



Εποχιακή Κατανομή των Ιών στην Επι-, Μεσο- και Βαθυπελαγική Ζώνη της Ανατολικής Μεσογείου

Ιορδάνης Μαγιόπουλος

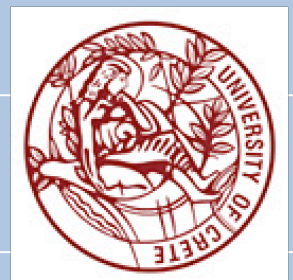
Επιβλέπουσα Ερευνήτρια: Δρ. Παρασκευή Πήττα

Επιβλέπων Καθηγητής: Αναπλ. Καθ. Ιωάννης Καρακάσης



Ινστιτούτο Ωκεανογραφίας

Ηράκλειο
Ιανουάριος 2010



Τμήμα Βιολογίας

MSc Thesis

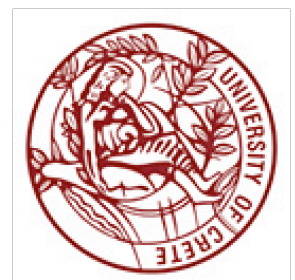
Seasonal Distribution of Marine Viruses in the Epi-, Meso- and Bathypelagic Zone of the Eastern Mediterranean Sea

Magiopoulos Iordanis

Supervisors: Dr. Paraskevi Pitta
As. Prof. Ioannis Karakassis



Ινστιτούτο Ωκεανογραφίας
Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών



Τμήμα Βιολογίας
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Εξεταστική Επιτροπή:

Ιωάννης Καρακάσης, Αναπληρωτής Καθηγητής

Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Παρασκευή Πήττα, Ερευνήτρια Γ΄

Ινστιτούτο Ωκεανογραφίας, Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών

Ευάγγελος Παπαθανασίου, Διευθυντής Ερευνών

Ινστιτούτο Ωκεανογραφίας, Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών

Ευχαριστίες

Στο τέλος αυτής της όμορφης και δύσκολης περιόδου θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν με τον ένα ή τον άλλο τρόπο.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το πρόγραμμα SESAME για την υποτροφία και τη δυνατότητα που μου έδωσε να συμμετάσχω σε κάποιες από τις δειγματοληψίες καθώς και για τα δείγματα της παρούσας εργασίας.

Μια μεγάλη ευγνωμοσύνη χρωστάω στους Dr. Gerald Gregori και Prof. Michel Denis από το LMGEM – CNRS, για τις πρώτες γνώσεις που μου προσέφεραν στην κυτταρομετρία ροής, τον Prof Markus Weinbauer από το LOV – CNRS που με δέχθηκε στο εργαστήριό του για λίγες μέρες προκειμένου να μάθω στην πράξη να χρησιμοποιώ τον κυτταρομετρητή μας, την Raffaella Cattaneo για την βοήθειά της όσο ήμουν στην Villefranche και φυσικά την «σούπερ τεχνικό» Marie – Emmanuelle Kerros για την σχολαστικότητά της και τις συμβουλές που με βοήθησαν αφάνταστα στο ξεκίνημα. Φυσικά δεν γίνεται να μην ευχαριστήσω την Δρ. Αντωνία Γιαννακούρου από το ΕΛΚΕΘΕ της Αθήνας καθώς και την δικιά μας «σούπερ τεχνικό» Αγγελική Κωνσταντινοπούλου που με την αμέριστη βοήθειά της, τις απίθανες πατέντες της αλλά και τους εξαιρετικούς φραπέδες της επιβίωσα στην πρώτη μου δειγματοληψία.

Εννοείται ότι δεν γίνεται να μην ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ιωάννη Καρακάση μιας και σε δικά του μαθήματα ήρθα πρώτη φορά σε επαφή με τον κόσμο της θαλάσσιας βιολογίας και με «έπεισε» να αλλάξω εντελώς κατεύθυνση. Αλλά και επειδή με σύστησε στο ΕΛΚΕΘΕ και τη Βιβή, η οποία με έβαλε στον κόσμο της μικροβιακής οικολογίας, η οποία άντεξε τις παραξενιές μου, τα ελληνικά και τ' αγγλικά μου, έδειξε κατανόηση στα άπειρα deadlines που ποτέ δεν τήρησα, ήταν πάντα διαθέσιμη για να της μιλήσω και να με συμβουλέψει για ό,τι και αν ρώταγα, φρόντιζε πάντα να βελτιώνομαι, και μου έδωσε τη δυνατότητα να συμμετασχω σε μεγάλα προγράμματα μαζεύοντας γνώσεις και εμπειρίες. Την οποία και να την ευχαριστήσω μάλλον λίγο είναι.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω την Δήμητρα, που στάθηκε δίπλα μου όλον αυτό το καιρό, που με υπομονή και αγάπη με βοήθησε παρά και τον δικό της περιορισμένο χρόνο.

Τέλος δεν μπορώ να μην ευχαριστήσω τον πατέρα και την μητέρα μου για την συνεχή οικονομική στήριξη, την κατανόησή τους και τις συμβουλές τους. Χωρίς αυτούς δεν θα μπορούσα να κάνω τίποτα από όλα αυτά. Ελπίζω να μπορέσω να τους το ανταποδώσω.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
Abstract.....	5
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή.....	6
Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι.....	10
• 2.1 Περιοχή μελέτης και δειγματοληψία.....	10
• 2.2 Ανάλυση των δειγμάτων των ιών και των προκαρυωτικών οργανισμών.....	13
• 2.3 Στατιστική Ανάλυση.....	14
Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα.....	15
• 3.1 Υδρολογικές μεταβλητές.....	15
• 3.2 Αφθονία ιών: βαθυμετρικές κατανομές στο χώρο και τον χρόνο.....	16
• 3.3 Αφθονία προκαρυωτών: βαθυμετρικές κατανομές στο χώρο και τον χρόνο.....	19
• 3.4 Η Αναλογία Ιών – Προκαρυωτικών κυττάρων.....	20
• 3.5 Οι ομάδες των ιών.....	21
Κεφάλαιο 4: Συζήτηση.....	23
• 4.1 Η αφθονία των ιών.....	23
• 4.2 Βαθυμετρική κατανομή των ιών.....	25
• 4.3 Χωρική κατανομή των ιών.....	27
• 4.4 Εποχιακή μεταβολή των ιών.....	29
• 4.5 Οι ομάδες φθορισμού των ιών.....	32
Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα.....	33
Βιβλιογραφία.....	34
Παράρτημα I: Ο Κυτταρομετρητής Ροής.....	40
Παράρτημα II: Ανάλυση Δειγμάτων με Κυτταρομετρητή Ροής.....	43
Παράρτημα III: Ομάδες Βακτηρίων και Ιών.....	48

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι θαλάσσιοι ιοί στο Ιόνιο, Λιβυκό και Αιγαίο Πέλαγος, από την επιφάνεια μέχρι τα 4000m, την εποχή της ανάμειξης και της στρωμάτωσης της στήλης του νερού με τη χρήση κυτταρομετρητή ροής. Η αφθονία τους ήταν μέσα στα όρια των ολιγοτροφικών συστημάτων και παρουσίασε αύξηση από το Μάρτιο στο Σεπτέμβριο. Παράλληλα σχετίστηκε θετικά με την αφθονία των προκαρυωτικών οργανισμών, καθώς και με το μέγεθός τους. Οι σταθμοί της ανοικτής θάλασσας έδειξαν παρόμοια πρότυπα αφθονίας και βαθυμετρικής κατανομής σε αντίθεση με το Βόρειο Αιγαίο στο οποίο οι εισροές των νερών της Μαύρης Θάλασσας οδήγησαν σε αυξημένη αφθονία ιών. Ο λόγος των ιών προς τους προκαρυωτικούς οργανισμούς μειώθηκε από την επιπελαγική ζώνη στη βαθυπελαγική το Μάρτιο ενώ το αντίθετο συνέβη το Σεπτέμβριο λόγω της έντονης αύξησης των ιών στη μεσο- και βαθυπελαγική ζώνη. Επιπλέον το Σεπτέμβριο αυξήθηκαν οι ιοί με μέση και υψηλή ένταση φθορισμού.

Abstract

In this paper marine viruses were studied from the Ionian, Libyan and Aegean Sea and from the entire water column (2 to 4000m) during the mixing and stratification periods. All measurements were conducted using Flow Cytometer. Viral abundance fell within the limits of an oligotrophic system and there was an increase of it during September compared to March. Viral abundance was positively correlated with prokaryotic abundance and size. Open Sea stations showed similar patterns in terms of viral abundance, while the North Aegean Sea stations presented different patterns and increased viral abundance due to Black Sea Water inflows. Virus to Prokaryotic Ratio decreased from the epipelagic to the bathypelagic depth zone during March whereas the opposite pattern appeared during September because of the increase of viral abundance in the meso- and bathypelagic zones. During September the contribution of Medium and High Fluorescence Viruses increased compared to March.

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

Οι ιοί είναι οι πιο άφθονες βιολογικές οντότητες στους ωκεανούς με έναν κατ' εκτίμηση συνολικό πληθυσμό της τάξης των 10^{30} ιών (Wilhelm and Suttle 1999) και μέση αφθονία στα ανοικτά θαλάσσια συστήματα μεταξύ 10^4 και 10^7 ιών ml^{-1} (Weinbauer 2004), υπερβαίνοντας την αφθονία των βακτηρίων κατά μία ή δύο τάξεις μεγέθους. Η εξαιρετικά υψηλή αφθονία τους τους κάνει ένα σημαντικό και καθοριστικό συστατικό όλων των υδρόβιων οικοσυστημάτων καθώς αφαιρούν περίπου το 20% ως 40% της προκαρυωτικής σταθμεύουσας συγκομιδής κάθε ημέρα (Suttle 1994). Αυτή η «θανάσιμη δύναμη» ασκεί σημαντική επίδραση στην ανακύκλωση των θρεπτικών μέσω του μικροβιακού βρόχου (microbial loop) όπως και στη σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας μέσω του μηχανισμού «killing the winner» (εξολόθρευσης του επικρατούς) όπως προτάθηκε από τους Thingstad και Lignell (1997), μέσω δηλαδή του ελέγχου της αφθονίας των πιο ανταγωνιστικών ειδών, καθώς και με την αλλαγή της γενετικής ποικιλομορφίας των ξενιστών τους (Fuhrman 1999, Wilhelm and Suttle 1999, Weinbauer 2004, Weinbauer and Rassoulzadegan 2004, Suttle 2007). Αν και ο αριθμός μελετών σχετικά με την οικολογία των ιών και τον ρόλο τους στα θαλάσσια οικοσυστήματα έχει αυξηθεί αισθητά κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας υπάρχουν ακόμα πολλά ανοικτά ερωτήματα (Brussaard et al 2008).

Γενικά, η Μεσόγειος χαρακτηρίζεται ως ολιγοτροφική θάλασσα, με μείωση της συγκέντρωσης των θρεπτικών (Krom et al 1991) και της πρωτογενούς παραγωγικότητας (Turley et al 2000) από το Δυτικό στο Ανατολικό άκρο της. Ο ολιγοτροφικός χαρακτήρας της Μεσογείου οφείλεται στην ανταλλαγή θαλασσίων μαζών στο στενό του Γιβραλτάρ, δηλαδή την είσοδο επιφανειακού νερού φτωχού σε θρεπτικά και την έξοδο υποεπιφανειακού νερού με μεγαλύτερη πυκνότητα και μεγαλύτερες συγκεντρώσεις θρεπτικών. Ειδικά στην Ανατολική Μεσόγειο, φαίνεται ότι η πρωτογενής παραγωγικότητα είναι περιορισμένη ακόμα και κατά την περίοδο της ανάμειξης (mixing period) (Krom et al 2003). Για τον λόγο αυτό η Ανατολική

Μεσόγειος έχει χαρακτηριστεί ως «θαλάσσια έρημος» ως προς το επίπεδο βιομάζας και παραγωγικότητας του φυτοπλαγκτού (Azon 1991). Όσον αφορά την κοινότητα των πρωτογενών παραγωγών, κυριαρχούν σε αυτήν οι πύκο- και νανοπλαγκτονικοί οργανισμοί (Li et al 1993, Zohary and Robarts 1998, Psarra et al 2000, Vidussi et al 2001).

Το Αιγαίο Πέλαγος, ως μέρος της ανατολικής λεκάνης της Μεσογείου, μοιράζεται τις ιδιότητές της, όπως η υψηλή διαφάνεια, οι χαμηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών και η χαμηλή παραγωγικότητα (Azon 1986, Yacobi et al 1995) και λόγω αυτών μπορεί να χαρακτηριστεί ως μία ακραία ολιγοτροφική θάλασσα. Επιπλέον υπάρχει μία πρόσθετη διαβάθμιση στην παραγωγικότητα μεταξύ του Βόρειου και Νότιου τμήματός του. Το Κρητικό Πέλαγος στο νότο επηρεάζεται από τα νερά της Λεβαντίνης (Souvermezoglou 1989, Theocharis et al 1993), και έχει χαρακτηριστεί ως μία από τις πιο ολιγοτροφικές περιοχές της Ανατολικής Μεσογείου, από την άποψη της παραγωγικότητας (Ignatiades 1998). Αντίθετα με το Νότιο, το Βόρειο Αιγαίο θεωρείται παραγωγικότερο και με μεγαλύτερη πλαγκτονική αφθονία και βιομάζα αλλά ακόμα μέσα στα ολιγοτροφικά όρια (Ignatiades et al 2002, Siokou-Fragou et al 2002). Αυτό οφείλεται στα πλούσια σε διαλυμένο οργανικό άνθρακα (Dissolved Organic Carbon, DOC) νερά της Μαύρης Θάλασσας που εισρέουν στο Βόρειο Αιγαίο Πέλαγος, έναντι της εισροής των ολιγοτροφικών νερών της Λεβαντίνης στο Νότιο Αιγαίο Πέλαγος (Sempere et al 2002, Siokou-Fragou et al 2002). Επιπλέον χωρική και χρονική μεταβλητότητα εμφανίζεται στην περιοχή του Βορείου Αιγαίου όσον αφορά την αφθονία και βιομάζα του μεσοζωοπλαγκτού, με αυξημένες τιμές στα επιφανειακά νερά κοντά στα στενά των Δαρδανελλίων σε σχέση με το υπόλοιπο Βόρειο Αιγαίο (Siokou-Fragou et al 2009).

