταφοτρώθηκαν στη βάση δεδομένων SRA της NCBI με κωδικό SRP016044 για ολόκληρο το πείραμα.

## Ανάλυση των αλληλουχιών *in silico*

Η αρχική διόρθωση των αλληλουχιών έγινε με το AmpliconNoise (Quince et al. 2011) όπως στο Κεφάλαιο Β.2. Τα OTUs όμως στην εργασία αυτή σχηματίστηκαν με average linkage αντί για complete linkage hierarchical clustering χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο UClust (Edgar 2010). Η φυλογενετική ταξινόμηση των OTUs έγινε στο QIIME v 1.8. (Caporaso et al. 2010b) συγκρίνοντας τις αντιπροσωπευτικές τους αλληλουχίες έναντι της νεότερης έκδοσης (Μάιος 2013) της βάσης δεδομένων Greengenes (McDonald et al. 2012). Τα OTUs που ήταν φυλογενετικά συνδεδεμένα με τον κλάδο SAR86 αναταξινομήθηκαν λόγω γνωστού προβλήματος σχετικά με αυτόν τον κλάδο σε αυτήν την έκδοση της Greengenes (Δρ. Phil Hugenholtz, προσωπική επικοινωνία). Τα OTUs που προέρχονταν από πλαστίδια διάτομων κι εκείνα που αντιπροσωπεύονταν από μια μοναδική παρατήρηση σε όλο το σετ δεδομένων απομακρύνθηκαν πριν κάθε περαιτέρω ανάλυση. Χρησιμοποιώντας τον κατάλληλο αλγόριθμο του QIIME (single\_rarefaction.py) έγινε τυχαία δειγματοληψία χωρίς επανατοποθέτηση στον πίνακα OTU για το μικρότερο δειγματοληπτικό μέγεθος (N) έτσι ώστε όλα τα δείγματα να έχουν το ίδιο N. Από τον πίνακα OTU που σχηματίστηκε, υπολογίστηκε ο ποσοτικός δείκτης β-ποικιλότητας Bray-Curtis μετά από μετασχηματισμό (υπολογισμός της τετραγωνικής ρίζας) των συχνοτήτων. Αυτό έγινε για τη μείωση της επιρροής των πιο κοινών OTUs στον υπολογισμό του δείκτη β-ποικιλότητας Bray-Curtis (δείτε §Α.3.).

## Στατιστικές αναλύσεις

Οι παράμετροι της α-ποικιλότητας ( $H'_{\log 2}$ ,  $J'$  και  $ES_{4217}$ ) υπολογίστηκαν στο πρόγραμμα Primer 6 (PRIMER-E Ltd, Plymouth, UK). Οι αναλύσεις SIMPER (similarity percentage) και ANOSIM (analysis of similarity) πραγματοποιήθηκαν επίσης στο Primer 6.

Τα θηκογράμματα (box-plots), τα μη-παραμετρικά t-tests και οι συσχετίσεις κατάταξης Spearman (Spearman rank correlations) μεταξύ των συχνοτήτων των πιο κοινών ταξινομικών ομάδων και των περιβαλλοντικών παραμέτρων πραγματοποιήθηκαν στο πρόγραμμα PAST v.2.17c (Hammer et al. 2001). Τα p-values όταν πραγματοποιούνταν πολλαπλές συγκρίσεις διορθώθηκαν με τη μέθοδο FDR (Benjamini and Hochberg 1995). Η γραφική αναπαράσταση των rarefaction curves, η ανάλυση κύριων συντεταγμένων (principal coordinates analysis -PCoA) και το UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) δένδρόγραμμα με jackknife υποστήριξη (από 100 OTU tables σχηματιζόμενα με τυχαία δειγματοληψία χωρίς επανατοποθέτηση με N=4217) πραγματοποιήθηκαν στο QIIME v.1.8.

### Γ.3. Αποτελέσματα

Η θερμοκρασία του νερού στις τρεις περιοχές κυμάνθηκε από 17 ως 17.6 °C, η αλατότητα από 38 ως 38.6 gr NaCl L<sup>-1</sup> και η αγωγιμότητα από 57.1 ως 57.9 mS cm<sup>-1</sup>. Το pH κυμάνθηκε από 7.96 ως 8.14 εκτός από τα δείγματα κάτω από τους κλωβούς στη Σητεία όπου ήταν ελαφρώς χαμηλότερο (7.58). Οι συγκεντρώσεις των DP και DN ήταν όμοιες στα δείγματα ελέγχου από όλες τις περιοχές (0.54-0.57 mg L<sup>-1</sup> και 3.2-3.81 mg L<sup>-1</sup>, αντίστοιχα). Η συγκέντρωση του DP δεν ήταν αυξημένη στα επηρεασμένα δείγματα από όλες τις περιοχές (0.53-0.56 mg L<sup>-1</sup>) αλλά αυτό είναι αναμενόμενο δεδομένης της πενίας φώσφορου σε αυτό το κομμάτι της Μεσογείου (Thingstad et al. 2005). Η συγκέντρωση του DN ήταν αυξημένη κατά 32-45% (4.63-5.03 mg L<sup>-1</sup>) στα επηρεασμένα δείγματα σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου. Η συγκέντρωση του DOC διέφερε ανάμεσα στα δείγματα ελέγχου (1.4-2.4 mg L<sup>-1</sup>). Στα επηρεασμένα δείγματα, η συγκέντρωση του DOC αυξήθηκε από 42-233% σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου. Ομοίως, η συγκέντρωση της χλωροφύλλης-α και ο αριθμός των ετερότροφων βακτηριακών κυττάρων αυξήθηκαν στα επηρεασμένα δείγματα κατά 54.2-80.3% και 111.1-423.8%, αντίστοιχα. Οι περιβαλλοντικές παράμετροι παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα Γ.3.1.

**Πίνακας Γ.3.1. Οι μέσες τιμές ± ένα τυπικό σφάλμα για τις περιβαλλοντικές παραμέτρους σε κάθε σταθμό.**

	SdC	SdI	AgC	AgI	StC	StI
<b>T (°C)</b>	17.4±0.2	17.5±0.1	17.2±0.2	17.5±0.1	17.2±0.1	17.1±0.1
<b>pH</b>	7.96±0.01	8.02±0.01	8.13±0.01	8.14±0.02	8.11±0.01	7.58±0.01
<b>αλατότητα (gr NaCl L<sup>-1</sup>)</b>	38.6±0	38.4±0	38±0	38.1±0	38.3±0	38.2±0
<b>αγωγιμότητα (mS cm<sup>-1</sup>)</b>	57.9±0	57.6±0	57.1±0	57.2±0	57.5±0	57.4±0
<b>DN (mg L<sup>-1</sup>)</b>	3.81±0.4	5.03±0.7	3.2±0.5	4.36±0.6	3.46±0.5	4.78±0.08
<b>DP (mg L<sup>-1</sup>)</b>	0.54±0.01	0.56±0.02	0.57±0.02	0.53±0.04	0.55±0.02	0.56±0.04
<b>DOC (mg L<sup>-1</sup>)</b>	2.48±0.02	3.7±0.05	1.42±0.06	2.36±0.02	1.52±0.02	5.07±0.05
<b>Ετερ. Βακτ. (10<sup>6</sup> cells ml<sup>-1</sup>)</b>	0.36±0.2	0.56±0.02	0.36±0.01	0.62±0.06	0.43±0.04	0.78±0.01
<b>Chl-α (μg L<sup>-1</sup>)</b>	0.12±0.01	0.26±0.02	0.21±0.01	1.1±0.06	0.36±0.02	0.76±0.04

Οι κωδικοί των δειγμάτων είναι σύμφωνα με την Εικόνα Γ.2.1. Οι περιβαλλοντικές παράμετροι είναι:

θερμοκρασία νερού (T), pH, αλατότητα, αγωγιμότητα, διαλυμένο άζωτο (DN), φώσφορος (DP), οργανικός άνθρακας (DOC), αριθμός των ετερότροφων βακτηρίων (Ετερ. Βακτ.) και συγκέντρωση της χλωροφύλλης-α (chl-α).

Μια σύνοψη των σταδίων της διόρθωσης των αλληλουχιών παρουσιάζεται στον Πίνακα Γ.3.2. Το μικρότερο δειγματοληπτικό μέγεθος, N, μετά τον καθαρισμό των αλληλουχιών ήταν 4875 (για το δείγμα StI1). Μετά όμως από την αφαίρεση των πλαστιδιακών αλληλουχιών οι οποίες ήταν πολύ αυξημένες στα δείγματα εντός της "λίμνης" του Αγίου Νικολάου (12.7-15.8% επί του συνόλου έναντι 0.5-7.3% στα άλλα δείγματα), πιθανώς λόγω αυξημένου αριθμού διατόμων στο νερό στα δείγματα αυτά και της ακόλουθης αφαίρεσης των "μοναδιαίων" (singleton) OTUs (0.2-3.8% επί του συνόλου των αλληλουχιών ανά δείγμα), το μικρότερο N ήταν 4217 (στο δείγμα AgI1).

**Πίνακας Γ.3.2. Ο αριθμός των αλληλουχιών και τα στάδια διόρθωσης για κάθε δείγμα.**

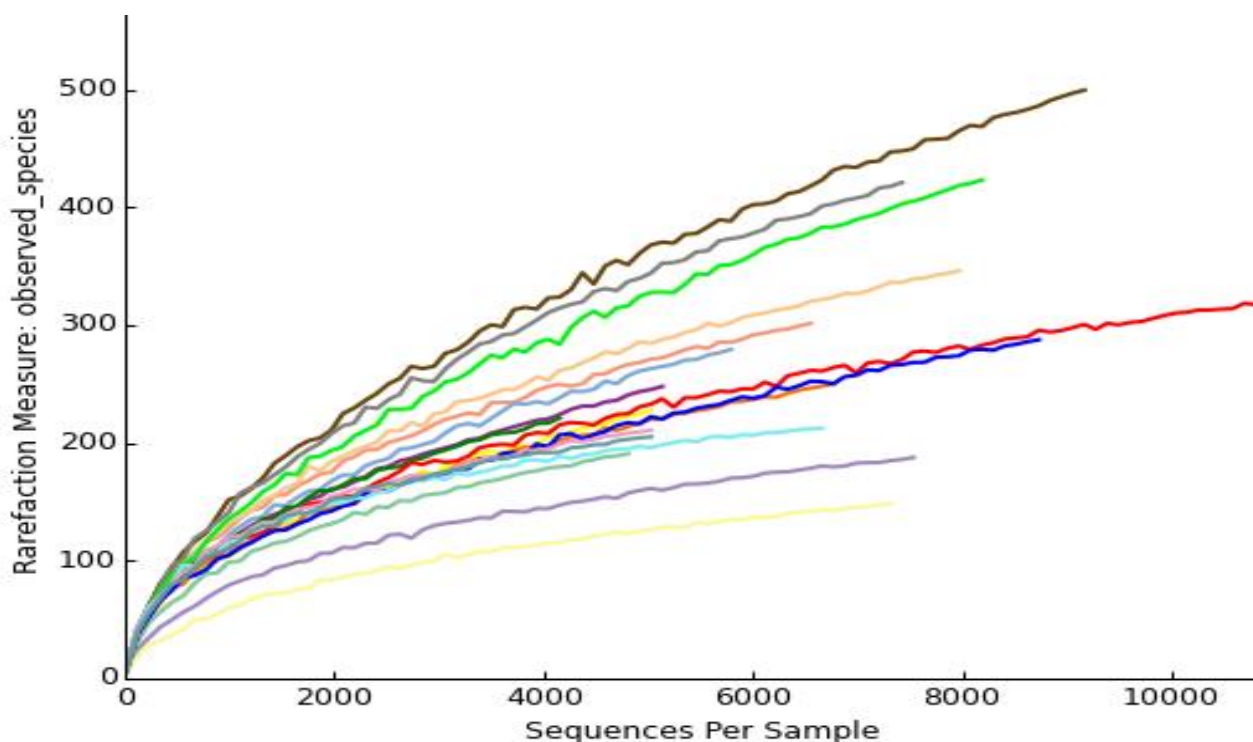
Sample	Αρχικά	Πρώτο στάδιο (%μικρών/θορύβου)	Χίμαιρες (%χιμαιρικών)	Καθαρές
StI1	6147	5357 (12.85)	482 (8.99)	4875
StI2	9424	8179 (13.21)	531 (6.49)	7648
StI3	8875	7904 (10.94)	468 (5.92)	7436
StC1	9073	8072 (11.03)	1211 (15.00)	6861
StC2	6771	6038 (10.82)	823 (13.63)	5215
StC3	7059	6209 (12.04)	1014 (16.33)	5195
AgI1	6925	5964 (13.87)	1062 (17.80)	4902
AgI2	8683	7616 (12.28)	1475 (19.36)	6141
AgI3	8305	7419 (10.66)	1298 (17.49)	6121
AgC1	17118	14947 (12.68)	2341 (15.66)	12606
AgC2	12197	10669 (12.52)	1679 (15.73)	8990
AgC3	9169	8087 (11.80)	1176 (14.54)	6911
SdI1	9352	8243 (11.85)	989 (11.99)	7254
SdI2	8478	7314 (13.72)	1151 (15.73)	6163
SdI3	11560	10088 (12.73)	1233 (12.22)	8855
SdC1	12344	10922 (11.51)	1125 (10.30)	9797



<b>SdC2</b>	10459	9241 (11.64)	1011 (10.94)	8230
<b>SdC3</b>	10670	9493 (11.03)	684 (7.20)	8809
<b>Total</b>	<b>172609</b>	<b>151762 (12.07 mean)</b>	<b>13560 (13.07 mean)</b>	<b>132009</b>

Οι κωδικοί των δειγμάτων είναι σύμφωνα με την Εικόνα Γ.2.1. Οι αριθμοί στο τέλος υποδηλώνουν τον αριθμό της επανάληψης. Πρώτη στήλη: ο αριθμός των αρχικών αλληλουχιών. Δεύτερη στήλη: ο αριθμός των αλληλουχιών μετά το πρώτο στάδιο καθαρισμού. Τρίτη στήλη: ο αριθμός των χιμαιρικών αλληλουχιών. Τέταρτη στήλη: Ο αριθμός των αλληλουχιών μετά τη διόρθωση, ανά δείγμα. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις συμβολίζουν τα ποσοστά που αφαιρέθηκαν σε κάθε στάδιο.

Οι αλληλουχίες μετά τον αρχικό καθαρισμό σχημάτισαν 3,275 OTUs, από τα οποία 78 ήταν πλαστιδιακά και απομακρύνθηκαν. Οι rarefaction curves που σχηματίστηκαν στο στάδιο αυτό, με βάση το δείκτη ES, έδειξαν ότι η δειγματοληψία μπορεί να χαρακτηριστεί ως μερικώς "επαρκής", αφού δεν άρχισαν όλες να κλίνουν ικανοποιητικά προς τον άξονα Χ (Εικόνα Γ.3.1.).



**Εικόνα Γ.3.1.** Οι rarefaction curves για όλα τα δείγματα. Κάθε καμπύλη αντιστοιχεί σε ένα διαφορετικό δείγμα. Τα ονόματα των δειγμάτων δεν παρουσιάζονται για λόγους ευκρίνειας.

Μετά από τη φυλογενετική ταξινόμηση, η πλειοψηφία των OTUs (>99.6%) αντιστοιχίστηκε σε 328 Γένη, 198 Οικογένειες, 108 Τάξεις, 55 Κλάσεις και 28 Φύλα, του Βασιλείου των Βακτηρίων (Πίνακας Γ.3.3.). Τρία κύρια Φύλα αποτελούσαν το 93.4-99.5% της κοινότητας κάθε δείγματος; τα *Proteobacteria* (67-84% ανά δείγμα), τα *Bacteroidetes* (6-32% ανά δείγμα) και τα *Cyanobacteria* (1-14% ανά δείγμα). Τα *Alphaproteobacteria* (44.6% κατά μέσο όρο), τα *Gammaproteobacteria* (28.7% κατά μέσο όρο), τα *Flavobacteria* (11.4% κατά μέσο όρο) και τα *Synechococcophycideae* (6.5% κατά μέσο όρο) ήταν οι κύριες Κλάσεις. Οι ομάδες με τη μεγαλύτερη συχνότητα σε κάθε Κλάση ήταν οι *Rickettsiales-Rhodobacterales*, οι *Alteromonadales-Oceanospirillales-SAR86*, οι *Flavobacteriales* και οι *Synechococcales*, αντίστοιχα. Ακολούθως, οι ομάδες με τη μεγαλύτερη συχνότητα ήταν οι *Pelagibacteraceae*, *Rhodobacteraceae*, *Alteromonadaceae-Colwelliaceae-OM60*, *Cryomorphaceae-Flavobacteriaceae* και *Synechococcaceae*.

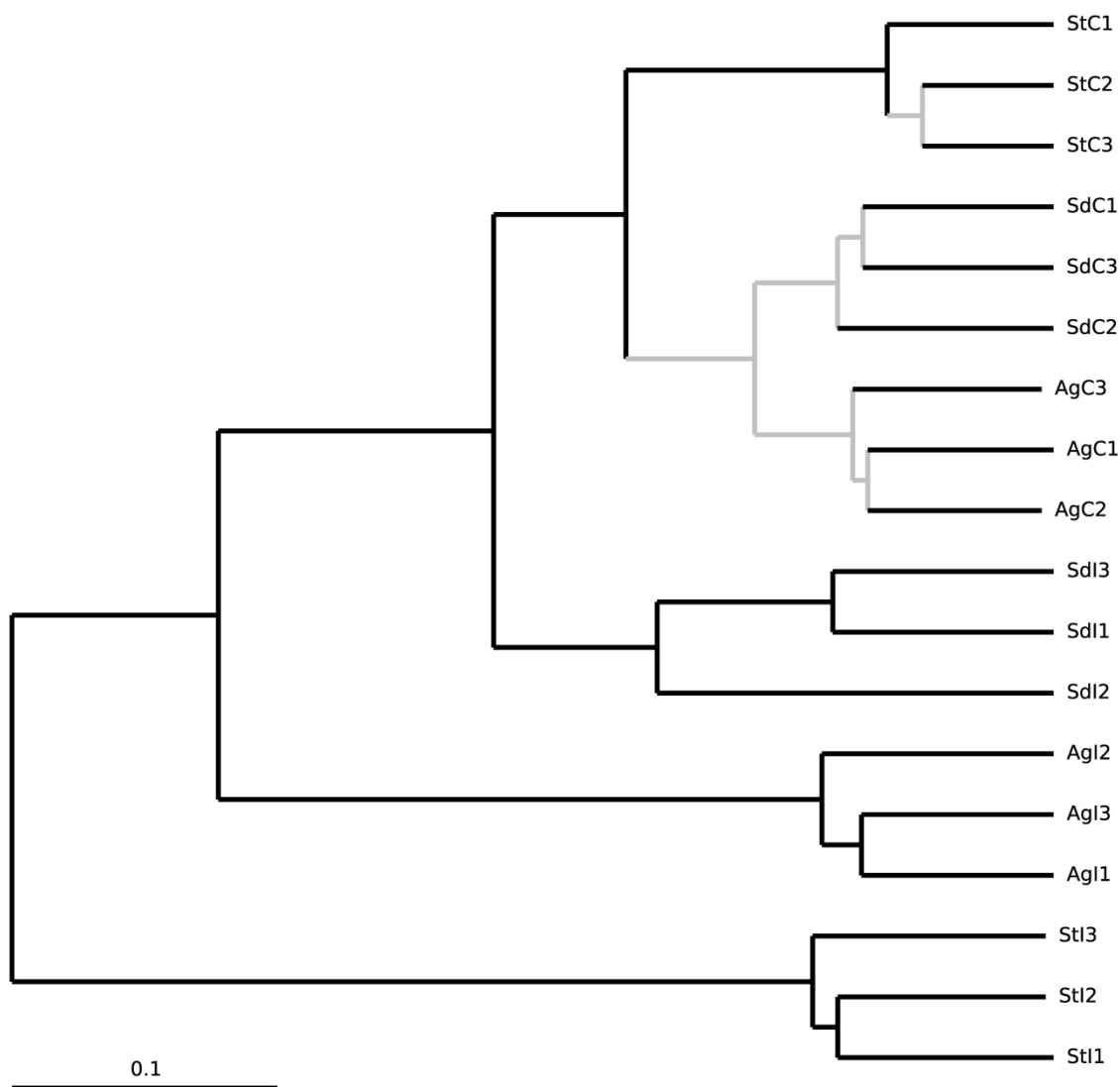
**Πίνακας Γ.3.3. Η κατανομή των φυλογενετικών ομάδων στα δείγματα των σταθμών κάθε περιοχής.**

	<b>AgI</b>	<b>AgC</b>	<b>StI</b>	<b>StC</b>	<b>SdI</b>	<b>SdC</b>	<b>Σύνολο</b>
<b>Μέσος αριθμός Γενών</b>	99.33	90.33	79.66	84.33	126.00	136.33	<b>328</b>
<b>Μέσος αριθμός Οικογενειών</b>	70.33	68.66	60.00	70.00	90.33	102.33	<b>198</b>
<b>Μέσος αριθμός Τάξεων</b>	44.3	44.00	39.33	44.00	52.33	62.00	<b>108</b>
<b>Μέσος αριθμός Κλάσεων</b>	19.00	21.33	20.00	21.66	24.00	30.66	<b>55</b>
<b>Μέσος αριθμός Φύλων</b>	8.33	11.66	9.66	11.00	12.00	15.66	<b>28</b>

Οι κωδικοί των δειγμάτων είναι σύμφωνα με την Εικόνα Γ.2.1. Οι επαναλήψεις έχουν συμψηφιστεί. Ο συνολικός αριθμός των διαφορετικών ομάδων κάθε φυλογενετικού επιπέδου φαίνεται στην τελευταία στήλη.

### **Μεταβλητότητα της κοινότητας ανάμεσα στα δείγματα**

Υπολογίστηκε ο δείκτης ομοιότητας Bray-Curtis μεταξύ όλων των δειγμάτων και ακολούθως εξετάστηκε πιθανή ομαδοποίηση χρησιμοποιώντας το ANOSIM τεστ. Τα δείγματα ελέγχου από όλες τις περιοχές σχημάτισαν μια διακριτή ομάδα (ANOSIM test, global R=0.615,  $p=0.016$ ), ενώ κάθε τριάδα "επηρεασμένων" δειγμάτων από κάθε περιοχή σχημάτισε μια ξεχωριστή ομάδα (ANOSIM test, global R=1,  $p=0.004$ ), γεγονός που υποδηλώνει ότι οι τρεις ομάδες των "επηρεασμένων" δειγμάτων διέφεραν τόσο από τα δείγματα ελέγχου όσο και μεταξύ τους. Ένα UPGMA δενδρόγραμμα με υποστήριξη jackknife, το οποίο απεικονίζει τις σχέσεις μεταξύ των δειγμάτων, παρουσιάζεται στην Εικόνα Γ.3.2.



**Εικόνα Γ.3.2. UPGMA δενδρόγραμμα με jackknife υποστήριξη (από 100 δέντρα). Οι κωδικοί των δειγμάτων είναι σύμφωνα με την Εικόνα Γ.2.1. Ο αριθμός στο τέλος κάθε κωδικού αντιστοιχεί στον αριθμό της επανάληψης. Οι κόμβοι με >75% jackknife υποστήριξη απεικονίζονται μαύροι ενώ οι κόμβοι με <75% jackknife υποστήριξη γκρι.**

### **Αλλαγές στις παραμέτρους της α-ποικιλότητας**

Ο δείκτης Shannon ( $H'_{\log 2}$ ), ο παρατηρούμενος αριθμός των OTUs ( $S$ ) και η ισοκατανομή κατά Pielou ( $J'$ ) χρησιμοποιήθηκαν για να εκτιμηθούν οι αλλαγές στη συνολική ποικιλότητα, στον αριθμό των διαφορετικών OTUs για το ίδιο δειγματοληπτικό μέγεθος (4217) και στην ισοκατανομή της κοινότητας, αντίστοιχα, μεταξύ "επηρεασμένων" και δειγμάτων ελέγχου σε κάθε περιοχή. Στον Άγιο Νικόλαο, ο αριθμός των παρατηρούμενων OTUs δεν άλλαξε, ενώ η ισοκατανομή και η συνολική ποικιλότητα

αυξήθηκαν στα "επηρεασμένα" δείγματα (Πίνακας Γ.3.4.). Όλες οι εξεταζόμενες παράμετροι μειώθηκαν στα δείγματα κάτω από τους κλωβούς στη Σητεία (Πίνακας Γ.3.4.). Στα "επηρεασμένα" δείγματα στη Σούδα, ο αριθμός των παρατηρούμενων OTUs μειώθηκε, η ισοκατανομή αυξήθηκε, ενώ η συνολική ποικιλότητα δεν άλλαξε (Πίνακας Γ.3.4.).