Η αφθονία και η κατανομή των ιών στη στήλη του νερού έχουν μελετηθεί σε διαφορετικά θαλάσσια οικοσυστήματα καθώς και οικοσυστήματα εσωτερικών υδάτων, όπως οι λίμνες (Auguet et al 2005, Colombet et al 2006, Personnic et al 2009), στα θαλάσσια ιζήματα (Danovaro and Serresi 2000, Danovaro et al 2002), σε υδροθερμικές πηγές (Ortmann and Suttle 2005) και σε πελαγικά οικοσυστήματα

(Cochlan et al 1993, Culley and Welschmeyer 2002, Hwang and Cho 2002). Οι περισσότερες από τις δημοσιεύσεις σχετικά με την οικολογία των θαλασσιών ιών στα πελαγικά οικοσυστήματα αφορούν είτε τα παράκτια περιβάλλοντα είτε επικεντρώνονται στην επι- (μέχρι τα 200m βάθος) και μεσοπελαγική (έως τα 1000m) ζώνη των ανοικτών θαλασσών και μόνο λίγες αφορούν την μελέτη της αφθονίας των ιών σε βάθη μεγαλύτερα από τα 1000m (Hara et al 1996, Parada et al 2007). Έχει παρατηρηθεί από όλες τις εργασίες μέχρι σήμερα ότι η αφθονία των ιών μειώνεται γρήγορα κάτω από 200m, αλλά οι ακριβείς λόγοι για αυτό παραμένουν άγνωστοι (Weinbauer 2004).

Όσον αφορά τη Μεσόγειο Θάλασσα, οι περισσότερες δημοσιεύσεις προέρχονται από δειγματοληψίες σε παράκτιες περιοχές ή μόνο σε επιφανειακά νερά ή ακόμα πρόκειται για μικρής κλίμακας τοπικές μελέτες (Weinbauer et al 1995, Guixa - Boixereu et al 1999, Alonso et al 2000, Storar et al 2004). Μόνο δύο μελέτες αφορούν τους ιούς στα βαθυπελαγικά νερά της Αδριατικής Θάλασσας (Corinaldesi et al 2003) και τη Δυτική – Κεντρική Μεσόγειο (Magagnini et al 2007). Από όσο γνωρίζουμε δεν υπάρχει καμία μελέτη μέχρι σήμερα, που να εξετάζει το ρόλο των ιών σε ολόκληρη την υδάτινη στήλη στην περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου, η οποία είναι μία από τις πιο ολιγοτροφικές περιοχές στον κόσμο.

Δεδομένου ότι η πρωτογενής παραγωγή και η μικροβιακή βιομάζα στις ολιγοτροφικές περιοχές προέρχονται κυρίως από τα κυανοβακτήρια και τα ετερότροφα βακτήρια αντιστοίχως και παράλληλα οι ιοί θανατώνουν σε καθημερινή βάση περίπου το 10 – 40% της σταθμεύουσας συγκομιδής (standing stock) των βακτηρίων στα θαλάσσια οικοσυστήματα (Suttle 1994, 2005) η επίδραση από τους ιούς σε αυτά τα οικοσυστήματα αναμένεται να είναι τουλάχιστον ίση με την επίδραση των θηρευτών.

Η παρούσα εργασία έγινε στα πλαίσια του προγράμματος SESAME (Southern European Seas: Assessing and Modelling Ecosystem changes) που χρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση και σαν σκοπό έχει τον προσδιορισμό και πρόβλεψη των

αλλαγών στα θαλάσσια οικοσυστήματα της Μεσογείου και της Μαύρης Θάλασσας καθώς και τις αλλαγές στην ποιότητα των οικοσυστημάτων αυτών από την άποψη των πόρων (αλιευτική παραγωγή, τουρισμός κτλ). Πιο συγκεκριμένα η εργασία αυτή αφορά τη μελέτη της αφθονίας και κατανομής των θαλασσίων ιών καθώς και των κυττάρων ξενιστών στην περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου κατά τη διάρκεια δύο χρονικών περιόδων, την περίοδο της ανάμειξης και την περίοδο της στρωμάτωσης των νερών. Οι περιοχές μελέτης είναι το Νότιο Ιόνιο Πέλαγος, και το Λιβυκό Πέλαγος που αντιπροσωπεύουν τις ανοικτές ολιγοτροφικές θάλασσες της Ανατολικής Μεσογείου, καθώς και το Νότιο και Βόρειο Αιγαίο Πέλαγος, ένα σχετικά μικρό αλλά αρκετά ποικίλο θαλάσσιο σύστημα με διαβάθμιση παραγωγικότητας. Τα δείγματα ελήφθησαν από ολόκληρη την υδάτινη στήλη, με σκοπό να μελετηθούν οι διαδικασίες και οι παράγοντες που επηρεάζουν την αφθονία και κατανομή των ιών στα επιφανειακά καθώς και στα βαθιά νερά.

Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μεθόδοι

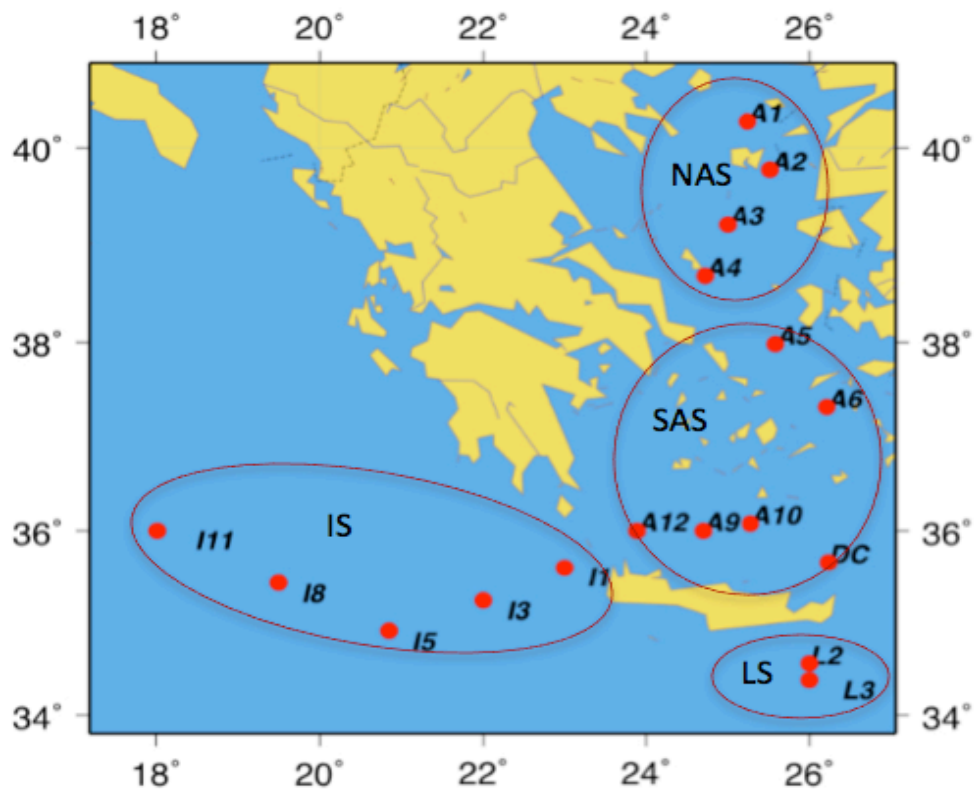
2.1 Περιοχή μελέτης και δειγματοληψία

Τα δείγματα συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια δύο δειγματοληπτικών αποστολών, στα πλαίσια του προγράμματος SESAME, με το ερευνητικό σκάφος “Αιγαίο” του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. (R/V Aegeao). Η πρώτη αποστολή πραγματοποιήθηκε από 22 Μαρτίου έως 4 Απριλίου 2008 (από εδώ και πέρα θα αναφέρεται ως Μάρτιος ή S1), κατά τη διάρκεια της περιόδου ανάμειξης των θαλασσιών μαζών, ενώ η δεύτερη αποστολή ήταν μεταξύ 28 Αυγούστου και 8 Σεπτεμβρίου 2008 (θα αναφέρεται ως Σεπτέμβριος ή S2), κατά τη διάρκεια της περιόδου στρωμάτωσης. Και στις δύο αποστολές δείγματα συλλέχθηκαν από 13 κύριους σταθμούς δειγματοληψίας, ενώ 4 πρόσθετοι σταθμοί επιλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της αποστολής του Σεπτεμβρίου. Οι 17 σταθμοί ομαδοποιήθηκαν σε 4 περιοχές, το Ιόνιο, το Λιβυκό, το Νότιο Αιγαίο και το Βόρειο Αιγαίο Πέλαγος (Πίνακας 1 και Σχήμα 1), σύμφωνα με τα ιδιαίτερα γεωγραφικά και περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά της κάθε περιοχής. Η περιοχή δειγματοληψίας εκτεινόταν από 34.38 °N ως 40.27 °N και από 18.00 °E ως 26.23 °E με τη συνολική απόσταση μεταξύ του βορειότερου και του νοτιότερου σταθμού να υπερβαίνει τα 660 χλμ.

Πίνακας 1. Το σύνολο των σταθμών των δύο αποστολών δειγματοληψίας, χωρισμένο σε 4 περιοχές. Οι σταθμοί που έχουν το χαρακτηριστικό S2 συλλέχθηκαν μόνο κατά τη διάρκεια της δεύτερης αποστολής. Το μέγιστο βάθος αντιστοιχεί στο βάθος του βαθύτερου δείγματος

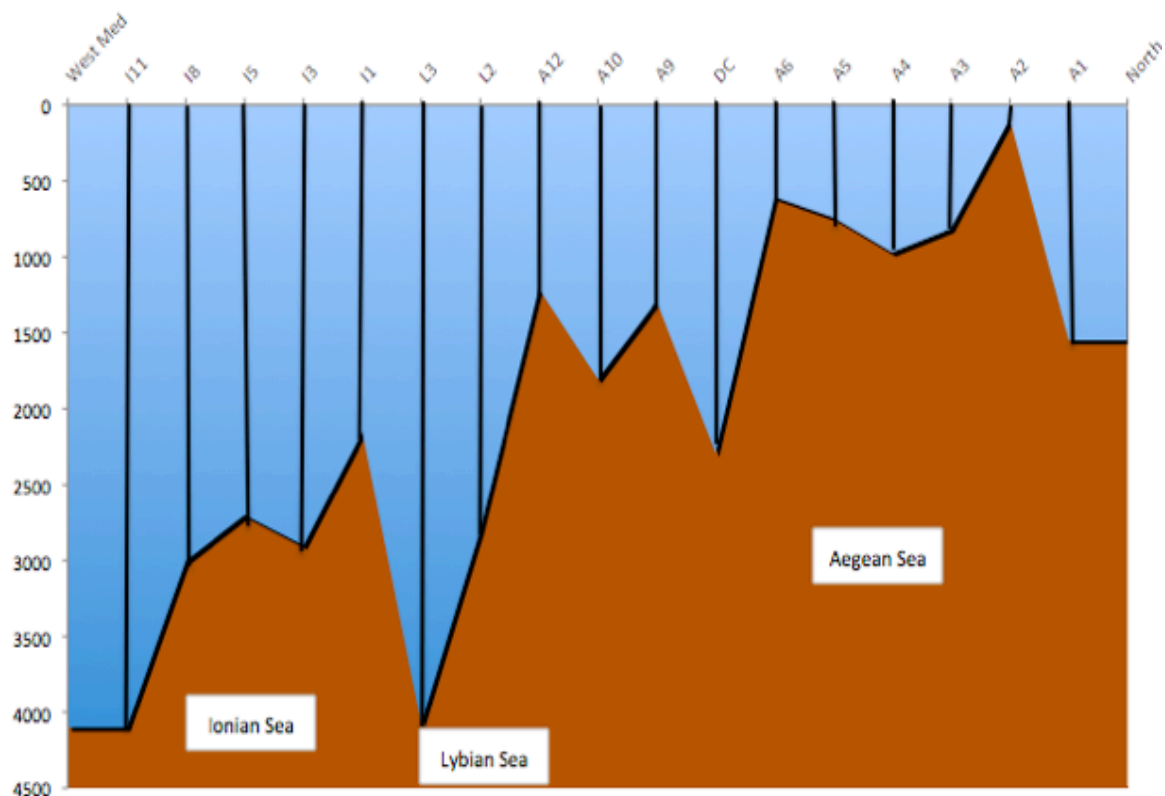
Area	Station	Lon °E	Lat °N	Max Depth (m)
North Aegean	A1	25.24	40.27	1550
North Aegean	A2	25.52	39.78	90
North Aegean	A3	25.00	39.22	815
North Aegean	A4 (S2)	24.72	38.69	970

South Aegean	A5	25.58	37.98	742
South Aegean	A6 (S2)	26.21	37.32	606
South Aegean	DC (S2)	26.23	35.66	2290
South Aegean	A9	24.70	36.00	1290
South Aegean	A10	25.28	36.08	1805
South Aegean	A12 (S2)	23.89	36.00	1210
Libyan	L2	26.00	34.56	2800
Libyan	L3	26.00	34.38	4075
Ionian	I1	23.00	35.60	2150
Ionian	I3	22.00	35.25	2900
Ionian	I5	20.85	34.92	2700
Ionian	I8	19.50	35.44	3000
Ionian	I11	18.01	36.00	4100



Σχήμα 1. Ο χάρτης των σταθμών. Με NAS είναι το Βόρειο Αιγαίο Πέλαγος, με SAS είναι το Νότιο Αιγαίο, με LS το Λιβυκό Πέλαγος και με IS το Ιόνιο Πέλαγος

Τα βάθη δειγματοληψίας κάλυπταν ολόκληρη την υδάτινη στήλη, από την επιφάνεια έως τα 4000m, όπου αυτό ήταν εφικτό. Υπήρξαν 13 προεπιλεγμένα βάθη δειγματοληψίας, 7 στη επιπελαγική ζώνη (2, 10, 20, 50, 75, 100, 150m), 3 στη μεσοπελαγική ζώνη (200, 300, 500m) και 3 στη βαθυπελαγική ζώνη (1000, 2000 και 4000m). Σε περίπτωση που το βάθος σε κάποιο σταθμό ήταν μικρότερο από τα 4000m το τελευταίο βάθος δειγματοληψίας ήταν λίγα μέτρα ψηλότερα από τον πυθμένα. Στους περισσότερους από τους σταθμούς του Ιόνιου, Λιβυκού και Νοτίου Αιγαίου Πελάγους, δείγματα συλλέχθηκαν και από τη βαθυπελαγική ζώνη ενώ από το Βόρειο Αιγαίο πέλαγος υπήρξε μόνο ένας σταθμός με βάθος κάτω από 1000m (Σχήμα 2). Η δειγματοληψία του νερού έγινε χρησιμοποιώντας ένα πολυδειγματολήπτη (ροζέτα) στο οποίο ήταν αναρτημένες 24 φιάλες Niskin των 10 λίτρων καθώς και ένα CTD (Sea Bird Electronics, SBE 911plus).