**Πίνακας Γ.3.4. Ο αριθμός των παρατηρούμενων OTUs (S), η ισοκατανομή κατά Piellou (J') και ο δείκτης Shannon ( $H'_{(\log 2)}$ ) για κάθε δείγμα.**

	S Ag	J' Ag	$H'_{(\log 2)}$ Ag	S St	J' St	$H'_{(\log 2)}$ St	S Sd	J' Sd	$H'_{(\log 2)}$ Sd
<b>Impacted1</b>	222	0.6529	5.089	172	0.5396	4.042	250	0.6670	5.313
<b>Impacted2</b>	231	0.6591	5.175	145	0.4742	3.428	245	0.6591	5.231
<b>Impacted3</b>	208	0.6546	5.041	142	0.4291	2.954	268	0.6602	5.325
<b>Control1</b>	221	0.6212	4.838	186	0.6750	5.089	337	0.6296	5.286
<b>Control2</b>	194	0.6181	4.697	202	0.6472	4.956	318	0.6212	5.164
<b>Control3</b>	209	0.6306	4.861	197	0.6485	4.943	289	0.6215	5.081
<b>increase/decrease</b>	-	αύξηση	αύξηση	μείωση	μείωση	μείωση	μείωση	αύξηση	-

Στατιστικά σημαντικές αλλαγές στις παραμέτρους παρουσιάζονται στην τελευταία γραμμή. Οι κωδικοί των δειγμάτων είναι σύμφωνα με την Εικόνα Γ.2.1.

### **Αλλαγές στις συχνότητες των ταξινομικών ομάδων με τη μεγαλύτερη αφθονία**

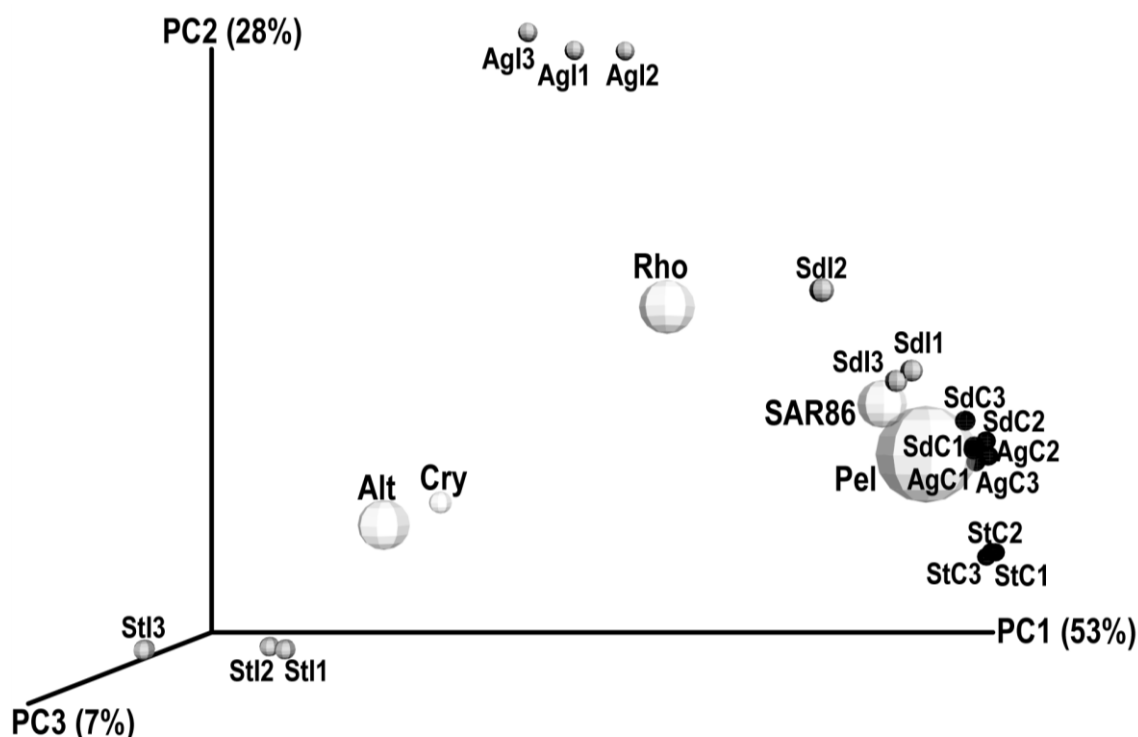
Εξετάστηκαν οι αλλαγές μεταξύ "επηρεασμένων" και δειγμάτων ελέγχου σε κάθε περιοχή, στις συχνότητες των ταξινομικών ομάδων με τη μεγαλύτερη αφθονία, δηλαδή τις οκτώ πιο άφθονες βακτηριακές Οικογένειες και τον κλάδο SAR86. Για πέντε από τις εννέα ομάδες, η τάση στις αλλαγές των συχνοτήτων ήταν όμοια για κάθε περιοχή: οι συχνότητες των *Rhodobacteraceae*, *Alteromonadaceae* και *Cryomorphaceae* αυξήθηκαν, ενώ οι συχνότητες των *Pelagibacteraceae* και SAR86 μειώθηκαν, στα "επηρεασμένα" δείγματα σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου (Πίνακας Γ.3.5.).

Πίνακας Γ.3.5. Η μέση αλλαγή στις σχετικές συχνότητες των εννέα ταξινομικών ομάδων με τη μεγαλύτερη αφθονία (πρώτη στήλη) για κάθε σταθμό σε καθεμία από τις τρεις περιοχές. Οι επαναλήψεις έχουν συμψηφιστεί.

	SdC	SdI	Αλλαγή	AgC	AgI	Αλλαγή	StC	StI	Αλλαγή
<i>Pelagibacteraceae</i>	46.2	31.3	-32.4%	55.2	15.6	-71.7%	47.2	7.6	-83.9%
<b>SAR86</b>	9.7	8.5	-12.7%	9.6	5.21	-45.7%	11.7	2.0	-82.8%
<i>Rhodobacteraceae</i>	6.8	11.0	+60.9%	3.9	25.8	+565%	2.8	12.5	+346%
<i>Alteromonadaceae</i>	1.3	4.4	+246%	1.0	8.5	+745%	1.3	46.2	+3,532%
<i>Cryomorphaceae</i>	0.8	1.4	+74.3%	0.8	3.0	+278%	0.5	12.4	+2,315%
<i>Flavobacteriaceae</i>	3.7	6.7	+79.5%	5.3	22.2	+319%	6.3	3.2	-50.0%
<i>Synechococcaceae</i>	7.1	12.1	+70.3%	6.3	0.7	-88.5%	11.4	1.6	-85.7%
<b>OM60</b>	1.9	2.6	+34.1%	1.3	2.0	+56.9%	0.2	0.1	-50.0%
<i>Colwelliaceae</i>	0.1	0.06	-38.5%	0.06	0.1	+114%	0.01	8.5	+100,800%

Οι κωδικοί των δειγμάτων είναι σύμφωνα με την Εικόνα Γ.2.1. Κάθε τρίτη στήλη μετά την πρώτη δείχνει την αλλαγή (%) της σχετικής συχνότητας κάθε ομάδας, στα "επηρεασμένα" δείγματα σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου για κάθε περιοχή.

Οι αλλαγές στις συχνότητες των πέντε αυτών ομάδων μπορούν να εξηγήσουν την πλειοψηφία της μεταβλητότητας στις κοινότητες μεταξύ "επηρεασμένων" δειγμάτων και δειγμάτων ελέγχου σε κάθε περιοχή (SIMPER, n=6, 55.96, 59.81 and 73.04% της συνολικής μεταβλητότητας στη Σούδα, τον Άγιο Νικόλαο και τη Σητεία, αντίστοιχα). Μια διπλή ανάλυση κύριων συντεταγμένων, στην οποία απεικονίζονται οι συχνότητες των παραπάνω πέντε ομάδων σε σχέση με τη διάταξη των κοινοτήτων των δειγμάτων, παρουσιάζεται στην Εικόνα Γ.3.3. Το πρότυπο της αλλαγής των συχνοτήτων για τις άλλες τέσσερις ομάδες ήταν διαφορετικό. Η συχνότητα των *Flavobacteriaceae* και OM60 αυξήθηκε στη Σούδα και τον Άγιο Νικόλαο αλλά μειώθηκε στη Σητεία, η συχνότητα των *Synechococcaceae* αυξήθηκε στη Σούδα αλλά μειώθηκε στον Άγιο Νικόλαο και τη Σητεία και η συχνότητα των *Colwelliaceae* μειώθηκε στη Σούδα αλλά αυξήθηκε στον Άγιο Νικόλαο και τη Σητεία (Πίνακας Γ.3.5.).



Εικόνα Γ.3.3. Διπλή ανάλυση κύριων συντεταγμένων των δειγμάτων και των ομάδων *Pelagibacteraceae* (Pel), SAR86, *Rhodobacteraceae* (Rho), *Alteromonadaceae* (Alt) και *Cryomorphaceae* (Cry). Οι κωδικοί των δειγμάτων είναι σύμφωνα με την Εικόνα Γ.2.1. Ο αριθμός στο τέλος κάθε κωδικού αντιστοιχεί στον αριθμό της επανάληψης. Τα δείγματα ελέγχου παριστάνονται με μαύρες σφαίρες ενώ τα "επηρεασμένα" δείγματα με γκριζες σφαίρες. Οι βακτηριακές ταξινομικές ομάδες παριστάνονται με λευκές σφαίρες, με διαμέτρους ανάλογες της μέσης συχνότητας της ομάδας ανά τα δείγματα.

Εξετάστηκε επίσης τυχόν συσχετισμός μεταξύ των αλλαγών στις συχνότητες καθεμιάς από τις εννέα ομάδες με τη μεγαλύτερη αφθονία και των περιβαλλοντικών παραμέτρων σχετικών με τον εμπλουτισμό με θρεπτικά, δηλαδή τον αριθμό των ετερότροφων βακτηρίων, τη συγκέντρωση χλωροφύλλης-α και τις συγκεντρώσεις των DP, DN και DOC. Οι συχνότητες των *Alteromonadaceae* και *Rhodobacteraceae* συσχετίστηκαν θετικά με τον αριθμό των ετερότροφων βακτηρίων, τη συγκέντρωση της χλωροφύλλης-α και τις συγκεντρώσεις των DN και DOC ( $n=18$ ,  $0.884 > \rho > 0.552$ ,  $0.04 > p > 3E-06$ ) (Πίνακας Γ.3.6.). Η συχνότητα των *Cryomorphaceae* συσχετίστηκε θετικά με τον αριθμό των ετερότροφων βακτηρίων, τη συγκέντρωση της χλωροφύλλης-α και τη συγκέντρωση του DOC ( $n=18$ ,  $0.697 > \rho > 0.556$ ,  $0.04 > p > 0.003$ ) (Πίνακας Γ.3.6.). Η συχνότητα των *Pelagibacteraceae* συσχετίστηκε αρνητικά με τον αριθμό των ετερότροφων βακτηρίων, τη

συγκέντρωση της χλωροφύλλης-α και τις συγκεντρώσεις των DN και DOC (n=18,  $-0.705 > \rho > -0.917$ ,  $0.003 > p > 2E-07$ ) (Πίνακας Γ.3.6.). Η συχνότητα των SAR86 συσχετίστηκε αρνητικά με τον αριθμό των ετερότροφων βακτηρίων και τις συγκεντρώσεις των DN και DOC (n=18,  $-0.613 > \rho > -0.670$ ,  $0.017 > p > 0.006$ ) (Πίνακας Γ.3.6.). Η συχνότητα των *Colwelliaceae* συσχετίστηκε θετικά με τη συγκέντρωση του DOC (n=18,  $\rho = 0.624$ ,  $p = 0.014$ ) (Πίνακας Γ.3.6.) ενώ οι συχνότητες των *Flavobacteriaceae*, *Synechococcaceae* και OM60 δεν συσχετίστηκαν με καμία από τις εξεταζόμενες μεταβλητές (n=18,  $0.461 > \rho > -0.463$ ,  $1 > p > 0.08$ ) (Πίνακας Γ.3.6.).

**Table 4. Οι συσχετίσεις κατά Spearman ανάμεσα στις συχνότητες των εννέα ταξινομικών ομάδων με τη μεγαλύτερη αφθονία και τις περιβαλλοντικές παραμέτρους που σχετίζονται με τον εμπλουτισμό με θρεπτικά.**

	Ετερ. Βακτ.	Χλωρ-α	DP	DN	DOC
<i>Pelagibacteraceae</i>	<b>-0.917**</b>	<b>-0.705**</b>	n/s	<b>-0.793**</b>	<b>-0.766**</b>
SAR86	<b>-0.670**</b>	n/s	n/s	<b>-0.613*</b>	<b>-0.653**</b>
<i>Alteromonadaceae</i>	<b>0.884**</b>	<b>0.737**</b>	n/s	<b>0.745**</b>	<b>0.697**</b>
<i>Rhodobacteraceae</i>	<b>0.693**</b>	<b>0.552*</b>	n/s	<b>0.721**</b>	<b>0.556*</b>
<i>Cryomorphaceae</i>	<b>0.697**</b>	<b>0.556*</b>	n/s	n/s	<b>0.585*</b>
<i>Flavobacteriaceae</i>	n/s	n/s	n/s	n/s	n/s
<i>Synechococcaceae</i>	n/s	n/s	n/s	n/s	n/s
OM60	n/s	n/s	n/s	n/s	n/s
<i>Colwelliaceae</i>	n/s	n/s	n/s	n/s	<b>0.624*</b>

Ετερ. Βακτ.: ο αριθμός των ετερότροφων βακτηρίων, Χλωρ-α: η συγκέντρωση της χλωροφύλλης-α. n/s: μη-σημαντικές (non-significant) συσχετίσεις. Οι τιμές του στατιστικού rho αναγράφονται με έντονη γραμματοσειρά για στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις σε επίπεδο σημαντικότητας 0.05 (\*) ή 0.01 (\*\*).



## Σύνοψη

Από την εργασία αυτή φαίνεται ότι, αντίθετα με τις αλλαγές στις παραμέτρους της α-ποικιλότητας, οι αλλαγές στις συχνότητες πέντε ταξινομικών ομάδων του βακτηριοπλαγκτού με μεγάλη αφθονία ήταν παρόμοιες μεταξύ των τριών περιοχών που εξετάστηκαν. Αυτό το *in situ* πρότυπο ήταν σημαντικά συσχετισμένο με τις περιβαλλοντικές παραμέτρους που σχετίζονται με τον εμπλουτισμό από θρεπτικά και μπορούσε να εξηγήσει το μεγαλύτερο μέρος της μεταβλητότητας των κοινοτήτων μεταξύ των "επηρεασμένων" δειγμάτων και των δειγμάτων ελέγχου σε κάθε περιοχή. Παρόμοιες μελλοντικές εργασίες, που θα πραγματοποιηθούν τυχόν σε ευρύτερη χωρική ή και χρονική κλίμακα, θα μπορούσαν να προσδιορίσουν το πόσο ευρέως διαδεδομένο είναι το πρότυπο αυτό. Αυτό θα μπορούσε να σημαίνει ότι οι συχνότητες των ομάδων αυτών του βακτηριοπλαγκτού, ιδιαίτερα των κοσμοπολιτικών SAR11 και SAR86, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως οικολογικοί δείκτες για την παρακολούθηση του εμπλουτισμού με θρεπτικά στη στήλη του νερού της θάλασσας.

# Κεφάλαιο Δ. Αλλαγές στη δομή και τη σύσταση των κοινοτήτων του βακτηριοπλαγκτού διαφορετικών παράκτιων ιζημάτων μετά από επώαση σε ίδιες περιβαλλοντικές συνθήκες

---

## Δ1. Εισαγωγή

Η βιογεωγραφία των μικροβίων έχει "στιγματιστεί" ιστορικά από την διάσημη θεωρία ότι "τα πάντα είναι παντού αλλά το περιβάλλον επιλέγει" (Becking 1934). Το σκεπτικό πίσω από τη φράση αυτή είναι ότι οι μικροοργανισμοί έχουν μεγάλη αφθονία, γρήγορους ρυθμούς ανάπτυξης και μεγάλη δυνατότητα διασποράς (Pedrós-Alió 1993; Whitman et al. 1998). Έτσι, η διασπορά τους θα μπορούσε να είναι ανεξάρτητη γεωγραφικών φραγμών και ενώ η α-ποικιλότητα να παρουσιάζεται πολύ μεγάλη τοπικά, οι αλλαγές σε παγκόσμιο επίπεδο να είναι μικρές (Fenchel and Finlay 2004). Μια πρώιμη μελέτη σε βάλτους αλμυρού νερού έδειξε ακριβώς αυτό, αποδεικνύοντας ότι στην "κλασσική" σχέση επιφάνειας/αριθμού ειδών  $S=cA^z$  (Arrhenius 1921; Gleason 1922), όπου  $S$  ο αριθμός ειδών ("τάξα" για τα βακτήρια)  $A$  η επιφάνεια της δειγματοληψίας και  $c, z$  σταθερές, το  $z$  ήταν πολύ μικρότερο για τα βακτήρια από ότι για τα φυτά, που σημαίνει ότι ο αριθμός των διαφορετικών παρατηρούμενων βακτηριακών τάξεων αυξανόταν πολύ λιγότερο αυξανόμενης της επιφάνειας δειγματοληψίας από τον αριθμό των διαφορετικών ειδών των φυτών (Horner-Devine et al. 2004). Πιο πρόσφατα βρέθηκε ότι για ένα σύνολο δεκατεσσάρων λιμνών, το  $S$  των κοινοτήτων του βακτηριοπλαγκτού ήταν αρνητικά αντί θετικά συσχετισμένο με την επιφάνεια της λίμνης αλλά πολύ σημαντικά συσχετισμένο με την διαθεσιμότητα θρεπτικών, περαιτέρω υποστηρίζοντας την παραπάνω θεωρία (Logue et al. 2012).

Ακόμα, σύμφωνα με την υπόθεση του Baas-Becking, η πλειοψηφία των μικροβιακών ειδών θα έπρεπε να είναι παρούσα παντού τουλάχιστον υπό τη μορφή μιας "τράπεζας σπόρων" (seed bank), δηλαδή ενός "ρεζερβουάρ από ανενεργά άτομα τα οποία έχουν τη δυνατότητα να ενεργοποιηθούν στο μέλλον κάτω από διαφορετικές

περιβαλλοντικές συνθήκες" (Lennon and Jones 2011), από την οποία θα γινόταν επιλογή από τις τοπικές περιβαλλοντικές παραμέτρους. Ως αποτέλεσμα, οι παρατηρούμενες μεταβολές στη σύσταση μιας κοινότητας σε χωρική (ή και χρονική) κλίμακα θα έπρεπε να οφείλονται σε αλλαγές του περιβάλλοντος παρά στην περιορισμένη διασπορά κάποιων ειδών (Langenheder and Ragnarsson 2007). Έχει προταθεί ότι οι παρατηρούμενες μακριές "ουρές" στις καμπύλες κατανομής των βακτηριακών κοινοτήτων αντιπροσωπεύουν αυτό το "ρεζερβουάρ" (Pedrós-Alió 2006; Sogin et al. 2006). Δυο πρόσφατες μελέτες στη θάλασσα της Μάγχης έχουν επίσης δείξει την ύπαρξη τέτοιου "ρεζερβουάρ". Η πρώτη μελέτη έδειξε ότι ~95% των OTUs τα οποία βρέθηκαν σε δείγματα νερού από μηνιαία δείγματα που είχαν συλλεχθεί σε μια περίοδο έξι χρόνων βρέθηκαν επίσης (έστω και σε πολύ μικρή συχνότητα) και σε ένα δείγμα από εκτεταμένη δειγματοληψία ( $N \sim 11 \times 10^6$ ) (Caroraso et al. 2012). Η δεύτερη μελέτη, συγκρίνοντας το ίδιο (μεγάλο) δείγμα με 356 δείγματα από όλους τους ωκεανούς, έδειξε ότι το ποσοστό των κοινών τάξων αυξάνονταν με την αύξηση του δειγματοληπτικού μεγέθους (Gibbons et al. 2013). Οι συγγραφείς υπολόγισαν ότι με μέγεθος δείγματος  $\sim 2 \times 10^{11}$  θα είχαν επιτύχει πλήρη αλληλεπικάλυψη με όλα τα δείγματα, υποστηρίζοντας την υπόθεση του Baas-Becking για μηδενικό περιορισμό της διασποράς των βακτηρίων.

Δυο άλλες μελέτες υποστηρίζουν το αντίθετο. Στην πρώτη, μια μετα-ανάλυση από 509 δείγματα από νερό και ίζημα των ωκεανών, βρέθηκε ότι, αντίθετα με τις κοινότητες της στήλης του νερού, οι κοινότητες του ιζήματος παρουσίαζαν μεγαλύτερη ανομοιογένεια αυξανόμενης της απόστασης, πιθανώς λόγω μειωμένης φυσικής μίξης των ιζημάτων στο βυθό του ωκεανού (Zinger et al. 2011). Στη δεύτερη, ανάλυση κοινοτήτων βακτηριοπλαγκτού της εύφωτης ζώνης 277 δειγμάτων από περιοχές με διαφορετικό γεωγραφικό πλάτος, έδειξε την ύπαρξη περισσότερων τάξων από ότι προέβλεπε η υπόθεση του μηδενικού περιορισμού της διασποράς κοντά στους πόλους και σε ένα από τα δύο ημισφαίρια αλλά όχι και στα δύο (Sul et al. 2013).

Παρά τη διαφωνία στα αποτελέσματά τους, όλες οι παραπάνω εργασίες συγκλίνουν στο ότι χρειάζεται ένας πολύ μεγάλος αριθμός δειγμάτων και δειγματοληπτικού μεγέθους ανά δείγμα για τον αποτελεσματικό έλεγχο της υπόθεσης του Baas-Becking. Ένας άλλος τρόπος ελέγχου της υπόθεσης αυτής είναι, αντί να εξεταστούν εξονυχιστικά οι διαφορές στις κοινότητες πολλών δειγμάτων από οικοσυστήματα με διαφορετικές περιβαλλοντικές

παραμέτρους, να εξεταστούν οι αλλαγές στην ομοιότητα μεταξύ διαφορετικών κοινοτήτων όταν βρεθούν κάτω από πανομοιότυπες συνθήκες. Η ομοιότητα των κοινοτήτων θα όφειλε να αυξάνεται κάτω από όμοιες συνθήκες αν ίσχυε η υπόθεση αυτή. Ένα τέτοιο πείραμα το οποίο πραγματοποιήθηκε με community fingerprinting (T-RFLPs) σε κοινότητες βακτηριοπλαγκτού του γλυκού νερού έδειξε ότι οι κοινότητες στο τέλος του πειράματος ήταν διαφορετικές τόσο ταξινομικά όσο και λειτουργικά (Langenheder et al. 2006).

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να ελεγχθεί η υπόθεση του Baas-Becking για τις βακτηριακές κοινότητες των παράκτιων ιζημάτων με παρόμοιο τρόπο, εξετάζοντας σε βάθος τις αλλαγές στις κοινότητες, με τη χρήση μεθόδων next generation sequencing. Για το σκοπό αυτό, επώασαμε ίζημα από τρεις διαφορετικές παράκτιες περιοχές σε τέσσερις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες για 32 ημέρες και ελέγξαμε τις αλλαγές στη σύσταση και τη δομή των βακτηριακών κοινοτήτων του ιζήματος ανά τέσσερις ημέρες με αλληλούχηση του 16S rRNA της κοινότητας με next generation sequencing. Παράλληλα, μετρήσαμε διάφορες περιβαλλοντικές μεταβλητές που σχετίζονται με αλλαγές στους βιογεωχημικούς κύκλους του ιζήματος κατά τη διάρκεια του πειράματος.

## Δ.2. Υλικά και μέθοδοι

### Πειραματική διάταξη και δειγματοληψία

Η αρχική δειγματοληψία για την επιλογή των πιο διαφορετικών κοινοτήτων βακτηριοπλαγκτού από το ίζημα έγινε από ένα σύνολο οκτώ παράκτιων περιοχών: στην παραλία του Λιμένα Χερσονήσου Ηρακλείου ( $35^{\circ}18'45.92''\text{N}$ ,  $25^{\circ}23'58.86''\text{E}$ ), στο τεχνητό λιμανάκι μπροστά από τις εγκαταστάσεις του ΕΛΚΕΘΕ στις Γούρνες Ηρακλείου ( $35^{\circ}20'6.00''\text{N}$ ,  $25^{\circ}16'53.10''\text{E}$ ), στις εκβολές του ποταμού Γιόφυρου στην πόλη του Ηρακλείου ( $35^{\circ}20'21.59''\text{N}$ ,  $25^{\circ}6'44.74''\text{E}$ ), στην παραλία της Αμμουδάρας στην πόλη του Ηρακλείου ( $35^{\circ}20'16.77''\text{N}$ ,  $25^{\circ}5'45.78''\text{E}$ ), στις εκβολές του ποταμού Αλμυρού δυτικά της πόλης του Ηρακλείου ( $35^{\circ}20'24.51''\text{N}$ ,  $25^{\circ}3'37.91''\text{E}$ ), στο τεχνητό λιμανάκι της Παντάνασσας δυτικά της πόλης του Ηρακλείου ( $35^{\circ}21'12.35''\text{N}$ ,  $25^{\circ}2'34.10''\text{E}$ ), στην παραλία της Αγίας Πελαγίας ( $35^{\circ}24'26.35''\text{N}$ ,  $25^{\circ}1'7.18''\text{E}$ ) και στην παραλία μπροστά από το χωριό Φόδελε ( $35^{\circ}24'9.58''\text{N}$ ,  $24^{\circ}57'12.82''\text{E}$ ) (Εικόνα Δ.2.1.).



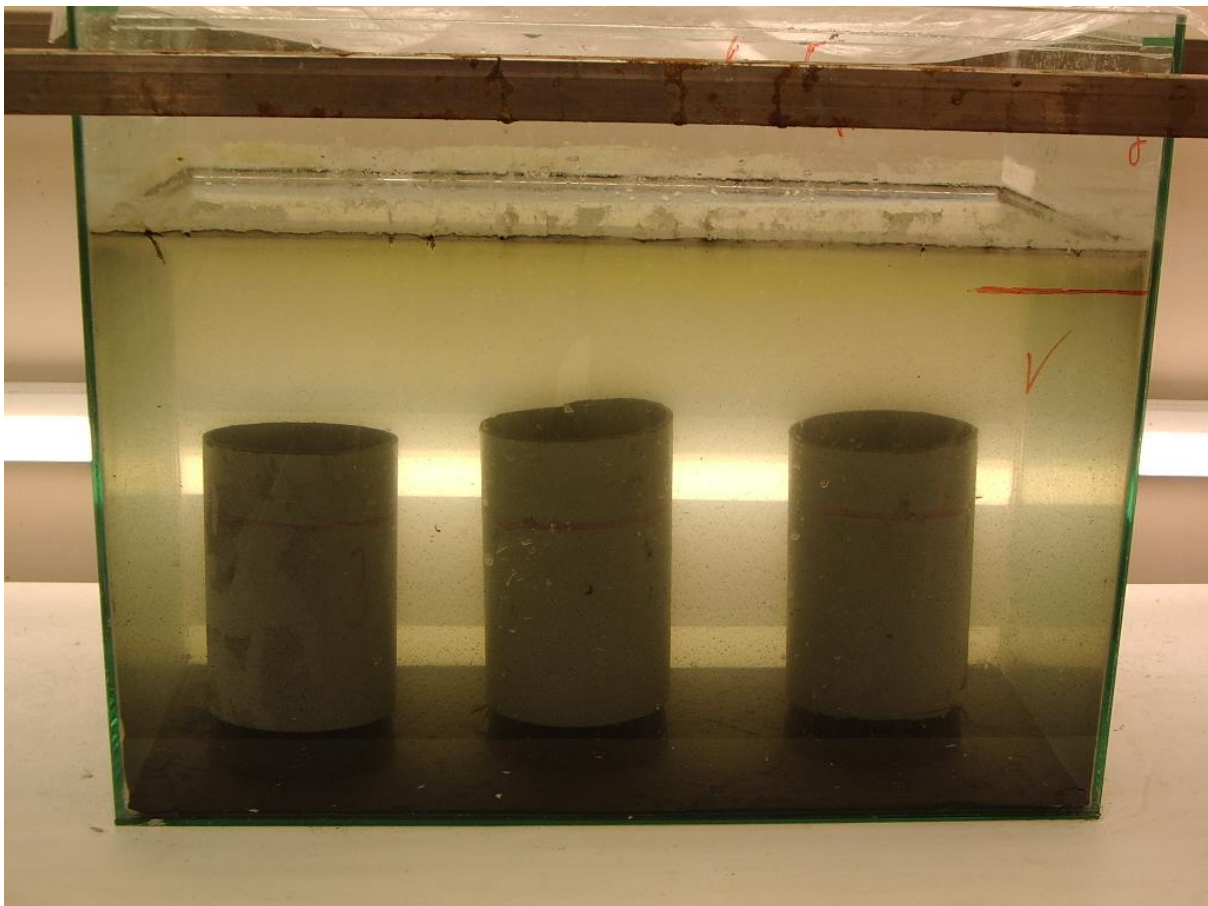
Εικόνα Δ.2.1. Χάρτης της αρχικής δειγματοληψίας. H1: Χερσόνησος, HCMR: ΕΛΚΕΘΕ, GFR1:Γιόφυρος, AM1:Αμμουδάρα, AL1:Αλμυρός, PA1:Παντάνασσα, AP1:Αγία Πελαγία, FR1: Φόδελε. Πηγή: επεξεργασμένη εικόνα από το Google Earth™

Παράκτιο ίζημα (~10 g), από το πρώτο εκατοστό της επιφάνειας του ιζήματος, συλλέχθηκε από βάθος νερού ~1 m τον Απρίλη του 2011 με ελεύθερη κατάδυση χρησιμοποιώντας κυλινδρικό πυρηνοδειγματολήπτη (corer) ή με τη χρήση αρπάγης Van Veen.

Μετά την επιλογή των τριών πιο διαφορετικών κοινοτήτων βακτηριοπλαγκτού (δείτε τα αποτελέσματα) έγινε δεύτερη δειγματοληψία από το Φόδελε, την Παντάνασσα

και το Γιόφυρο, ιζήματος της υποπαραλιακής ζώνης (~1 m βάθος νερού) με ελεύθερη κατάδυση και με τη χρήση πλαστικών (PVC) κυλινδρικών πυρηνοδειγματοληπτών εσωτερικής διαμέτρου 9.4 cm. Σε κάθε περιοχή συλλέχθηκαν δώδεκα δείγματα ιζήματος από τα ανώτερα 15 cm και παρέμειναν εντός του πυρηνοδειγματολήπτη μέχρι την μεταφορά τους στο εργαστήριο με τη βοήθεια δυο ελαστικών επιστομίων. Στην ίδια δειγματοληψία συλλέχθηκαν δείγματα για τη μελέτη της σύστασης του ιζήματος σε άμμο, ιλύ και άργιλο και μετρήθηκε η αλατότητα, η θερμοκρασία και το οξυγόνο του νερού, καθώς επίσης και το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ιζήματος (Eh).

Αμέσως μετά τη δειγματοληψία, οι πυρηνοδειγματολήπτες μεταφέρθηκαν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας, σε 12 μικρόκοσμους χωρητικότητας 50 L οι οποίοι περιείχαν ο καθένας 35 L αποστειρωμένο τεχνητό θαλασσινό νερό (αλατότητας 35 g NaCl L<sup>-1</sup>) και αφαιρέθηκε το άνω επιστόμιο. Κάθε μικρόκοσμος περιείχε τρία αντίγραφα δείγματα (replicates) ιζήματος από την ίδια περιοχή (Εικόνα Δ.2.2.).



**Εικόνα Δ.2.2. Πρόσωση μικρόκοσμου με τους τρεις πυρηνοδειγματολήπτες από την ίδια περιοχή (εδώ από το Γιόφυρο). Φωτογραφία: Arnaud Pirault-Latete.**

Η θερμοκρασία του θαλάμου ρυθμίστηκε στους 17 °C έτσι ώστε η θερμοκρασία του νερού στους μικρόκοσμους να παραμένει σταθερή στην θερμοκρασία κατά τη δειγματοληψία, 19 °C. Ο θάλαμος φωτίζονταν με λάμπες φθορίου λευκής ακτινοβολίας (10000 K) οι οποίες βρίσκονταν τόσο πλευρικά όσο και άνωθεν των μικρόκοσμων, με φωτοπερίοδο 12 h.

Οι μικρόκοσμοι αφέθηκαν σε ηρεμία για 24 h και στη συνέχεια ( $t_0$ ) ξεκίνησε η επώαση των δειγμάτων. Οι μικρόκοσμοι επώαστηκαν σε τέσσερις διαφορετικές συνθήκες: παρουσία/απουσία επιπλέον αερισμού της στήλης του νερού και παρουσία/απουσία οργανικού εμπλουτισμού (Πίνακας Δ.2.1.). Τα δείγματα από κάθε περιοχή επώαστηκαν ανά τρία (δηλαδή ανά μικρόκοσμο) για 32 ημέρες κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Οι κωδικοί των δειγμάτων ανάλογα με την περιοχή προέλευσης και τις συνθήκες επώασης φαίνονται στον Πίνακα Δ.2.2.

**Πίνακας Δ.2.1. Οι τέσσερις διαφορετικές συνθήκες επώασης (Treatment 1,2,3,4) για τα δείγματα από κάθε περιοχή.**

		Παροχή επιπλέον αερισμού	
		Όχι	Ναι
Οργανικός εμπλουτισμός	Όχι	Treatment 1	Treatment 2
	Ναι	Treatment 3	Treatment 4

**Πίνακας Δ.2.2. Οι κωδικοί των δειγμάτων ανάλογα την περιοχή προέλευσης και τις συνθήκες επώασης.**

	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3	Treatment 4
Φόδελε	1J, 1K, 1L	1G, 1H, 1I	1A, 1B, 1C	1D, 1E, 1F
Παντάνασσα	2A, 2B, 2C	2D, 2E, 2F	2J, 2K, 2L	2H, 2I, 2J
Γιόφυρο	3J, 3K, 3L	3G, 3H, 3I	3A, 3B, 3C	3D, 3E, 3F

Οι κωδικοί δόθηκαν ως αριθμοί, 1,2,3, για τα δείγματα από το Φόδελε, την Παντάνασσα και το Γιόφυρο, αντίστοιχα, και ως γράμματα του Αγγλικού αλφάβητου για τα διαφορετικά δείγματα από την ίδια περιοχή.

Για τον οργανικό εμπλουτισμό στα treatments 3 και 4, κάθε δύο μέρες προσθέτονταν 0.31 g στείρας ξηρής ιχθυοτροφής στην επιφάνεια του ιζήματος. Για την οξυγόνωση της στήλης του νερού στα treatments 2 και 4 ο επιπλέον αερισμός γινόταν

μέσω αντλίας αέρα με υψηλή παροχή ( $\sim 10 \text{ L min}^{-1}$ ). Η αλατότητα μετρούνταν κάθε δύο ημέρες και ρυθμιζονταν με την προσθήκη στείρου απιονισμένου νερού. Τα δείγματα για την εξέταση των αλλαγών στις βακτηριακές κοινότητες συλλέχθηκαν στο πεδίο ( $t_1$ ) στην αρχή του πειράματος ( $t_0$ ) και κάθε τέσσερις ημέρες μέχρι την 32η ημέρα ( $t_8$ ) και τοποθετήθηκαν στους  $-80^\circ\text{C}$  μέχρι την εξαγωγή του DNA. Κάθε τέσσερις μέρες μετρούνταν επίσης και οι εξής περιβαλλοντικές μεταβλητές: θερμοκρασία νερού, αλατότητα και διαλυμένο οξυγόνο στη στήλη του νερού, το pH και το οξειδοαναγωγικό δυναμικό στην επιφάνεια του ιζήματος (Eh), η συγκέντρωση του υδρόθειου ( $\text{H}_2\text{S}$ ) και το ποσοστό του οργανικού υλικού στο ίζημα. Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος επικρατούσαν στείρες συνθήκες για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων.

### Περιβαλλοντικές μεταβλητές

Η θερμοκρασία και το οξυγόνο του νερού καθώς επίσης το pH και το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ιζήματος μετρήθηκαν απευθείας στο νερό και στο ίζημα αντίστοιχα με κατάλληλα ηλεκτρόδια. Για το δυναμικό οξειδοαναγωγής το ηλεκτρόδιο ρυθμίστηκε με διάλυμα Zobell (Zobell 1946). Η αλατότητα μετρήθηκε με την βοήθεια μετρητή διάθλασης (refractometer). Η συγκέντρωση του  $\text{H}_2\text{S}$  του ιζήματος μετρήθηκε επίσης με κατάλληλο ηλεκτρόδιο αμέσως μετά τη δειγματοληψία (Wildish et al. 1999).

Η ποσότητα του οργανικού υλικού στο ίζημα μετρήθηκε με τη μέθοδο απώλειας μάζας λόγω καύσης (Loss On Ignition, LOI) (Loh et al. 2008). Με τη μέθοδο αυτή ήταν εφικτός ο διαχωρισμός της ποσότητας του βιοδιαθέσιμου οργανικού υλικού στο ίζημα από το μη βιοδιαθέσιμο. Περίπου 0.5 g ξηρού και ομογενοποιημένου ιζήματος τοποθετήθηκαν και ζυγίστηκαν σε ειδικά χωνευτήρια και θερμαίνονταν στους  $250^\circ\text{C}$  για 16 h, έπειτα ξαναζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν στο φούρνο στους  $500^\circ\text{C}$  για άλλες 16 h οπότε και μετρήθηκε το τελικό τους βάρος. Το ποσοστό της απώλειας μάζας λόγω καύσης σε αυτές τις δύο θερμοκρασίες χαρακτηρίζεται ως βιοδιαθέσιμο και μη βιοδιαθέσιμο οργανικό υλικό αντίστοιχα.

Η ανάλυση της κοκκομετρίας του ιζήματος έγινε με τη μέθοδο ξηρού κοσκινίσματος (Eleftheriou 2013). Τα δείγματα αρχικά ξεράθηκαν με freeze-drying και πέρασαν από μια σειρά από κόσκινα από -2φ έως 4φ ανά 0,5φ, όπου  $\phi = -\log_2$  των διαμέτρων των κόκκων σε mm. Όσο από το ίζημα απέμεινε σε κάθε κόσκινο ζυγίστηκε καθώς επίσης και το κλάσμα



του ιζήματος που πέρασε από το τελευταίο κόσκινο και αντιστοιχούσε στο κλάσμα ιλύος-αργίλου. Το τελευταίο, στις περιπτώσεις που υπήρχε, αναλύθηκε με υγρό διαχωρισμό και ανάλυση πιπέτας.

### **Εξαγωγή του DNA της κοινότητας του ιζήματος, PCR, DGGE, αλληλούχιση και *in silico* ανάλυση των αλληλουχιών**

Η εξαγωγή του DNA πραγματοποιήθηκε με συνδυασμό μηχανικής λύσης και χημικής απομόνωσης και καθαρισμού επιλέγοντας τις καταλληλότερες μεθόδους για την φύση των δειγμάτων μας από το σύνολο των μεθόδων που χρησιμοποιούνται βιβλιογραφικά (Roose-Amsaleg et al. 2001). Συνοπτικά, 0.8 g ιζήματος αναμιγνύονταν με 0.5 g στείρων σφαιριδίων ζirkονίου διαμέτρου 100  $\mu\text{m}$  (OPS Diagnostics, Lebanon, NJ, USA), 1 ml διαλύματος εξαγωγής (NaCl 50 mM, Tris-HCl pH 7.6 50 mM, EDTA 50 mM, SDS 5%, τελικό pH 8.0) και 1  $\mu\text{l}$  διαλύματος διθειοθρεϊτόλης (DTT) 1M και ανακινούνταν γρήγορα σε οριζόντια θέση σε vortex για 10-30 min ανάλογα με την αδρότητα των κόκκων του ιζήματος. Το υπερκείμενο συλλέγονταν μετά από φυγοκέντρηση στα 13000 rpm για 3 min και καθαριζόταν διαδοχικά με διαλύματα φαινόλης, φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης και καθαρού χλωροφορμίου όπως περιγράφεται στην § B.2. Για την κατακρήμνιση του DNA, το υπερκείμενο που συλλέγονταν αναμιγνύονταν με διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COONa}$  3M, pH 5.2 και ισοπροπανόλη (0.1 και 0.7 του όγκου του υπερκείμενου, αντίστοιχα) και φυγοκεντρούνταν στους 10 °C σε ψυχόμενη φυγόκεντρο για 30 min στα 14000 rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνονταν και η πελλέτα του DNA καθαριζόταν περεταίρω με 500  $\mu\text{l}$  αιθανόλης 70% v/v θερμοκρασίας -20 °C στους 10 °C και φυγοκεντρούνταν στους 10 °C για 5 min στα 14000 rpm. Το υπερκείμενο αφαιρούνταν προσεκτικά και η πελλέτα του DNA αφήνονταν να στεγνώσει ολονυκτίως υπό στείρες συνθήκες. Την επόμενη ημέρα η πελλέτα διαλύονταν σε 100  $\mu\text{l}$  στείρου υπερκάθαρου (nanopure) νερού και αφήνονταν σε ηρεμία 3-4 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για να διαλυθεί πλήρως. Τέλος, η ποσότητα του DNA μετρούνταν φωτομετρικά (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) και σε ορισμένες περιπτώσεις και με ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης 1% w/v. Σημειώνεται ότι δοκιμάστηκε ο καθαρισμός του DNA από τα χουμικά οξέα, τα οποία συν-απομονώνονταν και λειτουργούν ως αναστολείς της PCR, με διάφορες στήλες καθαρισμού και απορροφητικά πολυμερή (π.χ. PVPP) αλλά η συγκέντρωση του DNA του τελικού διαλύματος μειωνόταν δραματικά. Οπότε

αντί αυτού προτιμήθηκε η χρήση αλβουμίνης βοοειδών (bovine serum albumin - BSA), η οποία έχει δειχθεί ότι δεσμεύει τα χουμικά οξέα, κατά τον πολλαπλασιασμό του DNA με PCR.

Η PCR και το DGGE για τα δείγματα της αρχικής δειγματοληψίας πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τους (Fodelianakis et al. 2014).

Η PCR για την αλληλούχηση του V4 μεταβλητού κομματιού του 16S rRNA της κοινότητας (από την θέση 515 μέχρι την θέση 806) έγινε στο Joint Genomic Institute (JGI) του Υπουργείου Ενέργειας των ΗΠΑ με στάνταρντ πρωτόκολλα (Caporaso et al. 2011). Η αλληλούχηση έγινε και από τις δυο κατευθύνσεις (τόσο 5'-3' όσο και 3'-5') στην πλατφόρμα Illumina Miseq, σε τέσσερις πλακέτες των 96 δειγμάτων η καθεμία. Στη συνέχεια (πρώτο στάδιο ελέγχου), οι αλληλουχίες με χαμηλή ποιότητα (μικρό μέγεθος και αβεβαιότητα στη φύση >10 νουκλεοτιδίων) απομακρύνθηκαν και από τις εναπομείναντες αλληλουχίες αφαιρέθηκαν τα νουκλεοτίδια μετά το 165ο. Έπειτα, οι αλληλουχίες από αντίθετες κατευθύνσεις εξετάστηκαν για αλληλοεπικάλυψη μέσω του προγράμματος FLASH (Magoč and Salzberg 2011) και όσες από αυτές είχαν πλήρη αλληλοεπικάλυψη συνδυάστηκαν σε μία, ενώ οι υπόλοιπες απομακρύνθηκαν. Η ποιότητα των αλληλουχιών μετά τον συνδυασμό ελέγχθηκε ξανά στο στάδιο αυτό κι οι αλληλουχίες με χαμηλή ποιότητα απομακρύνθηκαν (δεύτερο στάδιο ελέγχου). Επίσης διορθώθηκαν τα λάθη κατά την PCR και οι χιμαιρικές αλληλουχίες απομακρύνθηκαν με τον αλγόριθμο UCHIME (Edgar et al. 2011). Οι πανομοιότυπες (100% ομοιότητα) αλληλουχίες στη συνέχεια ομαδοποιήθηκαν, ενώ σε επόμενο στάδιο δημιουργήθηκαν OTUs με βάση ομοιότητα στην αλληλουχία από 97% και άνω. Επιπλέον, απομακρύνθηκαν τα OTUs τα οποία αντιπροσωπεύονταν μόνο από μία μοναδική αλληλουχία (singletons) και τα OTUs χωρίς δυνατή φυλογενετική ταξινόμηση. Η φυλογενετική ταξινόμηση των OTUs έγινε στο QIIME v 1.6 συγκρίνοντας τις αντιπροσωπευτικές αλληλουχίες του κάθε OTU με τη βάση δεδομένων Greengenes (McDonald et al. 2012) χρησιμοποιώντας "αφελή" αλγόριθμο ταξινόμησης (Wang et al. 2007). Για τις αναλύσεις όπου αυτό ήταν απαραίτητο, τα OTUs ομαδοποιήθηκαν επίσης σε επίπεδο Τάξης ή Οικογένειας χρησιμοποιώντας τον κατάλληλο αλγόριθμο στο QIIME (summarize\_taxa.py).

## Στατιστικές αναλύσεις

Για την εκτίμηση της β-ποικιλότητας στις κοινότητες από την αρχική δειγματοληψία με τα δεδομένα από το DGGE χρησιμοποιήθηκε ο ποιοτικός δείκτης ομοιότητας Jaccard στο PRIMER 6. Ο δείκτης επικάλυψης του Good (Good 1953) υπολογίστηκε στο QIIME v 1.8. Για την εκτίμηση της β-ποικιλότητας από τα δεδομένα της αλληλούχισης του Illumina υπολογίστηκε ο δείκτης Bray-Curtis (BC) σε επίπεδο OTU στο PRIMER 6 μετά από λογαριθμικό μετασχηματισμό. Τα δένδρογράμματα (cluster analysis) με βάση το BC έγιναν στο πρόγραμμα PRIMER 6 με τη μέθοδο της μέσης σύνδεσης (average linkage). Ο μη παραμετρικός δείκτης συσχέτισης Spearman (Spearman rank correlation), τα μη-παραμετρικά t-tests και η μη παραμετρική ανάλυση Kruskal-Wallis χρησιμοποιήθηκαν για τη συσχέτιση των περιβαλλοντικών μεταβλητών και τη σύγκριση των τιμών τους ανά περιοχή και στο χρόνο και πραγματοποιήθηκαν στο PAST v2.17c.