Σχήμα 2. Σχηματική παρουσίαση των μέγιστων βαθών σε κάθε σταθμό

2.2 Ανάλυση των δειγμάτων των ιών και των προκαρυωτικών οργανισμών

Η ανάλυση των δειγμάτων των ιών και των προκαρυωτικών οργανισμών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας έναν κυτταρομετρητή ροής (flow cytometer) BD FACSCalibur (Becton Dickinson). Αναλυτική παρουσίαση της αρχής λειτουργίας του κυτταρομετρητή ροής υπάρχει στο Παράρτημα Ι.

Για την ανάλυση των δειγμάτων των ιών ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της Brussaard (2004) με μερικές τροποποιήσεις. Συνοπτικά αναφέρουμε ότι τα δείγματα συντηρήθηκαν με γλουταραλδεΐδη 25% φιλτραρισμένη στα 0.2 μm και με τελική συγκέντρωση 0.5% κατ' όγκο. Ακολούθως τα δείγματα παρέμειναν για 15-30 λεπτά στο σκοτάδι και στους 4°C ενώ στη συνέχεια πάγωσαν απότομα σε υγρό άζωτο (-196°C) και αποθηκεύτηκαν σε βαθειά κατάψυξη (-80°C) μέχρι την ανάλυσή τους. Αμέσως πριν την ανάλυση, τα δείγματα ξεπάγωσαν σε θερμοκρασία δωματίου, αραιώθηκαν με χρήση αποστειρωμένου buffer tris-EDTA (TE, 10mM Tris και 0.5mM EDTA, pH=8) προκειμένου να επιτευχθεί ένας ρυθμός ροής μεταξύ 100 και 700 γεγονότων ανά δευτερόλεπτο. Η σήμανση του γενετικού υλικού των ιών έγινε με χρήση SYBRGreen I (Molecular Probes) αραιωμένο στα 5×10^{-5} της εμπορικής αραιώσης στο δείγμα και ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά στους 80°C. Όμοια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την ανάλυση των δειγμάτων των ετερότροφων βακτηρίων με ορισμένες τροποποιήσεις. Σφαιρικά σωματίδια διαμέτρου 1 μm (YG Beads – Polysciencies) χρησιμοποιήθηκαν ως calibration standard. Η ανάλυση των δεδομένων του κυτταρομετρητή έγινε με τη χρήση των εξειδικευμένων πακέτων λογισμικού της Becton Dickinson, Cell Quest και Paint-A-Gate. Αναλυτικά το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε καθώς και οι τροποποιήσεις που έγιναν παρουσιάζονται στο Παράρτημα ΙΙ.

Οι συνολικοί προκαρυωτικοί οργανισμοί υπολογίστηκαν από άθροισμα του πληθυσμού των ετερότροφων βακτηρίων, καθώς και των πληθυσμών των *Synechococcus* και *Prochlorococcus*.

Σε όλα τα δείγματα των ιών διακρίθηκαν 2 έως 3 ομάδες, όπως έχει ήδη αναφερθεί (Brussaard 2004, Payet and Suttle, 2008, Winter et al 2009). Εντούτοις οι ομάδες αυτές δεν ήταν παρόμοιες ούτε όσον αφορά την ένταση φθορισμού ούτε σε αριθμό μεταξύ των διαφορετικών περιοχών και των ζωνών βάθους. Για την καλύτερη σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων, οι ιοί ομαδοποιήθηκαν σε 3 ομάδες σταθερού φθορισμού, τους ιούς με χαμηλό, μέσο και υψηλό φθορισμό (LFV, MFV και HFV αντίστοιχα). Οι ομάδες αυτές παρουσιάζονται σχηματικά στο Παράρτημα III.

2.3 Στατιστική ανάλυση

Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές για όλες τις παραμέτρους μεταξύ των εποχών, των περιοχών και των ζωνών βάθους (επι, μεσο και βαθυπελαγική) μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας την ανάλυση διασποράς (Analysis of Variance – ANOVA). Όποτε εκείνες οι διαφορές ήταν σημαντικές εφαρμόστηκε το Tukey test. Για τις συσχετίσεις των μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε ο μη παραμετρικός δείκτης συσχέτισης Spearman. Οι στατιστικές αναλύσεις εκτελέστηκαν με το στατιστικό πακέτο SPSS (Inc. SPSS).

Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα

3.1 Υδρολογικές μεταβλητές

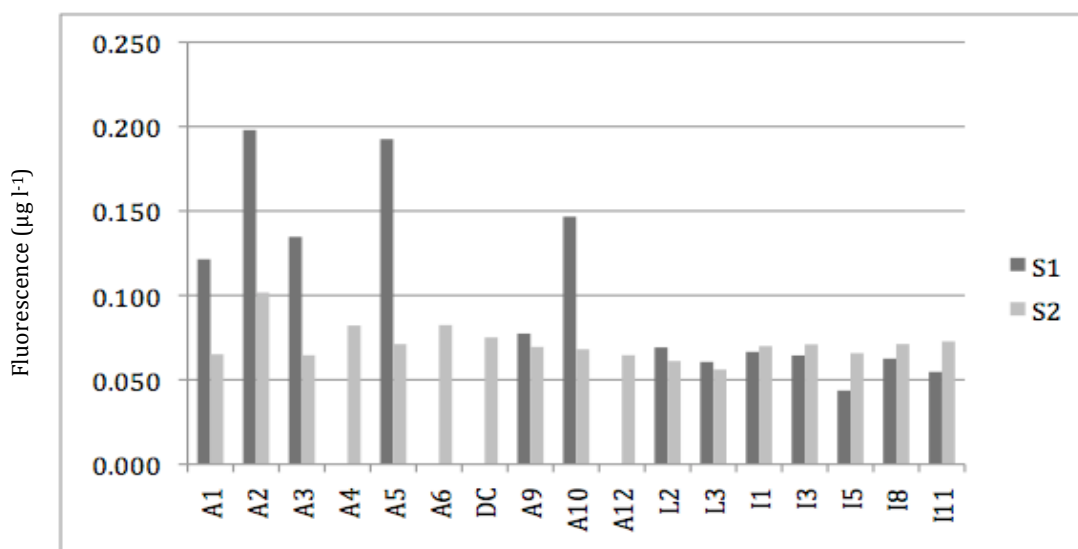
Η κατανομή των υδρολογικών μεταβλητών στις τέσσερις περιοχές που μελετήθηκαν κατά τη διάρκεια των δύο αποστολών δειγματοληψίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Η αλατότητα δεν παρουσίασε οποιαδήποτε μεταβολή μεταξύ των δύο περιόδων δειγματοληψίας, με τις τιμές της να κυμαίνονται από 35.19 psu (σταθμός A1, S2) ως 39.56 psu (A10, S2). Σύμφωνα με τα δεδομένα της θερμοκρασίας, η υδάτινη στήλη ήταν πλήρως αναμεμιγμενη κατά τη διάρκεια του Μαρτίου ενώ το Σεπτέμβριο ένα θερμοκλινές ανιχνεύθηκε σε βάθος μεταξύ 20 και 50m. Η θερμοκρασία κάτω από 50m ήταν σχεδόν σταθερή και στις δύο εποχές με τη χαμηλότερη τιμή στους 12.74 °C που μετρήθηκε στο σταθμό A1 κατά τη διάρκεια του Μαρτίου.

Πίνακας 2. Οι μέσες, μέγιστες και ελάχιστες τιμές της αλατότητας, του φθορισμού και της θερμοκρασίας σε κάθε περιοχή. Ο φθορισμός αναφέρεται μόνο στην επιπελαγική ζώνη

Area	Salinity (psu)						Fluorescence (µg/l)				Temperature (°C)					
	Average		Max		Min		Average		Max		Average		Max		Min	
	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2
North Aegean	39.05	39.08	39.16	39.29	37.80	37.29	0.15	0.08	0.31	0.26	14.15	15.50	14.53	22.49	13.41	14.50
South Aegean	39.08	39.09	39.12	39.36	39.05	38.89	0.14	0.07	0.39	0.24	14.65	14.93	15.83	23.96	14.29	14.35
Libyan	38.87	38.85	39.17	39.45	38.78	38.72	0.06	0.06	0.17	0.15	14.30	14.31	16.99	27.37	13.83	13.80
Ionian	38.82	38.83	38.93	39.05	38.78	38.50	0.06	0.07	0.15	0.16	14.24	14.43	15.98	27.11	13.79	13.75

Οι μέσες τιμές φθορισμού (βαθμονομημένου ως συγκέντρωση χλωροφύλλης) στην επιπελαγική ζώνη, κυμάνθηκαν μεταξύ 0.05 µg lt⁻¹ (L3, S2) και 0.20µg lt⁻¹ (A2, S1) (Σχήμα 3). Πιο αναλυτικά, ο φθορισμός παρουσίασε σημαντική μείωση το Σεπτέμβριο έναντι του Μαρτίου στο Αιγαίο Πέλαγος (p<0.003) ενώ στο Λιβυκό Πέλαγος η μείωση αυτή ήταν αρκετά μικρότερη, όμως στατιστικά σημαντική. Αντίθετα στο Ιόνιο Πέλαγος παρουσιάστηκε αύξηση (p<0.000) το

Σεπτέμβριο σε σχέση με το Μάρτιο. Κατά τη διάρκεια του Μαρτίου, τόσο στο Βόρειο όσο και στο Νότιο Αιγαίο Πέλαγος, οι τιμές του φθορισμού ήταν αυξημένες σε σχέση με το Ιόνιο και Λιβυκό Πέλαγος ($p < 0.0005$) ενώ κατά τη διάρκεια του Σεπτεμβρίου καμία σημαντική διαφορά μεταξύ των περιοχών δεν ανιχνεύθηκε. Το βαθύ μέγιστο χλωροφύλλης (Deep Chlorophyll Maximum – DCM) το Μάρτιο ανιχνεύθηκε μεταξύ 75 και 100m, στο Ιόνιο και Λιβυκό Πέλαγος, ενώ στο Αιγαίο Πέλαγος βρέθηκε πιο ρηχά, από 50 ως 75m. Αντίθετα το Σεπτέμβριο το DCM βρέθηκε πιο βαθιά, μεταξύ 100 ως 150m στο Ιόνιο και Λιβυκό Πέλαγος, και 75 ως 100m στο Αιγαίο Πέλαγος.



Σχήμα 3. Ο φθορισμός σε κάθε σταθμό και κάθε εποχή δειγματοληψίας. Το S1 αναφέρεται στην αποστολή του Μαρτίου και το S2 στην αποστολή του Σεπτεμβρίου

3.2 Αφθονία Ιών: βαθυμετρικές κατανομές στο χώρο και το χρόνο

Η αφθονία των ιών από όλους τους σταθμούς και τα βάθη είχε εύρος δύο τάξεων μεγέθους, με ελάχιστη και μέγιστη τιμή 1.2×10^5 ιούς ml⁻¹ (σταθμός I8 1000m, S1) και 2.7×10^7 (σταθμός A1 2m, S1) αντίστοιχα. Οι μέσες τιμές της αφθονίας των ιών στις τέσσερις περιοχές και τις βαθυμετρικές ζώνες παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Τα βαθυμετρικά διαγράμματα σε κάθε περιοχή παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.

Σύγκριση μεταξύ ζωνών βάθους: Η αφθονία των ιών μειώθηκε κατά περίπου μια τάξη μεγέθους από την επιπελαγική στην μέσο και βαθυπελαγική ζώνη σε όλους τους σταθμούς κατά τη διάρκεια και των δύο περιόδων δειγματοληψιών ($p < 0.000$). Η μείωση αυτή ήταν πολύ απότομη κάτω από τα 75 και 100m και συνεχίστηκε μέχρι τα 1000m σε όλους τους σταθμούς και κατά τη διάρκεια και των δύο περιόδων. Κάτω όμως από τα 1000m και έως τα 4000m σε όλους τους σταθμούς του Ιονίου και Λιβυκού Πελάγους η αφθονία των ιών έδειξε μικρή αύξηση κατά τη διάρκεια και των δύο περιόδων. Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν βρέθηκε στην αφθονία των ιών μεταξύ του μεσο- και βαθυπελαγικού στρώματος ($p < 0.608$). Η μέγιστη τιμή της στους περισσότερους από τους σταθμούς κατά τη διάρκεια του Μαρτίου βρέθηκε στο στρώμα άνω των 50m, ενώ κατά τη διάρκεια του Σεπτεμβρίου βρέθηκε βαθύτερα, μεταξύ 75 και 100m. Οι σταθμοί A1, A2 και A4 του Βορείου Αιγαίου την περίοδο του Σεπτεμβρίου, φαίνεται να αποτελούν εξαίρεση, καθώς έδειξαν τις υψηλότερες τιμές αφθονίας στα άνω 10m.