Ποσοτικοποιήθηκαν επίσης οι επιδράσεις α) της αρχικής δομής και σύστασης της κοινότητας (που καθοριζόταν από την περιοχή προέλευσης του ιζήματος) και β) της επώασης κάτω από διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, αυξανομένου του χρόνου επώασης. Οι αλλαγές στην ανά ζεύγη ομοιότητα Bray-Curtis μελετήθηκαν για τα δείγματα με βάση την περιοχή προέλευσής τους, τις συνθήκες επώασης, την πειραματική ημέρα κατά την οποία είχαν συλλεχθεί,  $t_{-1}$  -  $t_8$  όπου  $t_{-1}$  τα δείγματα που συλλέχθηκαν στο πεδίο, και τη διαφορά στο χρόνο επώασης (από εδώ και στο εξής θα καλείται "χρονική απόσταση"). Για την καταγραφή των αλλαγών στις κοινότητες από το πεδίο ( $t_{-1}$ ) στο περιβάλλον των μικρόκοσμων ( $t_0$ ) και από την ηρεμία ( $t_0$ ) σε συνθήκες επώασης, τα δείγματα από τα  $t_{-1}$  και  $t_0$  επεξεργάστηκαν ως ξεχωριστά treatments, με κωδικούς C και O, αντίστοιχα. Γραμμικά μοντέλα μικτών επιδράσεων (linear mixed effects models) χρησιμοποιήθηκαν για να εκτιμηθεί η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) μεταξύ των δεικτών της ομοιότητας της κοινότητας και όλων των παραπάνω μεταβλητών, με τους δείκτες ομοιότητας ως εξαρτημένες μεταβλητές και τις παραπάνω μεταβλητές ως σταθερούς παράγοντες (ανεξάρτητες μεταβλητές). Τα δεδομένα δεν υποβλήθηκαν σε κανένα μετασχηματισμό, αλλά η εξέταση των γραφημάτων των καταλοίπων (residual plots) για σταθερότητα της διακύμανσης και της ετεροσκεδαστικότητας έδειξε ότι τα μοντέλα συμπεριφέρθηκαν το ίδιο καλά σε όλες τις περιπτώσεις και πληρούσαν τις προϋποθέσεις της ANOVA όσον αφορά την ομοιογένεια της διακύμανσης. Τα γραμμικά μοντέλα μικτών επιδράσεων εφαρμόστηκαν στην έκδοση για τα Windows του προγράμματος "R" (R Core

Team 2012) χρησιμοποιώντας το πακέτο "nlme". Η ANOVA των κυρίων επιδράσεων (main effects) παραστάθηκε γραφικά σε σχέση με τις σταθερές επιδράσεις (fixed effects) του κάθε σταθερού παράγοντα (Fox and Hong 2009) και οι προβλεπόμενοι μέσοι (fitted means) παραστάθηκαν γραφικά για κάθε επίπεδο των διαφορετικών παραγόντων χρησιμοποιώντας το πακέτο "effects" στο πρόγραμμα R.

### Δ.3. Αποτελέσματα

#### Αρχική επιλογή των τριών πιο διαφορετικών κοινοτήτων

Ο πολλαπλασιασμός του DNA με PCR ήταν ανεπιτυχής για τα δείγματα από τη Χερσόνησσο και την Αμμουδάρα, πιθανώς λόγω μειωμένου ποσού βακτηρίων στο ίζημα ή/και μεγάλης περιεκτικότητας σε χουμικά οξέα, κι έτσι η επιλογή έγινε ανάμεσα από τα υπόλοιπα έξι δείγματα. Οι τιμές του δείκτη ομοιότητας Jaccard για τις βακτηριακές κοινότητες από τις οκτώ περιοχές της αρχικής δειγματοληψίας, με βάση των παρουσία/απουσία ζωνών από το πηγμα ακρυλαμίδης του DGGE, κυμάνθηκαν μεταξύ 39.4% και 73.5%. Οι τρεις περιοχές με τους μικρότερους δείκτες (ανά ζεύγη) ήταν οι περιοχές Φόδελε, Παντάνασσα και Γιόφυρο, με δείκτες ομοιότητας 39.4% (μεταξύ Φόδελε και Παντάνασσας), 45.7% (μεταξύ Φόδελε και Γιόφυρου) και 44.4% (μεταξύ Παντάνασσας και Γιόφυρου), αντίστοιχα (Εικόνα Δ.3.1.). Ακολούθως, ίζημα από τις τρεις αυτές περιοχές επωάστηκε για το κυρίως πείραμα.

Similarity (0 to 100)

	GFR1	PA1	AL1	FR1	HCMR	AP1
GFR1						
PA1	44,444					
AL1	55,882	48,649				
FR1	45,714	39,474	68,75			
HCMR	58,333	73,529	53,846	56,757		
AP1	50	42,857	64,516	63,333	61,765	

Εικόνα Δ.3.1. Η τριγωνική μήτρα ομοιότητας από τα δεδομένα παρουσίας/απουσίας του DGGE, με βάση τον δείκτη Jaccard. Τα ονόματα των δειγμάτων είναι σύμφωνα με την Εικόνα Δ.2.1.

#### Αλλαγές στις περιβαλλοντικές παραμέτρους

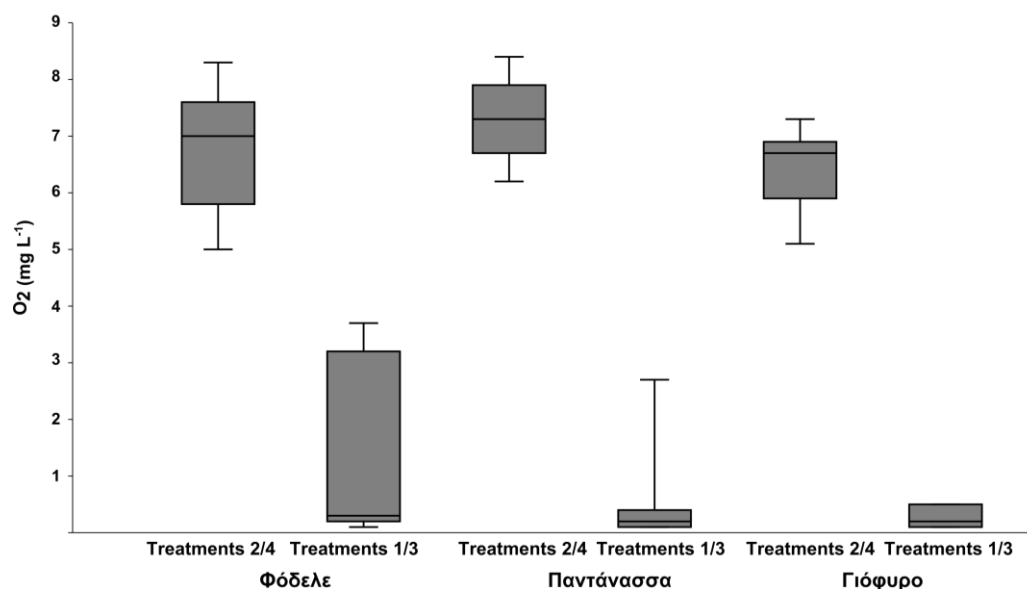
Η κοκκομετρική ανάλυση του ιζήματος έδειξε ότι στις τρεις περιοχές ο τύπος του ιζήματος ήταν αμμώδες. Το ποσοστό όμως ιλύος-αργίλου διέφερε ανάμεσα στις περιοχές, με το ίζημα από το Φόδελε να μην περιέχει σχεδόν καθόλου, το ίζημα από την Παντάνασσα να περιέχει ποσοστό <1% ενώ το ίζημα από το Γιόφυρο να περιέχει περίπου 20% ιλύ-άργιλο (Πίνακας Δ.3.1.). Ακολούθως, το ίζημα από το Φόδελε ήταν το πιο αδρόκοκκο

(MD=0.3), το ίζημα από την Παντάνασσα είχε ελαφρώς μικρότερη διάμεση διάμετρο κόκκων (MD=0.22) ενώ το ίζημα από το Γιόφυρο είχε την μικρότερη (MD=0.16).

**Πίνακας Δ.3.1. Αποτελέσματα κοκκομετρικής ανάλυσης των ιζημάτων από τις τρεις περιοχές**

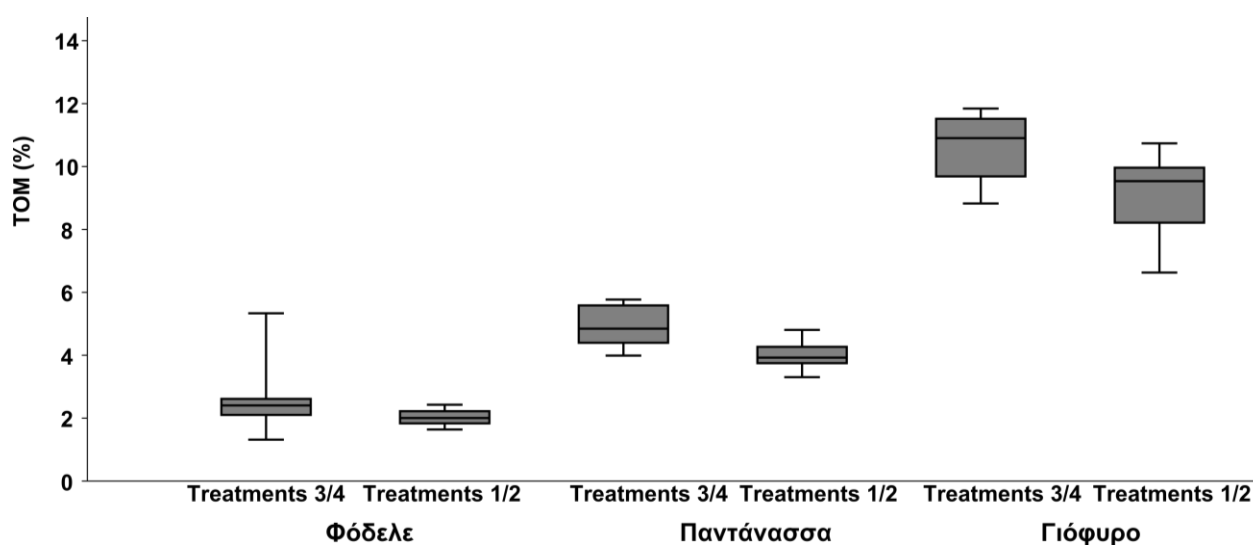
	MD	ιλύς/άργιλος%	άμμος%
<b>Φόδελε</b>	0.3	<0.01	99.99
<b>Παντάνασσα</b>	0.22	0.77	99.23
<b>Γιόφυρο</b>	0.16	19.46	80.54

Η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου στη στήλη του νερού κατά τη διάρκεια της επώασης ( $t_1 - t_8$ ) διέφερε ανάμεσα στους μικρόκοσμους με και χωρίς παροχή αερισμού (μη παραμετρικά t-test,  $n=24$ ,  $p<0.001$  και για τις τρεις περιοχές) και κυμάνθηκε από 5 έως  $8.4 \text{ mg L}^{-1}$  στους μικρόκοσμους με παροχή αέρα (treatments 2 και 4) και από 0.1 έως  $3.7 \text{ mg L}^{-1}$  στους μικρόκοσμους χωρίς παροχή αέρα (treatments 1 και 3), χωρίς σημαντικές διαφορές ανάλογα με την περιοχή προέλευσης του ιζήματος ή τη διάρκεια της επώασης (Εικόνα Δ.3.2.).



**Εικόνα Δ.3.2. Θηκογράμματα (των 25-75% τεταρτημορίων) της συγκέντρωσης του διαλυμένου οξυγόνου στη στήλη του νερού κατά τη διάρκεια της επώασης ( $t_1 - t_8$ ) για τους μικρόκοσμους με (treatments 2 και 4) και χωρίς (treatments 1 και 3) παροχή αερισμού για κάθε περιοχή. Η έντονη οριζόντια γραμμή εντός των θηκών συμβολίζει την διάμεση τιμή ενώ οι μπάρες άνω και κάτω τις ακραίες τιμές της μεταβλητής.**

Αντιθέτως, το ποσοστό της οργανικής ύλης στο ίζημα κατά τη διάρκεια της επώασης ( $t_1 - t_8$ ) διέφερε ανάλογα με την περιοχή προέλευσης του ιζήματος (μη-παραμετρικά t-test,  $n=32$ ,  $p<0.001$  και για τις τρεις συγκρίσεις) και ανάλογα με την παροχή ή μη οργανικού εμπλουτισμού στο ίζημα (μεταξύ των treatments 1/2 και 3/4) στην Παντάνασσα και το Γιόφυρο (μη-παραμετρικά t-test,  $n=16$ ,  $p<0.001$  και  $p=0.002$ , αντίστοιχα) αλλά όχι στο Φόδελε (μη-παραμετρικά t-test,  $n=16$ ,  $p=0.07$ ) (Εικόνα Δ.3.3.). Επίσης, δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή στο ποσοστό αυτό ανάλογα με τη διάρκεια της επώασης.



**Εικόνα Δ.3.3.** Θηκογράμματα (των 25-75% τεταρτημορίων) του ποσοστού της οργανικής ύλης στο ίζημα κατά τη διάρκεια της επώασης ( $t_1 - t_8$ ) για τους μικρόκοσμους με (treatments 3 και 4) και χωρίς (treatments 1 και 2) παροχή οργανικού εμπλουτισμού για κάθε περιοχή. Η έντονη οριζόντια γραμμή εντός των θηκών συμβολίζει την διάμεση τιμή ενώ οι μπάρες άνω και κάτω τις ακραίες τιμές της μεταβλητής.

Το Eh του επιφανειακού ιζήματος μειώθηκε σημαντικά με την αύξηση του χρόνου επώασης ( $\rho = -0.63$ ,  $n=255$ ,  $p<<0.001$ ) ανεξάρτητα από τις συνθήκες επώασης (Kruskal-Wallis test,  $n=58-72$ , Global  $p=0.48$ ). Η συγκέντρωση του υδρόθειου στο ίζημα παρουσίασε αντίθετη τάση, με σημαντική αύξηση με την αύξηση του χρόνου επώασης ( $\rho = 0.74$ ,  $n=255$ ,  $p<<0.001$ ) ανεξαρτήτως συνθηκών επώασης (Kruskal-Wallis test,  $n=58-72$ , Global  $p=0.96$ ). Τέλος, το Eh και η συγκέντρωση του υδρόθειου βρέθηκαν αρνητικά συσχετισμένες ( $\rho = -0.73$ ,  $n=255$ ,  $p<<0.001$ ).

## Αποτελέσματα αλληλούχισης

Συνολικά αλληλουχήθηκαν 295 δείγματα αντί των εκτιμώμενων 333 (36 δείγματα από εννέα δειγματοληψίες συν τα εννέα δείγματα που συλλέχθηκαν στο πεδίο) λόγω απωλειών τόσο κατά την δειγματοληψία (απώλεια ολόκληρου του πυρηνοδειγματολήπτη αρχικά ή κατά τη διάρκεια του πειράματος) όσο και αδυναμίας πολλαπλασιασμού με κάποιων δειγμάτων με PCR. Συνολικά αποκτήθηκαν 38.500.084 αλληλουχίες από τις οποίες 1.047.491 αφαιρέθηκαν στο πρώτο στάδιο ελέγχου λόγω μικρού μεγέθους ή "θορύβου". Στη συνέχεια, αφαιρέθηκαν επίσης 34.281 αλληλουχίες για τις οποίες δεν υπήρχε επαρκής αλληλεπικάλυψη με κάποια συμπληρωματική αλληλουχία. Οι υπόλοιπες αλληλουχίες συνδυάστηκαν με τις συμπληρωματικές τους σε 18,591,833 από τις οποίες 13,005,500 πέρασαν το δεύτερο στάδιο ελέγχου. Αυτές ταξινομήθηκαν σε 255,842 διαφορετικά OTUs από τα οποία τα 252,866 ήταν μη-μοναδιαία και είχαν τη δυνατότητα φυλογενετικής ταξινόμησης. Ο συνολικός αριθμός αλληλουχιών εν τέλει ήταν 12,508,917.

Από τα 295 δείγματα στη συνέχεια αφαιρέθηκαν από όλες τις περαιτέρω αναλύσεις τα δείγματα εκείνα για τα οποία η δειγματοληψία δεν ήταν επαρκής. Αυτό, στην εργασία αυτή ήταν δύσκολο να εκτιμηθεί με rarefaction curves λόγω του μεγάλου αριθμού των δειγμάτων. Αντί αυτού υπολογίστηκε ο δείκτης επικάλυψης Good, ο οποίος κυμαίνεται μεταξύ 0 και 1, με το 0 να υποδεικνύει μηδενική και το 1 πλήρη δειγματοληπτική κάλυψη της κοινότητας. Οι τιμές πάνω από 0.9 γενικά θεωρούνται γενικά αποδεκτές (Kuffner et al. 2012). Το όριο του δείκτη ορίστηκε στο 0.9 και ο ελάχιστος αριθμός αλληλουχιών ανά δείγμα στις 5,000. Από τα 295 δείγματα, τα 263 πληρούσαν τα παραπάνω κριτήρια ενώ τα υπόλοιπα 32 απομακρύνθηκαν από κάθε περεταίρω ανάλυση. Ο αριθμός των αλληλουχιών ανά δείγμα για τα 263 δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις παρακάτω αναλύσεις κυμάνθηκε από 6,615 έως 94,660. Η κατανομή των δειγμάτων ανάλογα με την περιοχή προέλευσης και τις συνθήκες επώασης φαίνεται στον Πίνακα Δ.3.2.

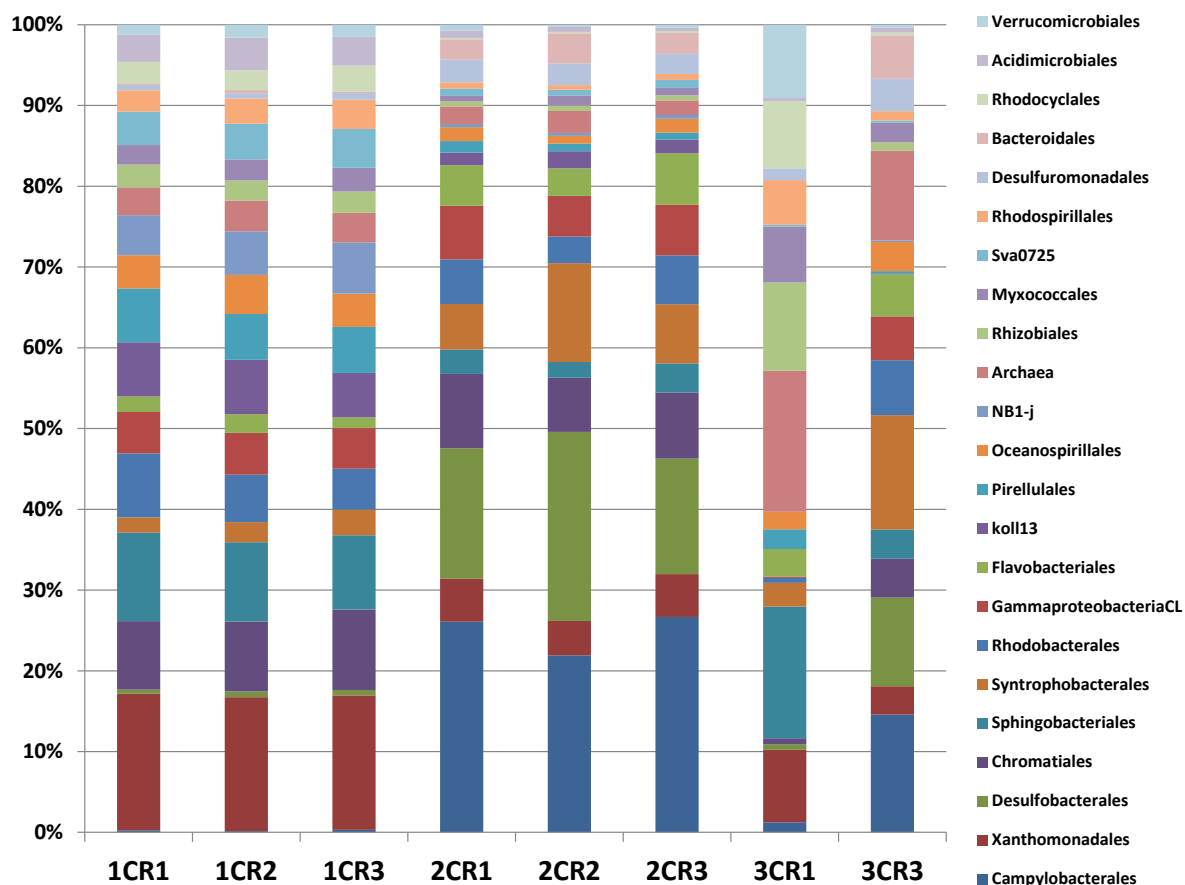


**Πίνακας Δ.3.2. Η κατανομή των δειγμάτων ανάλογα με την περιοχή προέλευσης και τις συνθήκες επώασης.**

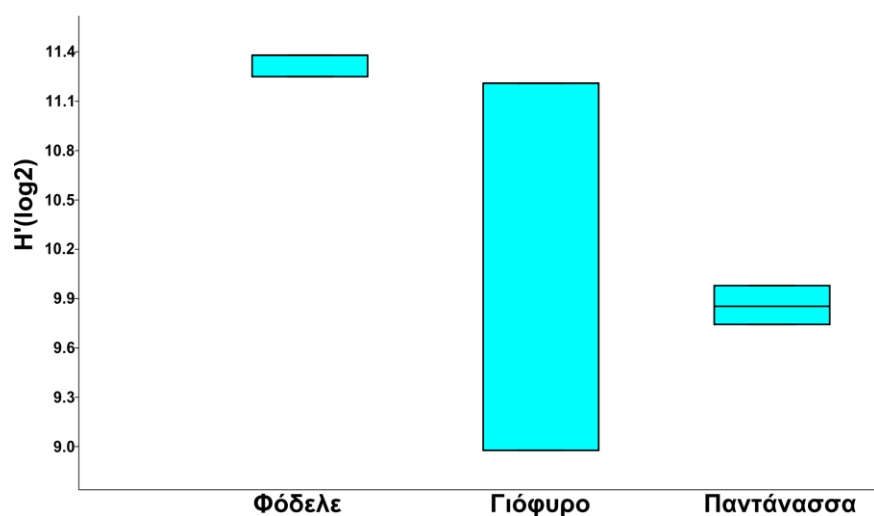
	Φόδελε	Παντάνασσα	Γιόφυρο	Σύνολο δειγμάτων
Treatment 1	27	24	21	72
Treatment 2	27	21	18	66
Treatment 3	27	14	18	59
Treatment 4	24	17	17	58
Controls	3	3	2	8
<b>Σύνολο δειγμάτων</b>	<b>108</b>	<b>79</b>	<b>76</b>	<b>263</b>

#### **Σύσταση της *in situ* κοινότητας σε κάθε περιοχή**

Οι κοινότητες κατά τη δειγματοληψία στο πεδίο διέφεραν σημαντικά ανάλογα με την περιοχή προέλευσης (ANOSIM TEST,  $n=8$ , Global  $R=0.782$ ,  $p=0.004$ ). Ο μέσος όρος του δείκτη BC (σε επίπεδο OTU) μεταξύ των δειγμάτων από τις διαφορετικές περιοχές ήταν 25.08% (Παντάνασσα-Γιόφυρο), 15.2% (Παντάνασσα-Φόδελε) και 10.9% (Φόδελε-Γιόφυρο). Οι ταξινομικές ομάδες σε επίπεδο Τάξης ήταν επίσης πολύ διαφορετικές, με τις κοινότητες από το Γιόφυρο να είναι οι μόνες που φέρουν ομάδες μεθανογενών Αρχαίων (*Methanobacteria*) και τις κοινότητες στο Γιόφυρο και την Παντάνασσα να φέρουν αυξημένα ποσοστά υποχρεωτικά αναερόβιων SRB βακτηρίων όπως τα *Desulfobacterales* και μικροαερόφιλων όπως τα *Campylobacterales* (Εικόνα Δ.3.4.). Αντίθετα οι κοινότητες από το Φόδελε έφεραν μεγαλύτερα ποσοστά από αερόφιλα και μικροαερόφιλα βακτήρια όπως οι *Xanthomonadales* και *Rhodobacterales* (Εικόνα Δ.3.4.). Οι διαφορές αυτές αντικατοπτρίζουν τις διαφορές στα επίπεδα οξυγόνωσης του ιζήματος κάθε περιοχής, σε συμφωνία με τις μετρήσεις για το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ιζήματος *in situ*. Επίσης, τα δυο δείγματα από το Γιόφυρο είχαν μεγάλη ετερογένεια στις κοινότητες, αντίθετα με τις άλλες δυο περιοχές. Ο δείκτης Shannon ήταν επίσης μεγαλύτερος στο Φόδελε, παρουσίασε μεγάλο εύρος στο Γιόφυρο και ήταν μικρότερος στην Παντάνασσα (Εικόνα Δ.3.5.).