Πίνακας 3. Η μέση αφθονία των ιών και των προκαρυωτικών οργανισμών καθώς και ο λόγος τους (VPR) σε κάθε περιοχή, εποχή και ζώνη βάθους

Area	Depth	Viruses ml ⁻¹		Total Prokaryotes ml ⁻¹		VPR	
		March	September	March	September	March	September
Ionian Sea	<u>epipelagic</u>	3.98E+06	4.28E+06	3.04E+05	4.55E+05	13.1	9.4
	<u>mesopelagic</u>	1.02E+06	1.84E+06	1.16E+05	1.18E+05	8.8	15.6
	<u>bathypelagic</u>	1.92E+05	6.27E+05	3.00E+04	4.39E+04	6.4	14.3
Libyan Sea	<u>epipelagic</u>	3.49E+06	4.14E+06	3.39E+05	4.10E+05	10.3	10.1
	<u>mesopelagic</u>	1.26E+06	1.87E+06	2.02E+05	1.36E+05	6.2	13.8
	<u>bathypelagic</u>	3.31E+05	5.25E+05	5.42E+04	3.49E+04	6.1	15.0
South Aegean Sea	<u>epipelagic</u>	3.47E+06	6.22E+06	3.81E+05	4.19E+05	9.1	14.8
	<u>mesopelagic</u>	1.46E+06	3.37E+06	1.83E+05	1.49E+05	8.0	22.5
	<u>bathypelagic</u>	4.65E+05	1.19E+06	5.12E+04	7.11E+04	9.1	16.8
North Aegean Sea	<u>epipelagic</u>	7.72E+06	1.06E+07	6.44E+05	6.27E+05	12.0	17.0
	<u>mesopelagic</u>	1.45E+06	3.44E+06	1.45E+05	1.96E+05	9.9	17.6

Σύγκριση μεταξύ εποχών: Η σύγκριση μεταξύ των δύο περιόδων δειγματοληψίας, συμπεριλαμβανομένων όλων των σταθμών, παρουσίασε αξιοπρόσεχτη αύξηση στην αφθονία των ιών το Σεπτέμβριο ($p < 0.000$) έναντι του Μαρτίου. Αν και αυτή η αύξηση είναι εμφανής στις μέσες τιμές της αφθονίας των ιών σε όλες τις περιοχές και τα βάθη, στατιστικά σημαντικές διαφορές βρέθηκαν μόνο στο Νότιο Αιγαίο Πέλαγος ($p < 0.000$) για την επι- και μεσοπελαγική ζώνη, στο μεσοπελαγικό στρώμα του Βόρειου Αιγαίου Πελάγους ($p < 0.000$) και στις μέσες και βαθυπελαγικές ζώνες του Ιονίου Πελάγους ($p < 0.001$ για τη μεσοπελαγική και $p < 0.000$ για τη βαθυπελαγική).

Η αφθονία των ιών παρουσίασε ισχυρή αρνητική συσχέτιση με την αλατότητα ($r = -0.603$, $p < 0.000$) και μέση θετική συσχέτιση με την θερμοκρασία ($r = 0.246$, $p < 0.000$) για όλες τις περιοχές, τα βάθη και τις εποχές. Επίσης εντοπίστηκε και μία μέση θετική συσχέτιση με τον φθορισμό (δηλαδή τη συγκέντρωση της χλωροφύλλης) για την επιπελαγική ζώνη ($r = 0.343$, $p < 0.000$).

3.3 Αφθονία προκαρυωτών: βαθυμετρικές κατανομές στο χώρο και το χρόνο

Η μέση αφθονία των προκαρυωτικών οργανισμών κυμάνθηκε από 1.7×10^4 έως 1.5×10^6 κύτταρα ml^{-1} (σταθμός I5 2000m, S1, και σταθμός A1 2m, S1, αντίστοιχα) (Πίνακας 3). Το συνολικό βαθυμετρικό πρότυπο κατανομής των προκαρυωτικών κυττάρων έχει πολλές ομοιότητες με αυτό των ιών (Σχήμα 4) και αυτό φαίνεται και στην ισχυρή συσχέτιση της αφθονίας των ιών και των προκαρυωτικών κυττάρων ($r=0.836$, $p < 0.000$). Και σε αυτήν την περίπτωση εμφανίστηκε μία σημαντική μείωση της αφθονίας από το επιφανειακό στρώμα στο μεσο- και βαθυπελαγικό στρώμα με μία απότομη μείωση κάτω από 200m. Παρόμοια με τους ιούς, κατά τη διάρκεια της περιόδου ανάμειξης, η μέγιστη αφθονία των προκαρυωτικών οργανισμών βρέθηκε περίπου σε βάθος 50m ενώ κατά τη διάρκεια της περιόδου στρωμάτωσης ήταν μεταξύ 75 και 100m.

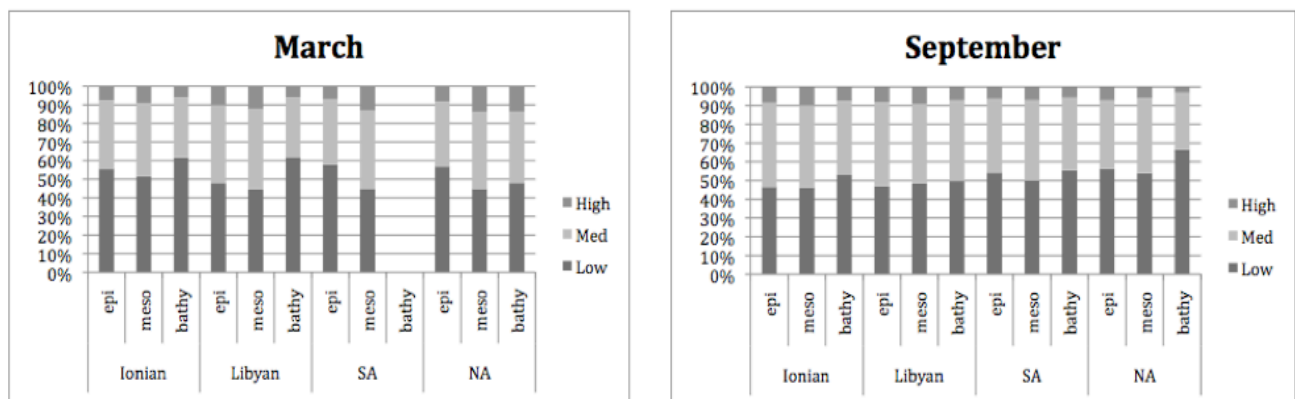
Η συνολική αφθονία των προκαρυωτικών δεν παρουσίασε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του Ιόνιου, Λιβυκού και Νότιου Αιγαίου Πελάγους, και στις δύο εποχές δειγματοληψίας, οι μέσες τιμές κυμάνθηκαν μεταξύ 2.5×10^5 και 3.1×10^5 κύτταρα ml^{-1} για το Μάρτιο και μεταξύ 3.0×10^5 και 3.8×10^5 κύτταρα ml^{-1} για το Σεπτέμβριο. Οι σταθμοί που βρίσκονται στο Βόρειο Αιγαίο Πέλαγος έδειξαν στατιστικά σημαντικές ($p < 0.000$) διαφορές στην αφθονία συγκρινόμενοι με τους σταθμούς των υπολοίπων περιοχών στη διάρκεια και των δύο αποστολών με τη μέση προκαρυωτική αφθονία περίπου στα 5.1×10^5 κυττάρων ml^{-1} και στις δύο αποστολές. Η σύγκριση μεταξύ των περιόδων δειγματοληψίας αποκάλυψε στατιστικά σημαντική αύξηση της αφθονίας μόνο για την επιπελαγική ζώνη του Ιονίου Πελάγους όπου αυξήθηκε κατά 50% το Σεπτέμβριο έναντι του Μαρτίου ($p < 0.000$).

3.4 Η αναλογία Ιών – Προκαρυωτικών κυττάρων (Viruses to Prokaryotic Ratio – VPR)

Η αναλογία των ιών προς τα προκαρυωτικά κύτταρα (VPR) κυμάνθηκε από 3.9 (σταθμός L3 1000m, S1) ως 44.2 (σταθμός A10 200m, S2). Κατά τη διάρκεια της πρώτης αποστολής δειγματοληψίας (Μάρτιος), το VPR μειώθηκε από το επιπελαγικό στις μέσο και βαθυπελαγικό στρώμα σε όλες τις περιοχές μελέτης. Το αντίθετο πρότυπο εμφανίστηκε κατά τη διάρκεια της δεύτερης αποστολής στη διάρκεια της οποίας παρατηρήθηκε μια συνολική αύξηση του VPR (ειδικά στα βάθη κάτω των 200m), που σημαίνει ότι η αύξηση της αφθονίας των ιών κατά τη διάρκεια της περιόδου στρωμάτωσης δεν ακολουθήθηκε από μια ανάλογη αύξηση της αφθονίας των προκαρυωτικών κυττάρων ειδικά για τα βάθη κάτω από το θερμοκλινές.

3.5 Οι ομάδες των Ιών

Όπως περιγράφεται και στο Παράρτημα III, οι ιοί χωρίστηκαν σε 3 ομάδες ανάλογα με την ένταση του φθορισμού τους. Τα ποσοστά ως προς την συνολική αφθονία της κάθε ομάδας σε κάθε εποχή και περιοχή παρουσιάζονται στο Σχήμα 5. Είναι εμφανές ότι σε όλες τις περιοχές και βαθυμετρικές ζώνες, οι ιοί με χαμηλές τιμές φθορισμού (LFV) ήταν η κυρίαρχη ομάδα καθώς αποτελούσαν το 52% όλων των virus-like σωματιδίων που μετρήθηκαν, ακολουθούμενη από τους ιούς με μέσο φθορισμό (MFV), οι οποίοι αποτελούσαν το 40% του συνόλου των ιών. Οι ιοί με υψηλές τιμές φθορισμού (HFV) ήταν με διαφορά η λιγότερο άφθονη ομάδα καθώς αποτελούσαν μόνο το 8% του συνόλου των ιών.



Σχήμα 5. Τα ποσοστά παρουσίας κάθε ομάδας ιών σε κάθε περιοχή και ζώνη βάθους. Αριστερά είναι η αποστολή του Μαρτίου και δεξιά του Σεπτεμβρίου. Με την ένδειξη High είναι οι High Fluorescence Viruses, Med οι Medium Fluorescence Viruses και Low οι Low Fluorescence Viruses.

Από το Μάρτιο μέχρι το Σεπτέμβριο, η ομάδα των LFV παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού της ($p < 0.001$) παράλληλα με μια αύξηση και των δύο άλλων ομάδων φθορισμού MFV και HFV ($p < 0.000$ και $p < 0.005$ αντίστοιχα) σε όλες τις περιοχές και τις ζώνες βάθους. Κατά τη διάρκεια του Μαρτίου δεν υπήρξε καμία σημαντική διαφορά στην ένταση του φθορισμού των ιών μεταξύ των περιοχών. Αντίθετα κατά το Σεπτέμβριο εμφανίστηκε διαφορά μεταξύ των σταθμών του Ιονίου και Λιβυκού Πελάγους και των σταθμών του Βορείου Αιγαίου Πελάγους. Συγκεκριμένα στο Ιόνιο και το Λιβυκό Πέλαγος η ομάδα LFV ήταν η λιγότερο πολυάριθμη σε σχέση με το Βόρειο Αιγαίο ενώ και οι δύο

ομάδες MFV και HFV παρουσίαζαν αυξημένα ποσοστά ($p < 0.032 - 0.000$).

Η στατιστική σύγκριση με ANOVA των διαφορετικών περιοχών και ζωνών βάθους όσον αφορά τις ομάδες φθορισμού των ιών έδειξε τις παρακάτω σημαντικές διαφορές:

1. Η επιπελαγική ζώνη του Λιβυκού Πελάγους το Μάρτιο έχει λιγότερους LFV σε σχέση με τις υπόλοιπες περιοχές (48% όλων των ιών, ενώ στις άλλες περιοχές η LV αποτελεί το 56%) και περισσότερους MFV (42% έναντι 36%) και HFV (10% έναντι 7.5%) (p -value από 0.048 έως 0.005).
2. Το Σεπτέμβριο στην επιπελαγική ζώνη το Ιόνιο και το Λιβυκό Πέλαγος είχαν αναλογικά λιγότερους LFV ιούς από ολόκληρο το Αιγαίο Πέλαγος (47% έναντι 55%, $0.012 < p < 0.000$) και αντίστοιχα περισσότερους MFV και HFV ($0.017 < p < 0.000$).
3. Στην επιπελαγική ζώνη, από το Μάρτιο μέχρι το Σεπτέμβριο οι LFV μειώθηκαν σημαντικά ($p < 0.002$) ενώ οι MFV αυξήθηκαν ($p < 0.000$). Οι διαφορές αυτές οφείλονται κυρίως στους σταθμούς του Ιονίου και Νοτίου Αιγαίου Πελάγους. Οι HFV δεν εμφάνισαν καμία σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο εποχών παρά μόνο στο Βόρειο Αιγαίο Πέλαγος όπου υπήρξε μία στατιστικά σημαντική μείωση από το Μάρτιο στο Σεπτέμβριο ($p < 0.043$).
4. Στην μεσοπελαγική ζώνη καμία σημαντική αλλαγή δεν εμφανίστηκε μεταξύ όλων των περιοχών και στις δύο εποχές για όλες τις ομάδες, εκτός από τους HFV στο Ιόνιο Πέλαγος όπου ήταν αναλογικά περισσότεροι σε σχέση με αυτούς του Βορείου Αιγαίου για την εποχή του Σεπτεμβρίου ($p < 0.003$) που οφείλεται στη μείωση των HFV από το Μάρτιο έως το Σεπτέμβριο στην περιοχή του Βορείου Αιγαίου (όπως έγινε και στην επιπελαγική ζώνη, $p < 0.001$).
5. Στη βαθυπελαγική ζώνη καμία σημαντική διαφορά δεν ανιχνεύθηκε μεταξύ των περιοχών και στις δύο εποχές. Όμως υπήρξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο εποχών με μείωση των LFV από το Μάρτιο μέχρι το Σεπτέμβριο (από 64% σε 51%, $p < 0.000$) και αύξηση των MFV (από 31% σε 43%, $p < 0.000$) και HFV (από 5% σε 7%, $p < 0.004$) όπως είδαμε και παραπάνω.

Κεφάλαιο 4: Συζήτηση

4.1 Η αφθονία των ιών

Κατά την παρούσα μελέτη στην Ανατολική Μεσόγειο, η μέση αφθονία των ιών βρέθηκε 5.6×10^6 ιοί ml^{-1} , 2.0×10^6 ιοί ml^{-1} και 6.9×10^5 ιοί ml^{-1} στην επι, μεσο και βαθυπελαγική ζώνη αντίστοιχα κατά τη διάρκεια και των δύο εποχών. Οι τιμές αυτές συμφωνούν με τιμές που έχουν ήδη αναφερθεί για περιοχές ανοικτής θάλασσας (Wommack and Colwell 2000). Είναι όμως αρκετά υψηλότερες συγκρινόμενες με τιμές από την περιοχή της Δυτικής και Κεντρικής Μεσογείου (Guixa-Boixereu et al 1999, Alonso et al 2001).

Πιο συγκεκριμένα, η αφθονία των ιών στην επιφάνεια και την επιπελαγική ζώνη της παρούσας εργασίας είναι κατά πολύ υψηλότερη (κατά μία ή δύο τάξεις μεγέθους) από αυτή που αναφέρουν οι Alonso et al (2001) από την περιοχή γύρω από το Γιβραλτάρ. Επίσης είναι δύο έως πέντε φορές υψηλότερη από αυτή που αναφέρεται από τους Corinaldesi et al (2003) από την Αδριατική Θάλασσα και από τους Magagnini et al (2007) οι οποίοι διεξήγαγαν μία δειγματοληψία μεγάλης κλίμακας από τη Δυτική Μεσόγειο έως το Δυτικό Ιόνιο Πέλαγος (ο ανατολικότερος σταθμός τους είναι κοντά με τον δυτικότερο – I11 – της δικής μας εργασίας). Αντίθετα, οι Guixa-Boixereu et al (1999) στη Δυτική Μεσόγειο καθώς και δύο μελέτες από τον σταθμό DYFRAMED (50 χλμ από τη Νίκαια) (Weinbauer et al 2003, Winter et al 2009) αναφέρουν υψηλότερες αφθονίες ιών στην επιπελαγική ζώνη συγκριτικά με τη μελέτη μας.

Πολύ λίγες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί στη Μεσόγειο αναφορικά με την αφθονία των ιών κάτω από την εύφωτη ζώνη (Corinaldesi et al 2003, Weinbauer et al 2003, Magagnini et al 2007, Winter et al 2009) και από αυτές μόνο μία (Magagnini et al 2007) είναι μεγάλης κλίμακας και με βάθη μελέτης κάτω από τα 3000m. Στις παραπάνω εργασίες η αφθονία των ιών ήταν επίσης μικρότερη από αυτή που αναφέρθηκε στην παρούσα μελέτη. Εξάιρεση αποτελεί η εργασία των Winter et al

(2009) στην οποία αναφέρεται ελαφρώς μεγαλύτερη αφθονία στο σταθμό DYFRAMED τον Απρίλιο και τον Σεπτέμβριο. Όσον αφορά τα βαθειά νερά, μέχρι τώρα οι υψηλότερες αφθονίες αναφέρθηκαν από τους Magagnini et al (2007) από τους σταθμούς στο Ιόνιο Πέλαγος, πολύ κοντά στους σταθμούς I11 και I8 της παρούσας εργασίας. Οι Magagnini et al (2007) αναφέρουν ολοκληρωμένη αφθονία της τάξης των $40 \text{ έως } 230 \times 10^{12}$ ιών m^{-2} μεταξύ Οκτωβρίου και Νοεμβρίου, που είναι ελαφρώς μικρότερη από αυτή που βρήκαμε στη δική μας εργασία για τα βαθειά νερά του Ιονίου τον Σεπτέμβριο. Εκτός Μεσογείου και πιο συγκεκριμένα από στον Ατλαντικό και τον Ειρηνικό Ωκεανό επίσης αναφέρεται μικρότερη αφθονία ιών (Cochlau et al 1993, Hara et al 1996), ή περίπου ίδια (Taylor et al 2003) με τη δική μας εργασία στα μέσα και βαθυπελαγικά νερά. Μόνο μία δημοσίευση από μεγάλα βάθη του Ατλαντικού Ωκεανού αναφέρει αφθονίες υψηλότερες από εμάς (Parada et al 2007).

Η αυξημένη αφθονία των ιών που αναφέρεται στην παρούσα εργασία έναντι των υπολοίπων είναι εκ πρώτης όψεως μη αναμενόμενη δεδομένου ότι η Ανατολική Μεσόγειος είναι πιά ολιγοτροφική έναντι τόσο της Δυτικής όσο και του Ατλαντικού και του Ειρηνικού Ωκεανού. Η αυξημένη αφθονία των ιών στην Ανατολική Μεσόγειο θα μπορούσε να οφείλεται (1) στη περίοδο δειγματοληψίας (όπως θα δούμε και παρακάτω), (2) στην τροφική κατάσταση των ξενιστών, (3) σε διάφορες φυσικές και χημικές παραμέτρους, (4) στην απόσταση από την ακτή και (5) σε μεθοδολογικές παραμέτρους. Δεδομένου ότι η έρευνα των θαλασσίων ιών είναι ένας αρκετά νέος κλάδος για τη θαλάσσια βιολογία, τα όργανα μελέτης τους και τα πρωτόκολλα βρίσκονται ακόμα στο στάδιο της εξέλιξης και σημαντικές βελτιώσεις έχουν γίνει τα τελευταία χρόνια (Thingstad et al 2008). Πιστεύουμε ότι ο κύριος λόγος για την αυξημένη αφθονία στην παρούσα εργασία είναι η μέθοδος μέτρησης που χρησιμοποιήθηκε δηλαδή η κυτταρομετρία ροής. Στις περισσότερες από τις παραπάνω μελέτες οι ιοί μετρήθηκαν είτε με μικροσκόπιο φθορισμού είτε, σε λιγότερες περιπτώσεις, με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (Transmission Electron Microscope – TEM) και με κυτταρομετρητή ροής (Flow Cytometer – FCM). Σύμφωνα με τους Marie et al (1999) και Chen et al (2001), οι μετρήσεις των ιών με

κυτταρομετρητή ροής είναι από 10% έως 30% υψηλότερες από το μικροσκόπιο φθορισμού, το οποίο με τη σειρά του δίνει υψηλότερες μετρήσεις από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Weinbauer and Suttle 1997, Noble and Fuhrman 1998, Bettarel et al 2000).

4.2 Βαθυμετρική κατανομή των ιών

Η αφθονία των ιών στην επιπελαγική ζώνη υπερβαίνει αυτή στη μέσο- και βαθυπελαγική ζώνη κατά μία τάξη μεγέθους. Η κύρια αιτία πίσω από αυτό είναι ότι η προσβολή των προκαρυωτικών οργανισμών από τους ιούς είναι μια στοχαστική διεργασία και επομένως εξαρτάται από την χωρική πυκνότητα του ξενιστή (Murray and Jackson 1992). Το πρότυπο αυτό εμφανίζεται σε όλες τις μελέτες ιών που έχουν δημοσιευτεί μέχρι σήμερα (Wommack and Colwell 2000, Weinbauer 2004).

Όσον αφορά την επιπελαγική ζώνη και κυρίως κατά την περίοδο της στρωμάτωσης εντοπίστηκαν μέγιστα σε διαφορετικά βάθη. Στους σταθμούς του Ιονίου, Λιβυκού και Νοτίου Αιγαίου Πελάγους, τα βαθυμετρικά μέγιστα ήταν μεταξύ 75 και 100m ενώ στους σταθμούς του Βορείου Αιγαίου αυτό βρισκόταν μεταξύ 2 και 50m. Σχεδόν το ίδιο πρότυπο κατανομής παρουσίασαν και οι προκαρυωτικοί οργανισμοί. Τον Μάρτιο και καθώς η υδάτινη στήλη ήταν αναμεμιγμένη δεν βρέθηκαν σαφή βαθυμετρικά μέγιστα, παρά μόνο σε λίγους σταθμούς του Ιονίου και Λιβυκού Πελάγους.

Μέγιστες τιμές της αφθονίας στην επιπελαγική ζώνη έχουν παρατηρηθεί σε βάθη που ποικίλουν από τα 15m (Maranger and Bird 1996) μέχρι τα 150m (Cochlan et al 1993, Hara et al 1996). Στις περισσότερες των περιπτώσεων τα μέγιστα αυτά σχετίζονται είτε με ασυνέχειες της στήλης του νερού όπως π.χ. τα πυκνοκλινή είτε με αλλαγές σε διάφορες χημικές ή/και βιολογικές παραμέτρους όπως τα νουτρικλινή ή τα μέγιστα της χλωροφύλλης (Deep Chlorophyll Maximum – DCM) (Weinbauer 2004). Οι ζώνες αυτές μπορούν να θεωρηθούν ως οικοτόνοι στους οποίους η αυξημένη αφθονία ή/και ποικιλότητα έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη

αφθονία ιών. Στο Βόρειο Ειρηνικό Ωκεανό το μέγιστο της αφθονίας των ιών ήταν γύρω από το DCM (Hara et al 1996) ενώ στην Αδριατική Θάλασσα ήταν κοντά στο θερμοκλινές (Weinbauer et al 1995). Σε σταθμούς ανοικτής θάλασσας στην Δυτική Μεσόγειο το μέγιστο ήταν λίγο πάνω από το DCM (Guixa – Boixereu et al 1999).

Στην παρούσα εργασία το θερμοκλινές εμφανίστηκε μόνο το Σεπτέμβριο και σε βάθη περίπου 20m. Η κατανομή όμως της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης έδειξε την ύπαρξη μέγιστου για τον Σεπτέμβριο σε βάθη 100 και 130m για το Ιόνιο και Λιβυκό Πέλαγος και 50 με 75m στο Αιγαίο Πέλαγος ενώ το Μάρτιο το DCM ήταν πιο ρηχά. Αυτό σημαίνει ότι τουλάχιστον για το Ιόνιο και Λιβυκό Πέλαγος την περίοδο του Σεπτεμβρίου το μέγιστο της αφθονίας των ιών ακολουθεί το DCM. Παράλληλα σχεδόν στα ίδια βάθη τα αυτότροφα βακτήρια εμφάνισαν τα μέγιστα της αφθονίας τους με τα ετερότροφα βακτήρια να τα εμφανίζουν λίγο πιο ρηχά (Pitta et al, unpublished). Αυτό ίσως να σημαίνει ότι στην επιπελαγική ζώνη ένα αρκετά σημαντικό ποσοστό των ιών είναι φάγοι αυτότροφων βακτηρίων γι' αυτό και τα μέγιστα ιών και αυτότροφων βακτηρίων σχετίζονται. Παράλληλα στα βάθη αυτά εμφανίζονται περισσότερες ομάδες αυτότροφων βακτηρίων (Pitta and Magiopoulos, personal observation) κάτι που είναι ένδειξη αυξημένης ποικιλότητας.

Όσον αφορά τους σταθμούς στο Βόρειο Αιγαίο, το μέγιστο της αφθονίας των ιών εμφανίστηκε στα άνω 10m. Αυτό οφείλεται στην είσοδο των νερών της Μαύρης Θάλασσας (Black Sea Water – BSW) τα οποία ενισχύουν τόσο πολύ την παραγωγή των ιών ώστε να ξεπερνά την καταστροφή των ιών λόγω της υπερϊώδους ακτινοβολίας του ήλιου (Suttle and Chen 1992).

Μετά το βάθος των 100 με 150m και σε όλους τους σταθμούς και εποχές έχουμε πολύ απότομη μείωση της αφθονίας των ιών. Ο βασικότερος λόγος για τη μείωση αυτή είναι η αντίστοιχη μείωση της αφθονίας των ξενιστών. Αυτό φαίνεται και από την ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της αφθονίας των ιών και των προκαρυωτικών οργανισμών ($r=0.836$, $p<0.000$). Ένας επιπλέον παράγοντας για τη μείωση της αφθονίας των ιών με την αύξηση του βάθους είναι το μειωμένο

ποσοστό των «μολυσμένων» κυττάρων (FIC) (Weinbauer et al 2003).

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται έντονη εποχιακή μεταβολή της αφθονίας των ιών στα βαθιά νερά ιδίως στο Λιβυκό Πέλαγος, και κατά συνέπεια αυξημένη αφθονία τον Σεπτέμβριο. Επίσης αναφέρεται πολύ υψηλός λόγος των ιών προς τους προκαρυωτικούς οργανισμούς παρά το γεγονός ότι η θερμοκρασία στα βαθιά νερά της Ανατολικής Μεσογείου είναι πολύ υψηλή και άρα και το decay rate αυξημένο. Αυτά δείχνουν ότι είτε έχουμε «αλλόχθονες» εισροές ιών από άλλα συστήματα χωρίς όμως αντίστοιχη εισαγωγή βακτηρίων είτε δείχνει ότι η επίδρασή τους στα βακτήρια της βαθυπελαγικής ζώνης είναι σαφώς πιο σημαντική την εποχή της στρωμάτωσης. Πάντως η ποικιλότητα των βακτηρίων στα βαθυπελαγικά νερά ήταν αυξημένη το Σεπτέμβριο σε σχέση με το Μάρτιο (Pitta – Magiopoulos, personal observation). Αυτό ίσως να είναι ένδειξη αυξημένης επίδρασης των ιών πάνω στα βακτήρια.