Εικόνα Δ.3.4. Η ταξινομική σύσταση των δειγμάτων κατά τη δειγματοληψία στο πεδίο, σε επίπεδο Τάξης. Με 1C συμβολίζονται τα δείγματα από το Φόδελε, με 2C τα δείγματα από την Παντάνασσα και με 3C τα δείγματα από το Γιόφυρο, ενώ με R1-R3 οι ρέπλικες. Στο υπόμνημα στα δεξιά οι ομάδες με τη σειρά που παρουσιάζονται.



Εικόνα Δ.3.5. Θηκογράμματα του δείκτη Shannon των *in situ* κοινοτήτων κάθε περιοχής.

## Αλλαγές στη δομή και στη σύσταση των κοινοτήτων κάτω από ίδιες συνθήκες επώασης

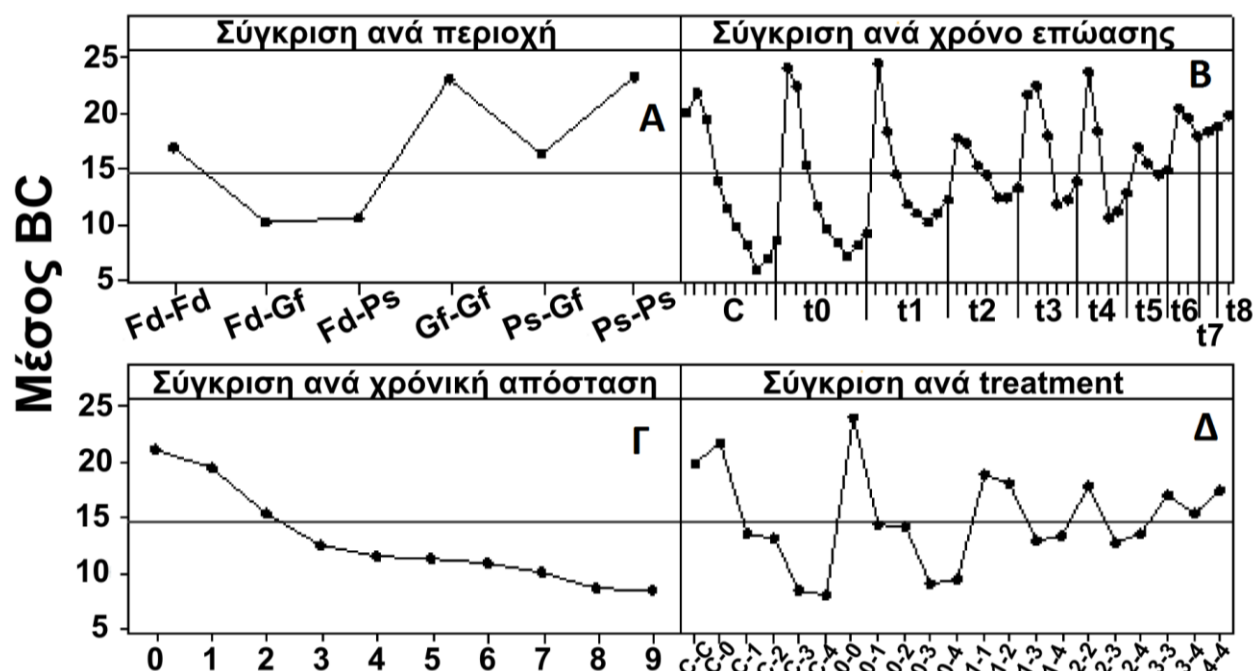
Ο δείκτης Shannon σε επίπεδο Τάξης [H(O)] και OTU ( $H'_{\log 2}$ ) και η ισοκατανομή κατά Piellou (J') βρέθηκε ότι μειώνονταν σε σχέση με το χρόνο επώασης τόσο όταν η σύγκριση έγινε σύμφωνα με την περιοχή προέλευσης όσο και σύμφωνα με τις συνθήκες επώασης. Το εύρος τιμών των συντελεστών συσχέτισεων και των επιπέδων σημαντικότητας παρουσιάζονται στον Πίνακα Δ.3.3.

**Πίνακας Δ.3.3. Το εύρος τιμών των συντελεστών συσχέτισεων και των επιπέδων σημαντικότητας, στις συσχέτισεις του δείκτη Shannon σε επίπεδο Τάξης [H(O)] και OTU ( $H'_{\log 2}$ ) και της ισοκατανομής κατά Piellou (J') με το χρόνο επώασης.**

	Σύγκριση ανά περιοχή	Σύγκριση ανά treatment
<b>H(O)</b>	-0.37>rho>-0.5, 8E-05>p>6E-09	-0.31>rho>-0.55, 0.032>p>6E-05
<b><math>H'_{\log 2}</math></b>	-0.46>rho>-0.5, 5E-05>p>7E-07	-0.42>rho>-0.37, 0.012>p>0.008
<b>J'</b>	-0.46>rho>-0.49, 3E-05>p>6E-07	-0.31>rho>-0.44, 0.041>p>0.0008

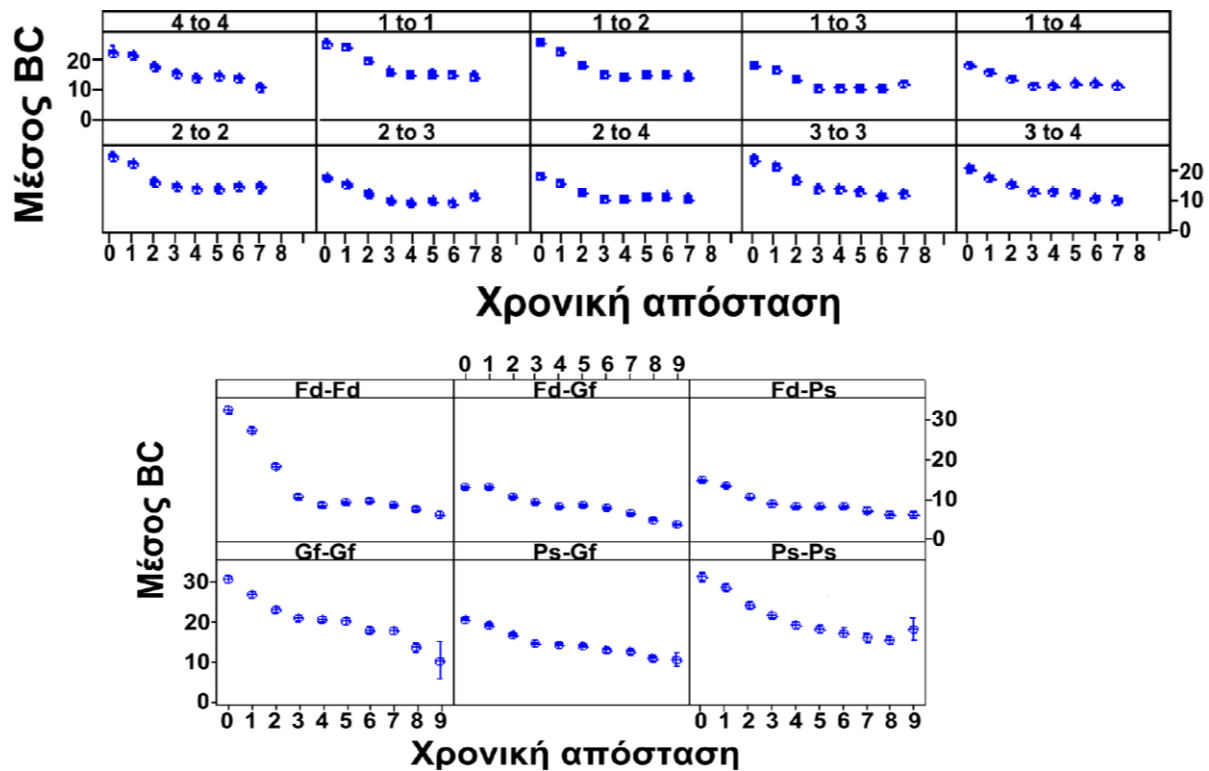
Οι τιμές του p διορθώθηκαν κατά τη διόρθωση Bonferroni για πολλαπλές συγκρίσεις.

Όταν συγκρίθηκαν οι δείκτες ομοιότητας των κοινοτήτων με βάση την περιοχή προέλευσης, βρέθηκε ότι οι κοινότητες με τη μεγαλύτερη ομοιότητα ήταν οι κοινότητες από την ίδια περιοχή προέλευσης (Εικόνα Δ.3.6.A). Ακόμα, παρατηρήθηκε ότι ο δείκτης BC μειωνόταν συνεχώς κατά την αύξηση της χρονικής απόστασης ανεξάρτητα από την περιοχή προέλευσης ή τις συνθήκες επώασης των συγκρινόμενων δειγμάτων (Εικόνα Δ.3.6.B και Δ.3.6.Γ), με μια μικρή αύξηση κατά τις τελευταίες οκτώ ημέρες της επώασης ( $t_7$  και  $t_8$ ) (Εικόνα Δ.3.6.B). Υπήρχε δηλαδή μια τάση μείωσης στην ομοιότητα των κοινοτήτων η οποία ήταν ανεξάρτητη από τα παραπάνω και θα μπορούσε να οφείλεται στα λεγόμενα "φαινόμενα περιορισμού" (confinement effects), δηλαδή τη διαταραχή που προκαλείται από την πειραματική διάταξη όπως τον εγκλεισμό των ιζημάτων σε πυρηνοδειγματολήπτες και μικρόκοσμους. Παράλληλα όμως, βρέθηκε ότι η μέση ομοιότητα των κοινοτήτων που επωάστηκαν στις ίδιες συνθήκες ήταν μεγαλύτερη από αυτή των κοινοτήτων που επωάστηκαν σε διαφορετικές συνθήκες (Εικόνα Δ.3.7.Δ).



Εικόνα Δ.3.6. Η μέση τιμή του δείκτη BC ανάλογα με την περιοχή προέλευσης των δειγμάτων (Α), το χρόνο επώασης (Β), τη χρονική απόσταση (Γ) και τις συνθήκες επώασης (Δ). Η οριζόντια γραμμή σε κάθε γράφημα συμβολίζει την τιμή του συνολικού μέσου (grand mean) του BC.

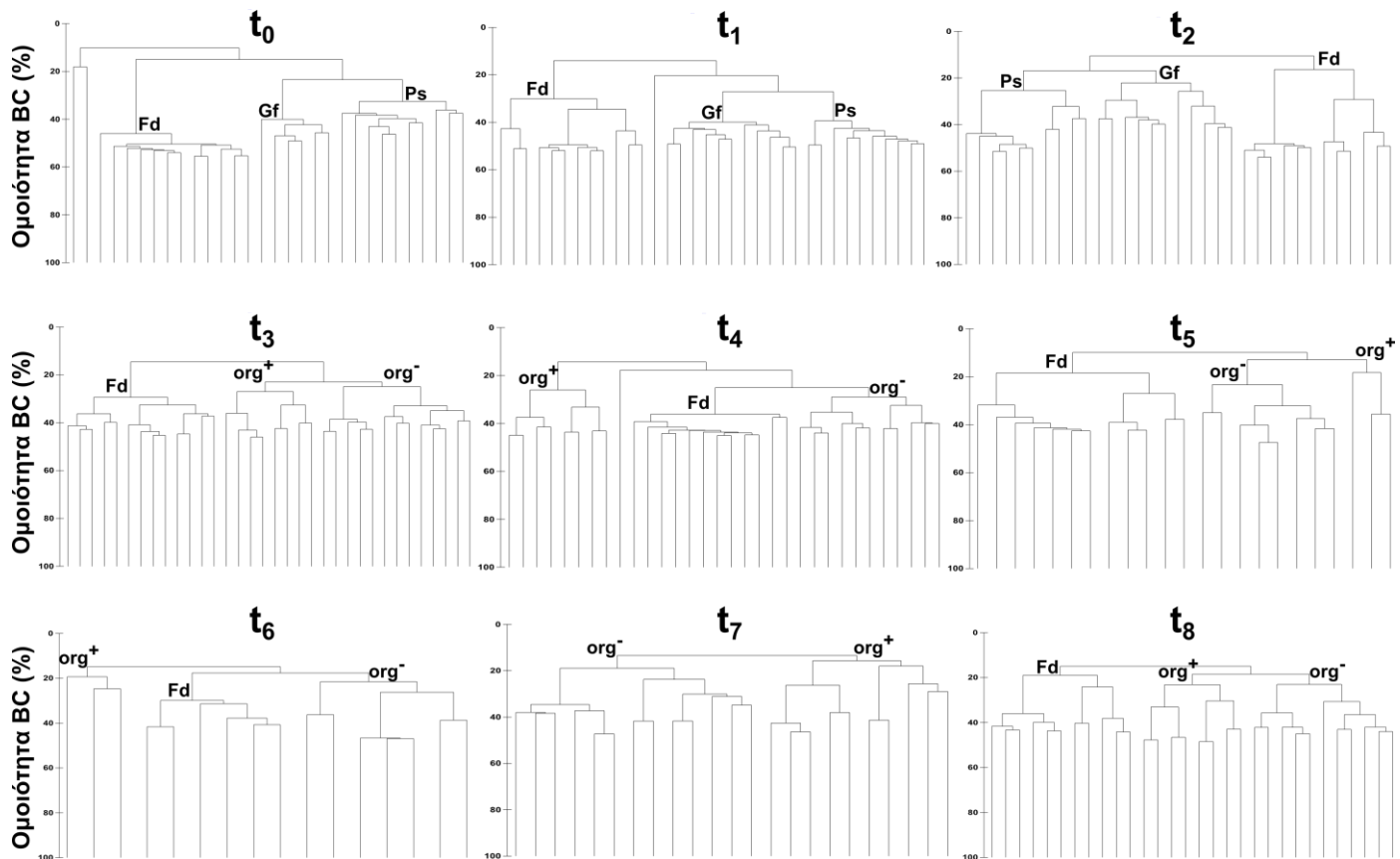
Παρά τη γενική μείωση που παρατηρήθηκε στην ομοιότητα των κοινοτήτων με την αύξηση του χρόνου επώασης, παρατηρήθηκε επίσης ότι η μείωση της μέσης τιμής της ομοιότητας μεταξύ των κοινοτήτων ήταν μικρότερη για τις κοινότητες που επωάστηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες (Εικόνα Δ.3.7. πάνω) παρά για τις κοινότητες από την ίδια περιοχή προέλευσης (Εικόνα Δ.3.7. κάτω). Η διαφορά στη μείωση της μέσης τιμής ήταν ακόμα μεγαλύτερη όταν συγκρίνονταν οι κοινότητες με μεγαλύτερη χρονική απόσταση, δηλαδή οι κοινότητες που επωάστηκαν για περισσότερο χρόνο κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Κατ' απόλυτη τιμή, η ομοιότητα των κοινοτήτων που επωάστηκαν χωρίς την προσθήκη οργανικού εμπλουτισμού (treatments 1 και 2) ήταν μεγαλύτερη από αυτή των κοινοτήτων που επωάστηκαν με την προσθήκη οργανικού εμπλουτισμού (treatments 3 και 4), για όλες τις χρονικές αποστάσεις (Εικόνα Δ.3.7. πάνω).



Εικόνα Δ.3.7. Το 95% του εύρους της μέσης τιμής της ομοιότητας BC σε συνάρτηση με τη χρονική απόσταση των συγκρινόμενων κοινοτήτων. Πάνω: Διαχωρισμός ανάλογα με τις συνθήκες επώασης. Κάτω: Διαχωρισμός ανάλογα με την περιοχή προέλευσης των κοινοτήτων. Gf: Γιόφυρο, Fd: Φόδελε Ps: Παντάνασσα

Δεδομένης της γενικής τάσης μείωσης της ομοιότητας με την αύξηση του χρόνου επώασης, ήταν αναμενόμενο να μην παρατηρηθεί αύξηση στην απόλυτη τιμή του BC ακόμα κι αν υπήρχε τάση σύγκλισης των κοινοτήτων κάτω από τις ίδιες συνθήκες επώασης. Για να εξεταστεί αυτό το ενδεχόμενο, μελετήθηκε η ομαδοποίηση των δειγμάτων (με ανάλυση δενδρογραμμάτων) από κάθε χρονική στιγμή από την αρχή έως το τέλος της επώασης ( $t_0$ - $t_8$ ) σε σχέση με την περιοχή προέλευσης και την παροχή ή όχι οργανικού εμπλουτισμού. Η κατηγοριοποίηση έγινε μόνο με βάση την παροχή οργανικού εμπλουτισμού κι όχι με την παροχή αερισμού, με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα (Εικόνα Δ.3.6.Δ) που δείχνουν ότι η επίδραση του αερισμού της στήλης του νερού στην τιμή του BC είναι μικρή (η μέση ομοιότητα των συγκρίσεων των treatments 1-2 και 3-4 ήταν μεγαλύτερη από το συνολικό μέσο της ομοιότητας). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής έδειξαν ότι η ομαδοποίηση κατά περιοχή προέλευσης ήταν σημαντική στα αρχικά στάδια του πειράματος ( $t_0$ - $t_2$ ) για όλες τις περιοχές, από τη χρονική στιγμή  $t_3$  και μετά οι κοινότητες από την Παντάνασσα και το Γιόφυρο ομαδοποιήθηκαν ανάλογα με την παροχή ή όχι

οργανικού εμπλουτισμού, τη χρονική στιγμή  $t_7$  αυτό ίσχυε για όλες τις κοινότητες, ενώ τη χρονική στιγμή  $t_8$  η ομαδοποίηση με βάση την παροχή ή όχι οργανικού εμπλουτισμού ήταν σημαντικότερη από την περιοχή προέλευσης μόνο για τις κοινότητες από την Παντάνασσα και το Γιόφυρο (Εικόνα Δ.3.8.).



Εικόνα Δ.3.8. Τα δενδρογράμματα των δειγμάτων ανά χρονική στιγμή της δειγματοληψίας ( $t_0$ - $t_8$ ).

Fd: Φόδελε,  $org^+$ : δείγματα από μικρόκοσμους με προσθήκη οργανικού εμπλουτισμού,  $org^-$ : δείγματα από μικρόκοσμους χωρίς προσθήκη οργανικού εμπλουτισμού.

## Σύνοψη

Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού έδειξαν ότι η επίδραση της πειραματικής μεταχείρισης (εγκλεισμός του ιζήματος σε πυρηνοδειγματολήπτες και των πυρηνοδειγματοληπτών σε μικρόκοσμους) ήταν ο κύριος παράγοντας που ευθύνονταν για τις αλλαγές στις κοινότητες, τόσο στο επίπεδο της δομής και της σύστασής τους όσο και στο επίπεδο της λειτουργικότητάς τους. Τόσο η α- όσο και η β-ποικιλότητα των κοινοτήτων έδειξαν μια συνεχή μείωση με την αύξηση του χρόνου επώασης ανεξάρτητα από την περιοχή προέλευσης των δειγμάτων και τις συνθήκες επώασης. Επίσης, οι αλλαγές στη λειτουργικότητα των κοινοτήτων ήταν παρόμοιες καθώς η μείωση του επιφανειακού οξειδοαναγωγικού δυναμικού αλλά και η αύξηση της παραγωγής υδρόθειου παρατηρήθηκαν ανεξάρτητα της περιοχής προέλευσης του ιζήματος και της παροχής ή όχι οργανικού εμπλουτισμού ή αερισμού στη στήλη του νερού.

Παρόλα αυτά η θεωρία του Baas-Becking ήταν δυνατόν να ελεγχθεί για το συγκεκριμένο πείραμα, εξετάζοντας α) την ομοιότητα των κοινοτήτων που επωάστηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες σε σχέση με την ομοιότητα αυτών που επωάστηκαν σε διαφορετικές συνθήκες και β) την ομαδοποίηση των δειγμάτων από κάθε χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια του πειράματος σε σχέση με την παροχή ή όχι οργανικού εμπλουτισμού και την περιοχή προέλευσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι α) η ομοιότητα των κοινοτήτων που επωάστηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες ήταν μεγαλύτερη από την ομοιότητα αυτών που επωάστηκαν σε διαφορετικές συνθήκες και β) η ομαδοποίηση με βάση την παροχή ή όχι οργανικού εμπλουτισμού ήταν πιο σημαντική από την περιοχή προέλευσης όταν οι κοινότητες επωάστηκαν από 12 και άνω ημέρες για τουλάχιστον δύο από τις τρεις περιοχές που εξετάστηκαν. Συνεπώς τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού αποτελούν μια έμμεση απόδειξη της θεωρίας του Baas-Becking, και πιο συγκεκριμένα του δεύτερου σκέλους της, δηλαδή ότι "το περιβάλλον επιλέγει".

## Κεφάλαιο Ε. Συζήτηση

---

Στην παρούσα διατριβή εξετάστηκαν οι αλλαγές στις κοινότητες των βακτηρίων της στήλης του νερού και του ιζήματος σε συνθήκες εμπλουτισμού με θρεπτικά, με μεθόδους αλληλούχισης νέας γενιάς. Πραγματοποιήθηκαν δυο πειράματα (Κεφάλαια Β και Δ) σε ελεγχόμενες πειραματικές συνθήκες (μεσοκόσμων και μικροκόσμων, αντίστοιχα) και επίσης (Κεφάλαιο Γ) εξετάστηκαν οι αλλαγές στις κοινότητες του βακτηριοπλαγκτού στο πεδίο (*in situ*).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, υπάρχει η πιθανότητα τα αποτελέσματα των εργασιών που εξετάζουν την ποικιλότητα του 16S rRNA με μεθόδους αλληλούχισης νέας γενιάς να επηρεαστούν λόγω μη πολλαπλασιασμού συγκεκριμένων ταξινομικών ομάδων κατά την PCR (Bergmann et al. 2011; Kuczynski et al. 2012) ή λόγω λανθασμένης επιλογής στο μεταβλητό κομμάτι του 16S rRNA που πολλαπλασιάζεται και εξετάζεται (Lee et al. 2012; Pinto and Raskin 2012; Cai et al. 2013). Από τα αποτελέσματα όμως των πειραμάτων της διατριβής αυτής φαίνεται ότι αυτό δεν συνέβη στην παρούσα διατριβή. Η δομή των κοινοτήτων του βακτηριοπλαγκτού στο Κεφάλαιο Β ήταν πολύ όμοια με τη δομή των κοινοτήτων όπως παρουσιάστηκε από μελέτη η οποία έγινε με μεθόδους υβριδισμού βασισμένη στο ίδιο πείραμα (Sebastian et al. 2012). Επίσης, η δομή και η σύσταση των κοινοτήτων που εξετάστηκαν στο Κεφάλαιο Β όσο και των κοινοτήτων των δειγμάτων ελέγχου του Κεφαλαίου Γ ήταν πολύ όμοιες με κοινότητες από την ανώτερη στήλη του νερού της Μεσογείου όπως αυτές παρουσιάζονται σε άλλες μελέτες (Alonso-Sáez et al. 2007; Feingersch et al. 2010; Ferrera et al. 2011). Επιπροσθέτως, οι αλλαγές που ανιχνεύτηκαν στις συχνότητες των ομάδων με τη μεγαλύτερη αφθονία στο κεφάλαιο Γ, δεν επηρεάζονται από τέτοιου είδους μεθοδολογική μεροληψία καθώς αυτή, αν υπάρχει, επηρεάζει με τον ίδιο τρόπο όλα τα δείγματα κι άρα οι αλλαγές δεν είναι δυνατόν να επισκιαστούν. Οι κοινότητες του ιζήματος του Κεφαλαίου Δ από την δειγματοληψία στο πεδίο ( $t_{-1}$ ) είχαν επίσης παρόμοια δομή και χαρακτηριστικά, όπως μεγαλύτερες τιμές ισοκατανομής, με κοινότητες του ιζήματος από πολλές παράκτιες περιοχές (Zinger et al. 2011; Zhu et al. 2013; Zinger et al. 2014).