4.3 Χωρική κατανομή των ιών

Με βάση την αφθονία των ιών οι περιοχές της δειγματοληψίας μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τους σταθμούς του Ιονίου, του Λυβικού και του Νοτίου Αιγαίου Πελάγους, δηλαδή τους σταθμούς της «ανοικτής θάλασσας» ενώ στη δεύτερη ομάδα είναι μόνο οι σταθμοί του Βορείου Αιγαίου Πελάγους. Στο Βόρειο Αιγαίο η αφθονία των ιών ήταν σχεδόν διπλάσια σε σχέση με τις υπόλοιπες περιοχές ενώ στην περίπτωση των προκαρυωτικών οργανισμών η αύξηση της αφθονίας τους ήταν της τάξης του 50 – 70% κατά τη διάρκεια και των δύο εποχών.

Η μέση αφθονία των ιών στην επιπελαγική ζώνη του Βορείου Αιγαίου ήταν 7.72×10^6 ιοί ml^{-1} και 1.06×10^7 ιοί ml^{-1} τον Μάρτιο και το Σεπτέμβριο αντίστοιχα με μέγιστες τιμές της τάξης των 1.4×10^7 ιών ml^{-1} στους σταθμούς A1 και A2 κατά τη διάρκεια του Σεπτεμβρίου. Οι τελευταίες τιμές ήταν όχι μόνο σημαντικά υψηλότερες από οποιαδήποτε άλλη που βρέθηκε στους σταθμούς της ανοικτής

θάλασσας, αλλά είναι μέσα στο εύρος των αφθονιών μη-ολιγοτροφικών περιοχών (Wommack and Colwell 2000) και κοντά στις υψηλότερες τιμές που αναφέρθηκαν στη Μεσόγειο (Magagnini et al 2007, Winter et al 2009).

Μια πιθανή εξήγηση για τα παραπάνω είναι οι πλούσιες σε διαλυμένο οργανικό άνθρακα (DOC) εισροές των νερών της Μαύρης Θάλασσας (Black Sea Water – BSW) (Sempere et al 2002, Siokou-Fragou et al 2002) που πιθανότατα ενισχύουν την παραγωγικότητα της περιοχής. Αυτό σημαίνει ότι οι μονοκύτταροι ξενιστές είναι πιο πολλοί αριθμητικά αλλά και ότι βρίσκονται πιο κοντά στο βέλτιστο της ανάπτυξής τους, γεγονός το οποίο οδηγεί με τη σειρά του σε αυξημένη παραγωγή ιών (Wilson et al 1998, Onreas et al 2003).

Επιπλέον, η παραπάνω υπόθεση ενισχύεται από τρεις παρατηρήσεις σχετικά με τους σταθμούς και τα βάθη που εμφανίστηκαν οι μέγιστες αφθονίες καθώς και την εποχιακή μεταβολή τους. Πρώτον το BSW εξέρχεται επιφανειακά, άνω των 30 με 50m (όπως διαπιστώνεται και από το πυκνοκλινές – τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται) ενώ και η μέγιστη αφθονία των ιών στους βορειότερους σταθμούς βρέθηκε μεταξύ 2 και 50 m. Δεύτερον οι μεγαλύτερες αφθονίες ιών μετρήθηκαν στους σταθμούς A1 το Μάρτιο και A1 και A2 το Σεπτέμβριο, δηλαδή τους σταθμούς που δέχονται τα νερά της Μαύρης Θάλασσας τις δύο αυτές εποχές (Zervakis and Georgoroulos 2002). Τρίτον, ενώ γενικά βρέθηκε μεταβολή της αφθονίας των ιών με το χρόνο στην επιπελαγική ζώνη του Βορείου Αιγαίου δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή.

Οι υπόλοιποι σταθμοί (Ιονίου, Λυβικού και Νοτίου Αιγαίου Πελάγους) δεν έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους σε καμία εποχή όσον αφορά την αφθονία των ιών και των προκαρυωτικών οργανισμών. Αυτό σημαίνει ότι ο μηχανισμός που ελέγχει την αφθονία τόσο των ιών όσο και των ξενιστών τους είναι κοινός και στα τρία πελάγη.

4.4 Εποχιακή μεταβολή των ιών

Από τις πρώτες δημοσιεύσεις για θαλάσσιους ιούς είναι γνωστό ότι η αφθονία τους υπόκειται σε εποχιακές μεταβολές (Bergh et al 1988). Οι μεταβολές της αφθονίας των ιών ακολουθούν συνήθως τις ανθήσεις του φυτοπλαγκτού ή τις μεταβολές της αφθονίας των βακτηρίων, δηλαδή των κυριότερων ξενιστών τους (αναλυτική περιγραφή του φαινομένου υπάρχει στις ανασκοπήσεις των Wommack and Colwell 2000 και Weinbauer 2004). Οι Winter et al (2009) στην Κεντρική Μεσόγειο εντόπισαν σημαντικές εποχιακές μεταβολές στην αφθονία τόσο των ιών όσο και των προκαρυωτικών οργανισμών από την επιπελαγική έως τη βαθυπελαγική ζώνη. Οι εποχιακές αυτές μεταβολές ήταν πιο έντονες από τις χωρικές μεταβολές που μετρήθηκαν για τη Δυτική και Κεντρική Μεσόγειο από τους Magagnini et al (2007).

Στη μελέτη μας, η αφθονία των ιών αυξήθηκε αισθητά κατά τη διάρκεια της περιόδου στρωμάτωσης της στήλης σε σχέση με την περίοδο της ανάμειξης. Η παρατήρηση αυτή είναι σε συμφωνία με άλλες εποχιακές μελέτες από τη Μεσόγειο (Weinbauer et al 1995, Winter et al 2009) και αλλού (Payet and Suttle 2008).

Στη διάρκεια της παρούσας μελέτης διαπιστώθηκε ότι η αφθονία των ιών σχετίζεται ισχυρά με την αφθονία των ξενιστών – προκαρυωτικών οργανισμών ($r=0.836$, $p<0.000$). Όμως, σε αντίθεση με τους ιούς, τα βακτήρια δεν αυξάνουν ιδιαίτερα σε αφθονία από το Μάρτιο στο Σεπτέμβριο, με εξαίρεση τα επιπελαγικά νερά του Ιονίου Πελάγους. Αυτό σημαίνει ότι οι αιτίες για την εποχιακή μεταβολή της αφθονίας των ιών θα πρέπει να αναζητηθούν σε άλλους παράγοντες.

Μια πρώτη υπόθεση θα μπορούσε να είναι η θρεπτική κατάσταση ή/και η μεταβολική δραστηριότητα των ξενιστών, καθώς γνωρίζουμε ότι παίζουν μεγάλο ρόλο στην επιμόλυνση του ξενιστή από τον ιό, στην αναπαραγωγή του, την λυτική ή λυσογενή δράση (lytic and lysogenic activity) του και κατά συνέπεια στην επιβίωση των ίδιων των ιών (Weinbauer 2004). Παραδείγματα των παραπάνω υπάρχουν σε

μελέτες με καλλιέργειες που δείχνουν ότι ο χρόνος διπλασιασμού των ξενιστών μπορεί να επηρεάσει το latent time καθώς και ότι η περιορισμένη διαθεσιμότητα των θρεπτικών οδηγεί σε αύξηση του latent time period και σε μείωση του burst size (Proctor et al 1993, Middelboe 2000). Στη δική μας περίπτωση θα περιμέναμε την εποχή της ανάμειξης των νερών, δηλαδή την εποχή της αυξημένης διαθεσιμότητας σε θρεπτικά, να έχουμε περισσότερους ιούς, όμως συμβαίνει ακριβώς το αντίθετο.

Από τις αναλύσεις των δειγμάτων των ετερότροφων βακτηρίων στα πλαίσια του ίδιου προγράμματος (Pitta et al, unpublished) διαπιστώθηκε ότι η κοινότητα των βακτηρίων αλλάζει με την εποχή. Συγκεκριμένα, κατά τον Σεπτέμβριο αυξήθηκε το ποσοστό των HFB καθώς και το μέγεθός τους.

Η αυξημένη παρουσία των HFB καθώς και το μεγαλύτερο μέγεθός τους την περίοδο του Σεπτεμβρίου (Pitta et al, unpublished) είναι σημαντικές ενδείξεις ότι η κοινότητα των βακτηρίων μπορεί να μην αυξάνεται σε αφθονία, βελτιώνεται όμως σε «ποιότητα». Με άλλα λόγια υπάρχουν περισσότερα δραστήρια βακτήρια, γεγονός που σημαίνει πιο σύντομα latent time periods και μεγαλύτερα burst sizes, ενώ το αυξημένο μέγεθος των βακτηρίων μπορεί να σημαίνει και μεγαλύτερο burst size καθώς ένα μεγάλο κύτταρο μπορεί να «χωρέσει» περισσότερους ιούς (Weinbauer et al 1994, Weinbauer and Hofle 1998).

Ένας επιπλέον παράγοντας που θα μπορούσε να παίζει ρόλο στην μεταβολή της αφθονίας των ιών στην επιπελαγική ζώνη είναι η μεταβολή της θερμοκρασίας. Είναι γνωστό ότι η αύξηση της θερμοκρασίας μειώνει το latent time period (Zachary 1978) είτε αυξάνει το burst size (Mathias et al 1995). Δεδομένου ότι η θερμοκρασία στην επιπελαγική ζώνη το Σεπτέμβριο ήταν αυξημένη σε σχέση με το Μάρτιο ίσως αποτελεί άλλη μια αιτία για την αύξηση της αφθονίας των ιών κατά την εποχή της στρωμάτωσης.

Σε βάθος μεγαλύτερο από 200m η εικόνα φαίνεται να είναι πιο σύνθετη. Οι

προκαρυωτικοί οργανισμοί δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική μεταβολή μεταξύ των εποχών ενώ και οι περιβαλλοντικές παράμετροι είναι σταθερές. Όμως η αφθονία των ιών παρουσιάζει σαφή αύξηση το Σεπτέμβριο σε σχέση με το Μάρτιο με αποτέλεσμα το VPR να αυξάνεται από 7.8 το Μάρτιο σε 16.5 το Σεπτέμβριο. Η τελευταία τιμή είναι σαφώς υψηλότερη από οποιαδήποτε άλλη έχει αναφερθεί στη Μεσόγειο (Weinbauer et al 2003, Magagnini et al 2007, Winter et al 2009) αλλά και από τη μέση τιμή του λόγου των ιών προς τους προκαρυωτικούς οργανισμούς (VPR) στη μεσο- και βαθυπελαγική ζώνη σε παγκόσμιο επίπεδο, που είναι περίπου 10 (Aristegui et al 2009). Σε όλες σχεδόν τις εργασίες μέχρι σήμερα, έχει παρατηρηθεί μείωση ή μη μεταβολή του VPR από την επιπελαγική ζώνη στην μεσο- και βαθυπελαγική ζώνη. Εξαιρεση αποτελεί μία μελέτη από τον Κεντρικό Ατλαντικό Ωκεανό στην οποία όχι μόνο παρατηρήθηκε αύξηση του VPR με το βάθος αλλά αυτή ήταν και ιδιαίτερα σημαντική (από 9 στην επιπελαγική ζώνη σε 110 στην βαθυπελαγική).

Οι Parada et al (2007) απέδωσαν τη μεγάλη αφθονία των ιών στα βαθιά έναντι των βακτηρίων στη δράση δύο μηχανισμών «εισαγωγής» ιών στη βαθυπελαγική ζώνη. Συγκεκριμένα, ο πρώτος μηχανισμός προβλέπει την συσσωμάτωση μεταξύ ιών και άλλων σωματιδίων (marine snow-type particles) και τη μεταφορά των ιών μέσω καθίζησης από την επιπελαγική ζώνη. Ο δεύτερος μηχανισμός, που προτάθηκε είναι η εισαγωγή ιών από το υπόστρωμα («sedimenting virus hypothesis») δηλαδή από το βένθος.

Με τα δεδομένα της δικιάς μας εργασίας, ο πρώτος μηχανισμός δεν μπορεί να εξηγήσει την αυξημένη αφθονία την εποχή της στρωμάτωσης κατά την οποία τα καταβυθιζόμενα σωματίδια θα πρέπει να είναι λιγότερα σε σχέση με την εποχή της ανάμειξης. Αντίθετα ο δεύτερος μηχανισμός θα μπορούσε να ισχύει και επιπλέον θα μπορούσε ίσως να εξηγήσει την αύξηση των ιών μετά τα 1000m που εμφανίζεται σε όλους τους σταθμούς του Ιονίου και του Λιβυκού Πελάγους και τις δύο εποχές

Επιπλέον λόγοι στους οποίους ίσως θα μπορούσε να οφείλεται αυτή η

αύξηση των ιών το Σεπτέμβριο είναι το μέγεθος των βακτηρίων όπως το αναφέραμε και παραπάνω, το μεγαλύτερο burst size, το μεγαλύτερο ποσοστό lysogenic σε σχέση με lytic ιούς στην περίοδο του Σεπτεμβρη ή στο διαφορετικό ποσοστό των «μολυσμένων» βακτηρίων (Frequency of Infected Cells – FIC). Όμως δεν έχουμε δεδομένα που να μπορούν να υποστηρίξουν ή να απορρίψουν κάποια από αυτές τις υποθέσεις.