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν πραγματοποιηθεί αρκετά πειράματα εμπλουτισμού της στήλης του νερού με θρεπτικά σε ελεγχόμενες συνθήκες παρουσία ή απουσία



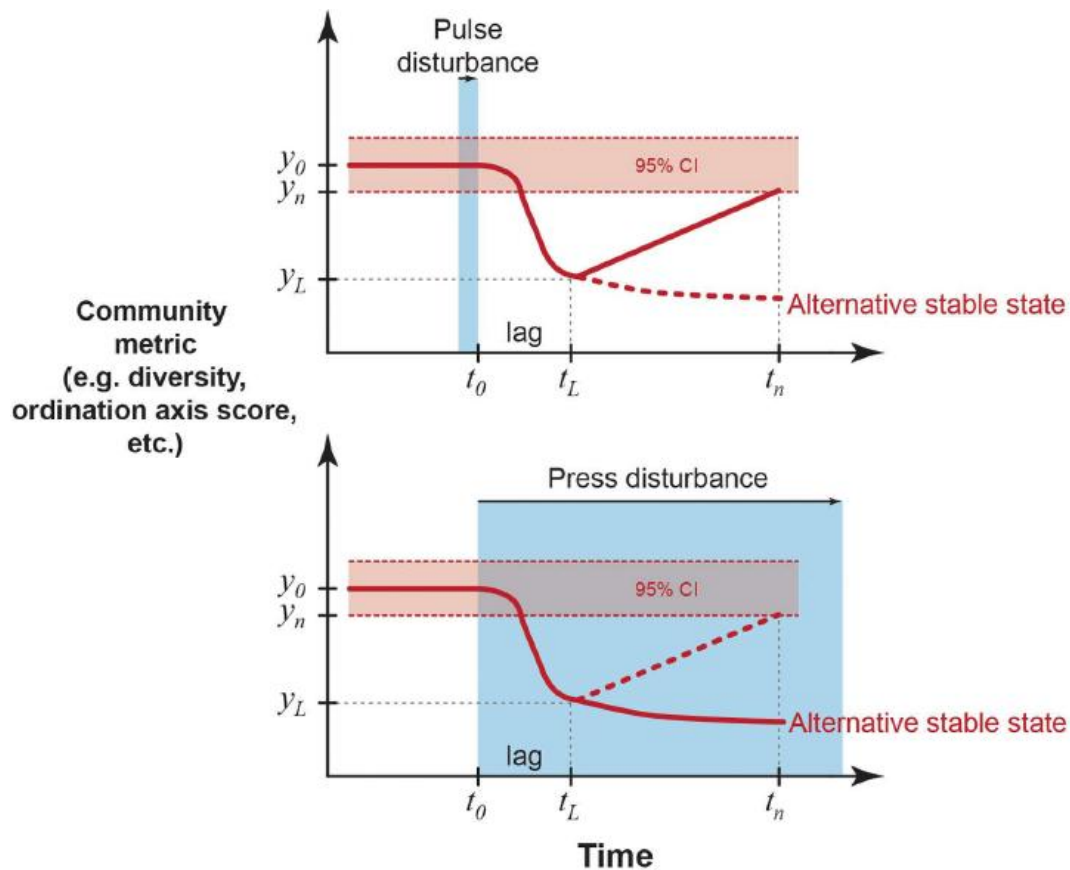
θηρευτών (π.χ. ετερότροφων νανομαστιγωτών) σε διαφορετικές κλίμακες μεγέθους [π.χ. (Carlson and Ducklow 1996; Cherrier et al. 1996; Kirchman and Rich 1997; Rivkin and Anderson 1997; Zohary and Robarts 1998; Pinhassi et al. 1999; Church et al. 2000; Eilers et al. 2000; Kirchman et al. 2000; Carlson et al. 2002; Carlson et al. 2004; Kirchman et al. 2005; Allers et al. 2007; Lekunberri et al. 2012)]. Σε κάποια από αυτά, όταν εξετάζονται οι αλλαγές στις κοινότητες του βακτηριοπλαγκτού, έχει παρατηρηθεί ότι η αφθονία κάποιων από τις ταξινομικές ομάδες αλλάζει ανάλογα με το χρόνο επώασης ανεξάρτητα της πειραματικής μεταχείρισης (π.χ. την προσθήκη θρεπτικών) (Eilers et al. 2000; Allers et al. 2007; Lekunberri et al. 2012).

Στο Κεφάλαιο Β παρατηρήθηκε μια έντονη αλλαγή στις βακτηριακές κοινότητες ανάλογα την ημέρα της δειγματοληψίας τόσο έντονη ώστε τα δείγματα στο σύνολό τους κατηγοριοποιήθηκαν πρώτα σύμφωνα με την πειραματική ημέρα από την οποία προέρχονταν. Αυτό ουσιαστικά σημαίνει ότι οι αλλαγές στις κοινότητες λόγω πειραματικής διαδικασίας ήταν πολύ μεγαλύτερες από τις αλλαγές λόγω της προσθήκης φώσφορου. Δεν μπορεί βέβαια να αποκλειστεί και το ενδεχόμενο οι αλλαγές αυτές να είναι συνδυασμός της πειραματικής μεταχείρισης και των αλλαγών στο χρόνο που θα συνέβαιναν ούτως ή άλλως εάν οι κοινότητες βρίσκονταν στο φυσικό τους περιβάλλον. Πράγματι, υπάρχουν εργασίες οι οποίες αναφέρουν σημαντικές αλλαγές στη δομή των κοινοτήτων του βακτηριοπλαγκτού της ανώτερης στήλης του νερού της θάλασσας ακόμα και σε επίπεδο ημερών (Hewson et al. 2006; Ottesen et al. 2011; Yao et al. 2011).

Παρομοίως, όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του Κεφαλαίου Δ, οι αλλαγές στις κοινότητες με την αύξηση του χρόνου επώασης ήταν επίσης πολύ σημαντικές και όσον αφορά το ιζημα. Αυτό αντικατοπτρίζεται τόσο στο επίπεδο της δομής και της σύστασης της κοινότητας όσο και στη λειτουργικότητά της. Οι παράμετροι της α-ποικιλότητας των κοινοτήτων έδειξαν μια μείωση στο χρόνο η οποία ήταν ανεξάρτητη των συνθηκών επώασης και της περιοχής προέλευσης των ιζημάτων και το ίδιο ίσχυε για την ομοιότητα μεταξύ των κοινοτήτων στο χρόνο. Επίσης, ανεξαρτήτως περιοχής προέλευσης και συνθηκών επώασης παρατηρήθηκε μείωση στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό της επιφάνειας του ιζήματος και αύξηση της παραγωγής υδρόθειου, γεγονός που υποδηλώνει ότι με την αύξηση του χρόνου επώασης οι συνθήκες στην επιφάνεια του ιζήματος γινόταν ολοένα και πιο ανοξικές. Το φαινόμενο παρατηρήθηκε ακόμα και στους μικρόκοσμους στους οποίους

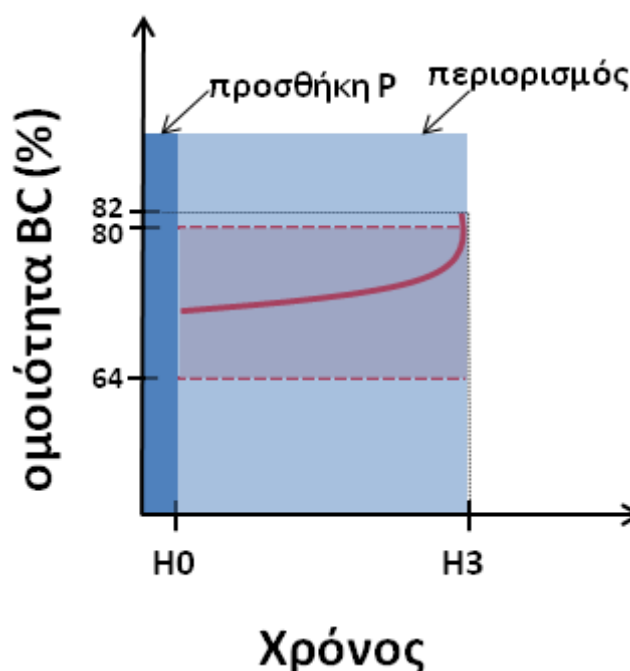
υπήρχε παροχή αέρα στη στήλη του νερού και το διαλυμένο οξυγόνο στη στήλη ήταν πάντα σε υψηλά επίπεδα. Παρόμοια φαινόμενα αύξησης της παραγωγής υδρόθειου με το χρόνο επώασης ανεξαρτήτως μεταχείρισης έχουν παρατηρηθεί και σε άλλα πειράματα επώασης ιζημάτων σε πυρηνοδειγματολήπτες (Valdemarsen et al. 2009, 2010) με τη διαφορά ότι σε εκείνα τα πειράματα σημειώθηκε σημαντική αύξηση κάτω από συνθήκες οργανικού εμπλουτισμού, κάτι που δεν παρατηρήθηκε στην παρούσα εργασία.

Ως διαταραχή για μια κοινότητα ορίζεται ένα αιτιολογικό γεγονός το οποίο α) αλλάζει το άμεσο περιβάλλον με πιθανές επιπτώσεις στην κοινότητα ή β) απευθείας αλλάζει μια κοινότητα (Rykiel Jr 1985; Glasby and Underwood 1996). Επομένως, η προσθήκη θρεπτικών μπορεί να χαρακτηριστεί ως διαταραχή που ανήκει στην πρώτη κατηγορία καθώς κατά την προσθήκη αλλάζει το άμεσο περιβάλλον της κοινότητας με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι πολύ πιθανόν να αλλάξει και η κοινότητα (λόγω της μεγάλης συνάφειας των κοινοτήτων του βακτηριοπλαγκτού με την πρόσληψη θρεπτικών - δείτε Κεφάλαιο Α). Επίσης, η ανθεκτικότητα των μικροβιακών κοινοτήτων σε μια διαταραχή ορίζεται ως ο βαθμός στον οποίο η δομή και η σύσταση μιας κοινότητας παραμένει σταθερή μετά από τη διαταραχή (Allison and Martiny 2008) και ποικίλει ανάλογα με την διάρκεια την ένταση και την συχνότητα της διαταραχής (Shade et al. 2012) (Εικόνα Ε.1.) με τις βραχυπρόθεσμες (pulse) διαταραχές να επιφέρουν λιγότερες αλλαγές και γρηγορότερη ανάκαμψη της κοινότητας από τις μακροπρόθεσμες (press) διαταραχές. Η φύση του εμπλουτισμού ως διαταραχή σύμφωνα με τον παραπάνω διαχωρισμό ήταν διαφορετική στα πειράματα της διατριβής αυτής και το ίδιο ισχύει και για τις αλλαγές στη δομή και τη σύσταση της κοινότητας.



**Εικόνα Ε.1.** Οι διαφορές στη φύση των διαταραχών ανάλογα με τη διάρκεια και οι πιθανές αλλαγές στις κοινότητες ως απόκριση αυτών. Οι κοινότητες είναι πιο πιθανό να σταθεροποιηθούν στην αρχική τους σύσταση μετά από βραχυπρόθεσμες διαταραχές (πάνω) παρά μετά από μακροπρόθεσμες (κάτω). Εικόνα από (Shade et al. 2012).

Στο πείραμα του Κεφαλαίου Β, η φύση του εμπλουτισμού ήταν βραχυπρόθεσμη καθώς η προσθήκη του Ρ έγινε μία φορά στην αρχή του πειράματος. Παράλληλα, τα φαινόμενα περιορισμού αποτελούν κι άλλη μια κατηγορία διαταραχής που αυξάνουν το εύρος των τιμών της ομοιότητας Bray-Curtis (BC) αλλά, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, δεν υπάρχει τρόπος να ποσοτικοποιηθεί. Παρόλα αυτά, οι κοινότητες των μεσοκόσμων με προσθήκη Ρ στην τρίτη πειραματική ημέρα ήταν (έστω και ελαφρώς) σημαντικά πιο όμοιες σε σχέση με τις υπόλοιπες (Εικόνα Ε.2.).

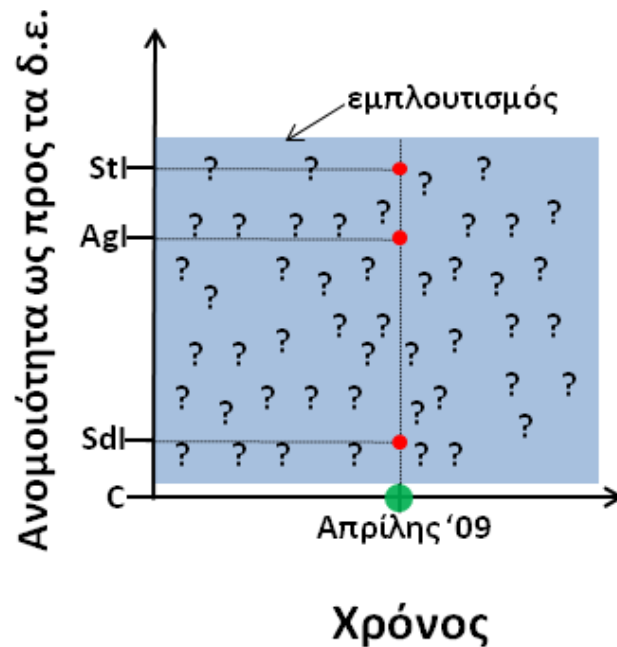


**Εικόνα Ε.2.** Γραφική αναπαράσταση των διαφορετικών διαταραχών στο πείραμα του Κεφαλαίου Β με τρόπο ανάλογο της Εικόνας Ε.1. Η κυρτή γραμμή που συμβολίζει την αύξηση της ομοιότητας των κοινοτήτων μετά την προσθήκη Ρ είναι υποθετική και παρουσιάζεται για συγκριτικούς λόγους.

Αυτό υποδηλώνει ότι οι κοινότητες του βακτηριοπλαγκτού στο πείραμα έδειξαν μεγάλη ανθεκτικότητα στην προσθήκη Ρ, παρά το γεγονός ότι προέρχονταν από την Ανατολική Μεσόγειο όπου η παραγωγικότητα του βακτηριοπλαγκτού περιορίζεται από τον φώσφορο. Το γεγονός αυτό πιθανώς υπογραμμίζει την ικανότητα των κοινοτήτων του βακτηριοπλαγκτού από την περιοχή αυτή να αφομοιώνουν γρήγορα μεγάλες ποσότητες προστιθέμενου φώσφορου χωρίς σημαντικές αλλαγές στη δομή τους. Αξίζει πάντως να αναφερθεί ότι τα αρχικά επίπεδα μετά την προσθήκη (100 nM) ήταν συγκρίσιμα με τις συγκεντρώσεις στο πεδίο που έχουν καταγραφεί για την Ανατολική Μεσόγειο (Zohary and Robarts 1998). Έτσι, ο προστιθέμενος φώσφορος στο πείραμα αυτό ίσως δεν ήταν αρκετός ώστε να προκαλέσει αλλαγές στις κοινότητες, παρά την αύξηση στην βιομάζα και παραγωγικότητα του βακτηριοπλαγκτού μετά την προσθήκη (Sebastian et al. 2012). Υπάρχουν, πάντως, πειράματα παρόμοιας κλίμακας στα οποία η προσθήκη φώσφορου πραγματοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση της τάξεως των  $\mu\text{mol}$  χωρίς να παρατηρηθούν αλλαγές στην δομή των κοινοτήτων του βακτηριοπλαγκτού (Lekunberri et al. 2010; Teira et al. 2011). Εναλλακτικά, μια αλλαγή στο περιοριστικό θρεπτικό μεταξύ των διαφορετικών

ταξινομικών ομάδων του βακτηριοπλαγκτού θα μπορούσε πιθανώς να έχει ακολουθήσει την αρχική αύξηση της βιομάζας μετά την προσθήκη φώσφορου, όπως πρόσφατα παρατηρήθηκε σε παρόμοιο πείραμα προσθήκης θρεπτικών στην Ανατολική Μεσόγειο (Sebastián and Gasol 2013).

Στο πείραμα του Κεφαλαίου Γ η διαταραχή ανάμεσα στα δείγματα ελέγχου και στα "επηηρεασμένα" δείγματα είναι ο εμπλουτισμός με θρεπτικά. Αντίθετα με τα άλλα δυο πειράματα, οι αλλαγές εδώ εξετάστηκαν σε χωρική κι όχι σε χρονική κλίμακα. Προφανώς η φύση της διαταραχής στην περίπτωση αυτή είναι μακροπρόθεσμη, καθώς ο εμπλουτισμός συμβαίνει συνεχώς και επιπροσθέτως η διάρκεια και η συχνότητά του μεταβάλλονται από περιοχή σε περιοχή αλλά και στο χρόνο μέσα στην ίδια περιοχή (π.χ. σε περιόδους όπου η μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας στη Σητεία υπολειτουργεί). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τη διαφορετικότητα στις πηγές των θρεπτικών και την μορφολογία της ακτογραμμής σε κάθε περιοχή, θα αναμενόταν να προκαλέσει διαφορετικές αλλαγές στις κοινότητες σε κάθε περιοχή, όπως και παρατηρήθηκε για το σύνολο της κοινότητας κάθε περιοχής (Εικόνα Ε.3.).



Εικόνα Ε.3. Γραφική αναπαράσταση των αλλαγών στις κοινότητες στο πείραμα του Κεφαλαίου Γ.

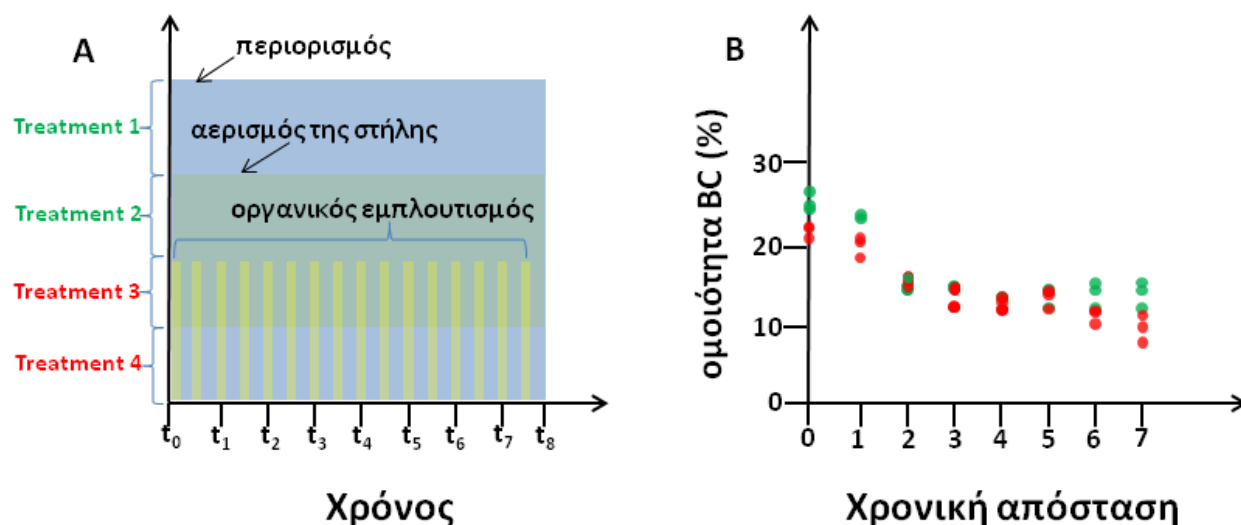
Με πράσινη κουκκίδα συμβολίζονται τα δείγματα ελέγχου ενώ με κόκκινες τα "επηηρεασμένα" δείγματα. Τα ερωτηματικά συμβολίζουν την αβεβαιότητα στη διάρκεια, συχνότητα και φύση του οργανικού εμπλουτισμού σε κάθε περιοχή.

Παρά το γεγονός αυτό, παρατηρήθηκε ένα επαναλαμβανόμενο μοτίβο στις αλλαγές των συχνοτήτων πέντε ταξινομικών ομάδων με μεγάλη αφθονία στα επηρεασμένα δείγματα από κάθε περιοχή. Οι αλλαγές αυτές ήταν σημαντικές καθώς μπορούσαν να εξηγήσουν το μεγαλύτερο ποσοστό της μεταβλητότητας της κοινότητας μεταξύ "επηρεασμένων" δειγμάτων και δειγμάτων ελέγχου σε κάθε περιοχή και ήταν σημαντικά συσχετισμένες με τις περισσότερες από τις περιβαλλοντικές παραμέτρους που σχετίζονταν με τον εμπλουτισμό. Επίσης, οι στρατηγικές επιβίωσης που έχουν αναπτύξει οι ομάδες αυτές, όπως περιγράφονται από τη βιβλιογραφία, συμβαδίζουν με τις παρατηρήσεις μας. Τα *Pelagibacteraceae* (γνωστά και ως SAR11) αποτελούν μια οικογένεια άκρως ολιγότροφων βακτηρίων με ευρεία κατανομή σε όλους τους ωκεανούς της Γης (Rappe et al. 2002). Η συχνότητα των *Pelagibacteraceae* έχει δειχθεί να μειώνεται σε περιπτώσεις αυξημένου DOC (Teira et al. 2009; Dinasquet et al. 2013), αυξημένης πυκνότητας βακτηριακών κυττάρων στη στήλη του νερού (Teira et al. 2009) και αυξημένων επιπέδων χλωροφύλλης-α (Williams et al. 2013), σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας. Ο φυλογενετικός κλάδος των SAR86 έχει επίσης ευρεία κατανομή στην εύφωτη ζώνη των ωκεανών και μοιράζεται πολλά χαρακτηριστικά σε επίπεδο γονιδιώματος με την οικογένεια των *Pelagibacteraceae* (Dupont et al. 2012). Υπάρχουν, πάντως, κάποιες εργασίες που δείχνουν αύξηση στους πληθυσμούς και τη δραστηριότητα της ομάδας αυτής σε νερά με αυξημένα επίπεδα θρεπτικών και χλωροφύλλης-α (Alonso-Gutiérrez et al. 2009; Tada et al. 2011) ενώ άλλες έδειξαν το αντίθετο (Teira et al. 2009; Morris et al. 2012). Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με τις τελευταίες, καθώς παρατηρήσαμε μείωση στην αφθονία των SAR86 στις "επηρεασμένες" περιοχές, όμοια με τη μείωση των *Pelagibacteraceae* στις περιοχές αυτές. Η αφθονία της οικογένειας των *Alteromonadaceae* έχει συσχετιστεί θετικά με αυξημένα επίπεδα οργανικού άνθρακα (Allers et al. 2007; McCarren et al. 2010; Dinasquet et al. 2013), ενώ οι αφθονίες των *Rhodobacteraceae* και *Cryomorphaceae* με την αποσύνθεση οργανικής ύλης προερχόμενης από το φυτοπλαγκτόν κατά τα τελευταία στάδια φυτοπλαγκτονικών ανθήσεων (Pinhassi et al. 2004; Grossart et al. 2005; Allers et al. 2007; Tada et al. 2011; Tada et al. 2012). Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν τις παρατηρήσεις αυτές, καθώς η συχνότητα των *Alteromonadaceae* βρέθηκε αυξημένη κυρίως στα "επηρεασμένα" δείγματα από τη Σητεία όπου τα επίπεδα του DOC ήταν τα υψηλότερα, ενώ η συχνότητα των *Rhodobacteraceae* είχε τη μεγαλύτερη αύξηση στα "επηρεασμένα" δείγματα από τον Άγιο Νικόλαο όπου τα επίπεδα της

χλωροφύλλης-α ήταν τα υψηλότερα και όπου φυτοπλαγκτονικές ανθήσεις έχουν συμβεί στο παρελθόν. Παραδόξως, τα *Cryomorphaceae* είχαν τη μεγαλύτερη αύξηση στα "επηρεασμένα" δείγματα από τη Σητεία, ενώ μία άλλη μεγάλη σε αφθονία οικογένεια που ανήκει στο Φύλο των *Bacteroidetes*, τα *Flavobacteriaceae*, έδειξαν μεγάλη αύξηση στα "επηρεασμένα" δείγματα από τον Άγιο Νικόλαο. Παρόλο που οι ομοιότητες σε επίπεδο γονιδιώματος πολλών *Bacteroidetes* υποδεικνύουν την ίδια στρατηγική επιβίωσης η οποία σχετίζεται με την αποσύνθεση σωματιδιακής οργανικής ύλης (Fernandez-Gomez et al. 2013), παραμένει απροσδιόριστος ο λόγος που στη μελέτη αυτή διαφορετικές οικογένειες του Φύλου των *Bacteroidetes* αυξήθηκαν σε συχνότητα σε διαφορετικές "επηρεασμένες" περιοχές. Μια υπόθεση θα ήταν ότι αυτό θα μπορούσε να σχετίζεται με τη διαφορετικότητα των πηγών της αποσυντιθέμενης σωματιδιακής ύλης στις δυο περιοχές, πιθανώς λόγω της αποσύνθεσης του μακροφύκου *Posidonia oceanica* κοντά στην ιχθυοκαλλιέργεια στη Σητεία (Apostolaki et al. 2010). Άλλη μια ένδειξη που συνηγορεί στην παρουσία του φαινομένου αυτού στη Σητεία είναι η αυξημένη συχνότητα της οικογένειας των *Colwelliaceae* στην περιοχή αυτή, καθώς η ομάδα αυτή έχει δειχθεί ότι συμμετέχει στην αποσύνθεση ιστών μακροφυκών (Fernandes et al. 2012).