4.5 Οι ομάδες φθορισμού των ιών

Όπως και σε όλες τις άλλες εργασίες που έχουν δημοσιευθεί στο παρελθόν και έχουν μελετηθεί οι διαφορετικές ομάδες ιών με βάση τον φθορισμό τους, οι LFV είναι με διαφορά η πιο άφθονη ομάδα ακολουθούμενη από τους MFV (Payet and Suttle 2008, Winter et al 2009). Μάλιστα οι Winter et al (2009) από το σταθμό DYFRAMED της Κεντρικής Μεσογείου αναφέρουν ότι οι δύο αυτές ομάδες αναλογούν στο 95% της συνολικής αφθονίας των ιών ενώ στα δικά μας αποτελέσματα το ποσοστό αυτό κυμαίνεται στο 92%.

Η αυξημένη παρουσία των MFV και HFV στο επιπελαγικό στρώμα είναι μια ένδειξη ότι σε αυτές τις ομάδες ανήκουν και οι φάγοι των αυτότροφων βακτηρίων. Σε αυτό το συμπέρασμα καταλήγουν και οι Winter et al (2009). Οι τελευταίοι δεν αναφέρουν αν βρέθηκε μεταβολή στα ποσοστά παρουσίας των διαφορετικών ομάδων με την εποχή. Στην παρούσα εργασία βρέθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των MFV και HFV το Σεπτέμβριο σε σχέση με το Μάρτιο κάτι που σημαίνει ότι η αύξηση της αφθονίας των ιών την εποχή εκείνη συνοδεύτηκε από αύξηση του φθορισμού τους.

Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα

1. Οι ιοί στην Ανατολική Μεσόγειο εμφάνισαν αφθονία από 1.2×10^5 έως 2.7×10^7 ιούς ml^{-1} . Η μέση τιμή το Μάρτιο για την επιπελαγική ζώνη ήταν 4.6×10^6 , για τη μεσοπελαγική ζώνη 1.2×10^6 και για τη βαθυπελαγική ζώνη 3.7×10^5 ιοί ml^{-1} . Οι αντίστοιχες τιμές για το Σεπτέμβριο ήταν 6.3×10^6 , 2.8×10^6 και 8.8×10^5 ιοί ml^{-1} . Οι παραπάνω τιμές είναι μέσα στα όρια των ολιγοτροφικών συστημάτων.
2. Η αφθονία των ιών ήταν αυξημένη σε σχέση με τις περισσότερες εργασίες στην Μεσόγειο αλλά αυτό οφείλεται στην αυξημένη ευαισθησία και ακρίβεια του οργάνου με το οποίο μετρήθηκαν, δηλαδή του κυτταρομετρητή ροής, σε σχέση με το μικροσκόπιο φθορισμού.
3. Η αφθονία των ιών μειώθηκε απότομα μετά το βάθος των 150m περίπου, κάτι που συμβαίνει σε όλα τα θαλάσσια και λιμναία οικοσυστήματα. Η μεσο- και η βαθυπελαγική ζώνη δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους όσον αφορά την αφθονία των ιών.
4. Ο κύριος λόγος για τη μείωση της αφθονίας των ιών με το βάθος ήταν η μείωση της αφθονίας των ξενιστών τους.
5. Το Ιόνιο, Λιβυκό και Νότιο Αιγαίο Πέλαγος έδειξαν να έχουν σχετικά ίδιες αφθονίες ιών σε αντίθεση με το Βόρειο Αιγαίο το οποίο είχε στατιστικά σημαντικά περισσότερους ιούς και τις δύο εποχές. Αυτό οφείλεται στην εισροή νερών από τη Μαύρη Θάλασσα.
6. Το Σεπτέμβριο μετρήθηκαν σημαντικά περισσότεροι ιοί σε σχέση με το Μάρτιο. Πιο σημαντική ήταν η αύξηση των ιών στην μεσο- και βαθυπελαγική ζώνη (κυρίως στο Ιόνιο Πέλαγος) χωρίς αντίστοιχη αύξηση των προκαρυωτικών οργανισμών. Αυτό οφείλεται στην αύξηση του μεγέθους και της «ενεργότητας» των προκαρυωτικών οργανισμών.
7. Οι περισσότεροι ιοί εμφάνισαν μειωμένη ένταση φθορισμού. Το Σεπτέμβριο αυξήθηκαν οι ιοί με μέση και υψηλή ένταση φθορισμού.

Βιβλιογραφία

Aristegui, J., Gasol, J.M., Duarte, C.M., Herndl, G.J., 2009. Microbial oceanography of the dark ocean's pelagic realm. *Limnology and Oceanography*, 54, 1501-1529.

Auguet, J.C., Montanié, H., Delmas, D., Hartmann, H.J., Huet, V., 2005. Dynamic of virioplankton abundance and its environmental control in the Charente estuary (France). *Microbial ecology*, 50, 337-349.

Azov, Y., 1986. Seasonal patterns of phytoplankton productivity and abundance in nearshore oligotrophic waters of the Levant Basin (Mediterranean). *Journal of Plankton Research*, 8, 41-53.

Azov, Y., 1991. Eastern Mediterranean - A marine desert?. *Marine pollution bulletin*, 23, 225-232.

Bergh, O., Borsheim, K.Y., Bratbak, G., Heldal, M., 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*, 340, 467-468.

Bettarel, Y., Sime-Ngando, T., Amblard, C., Laveran, H., 2000. A comparison of methods for counting viruses in aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2283-2289.

Brussaard, C.P.D., Wilhelm, S.W., Thingstad, F., Weinbauer, M.G., Bratbak, G., Heldal, M., Kimmance, S.A., Middelboe, M., Nagasaki, K., Paul, J.H., Schroeder, D.C., Suttle, C.A., Vaqué, D., Wommack, K.E., 2008. Global-scale processes with a nanoscale drive: The role of marine viruses. *ISME Journal*, 2, 575-578.

Chen, F., Lu, J.-R., Binder, B.J., Liu, Y.-C., Hodson, R.E., 2001. Application of digital image analysis and flow cytometry to enumerate marine viruses stained with SYBR Gold. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 539-545.

Cochlan, W.P., Wikner, J., Steward, G.F., Smith, D.C., Azam, F., 1993. Spatial distribution of viruses, bacteria and chlorophyll a in neritic, oceanic and estuarine environments. *Marine Ecology Progress Series*, 92, 77-87.

Colombet, J., Sime-Ngando, T., Cauchie, H.M., Fonty, G., Hoffmann, L., Demeure, G., 2006. Depth-related gradients of viral activity in Lake Pavin, *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 4440-4445.

Corinaldesi, C., Crevatin, E., Del Negro, P., Marini, M., Russo, A., Fonda-Umani, S., Danovaro, R., 2003. Large-scale spatial distribution of virioplankton in the adriatic

sea: Testing the trophic state control hypothesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2664-2673.

Culley, A.I. & Welschmeyer, N.A. 2002. The abundance, distribution, and correlation of viruses, phytoplankton, and prokaryotes along a Pacific Ocean transect. *Limnology and Oceanography*, 47, 1508-1513.

Danovaro, R., Serresi, M., 2000. Viral density and virus-to-bacterium ratio in deep-sea sediments of the Eastern Mediterranean. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1857-1861.

Danovaro, R., Manini, E., Dell'Anno, A. 2002. Higher abundance of bacteria than of viruses in deep Mediterranean sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1468-1472.

Fuhrman, J.A., 1999. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, 399, 541-548.

Guixa-Boixereu, N., Vaqué, D., Gasol, J.M., Pedrós-Alió, C., 1999. Distribution of viruses and their potential effect on bacterioplankton in an oligotrophic marine system. *Aquatic Microbial Ecology*, 19, 205-213.

Hara, S., Koike, I., Terauchi, K., Kamiya, H., Tanoue, E., 1996. Abundance of viruses in deep oceanic waters. *Marine Ecology Progress Series*, 145, 269-277.

Hwang, C.Y., Cho, B.C., 2002. Virus-infected bacteria in oligotrophic open waters of the East Sea, Korea. *Aquatic Microbial Ecology*, 30, 1-9.

Ignatiades, L. 1998, The productive and optical status of the oligotrophic waters of the Southern Aegean Sea (Cretan Sea), Eastern Mediterranean. *Journal of Plankton Research*, 20, 985-995.

Ignatiades, L., Psarra, S., Zervakis, V., Pagou, K., Souvermezoglou, E., Assimakopoulou, G., Gotsis-Skretas, O., 2002. Phytoplankton size-based dynamics in the Aegean Sea (Eastern Mediterranean). *Journal of Marine Systems*, 36, 11-28.

Krom, M.D., Brenner, S., Israilov, L., Krumgalz, B., 1991. Dissolved nutrients, preformed nutrients and calculated elemental ratios in the south-east Mediterranean Sea. *Oceanologica Acta*, 14, 189-194.

Li, W.K.W., Zohary, T., Yacobi, Y.Z. and Wood, A.M., 1993. Ultraphytoplankton in the eastern Mediterranean Sea - Towards deriving phytoplankton biomass from flow cytometric measurements of abundance, fluorescence and light scatter. *Marine Ecology Progress Series*, 102, 79-88.

Magagnini, M., Corinaldesi, C., Monticelli, L.S., De Domenico, E., Danovaro, R., 2007.

Viral abundance and distribution in mesopelagic and bathypelagic waters of the Mediterranean Sea. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 54, 1209-1220.

Maranger, R., Bird, D.F., 1995. Viral abundance in aquatic systems: A comparison between marine and fresh waters. *Marine Ecology Progress Series*, 121, 217-226.

Marie, D., Brussaard, C.P.D., Thyraug, R., Bratbak, G., Vaulot, D., 1999. Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 45-52.

Mathias, C.B., Kirschner, A.K.T., Velimirov, B., 1995. Seasonal variations of virus abundance and viral control of the bacterial production in a backwater system of the Danube River. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3734-3740.

Middelboe, M., 2000. Bacterial growth rate and marine virus-host dynamics. *Microbial Ecology*, 40, 114-124.

Murray, A.G., Jackson, G.A., 1992. Viral dynamics: a model of the effects of size, shape, motion and abundance of single-celled planktonic organisms and other particles. *Marine Ecology Progress Series*, 89, 103-116.

Noble, R.T., Fuhrman, J.A., 1998. Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 14, 113-118.

Ortmann, A.C., Suttle, C.A., 2005. High abundances of viruses in a deep-sea hydrothermal vent system indicates viral mediated microbial mortality. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 52, 1515-1527.

Øvreås, L., Bourne, D., Sandaa, R.-A., Casamayor, E.O., Benlloch, S., Goddard, V., Smerdon, G., Heldal, M., Thingstad, T.F., 2003. Response of bacterial and viral communities to nutrient manipulations in seawater mesocosms. *Aquatic Microbial Ecology*, 31, 109-121.

Parada, V., Sintes, E., Van Aken, H.M., Weinbauer, M.G., Herndl, G.J., 2007. Viral abundance, decay, and diversity in the meso- and bathypelagic waters of the North Atlantic. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 4429-4438.

Payet, J.P., Suttle, C.A., 2008. Physical and biological correlates of virus dynamics in the southern Beaufort Sea and Amundsen Gulf. *Journal of Marine Systems*, 74, 933-945.

Personnic, S., Domaizon, I., Dorigo, U., Berdjeb, L., Jacquet, S., 2009. Seasonal and spatial variability of virio-, bacterio-, and picophytoplanktonic abundances in three peri-alpine lakes. *Hydrobiologia*, 627, 99-116.

Proctor, L.M., Okubo, A., Fuhrman, J.A., 1993. Calibrating estimates of phage-induced mortality in marine bacteria: Ultrastructural studies of marine bacteriophage development from one-step growth experiments. *Microbial Ecology*, 25, 161-182.

Psarra, S., Tselepides, A. and Ignatiades, L., 2000. Primary productivity in the oligotrophic Cretan Sea (NE Mediterranean): Seasonal and interannual variability. *Progress in Oceanography*, 46, 187-204.

Sempéré, R., Panagiotopoulos, C., Lafont, R., Marroni, B. , Van Wambeke, F., 2002. Total organic carbon dynamics in the Aegean Sea. *Journal of Marine Systems*, 33-34, 355-364.

Siokou-Frangou, I., Bianchi, M., Christaki, U., Christou, E.D., Giannakourou, A., Gotsis, O., Ignatiades, L., Pagou, K., Pitta, P., Psarra, S., Souvermezoglou, E., Van Wambeke, F. , Zervakis, V., 2002. Carbon flow in the planktonic food web along a gradient of oligotrophy in the Aegean Sea (Mediterranean Sea), *Journal of Marine Systems*, 33-34, 335-353.

Siokou-Frangou, I., Christaki, U., Mazzocchi, M.G., Montresor, M., Ribera D'Alcalá, M., Vaqué, D., Zingone, A. 2009. Plankton in the open Mediterranean Sea: A review. *Biogeosciences Discussions*, 6, 11187-11293.

Souvermezoglou E, 1989. Nutrients and oxygen. In A. Boussoulengas and A.V. Catsiki (eds), *Pollution research and monitoring programme in the Aegean and Ionian Seas*, Report II, 1986-1987. National Center for Marine Research, 88-102.

Stopar, D., Černe, A., Žigman, M., Poljšak-Prijatelj, M., Turk, V., 2004. Viral abundance and a high proportion of lysogens suggest that viruses are important members of the microbial community in the Gulf of Trieste. *Microbial Ecology*, 47, 1-8.

Suttle, C.A., Chen, F., 1992. Mechanisms and rates of decay of marine viruses in seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3721-3729.

Suttle, C.A., 1994. The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities. *Microbial Ecology*, 28, 237-243

Suttle, C.A., 2007. Marine viruses - Major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology*, 5, 801-81.