Στο πείραμα του Κεφαλαίου Δ, η φύση των διαταραχών ήταν τόσο βραχυπρόθεσμη όσο και μακροπρόθεσμη. Οι μακροπρόθεσμες διαταραχές, οι οποίες υπήρχαν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, ήταν ο περιορισμός όλων των κοινοτήτων λόγω της πειραματικής διάταξης και ο αερισμός της στήλης του νερού στα treatments 2 και 3 ενώ η βραχυπρόθεσμη ήταν ο οργανικός εμπλουτισμός μέσω προσθήκης διαλυμένης ιχθυοτροφής με ένταση  $0.155 \text{ g day}^{-1}$  που πραγματοποιούνταν ανά δύο ημέρες από την αρχή έως και την τριακοστή ημέρα του πειράματος στα treatments 3 και 4 (Εικόνα Ε.4.Α). Η επίδραση των φαινομένων περιορισμού, όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο Δ, φαίνεται στη διαρκή μείωση των παραμέτρων της α-ποικιλότητας και στη μείωση της ομοιότητας μεταξύ των κοινοτήτων. Επίσης, φάνηκε ότι ο οργανικός εμπλουτισμός είχε πιο σημαντική επίδραση στη δομή και στη σύσταση των κοινοτήτων από τον αερισμό της στήλης του νερού, καθώς η μέση ομοιότητα μεταξύ των treatments 1 και 2 (χωρίς εμπλουτισμό ανεξαρτήτως αερισμού) και 3 και 4 (με εμπλουτισμό ανεξαρτήτως αερισμού) ήταν σημαντικά μεγαλύτερες από όλες τις άλλες συγκρίσεις μεταξύ των treatments (Εικόνα Δ.3.6.Δ). Έτσι, η επίδραση της προσθήκης οργανικού εμπλουτισμού μπορεί να εκτιμηθεί αν

συγκριθεί η αλλαγή στη μέση ομοιότητα των δειγμάτων με και χωρίς οργανικό εμπλουτισμό σε συνάρτηση με τη χρονική απόσταση (Εικόνα Ε.4.Β).



**Εικόνα Ε.4. Α: Γραφική αναπαράσταση των διαφορετικών ως προς τη διάρκεια διαταραχών στο πείραμα του Κεφαλαίου Δ με τρόπο ανάλογο της Εικόνας Ε.1. Β: Η αλλαγή στη μέση ομοιότητα των δειγμάτων με (κόκκινα σημεία) και χωρίς (πράσινα σημεία) οργανικό εμπλουτισμό σε συνάρτηση με τη χρονική απόσταση.**

Η μέση ομοιότητα των δειγμάτων χωρίς οργανικό εμπλουτισμό (πράσινα σημεία) ήταν ίση (για χρονική απόσταση 2,3,4 και 5) ή μεγαλύτερη (για χρονική απόσταση 0,1,6 και 7) από αυτή των δειγμάτων με οργανικό εμπλουτισμό (κόκκινα σημεία). Παρατηρήθηκε δηλαδή μια τάση αποσταθεροποίησης της κοινότητας όσον αφορά τη σύστασή της, δηλαδή μείωση της ομοιότητας με την αύξηση του χρόνου επώασης, στους μικρόκοσμους που επωάστηκαν κάτω από συνθήκες οργανικού εμπλουτισμού. Οι κοινότητες του θαλάσσιου ιζήματος είναι πολύ λιγότερο μελετημένες κάτω από συνθήκες διαταραχής από ότι οι κοινότητες άλλων οικοσυστημάτων, π.χ. της στήλης του νερού ή του εδάφους (Shade et al. 2012). Γενικότερα όμως, ο εμπλουτισμός (με θρεπτικά ή οργανική ύλη) έχει εξεταστεί σε πολλές μελέτες σε άλλα συστήματα και έχει φανεί ότι, όπως και στη δικιά μας μελέτη, οι κοινότητες είναι ευαίσθητες σε αυτού του είδους την διαταραχή (Allison and Martiny 2008; Shade et al. 2012).

Ο βαθμός όμως της ευαισθησίας στον οργανικό εμπλουτισμό δεν ήταν ο ίδιος για τις κοινότητες από κάθε περιοχή. Οι κοινότητες από την Παντάνασσα και το Γιόφυρο, έχασαν γρήγορα την "ταυτότητά" τους, καθώς από την 12η πειραματική ημέρα και μετά η



ομαδοποίηση των δειγμάτων από τις δυο αυτές περιοχές γινόταν ανάλογα με τις συνθήκες επώασης κι όχι ανάλογα με την περιοχή προέλευσης. Απεναντίας, για τις κοινότητες από το Φόδελε η ομαδοποίηση ανά περιοχή προέλευσης ήταν σημαντική για όλες τις χρονικές στιγμές εκτός από την 28η πειραματική ημέρα ( $t_7$ ) (Εικόνα Δ.3.8.). Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί τόσο με βάση τη βιογεωχημία του ιζήματος όσο και με βάση τη δομή της βακτηριακής κοινότητας της περιοχής αυτής *in situ*. Καταρχήν, αν υποθέσουμε ότι και οι τρεις περιοχές είχαν αρχικά την ίδια "φέρουσα ικανότητα" διαχείρισης οργανικού υλικού, τότε το ίζημα από το Φόδελε είναι αναμενόμενο να παρουσιάσει μικρότερες αλλαγές στην κοινότητα μετά την προσθήκη οργανικού υλικού λόγω της μικρότερης αρχικής του περιεκτικότητας. Επιπροσθέτως, η ανοργανοποίηση του προστιθέμενου οργανικού υλικού στο Φόδελε φαίνεται να ήταν πιο αποτελεσματική από ότι στις άλλες δυο περιοχές καθώς τα επίπεδα οργανικής ύλης στο ίζημα δε διέφεραν σημαντικά στους μικρόκοσμους με και χωρίς προσθήκη οργανικού υλικού, αντίθετα από ότι παρατηρήθηκε για τις άλλες δυο περιοχές (Εικόνα Δ.3.3.). Από πλευράς βακτηριακής κοινότητας, αυτό θα μπορούσε να σχετίζεται με την αυξημένη αρχική ποικιλότητα της κοινότητας από το Φόδελε σε σχέση με τις κοινότητες από τις άλλες δυο περιοχές (Εικόνα Δ.3.5.). Ο οικολογικός μηχανισμός πίσω από τη θετική συσχέτιση μεταξύ ποικιλότητας και αντίστασης σε κάποιου είδους διαταραχή έχει προταθεί ότι σχετίζεται με τη λεγόμενη "Υπόθεση Ασφαλείας" (Insurance Hypothesis) (Yachi and Loreau 1999), σύμφωνα με την οποία η ποικιλότητα εξασφαλίζει σε ένα σύστημα αυξημένη λειτουργικότητα μετά από κάποια διαταραχή επειδή ο αυξημένος αριθμός ειδών προσδίδει περισσότερη "ασφάλεια" ότι κάποια θα συνεχίσουν να είναι λειτουργικά ακόμη και μετά τη διαταραχή. Πολλές εργασίες έχουν πειραματικά αποδείξει ότι κοινότητες με αυξημένη γενετική ποικιλότητα είναι πιθανότερο να περιέχουν τάξα με συμπληρωματικά λειτουργικά χαρακτηριστικά [π.χ. (Tilman et al. 1997; Lavorel and Garnier 2002; Tilman et al. 2006)] και την ικανότητα για γρήγορη ανάκαμψη μετά από μια διαταραχή, μειώνοντας το χρόνο ανάκαμψης της κοινότητας [π.χ. (Flöder et al. 2010)]. Για τις βακτηριακές κοινότητες συγκεκριμένα, έχει βρεθεί θετική συσχέτιση της αντίστασης σε κάποια διαταραχή τόσο με τον πλούτο ειδών της κοινότητας (Griffiths et al. 2000; Van Elsas et al. 2012) όσο και με την ισοκατανομή της (Wittebolle et al. 2009).

# Αναφορές

---

- Allers E, Gomez-Consarnau L, Pinhassi J, Gasol JM, Simek K, Pernthaler J (2007) Response of Alteromonadaceae and Rhodobacteriaceae to glucose and phosphorus manipulation in marine mesocosms. *Environmental microbiology* 9 (10):2417-2429. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01360.x
- Allgeier JE, Rosemond AD, Layman CA (2011) The frequency and magnitude of non-additive responses to multiple nutrient enrichment. *Journal of Applied Ecology* 48 (1):96-101
- Allison SD, Martiny JB (2008) Colloquium paper: resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 Suppl 1:11512-11519. doi:10.1073/pnas.0801925105
- Alonso-Gutiérrez J, Lekunberri I, Teira E, Gasol JM, Figueras A, Novoa B (2009) Bacterioplankton composition of the coastal upwelling system of 'Ría de Vigo', NW Spain. *FEMS microbiology ecology* 70 (3):493-505
- Alonso-Sáez L, Balagué V, Sà EL, Sánchez O, González JM, Pinhassi J, Massana R, Pernthaler J, Pedrós-Alió C, Gasol JM (2007) Seasonality in bacterial diversity in north-west Mediterranean coastal waters: Assessment through clone libraries, fingerprinting and FISH. *Fems Microbiology Ecology* 60 (1):98-112
- Apostolaki ET, Holmer M, Marbà N, Karakassis I (2010) Degrading seagrass (*Posidonia oceanica*) ecosystems: A source of dissolved matter in the Mediterranean. *Hydrobiologia* 649 (1):13-23
- Arrhenius O (1921) Species and area. *Journal of Ecology* 9 (1):95-99
- Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyer-Reil LA, Thingstad F (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar Ecol Prog Ser* 23:99-106
- Azam F, Malfatti F (2007) Microbial structuring of marine ecosystems. *Nat Rev Microbiol* 5 (10):782-791. doi:10.1038/nrmicro1747
- Basurco B, Larrazabal G (2000) Marine fish farming in Spain. *Cah Options Mediterr* 30:45-56
- Becking LB (1934) Geobiologie of inleiding tot de milieukunde. WP Van Stockum & Zoon,
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* 57 (1):289-300. doi:10.2307/2346101
- Benlloch S, Rodríguez-Valera F, Martínez-Murcia AJ (1995) Bacterial diversity in two coastal lagoons deduced from 16S rDNA PCR amplification and partial sequencing. *FEMS microbiology ecology* 18 (4):267-280
- Bent SJ, Pierson JD, Forney LJ (2007) Measuring species richness based on microbial community fingerprints: The emperor has no clothes [2]. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (7):2399
- Bergmann GT, Bates ST, Eilers KG, Lauber CL, Caporaso JG, Walters WA, Knight R, Fierer N (2011) The under-recognized dominance of Verrucomicrobia in soil bacterial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 43 (7):1450-1455
- Bissett A, Burke C, Cook PLM, Bowman JP (2007) Bacterial community shifts in organically perturbed sediments. *Environmental microbiology* 9 (1):46-60
- Boynton WR, Murray L, Hagy JD, Stokes C, Kemp WM (1996) A comparative analysis of eutrophication patterns in a temperate coastal lagoon. *Estuaries* 19 (2 B):408-421
- Bravo F, Montanes A (2001) Aquaculture and environment from the perspective of a Spanish fish farmer. *Cah Options Mediterr* 55:101-109
- Cai L, Ye L, Tong AHY, Lok S, Zhang T (2013) Biased Diversity Metrics Revealed by Bacterial 16S Pyrotags Derived from Different Primer Sets. *PloS one* 8 (1)

- Caporaso JG, Bittinger K, Bushman FD, Desantis TZ, Andersen GL, Knight R (2010a) PyNAST: A flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* 26 (2):266-267
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pêa AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R (2010b) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods* 7 (5):335-336
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (SUPPL. 1):4516-4522
- Caporaso JG, Paszkiewicz K, Field D, Knight R, Gilbert JA (2012) The Western English Channel contains a persistent microbial seed bank. *ISME Journal* 6 (6):1089-1093
- Carlson CA, Ducklow HW (1996) Growth of bacterioplankton and consumption of dissolved organic carbon in the Sargasso Sea. *Aquatic Microbial Ecology* 10 (1):69-85
- Carlson CA, Giovannoni SJ, Hansell DA, Goldberg SJ, Parsons R, Otero MP, Vergin K, Wheeler BR (2002) Effect of nutrient amendments on bacterioplankton production, community structure, and DOC utilization in the northwestern Sargasso Sea. *Aquatic Microbial Ecology* 30 (1):19-36
- Carlson CA, Giovannoni SJ, Hansell DA, Goldberg SJ, Parsons R, Vergin K (2004) Interactions among dissolved organic carbon, microbial processes, and community structure in the mesopelagic zone of the northwestern Sargasso Sea. *Limnology and Oceanography* 49 (4 I):1073-1083
- Caro-Quintero A, Konstantinidis KT (2012) Bacterial species may exist, metagenomics reveal. *Environmental microbiology* 14 (2):347-355. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02668.x
- Celussi M, Pugnetti A, Del Negro P (2009) Structural dynamics of bacterioplankton assemblages in the Lagoon of Venice. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 84 (1):154-160
- Chao A, Shen TJ (2003) Nonparametric estimation of Shannon's index of diversity when there are unseen species in sample. *Environmental and Ecological Statistics* 10 (4):429-443
- Cherrier J, Bauer JE (2004) Bacterial utilization of transient plankton-derived dissolved organic carbon and nitrogen inputs in surface ocean waters. *Aquatic Microbial Ecology* 35 (3):229-241
- Cherrier J, Bauer JE, Druffel ERM (1996) Utilization and turnover of labile dissolved organic matter by bacterial heterotrophs in eastern North Pacific surface waters. *Marine Ecology Progress Series* 139 (1-3):267-279
- Church MJ, Hutchins DA, Ducklow HW (2000) Limitation of bacterial growth by dissolved organic matter and iron in the Southern Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (2):455-466
- Ciccarelli FD, Doerks T, Von Mering C, Creevey CJ, Snel B, Bork P (2006) Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science* 311 (5765):1283-1287
- Clarke K, Warwick R (2001) Change in Marine Communities: An approach to statistical analysis and interpretation. 2001. PRIMER-E: Plymouth, UK
- Cloern JE (2001) Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Marine Ecology Progress Series* 210:223-253
- Cuevas LA, Egge JK, Thingstad TF, Töpper B (2011) Organic carbon and mineral nutrient limitation of oxygen consumption, bacterial growth and efficiency in the Norwegian Sea. *Polar Biology* 34 (6):871-882
- Cury JC, Araujo FV, Coelho-Souza SA, Peixoto RS, Oliveira JAL, Santos HF, Dávila AMR, Rosado AS (2011) Microbial diversity of a Brazilian coastal region influenced by an upwelling system and anthropogenic activity. *PloS one* 6 (1)

- Damgaard C, Weiner J (2000) Describing inequality in plant size or fecundity. *Ecology* 81 (4):1139-1142
- Dinasquet J, Kragh T, Schroter ML, Sondergaard M, Riemann L (2013) Functional and compositional succession of bacterioplankton in response to a gradient in bioavailable dissolved organic carbon. *Environmental microbiology* 15 (9):2616-2628. doi:10.1111/1462-2920.12178
- Dupont CL, Rusch DB, Yooseph S, Lombardo MJ, Richter RA, Valas R, Novotny M, Yee-Greenbaum J, Selengut JD, Haft DH, Halpern AL, Lasken RS, Nealson K, Friedman R, Venter JC (2012) Genomic insights to SAR86, an abundant and uncultivated marine bacterial lineage. *The ISME journal* 6 (6):1186-1199. doi:10.1038/ismej.2011.189
- Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26 (19):2460-2461
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27 (16):2194-2200
- Eilers H, Pernthaler J, Amann R (2000) Succession of pelagic marine bacteria during enrichment: A close look at cultivation-induced shifts. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (11):4634-4640
- Eleftheriou A (2013) *Methods for the Study of Marine Benthos: Fourth Edition.*
- Falb M, Müller K, Königsmaier L, Oberwinkler T, Horn P, Von Gronau S, Gonzalez O, Pfeiffer F, Bornberg-Bauer E, Oesterhelt D (2008) Metabolism of halophilic archaea. *Extremophiles* 12 (2):177-196
- Feingersch R, Suzuki MT, Shmoish M, Sharon I, Sabehi G, Partensky F, Béjà O (2010) Microbial community genomics in eastern Mediterranean Sea surface waters. *ISME Journal* 4 (1):78-87
- Fenchel T (2008) The microbial loop - 25 years later. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 366 (1-2):99-103
- Fenchel T, Finlay BJ (2004) The ubiquity of small species: Patterns of local and global diversity. *BioScience* 54 (8):777-784
- Ferguson RL, Buckley EN, Palumbo AV (1984) Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. *Applied and Environmental Microbiology* 47 (1):49-55
- Fernandes N, Steinberg P, Rusch D, Kjelleberg S, Thomas T (2012) Community structure and functional gene profile of bacteria on healthy and diseased thalli of the red seaweed *Delisea pulchra*. *PloS one* 7 (12):e50854. doi:10.1371/journal.pone.0050854
- Fernandez-Gomez B, Richter M, Schuler M, Pinhassi J, Acinas SG, Gonzalez JM, Pedros-Alio C (2013) Ecology of marine Bacteroidetes: a comparative genomics approach. *The ISME journal* 7 (5):1026-1037. doi:10.1038/ismej.2012.169
- Ferrera I, Gasol JM, Sebastián M, Hojerová E, Kobížek M (2011) Comparison of growth rates of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria and other bacterioplankton groups in coastal mediterranean waters. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (21):7451-7458
- Flöder S, Jaschinski S, Wells G, Burns CW (2010) Dominance and compensatory growth in phytoplankton communities under salinity stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 395 (1-2):223-231
- Fodelianakis S, Papageorgiou N, Karakassis I, Ladoukakis ED (2014) Community structure changes in sediment bacterial communities along an organic enrichment gradient associated with fish farming. *Annals of Microbiology*. doi:10.1007/s13213-014-0865-4
- Fox J, Hong J (2009) Effect displays in R for multinomial and proportional-odds logit models: Extensions to the effects package. *Journal of Statistical Software* 32 (1):1-24
- Fuhrman JA, Azam F (1982) Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: Evaluation and field results. *Marine Biology* 66 (2):109-120

- Gibbons SM, Caporaso JG, Pirrung M, Field D, Knight R, Gilbert JA (2013) Evidence for a persistent microbial seed bank throughout the global ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (12):4651-4655
- Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL, Field KG (1990) Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345 (6270):60-63
- Glasby TM, Underwood AJ (1996) Sampling to differentiate between pulse and press perturbations. *Environmental Monitoring and Assessment* 42 (3):241-252
- Gleason HA (1922) ON THE RELATION BETWEEN SPECIES AND AREA<sup>1</sup>. *Ecology* 3:158
- Good IJ (1953) The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40 (3-4):237-264
- Griffiths BS, Ritz K, Bardgett RD, Cook R, Christensen S, Ekelund F, Sørensen SJ, Bååth E, Bloem J, De Ruiter PC, Dolfing J, Nicolardot B (2000) Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: An examination of the biodiversity-ecosystem function relationship. *Oikos* 90 (2):279-294
- Grossart HP, Levold F, Allgaier M, Simon M, Brinkhoff T (2005) Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environmental microbiology* 7 (6):860-873
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4 (1):XIX-XX
- Hanage WP, Fraser C, Spratt BG (2005) Fuzzy species among recombinogenic bacteria. *BMC Biology* 3
- Harris SR, Cartwright EJP, Török ME, Holden MTG, Brown NM, Ogilvy-Stuart AL, Ellington MJ, Quail MA, Bentley SD, Parkhill J, Peacock SJ (2013) Whole-genome sequencing for analysis of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases* 13 (2):130-136
- Hewson I, Steele JA, Capone DG, Fuhrman JA (2006) Temporal and spatial scales of variation in bacterioplankton assemblages of oligotrophic surface waters. *Marine Ecology Progress Series* 311:67-77
- Hobbie JE, Daley RJ, Jasper S (1977) Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 33 (5):1225-1228
- Holm-Hansen O, Lorenzen CJ, Holmes RW, Strickland JDH (1965) Fluorometric Determination of Chlorophyll. *Journal du Conseil* 30 (1):3-15
- Holmer M, Argyrou M, Dalsgaard T, Danovaro R, Diaz-Almela E, Duarte CM, Frederiksen M, Grau A, Karakassis I, Marbà N, Mirto S, Pérez M, Pusceddu A, Tsapakis M (2008) Effects of fish farm waste on *Posidonia oceanica* meadows: Synthesis and provision of monitoring and management tools. *Marine Pollution Bulletin* 56 (9):1618-1629
- Horner-Devine MC, Lage M, Hughes JB, Bohannon BJM (2004) A taxa-area relationship for bacteria. *Nature* 432 (7018):750-753
- Huber JA, Mark Welch DB, Morrison HG, Huse SM, Neal PR, Butterfield DA, Sogin ML (2007) Microbial population structures in the deep marine biosphere. *Science* 318 (5847):97-100
- Huse SM, Huber JA, Morrison HG, Sogin ML, Welch DM (2007) Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biology* 8 (7)
- Iannelli R, Bianchi V, Macci C, Peruzzi E, Chiellini C, Petroni G, Masciandaro G (2012) Assessment of pollution impact on biological activity and structure of seabed bacterial communities in the Port of Livorno (Italy). *Science of the Total Environment* 426:56-64
- Islam MS, Tanaka M (2004) Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: A review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin* 48 (7-8):624-649
- Kaiser D (2003) Coupling cell movement to multicellular development in myxobacteria. *Nature reviews Microbiology* 1 (1):45-54
- 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

- Kawahara N, Shigematsu K, Miyadai T, Kondo R (2009) Comparison of bacterial communities in fish farm sediments along an organic enrichment gradient. *Aquaculture* 287 (1-2):107-113
- Kirchman D, K'Neas E, Hodson R (1985) Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology* 49 (3):599-607
- Kirchman DL (2008) *Microbial Ecology of the Oceans: Second Edition*.
- Kirchman DL, Malmstrom RR, Cottrell MT (2005) Control of bacterial growth by temperature and organic matter in the Western Arctic. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 52 (24-26):3386-3395
- Kirchman DL, Meon B, Cottrell MT, Hutchins DA, Weeks D, Bruland KW (2000) Carbon versus iron limitation of bacterial growth in the California upwelling regime. *Limnology and Oceanography* 45 (8):1681-1688
- Kirchman DL, Rich JH (1997) Regulation of bacterial growth rates by dissolved organic carbon and temperature in the equatorial Pacific Ocean. *Microbial Ecology* 33 (1):11-20
- Kolber ZS, Plumley FG, Lang AS, Beatty JT, Blankenship RE, VanDover CL, Vetrani C, Koblizek M, Rathgeber C, Falkowski PG (2001) Contribution of aerobic photoheterotrophic bacteria to the carbon cycle in the ocean. *Science* 292 (5526):2492-2495
- Kolber ZS, Van Dover CL, Niederman RA, Falkowski PG (2000) Bacterial photosynthesis in surface waters of the open ocean. *Nature* 407 (6801):177-179
- Konopka A (2009) What is microbial community ecology. *ISME Journal* 3 (11):1223-1230
- Konstantinidis KT, Ramette A, Tiedje JM (2006) The bacterial species definition in the genomic era. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361 (1475):1929-1940
- Kress N, Frede Thingstad T, Pitta P, Psarra S, Tanaka T, Zohary T, Groom S, Herut B, Fauzi C, Mantoura R, Polychronaki T, Rassoulzadegan F, Spyres G (2005) Effect of P and N addition to oligotrophic Eastern Mediterranean waters influenced by near-shore waters: A microcosm experiment. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 52 (22-23):3054-3073
- Krom MD, Herut B, Mantoura RFC (2004) Nutrient budget for the Eastern Mediterranean: Implications for phosphorus limitation. *Limnology and Oceanography* 49 (5):1582-1592
- Kuczynski J, Lauber CL, Walters WA, Parfrey LW, Clemente JC, Gevers D, Knight R (2012) Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nature reviews Genetics* 13 (1):47-58. doi:10.1038/nrg3129
- Kuczynski J, Liu Z, Lozupone C, McDonald D, Fierer N, Knight R (2010) Microbial community resemblance methods differ in their ability to detect biologically relevant patterns. *Nature methods* 7 (10):813-819. doi:10.1038/nmeth.1499
- Kuffner M, Hai B, Rattei T, Melodelima C, Schlöter M, Zechmeister-Boltenstern S, Jandl R, Schindlbacher A, Sessitsch A (2012) Effects of season and experimental warming on the bacterial community in a temperate mountain forest soil assessed by 16S rRNA gene pyrosequencing. *FEMS microbiology ecology* 82 (3):551-562. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01420.x
- Kunin V, Engelbrektson A, Ochman H, Hugenholtz P (2010) Wrinkles in the rare biosphere: Pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environmental microbiology* 12 (1):118-123
- Kuosa H, Kaartokallio H (2006) Experimental evidence on nutrient and substrate limitation of Baltic Sea sea-ice algae and bacteria. *Hydrobiologia* 554 (1):1-10
- Langenheder S, Lindstrom ES, Tranvik LJ (2006) Structure and function of bacterial communities emerging from different sources under identical conditions. *Appl Environ Microbiol* 72 (1):212-220. doi:10.1128/AEM.72.1.212-220.2006
- Langenheder S, Ragnarsson H (2007) The role of environmental and spatial factors for the composition of aquatic bacterial communities. *Ecology* 88 (9):2154-2161

- Lavorel S, Garnier E (2002) Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: Revisiting the Holy Grail. *Functional Ecology* 16 (5):545-556
- Lawrence JG (2002) Gene Transfer in Bacteria: Speciation without Species? *Theoretical Population Biology* 61 (4):449-460
- Lee CK, Herbold CW, Polson SW, Wommack KE, Williamson SJ, McDonald IR, Cary SC (2012) Groundtruthing Next-Gen Sequencing for Microbial Ecology-Biases and Errors in Community Structure Estimates from PCR Amplicon Pyrosequencing. *PloS one* 7 (9)
- Lekunberri I, Lefort T, Romera-Castillo C, Cardelús C, Coll-Lladó M, Ruiz-González C, Marrasé C, Gasol JM (2012) Relationship between induced phytoplankton blooms and the structure and dynamics of the free-living heterotrophic bacterial community. *Marine Ecology Progress Series* 448:23-37. doi:10.3354/meps09480
- Lekunberri I, Lefort T, Romero E, Vázquez-Domínguez E, Romera-Castillo C, Marrasé C, Peters F, Weinbauer M, Gasol JM (2010) Effects of a dust deposition event on coastal marine microbial abundance and activity, bacterial community structure and ecosystem function. *Journal of Plankton Research* 32 (4):381-396
- Lennon JT, Jones SE (2011) Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. *Nat Rev Microbiol* 9 (2):119-130. doi:10.1038/nrmicro2504
- Lindholm T, Svartström M, Spoof L, Meriluoto J (2001) Effects of ship traffic on archipelago waters off the Långnäs harbour in Åland, SW Finland. *Hydrobiologia* 444:217-225
- Logue JB, Langenheder S, Andersson AF, Bertilsson S, Drakare S, Lanzen A, Lindstrom ES (2012) Freshwater bacterioplankton richness in oligotrophic lakes depends on nutrient availability rather than on species-area relationships. *The ISME journal* 6 (6):1127-1136. doi:10.1038/ismej.2011.184
- Loh PS, J. Miller AE, Reeves AD, Harvey SM, Overnell J (2008) Assessing the biodegradability of terrestrially-derived organic matter in Scottish sea loch sediments. *Hydrology and Earth System Sciences* 12 (3):811-823
- Lozupone C, Lladser ME, Knights D, Stombaugh J, Knight R (2011) UniFrac: An effective distance metric for microbial community comparison. *ISME Journal* 5 (2):169-172
- Ma Y, Xiong H, Tang S, Yang Q, Li M (2009) Comparison of the community structure of planktonic bacteria in ballast water from entry ships and local sea water in Xiamen Port. *Progress in Natural Science* 19 (8):946-953
- MacLean D, Jones JD, Studholme DJ (2009) Application of 'next-generation' sequencing technologies to microbial genetics. *Nature Reviews Microbiology* 7 (4):287-296
- Magoč T, Salzberg SL (2011) FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27 (21):2957-2963
- Magurran AE (2004) Measuring biological diversity.
- Martínez-García S, Fernández E, Calvo-Díaz A, Marañón E, Morán XAG, Teira E (2010) Response of heterotrophic and autotrophic microbial plankton to inorganic and organic inputs along a latitudinal transect in the Atlantic Ocean. *Biogeosciences Discussions* 7 (1):463-502
- Massana R, Murray AE, Preston CM, DeLong EF (1997) Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (1):50-56
- McCarren J, Becker JW, Repeta DJ, Shi Y, Young CR, Malmstrom RR, Chisholm SW, DeLong EF (2010) Microbial community transcriptomes reveal microbes and metabolic pathways associated with dissolved organic matter turnover in the sea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (38):16420-16427
- McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, Desantis TZ, Probst A, Andersen GL, Knight R, Hugenholtz P (2012) An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME Journal* 6 (3):610-618
- McGlathery KJ, Sundbäck K, Anderson IC (2007) Eutrophication in shallow coastal bays and lagoons: The role of plants in the coastal filter. *Marine Ecology Progress Series* 348:1-18

- Morris RM, Frazar CD, Carlson CA (2012) Basin-scale patterns in the abundance of SAR11 subclades, marine Actinobacteria (OM1), members of the Roseobacter clade and OCS116 in the South Atlantic. *Environmental microbiology* 14 (5):1133-1144. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02694.x
- Mullins TD, Britschgi TB, Krest RL, Giovannoni SJ (1995) Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities. *Limnology and Oceanography* 40 (1):148-158
- Nishimura Y, Kim C, Nagata T (2005) Vertical and Seasonal Variations of Bacterioplankton Subgroups with Different Nucleic Acid Contents: Possible Regulation by Phosphorus. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (10):5828-5836. doi:10.1128/aem.71.10.5828-5836.2005
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Wagner H (2013) *vegan: Community Ecology Package*.
- Olsen GJ, Lane DJ, Giovannoni SJ, Pace NR, Stahl DA (1986) Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual review of microbiology* 40:337-365
- On On L, Yong W, Jiangke Y, Feras FL, Abdulaziz A-S, Pei-Yuan Q (2010) Pyrosequencing reveals highly diverse and species-specific microbial communities in sponges from the Red Sea. *The ISME journal* 5 (4):650-664. doi:10.1038/ismej.2010.165
- Ottesen EA, Marin R, Preston CM, Young CR, Ryan JP, Scholin CA, Delong EF (2011) Metatranscriptomic analysis of autonomously collected and preserved marine bacterioplankton. *ISME Journal* 5 (12):1881-1895
- Pace NR (2006) Time for a change. *Nature* 441 (7091):289
- Pace NR, Stahl DA, Lane DJ, Olsen GJ (1986) The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. In: *Advances in microbial ecology*. Springer, pp 1-55
- Parkhill J (2013) What has high-throughput sequencing ever done for us? *Nat Rev Microbiol* 11 (10):664-665. doi:10.1038/nrmicro3112
- Pedler BE, Aluwihare LI, Azam F (2014) Single bacterial strain capable of significant contribution to carbon cycling in the surface ocean. *Proc Natl Acad Sci U S A*. doi:10.1073/pnas.1401887111
- Pedrós-Alió C (1993) Diversity of bacterioplankton. *Trends in Ecology and Evolution* 8 (3):86-90
- Pedrós-Alió C (2006) Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends in Microbiology* 14 (6):257-263
- Pernthaler A, Pernthaler J, Amann R (2002) Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (6):3094-3101
- Piccini C, Conde D, Alonso C, Sommaruga R, Pernthaler J (2006) Blooms of single bacterial species in a coastal lagoon of the southwestern Atlantic Ocean. *Appl Environ Microbiol* 72 (10):6560-6568
- Pinhassi J, Azam F, Hemphälä J, Long RA, Martinez J, Zweifel UL, Hagström Å (1999) Coupling between bacterioplankton species composition, population dynamics, and organic matter degradation. *Aquatic Microbial Ecology* 17 (1):13-26
- Pinhassi J, Sala MM, Havskum H, Peters F, Guadayol O, Malits A, Marrase C (2004) Changes in bacterioplankton composition under different phytoplankton regimens. *Appl Environ Microbiol* 70 (11):6753-6766. doi:10.1128/AEM.70.11.6753-6766.2004
- Pinto AJ, Raskin L (2012) PCR biases distort bacterial and archaeal community structure in pyrosequencing datasets. *PloS one* 7 (8)
- Pitta P, Stambler N, Tanaka T, Zohary T, Tselepidis A, Rassoulzadegan F (2005) Biological response to P addition in the Eastern Mediterranean Sea. The microbial race against time. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 52 (22-23):2961-2974. doi:10.1016/j.dsr2.2005.08.012



- Porter KG, Feig YS (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology & Oceanography* 25:943-948. doi:citeulike-article-id:377364
- Price MN, Dehal PS, Arkin AP (2009) Fasttree: Computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Molecular Biology and Evolution* 26 (7):1641-1650
- Quince C, Curtis TP, Sloan WT (2008) The rational exploration of microbial diversity. *The ISME journal* 2 (10):997-1006. doi:10.1038/ismej.2008.69
- Quince C, Lanzen A, Curtis TP, Davenport RJ, Hall N, Head IM, Read LF, Sloan WT (2009) Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nat Meth* 6 (9):639-641. doi:http://www.nature.com/nmeth/journal/v6/n9/supinfo/nmeth.1361\_S1.html
- Quince C, Lanzen A, Davenport RJ, Turnbaugh PJ (2011) Removing Noise From Pyrosequenced Amplicons. *BMC Bioinformatics* 12
- R Core Team (2012) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
- Rappe MS, Connon SA, Vergin KL, Giovannoni SJ (2002) Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* 418 (6898):630-633
- Reed CJ, Lewis H, Trejo E, Winston V, Evilia C (2013) Protein adaptations in archaeal extremophiles. *Archaea* 2013
- Rivkin RB, Anderson MR (1997) Inorganic nutrient limitation of oceanic bacterioplankton. *Limnology and Oceanography* 42 (4):730-740
- Roose-Amsaleg CL, Garnier-Sillam E, Harry M (2001) Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Applied Soil Ecology* 18 (1):47-60. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0929-1393(01)00149-4
- Rusch DB, Halpern AL, Sutton G, Heidelberg KB, Williamson S, Yooseph S, Wu D, Eisen JA, Hoffman JM, Remington K, Beeson K, Tran B, Smith H, Baden-Tillson H, Stewart C, Thorpe J, Freeman J, Andrews-Pfannkoch C, Venter JE, Li K, Kravitz S, Heidelberg JF, Utterback T, Rogers YH, Falcón LI, Souza V, Bonilla-Rosso G, Eguiarte LE, Karl DM, Sathyendranath S, Platt T, Bermingham E, Gallardo V, Tamayo-Castillo G, Ferrari MR, Strausberg RL, Nealson K, Friedman R, Frazier M, Venter JC (2007) The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: northwest Atlantic through eastern tropical Pacific. *PLoS biology* 5 (3)
- Rykiel Jr EJ (1985) Towards a definition of ecological disturbance. *Australian Journal of Ecology* 10 (3):361-365
- Rysgaard S, Glud RN, Sejr MK, Blicher ME, Stahl HJ (2008) Denitrification activity and oxygen dynamics in Arctic sea ice. *Polar Biology* 31 (5):527-537
- Sánchez O, Gasol JM, Massana R, Mas J, Pedrós-Alió C (2007) Comparison of different denaturing gradient gel electrophoresis primer sets for the study of marine bacterioplankton communities. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (18):5962-5967
- Scavia D, Justić D, Bierman Jr VJ (2004) Reducing hypoxia in the Gulf of Mexico: Advice from three models. *Estuaries* 27 (3):419-425
- Scavia D, Kelly ELA, Hagy JJD (2006) A simple model for forecasting the effects of nitrogen loads on Chesapeake Bay Hypoxia. *Estuaries and Coasts* 29 (4):674-684
- Sebastián M, Gasol JM (2013) Heterogeneity in the nutrient limitation of different bacterioplankton groups in the Eastern Mediterranean Sea. *ISME Journal* 7 (8):1665-1668
- Sebastian M, Pitta P, Gonzalez JM, Thingstad TF, Gasol JM (2012) Bacterioplankton groups involved in the uptake of phosphate and dissolved organic phosphorus in a mesocosm experiment with P-starved Mediterranean waters. *Environmental microbiology* 14 (9):2334-2347. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02772.x
- Shade A, Peter H, Allison SD, Baho DL, Berga M, Bürgmann H, Huber DH, Langenheder S, Lennon JT, Martiny JBH, Matulich KL, Schmidt TM, Handelsman J (2012) Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Frontiers in Microbiology* 3 (DEC)
- Shannon CE (2001) A mathematical theory of communication. *ACM SIGMOBILE Mobile Computing and Communications Review* 5 (1):3-55

- Sheppard SK, McCarthy ND, Falush D, Maiden MCJ (2008) Convergence of *Campylobacter* species: Implications for bacterial evolution. *Science* 320 (5873):237-239
- Simonato F, Gómez-Pereira PR, Fuchs BM, Amann R (2010) Bacterioplankton diversity and community composition in the Southern Lagoon of Venice. *Systematic and Applied Microbiology* 33 (3):128-138. doi:10.1016/j.syapm.2009.12.006
- Simpson EH (1949) Measurement of diversity. *Nature*
- Sipura J, Haukka K, Helminen H, Lagus A, Suomela J, Sivonen K (2005) Effect of nutrient enrichment on bacterioplankton biomass and community composition in mesocosms in the Archipelago Sea, northern Baltic. *Journal of Plankton Research* 27 (12):1261-1272
- Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Mark Welch D, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM, Herndl GJ (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (32):12115-12120. doi:10.1073/pnas.0605127103
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PAD, Kämpfer P, Maiden MCJ, Nesme X, Rosselló-Mora R, Swings J, Trüper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB (2002) Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52 (3):1043-1047
- Staley JT, Konopka A (1985) Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology* 39:321-346
- Sul WJ, Oliver TA, Ducklow HW, Amaral-Zettler LA, Sogin ML (2013) Marine bacteria exhibit a bipolar distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (6):2342-2347
- Suratman S, Jickells T, Weston K, Fernand L (2008) Seasonal variability of inorganic and organic nitrogen in the North Sea. *Hydrobiologia* 610 (1):83-98. doi:10.1007/s10750-008-9424-y
- Tada Y, Taniguchi A, Nagao I, Miki T, Uematsu M, Tsuda A, Hamasaki K (2011) Differing growth responses of major phylogenetic groups of marine bacteria to natural phytoplankton blooms in the western North Pacific Ocean. *Appl Environ Microbiol* 77 (12):4055-4065. doi:10.1128/AEM.02952-10
- Tada Y, Taniguchi A, Sato-Takabe Y, Hamasaki K (2012) Growth and succession patterns of major phylogenetic groups of marine bacteria during a mesocosm diatom bloom. *Journal of Oceanography* 68 (4):509-519
- Taketani RG, de Araújo FV, de Cannavan FS, Tsai SM, Rosado AS (2010) Influence of the bacterioplankton community of a tropical eutrophic lagoon on the bacterial community of its neighbouring ocean. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26 (10):1865-1873
- Teira E, Martinez-Garcia S, Carreira C, Moran XAG (2011) Changes in bacterioplankton and phytoplankton community composition in response to nutrient additions in coastal waters off the NW Iberian Peninsula. *Marine Ecology Progress Series* 426:87-104
- Teira E, Martinez-Garcia S, Lonborg C, Alvarez-Salgado XA (2009) Growth rates of different phylogenetic bacterioplankton groups in a coastal upwelling system. *Environmental microbiology reports* 1 (6):545-554. doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00079.x
- Teramoto M, Queck SY, Ohnishi K (2013) Specialized Hydrocarbonoclastic Bacteria Prevailing in Seawater around a Port in the Strait of Malacca. *PLoS one* 8 (6)
- Thingstad TF, Krom MD, Mantoura RFC, Flaten GAF, Groom S, Herut B, Kress N, Law CS, Pasternak A, Pitta P, Psarra S, Rassoulzadegan F, Tanaka T, Tselepides A, Wassmann P, Woodward EMS, Riser CW, Zodiatis G, Zohary T (2005) Nature of phosphorus limitation in the ultraoligotrophic eastern Mediterranean. *Science* 309 (5737):1068-1071. doi:10.1126/Science.1112632
- Tilman D, Knops J, Wedin D, Reich P, Ritchie M, Siemann E (1997) The influence of functional diversity and composition on ecosystem processes. *Science* 277 (5330):1300-1302
- Tilman D, Reich PB, Knops JMH (2006) Biodiversity and ecosystem stability in a decade-long grassland experiment. *Nature* 441 (7093):629-632

- Tsagaraki TM, Pitta P, Frangoulis C, Petihakis G, Karakassis I (2013) Plankton response to nutrient enrichment is maximized at intermediate distances from fish farms. *Marine Ecology Progress Series* 493:31-42
- Tzahor S, Man-Aharonovich D, Kirkup BC, Yogev T, Berman-Frank I, Polz MF, Béjà O, Mandel-Gutfreund Y (2009) A supervised learning approach for taxonomic classification of core-photosystem-II genes and transcripts in the marine environment. *BMC Genomics* 10
- Valdemarsen T, Kristensen E, Holmer M (2009) Metabolic threshold and sulfide-buffering in diffusion controlled marine sediments impacted by continuous organic enrichment. *Biogeochemistry* 95 (2):335-353
- Valdemarsen T, Kristensen E, Holmer M (2010) Sulfur, carbon, and nitrogen cycling in faunated marine sediments impacted by repeated organic enrichment. *Marine Ecology Progress Series* 400:37-53
- Valette-Silver NJ (1993) The use of sediment cores to reconstruct historical trends in contamination of estuarine and coastal sediments. *Estuaries* 16 (3):577-588
- van Dorst J, Bissett A, Palmer AS, Brown M, Snape I, Stark JS, Raymond B, McKinlay J, Ji M, Winsley T, Ferrari BC (2014) Community fingerprinting in a sequencing world. *FEMS microbiology ecology*. doi:10.1111/1574-6941.12308
- Van Elsas JD, Chiurazzi M, Mallon CA, Elhottova D, Krištůfek V, Salles JF (2012) Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (4):1159-1164
- Van Wambeke F, Christaki U, Giannakourou A, Moutin T, Souvemerzoglou K (2002) Longitudinal and vertical trends of bacterial limitation by phosphorus and carbon in the Mediterranean Sea. *Microb Ecol* 43 (1):119-133. doi:10.1007/s00248-001-0038-4
- Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers YH, Smith HO (2004) Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304 (5667):66-74
- Vezzulli L, Chelossi E, Riccardi G, Fabiano M (2002) Bacterial community structure and activity in fish farm sediments of the Ligurian Sea (Western Mediterranean). *Aquaculture International* 10 (2):123-141
- Wambeke FV, Ghiglione JF, Nedoma J, Mevel G, Raimbault P (2009) Bottom up effects on bacterioplankton growth and composition during summer-autumn transition in the open NW Mediterranean Sea. *Biogeosciences* 6 (4):705-720
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (16):5261-5267
- Wayne LG (1988) International Committee on Systematic Bacteriology: announcement of the report of the ad hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene - Abt 1 Orig A* 268 (4):433-434
- Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (12):6578-6583
- Whittaker RH (1960) Vegetation of the Siskiyou mountains, Oregon and California. *Ecological monographs* 30 (3):279-338
- Wildish D, Akagi H, Hamilton N, Hargrave B (1999) A recommended method for monitoring sediments to detect organic enrichment from mariculture in the Bay of Fundy. Canadian technical report of fisheries and aquatic sciences/Rapport technique canadien des sciences halieutiques et aquatiques Imprint varies 2286:34
- Williams TJ, Wilkins D, Long E, Evans F, DeMaere MZ, Raftery MJ, Cavicchioli R (2013) The role of planktonic Flavobacteria in processing algal organic matter in coastal East Antarctica revealed using metagenomics and metaproteomics. *Environmental microbiology* 15 (5):1302-1317. doi:10.1111/1462-2920.12017

- Wittebolle L, Marzorati M, Clement L, Balloi A, Daffonchio D, Heylen K, De Vos P, Verstraete W, Boon N (2009) Initial community evenness favours functionality under selective stress. *Nature* 458 (7238):623-626
- Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* 51 (2):221-271
- Xia W, Wang J, Tan L, Wang Q (2011) Variation of bacteria biomass and its possible controlling factors in the East China Sea. *Journal of Ocean University of China* 10 (2):135-141. doi:10.1007/s11802-011-1732-6
- Yachi S, Loreau M (1999) Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: The insurance hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (4):1463-1468
- Yao D, Buchan A, Suzuki MT (2011) In situ activity of NAC11-7 roseobacters in coastal waters off the Chesapeake Bay based on *ftsZ* expression. *Environmental microbiology* 13 (4):1032-1041. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02408.x
- Zhang R, Liu B, Lau SC, Ki JS, Qian PY (2007) Particle-attached and free-living bacterial communities in a contrasting marine environment: Victoria Harbor, Hong Kong. *FEMS microbiology ecology* 61 (3):496-508. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00353.x
- Zhu D, Tanabe SH, Yang C, Zhang W, Sun J (2013) Bacterial Community Composition of South China Sea Sediments through Pyrosequencing-Based Analysis of 16S rRNA Genes. *PloS one* 8 (10)
- Zimmermann R, Meyer-Reil L (1974) A new method for fluorescence staining of bacterial populations on membrane filters. *Kiel Meeresforsch* 30 (1):24-27
- Zinger L, Amaral-Zettler LA, Fuhrman JA, Horner-Devine MC, Huse SM, Welch DB, Martiny JB, Sogin M, Boetius A, Ramette A (2011) Global patterns of bacterial beta-diversity in seafloor and seawater ecosystems. *PloS one* 6 (9):e24570. doi:10.1371/journal.pone.0024570
- Zinger L, Boetius A, Ramette A (2014) Bacterial taxa-area and distance-decay relationships in marine environments. *Molecular ecology* 23 (4):954-964. doi:10.1111/mec.12640
- ZoBell CE (1946) Studies on redox potential of marine sediments. *AAPG Bulletin* 30 (4):477-513
- Zohary T, Herut B, Krom MD, Fauzi C, Mantoura R, Pitta P, Psarra S, Rassoulzadegan F, Stambler N, Tanaka T, Frede Thingstad T, Malcolm S, Woodward E (2005) P-limited bacteria but N and P co-limited phytoplankton in the Eastern Mediterranean—a microcosm experiment. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 52 (22–23):3011-3023. doi:10.1016/j.dsr2.2005.08.011
- Zohary T, Robarts RD (1998) Experimental study of microbial P limitation in the eastern Mediterranean. *Limnology and Oceanography* 43 (3):387-395