Theocharis, A., Georgopoulos, D., Lascaratos, A. & Nittis, K., 1993, Water masses and circulation in the central region of the Eastern Mediterranean: Eastern Ionian, South Aegean and Northwest Levantine, 1986-1987, *Deep-Sea Research Part II*, 40, 1121-1142.

Thingstad, T.F., Lignell, R., 1997. Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand. *Aquatic Microbial Ecology*, 13, 19-27

Thingstad, T.F., Bratbak, G., Heldal, M., 2008. Aquatic phage ecology, in: Abedon, S., T. (Ed.), *Bacteriophage ecology: Population growth, evolution and impact of bacterial viruses*. Cambridge University Press, pp 251-280.

Turley, C.M., Bianchi, M., Christaki, U., Conan, P., Harris, J.R.W., Psarra, S., Ruddy, G., Stutt, E.D., Tselepides, A., Van Wambeke, F., 2000. Relationship between primary producers and bacteria in an oligotrophic sea - The Mediterranean and biogeochemical implications. *Marine Ecology Progress Series*, 193, 11-18.

Vidussi, F., Claustre, H., Manca, B.B., Luchetta, A. and Marty, J., 2001. Phytoplankton pigment distribution in relation to upper thermocline circulation in the eastern Mediterranean Sea during winter. *Journal of Geophysical Research C: Oceans*, 106, 19939-19956.

Weinbauer, M.G., Fuks, D., Peduzzi, P., 1993. Distribution of viruses and dissolved DNA along a coastal trophic gradient in the northern Adriatic Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 4074-4082.

Weinbauer, M.G., Fuks, D., Puskaric, S., Peduzzi, P., 1995. Diel, seasonal, and depth-related variability of viruses and dissolved DNA in the northern Adriatic Sea. *Microbial Ecology*, 30, 25-41.

Weinbauer, M.G., Suttle, C.A., 1997. Comparison of epifluorescence and transmission electron microscopy for counting viruses in natural marine waters. *Aquatic Microbial Ecology*, 13, 225-232.

Weinbauer, M.G., Höfle, M.G., 1998. Size-specific mortality of lake bacterioplankton by natural virus communities. *Aquatic Microbial Ecology*, 15, 103-113.

Weinbauer, M.G., Brettar, I., Höfle, M.G., 2003. Lysogeny and virus-induced mortality of bacterioplankton in surface, deep, and anoxic marine waters. *Limnology and Oceanography*, 48, 1457-1465.

Weinbauer, M.G., 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 127-181

Weinbauer, M.G., Rassoulzadegan, F., 2004. Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environmental Microbiology*, 6, 1-11

Wilhelm, S.W., Suttle, C.A., 1999. Viruses and nutrient cycles in the sea. *BioScience*, 49, 781-788.

Wilson, W.H., Turner, S., Mann, N.H., 1998. Population dynamics of phytoplankton and viruses in a phosphate-limited mesocosm and their effect on DMSP and DMS production. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 46, 49-59.

Winter, C., Kerros, M.-E., Weinbauer, M.G., 2009. Seasonal and depth-related dynamics of prokaryotes and viruses in surface and deep waters of the northwestern Mediterranean Sea. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 56, 1972-1982.

Wommack, K.E., Colwell, R.R., 2000. Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 69-114.

Yacobi YZ, Zohary T, Kress N, Hecht A, Robarts RD, Waiser M, Wood AM, Li WKW., 1995. Chlorophyll distribution throughout the southeastern Mediterranean in relation to the physical structure of the water mass. *Journal of Marine Systems*, 6, 179-190.

Zervakis V., Georgopoulos D., 2002. Hydrology and circulation in the North Aegean (eastern Mediterranean) throughout 1997 and 1998. *Mediterranean Marine Science*, 3, 5-19.

Zachary, A., 1978. An ecological study of bacteriophages of *Vibrio natriegens*. *Canadian Journal of Microbiology*, 24, 321-324.

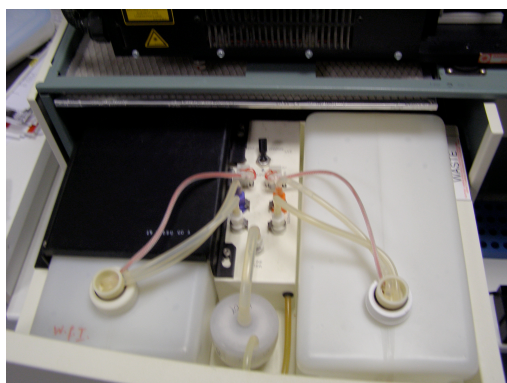
Zohary, T., Robarts, R.D., 1998. Experimental study of microbial P limitation in the eastern Mediterranean. *Limnology and Oceanography*, 43, 387-395.

Παράρτημα Ι: Ο Κυτταρομετρητής Ροής

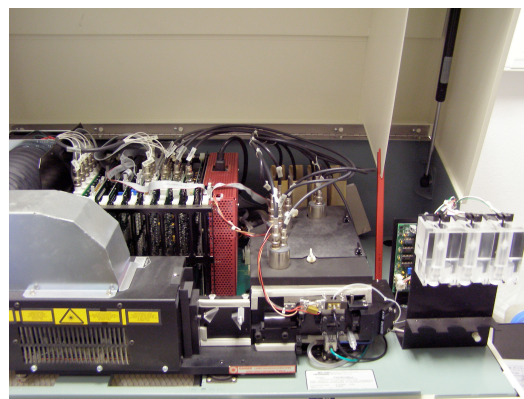
Η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιείται για μοριακούς και βιοϊατρικούς σκοπούς από την δεκαετία ακόμα του 1970. Αρχικά αναπτύχθηκε για να μετρά ανθρώπινα κύτταρα (αίμα, κ.α.) όμως η χρήση της ήταν ακριβή και απαιτούσε εξειδικευμένο προσωπικό. Στην πορεία του χρόνου όμως έγινε πιο εύχρηστη επιτρέποντας την χρήση της από εργαστήρια περιβαλλοντικών ερευνών. Τα ιδιαίτερα σημαντικά πλεονεκτήματά της έναντι άλλων τεχνικών, όπως του μικροσκοπίου, όσον αφορά τον χρόνο ανάλυσης των δειγμάτων και την μέτρηση πολλών άλλων παραμέτρων, την έκαναν γρήγορα ένα σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη της περιβαλλοντικής βιολογίας.

Στον τομέα της θαλάσσιας βιολογίας χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση των προχλωροφυκών (εντοπίστηκαν πρώτη φορά χάρις στην τεχνική αυτή σε δείγματα νερού από τον Βόρειο Ατλαντικό και τον Ειρηνικό) που δεν είναι εύκολο να γίνει με το μικροσκόπιο, για την καταμέτρηση βακτηρίων, μαστιγωτών και ιών, για την ανάλυση της φυσιολογίας των μικροβίων π.χ. τη διάκριση ενεργών – ανενεργών, για τη μελέτη της μικροβιακής ανάπτυξης, κ.α. (ένα εξαιρετικό, πολύ πρόσφατο και συνοπτικό review είναι αυτό των Czechowska et al 2008).

Ένας κυτταρομετρητής ροής αποτελείται από 2 κύρια τμήματα. Το υδραυλικό (Σχήμα 6) και το ηλεκτρονικό (Σχήμα 7).

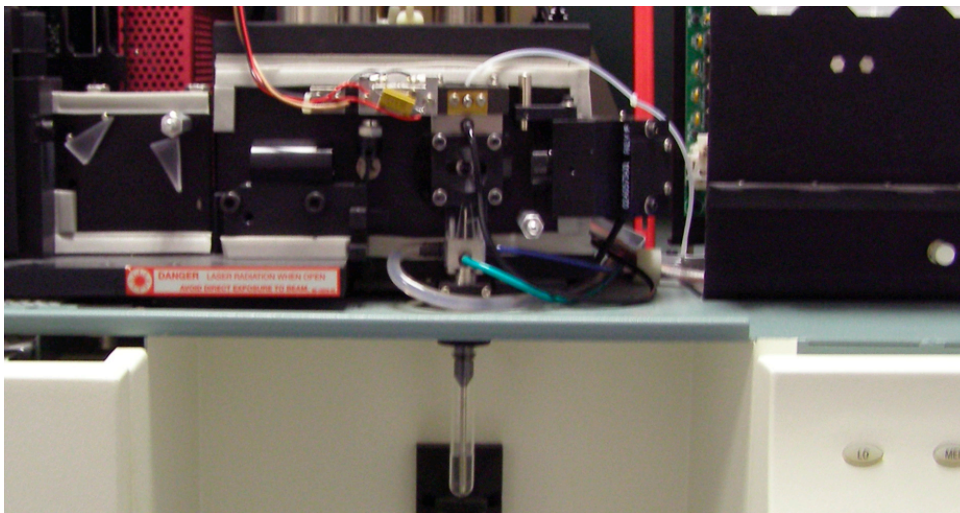


Σχήμα 7. Το υδραυλικό τμήμα του κυτταρομετρητή ροής



Σχήμα 6. Το ηλεκτρονικό τμήμα του κυτταρομετρητή ροής

Η βασική αρχή λειτουργίας: το δείγμα προς ανάλυση συγκεντρώνεται με την βοήθεια του υγρού ροής (sheath fluid) σε μια στενή οπή (Σχήμα 8) το flow cell, από την οποία θεωρητικά περνά ένα – ένα κύτταρο. Η ροή αυτή είναι ευθυγραμμισμένη προκειμένου τα κύτταρα να περνούν ακριβώς μπροστά από μια δέσμη ακτινοβολίας λέιζερ (πχ 454 – 676 nm). Όταν η δέσμη του λέιζερ έρθει σε επαφή με το κύτταρο, ένα μέρος της σκεδάζεται με το σκεδαζόμενο φως να συλλέγεται από ανιχνευτές σε σταθερές γωνίες 90° (SSC) και 0° (FSC). Η σκεδαζόμενη ακτινοβολία δίνει πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος (κυρίως αυτή που σκεδάζεται στις 0°), σχήμα, δομή και υφή του κυττάρου (κυρίως αυτή που σκεδάζεται στις 90°).

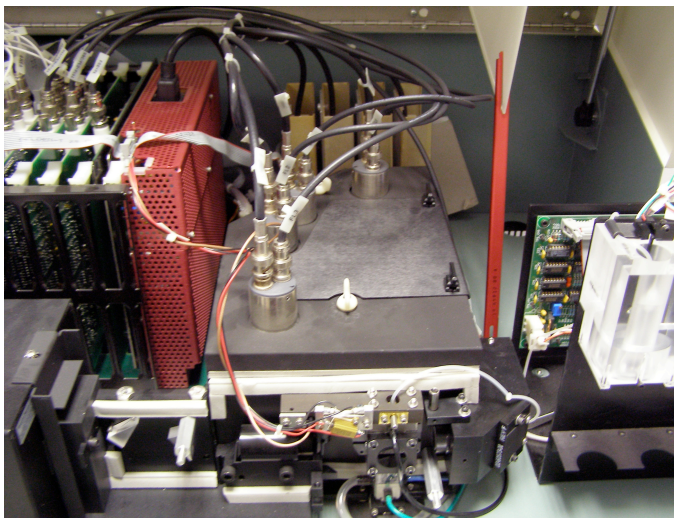


Σχήμα 8. Το flow cell

Η ακτινοβολία του λέιζερ μπορεί να προκαλέσει και φθορισμό ο οποίος εντοπίζεται από άλλους ανιχνευτές. Ο φθορισμός αυτός μπορεί να είναι είτε από ουσίες χαρακτηριστικές του κυττάρου, όπως η χλωροφύλλη και η φυκοερυθρίνη, είτε να προέρχεται από τεχνητή σήμανση του γενετικού υλικού του κυττάρου με μοριακούς σημαντές όπως το SYBRGreen I, YO-PRO, DAPI, κτλ. Η ακτινοβολία φθορισμού διαχωρίζεται από μονοχρωματικά φίλτρα ανάλογα με το μήκος κύματος που είναι προσαρμοσμένος να ανιχνεύει ο κάθε ανιχνευτής. Ο ανιχνευτής FL1 είναι προσαρμοσμένος για πράσινη ακτινοβολία, χαρακτηριστική των μοριακών σημαντών, ο ανιχνευτής FL2 για πορτοκαλί, χαρακτηριστικό της φυκοερυθρίνης και

ο ανιχνευτής FL3 για κόκκινη, που είναι η ακτινοβολία φθορισμού της χλωροφύλλης όταν διεγείρεται από μπλέ ή UV ακτινοβολία. Από την ακτινοβολία φθορισμού είναι εφικτό να διαχωριστούν τα κύτταρα ανάλογα με το είδος τους (κυανοβακτήρια, προχλωροφύκη, High DNA Bacteria, κ.ο.κ.

Σε κάθε ανιχνευτή είναι προσαρμοσμένος ένας φωτοπολλαπλασιαστής προκειμένου να ενισχύει κατάλληλα το σήμα. Ανάλογα με το κάθε είδος κυττάρου που θέλουμε να ανιχνεύσουμε προσαρμόζεται και η τάση (voltage) σε κάθε φωτοπολλαπλασιαστή. Παράδειγμα, εάν θέλουμε να εντοπίσουμε προχλωροφύκη που έχουν πολύ μικρή ποσότητα χλωροφύλλης ανά κύτταρο θα πρέπει να



Σχήμα 9. Οι ανιχνευτές της φθορίζουσας και σκεδαζόμενης ακτινοβολίας

αυξήσουμε την τάση του φωτοπολλαπλασιαστή FL3 πολύ περισσότερο σε σχέση με αυτήν που θα είχαμε εάν θέλαμε να αναλύσουμε κύτταρα αυτότροφων μαστιγωτών. Ο συνδυασμός των τάσεων για κάθε ανιχνευτή είναι τα settings του οργάνου.

Το κάθε οπτικό σήμα που φτάνει στους ανιχνευτές μετατρέπεται σε ηλεκτρικό σήμα και προβάλλεται στα ειδικά διαγράμματα του λογισμικού στον υπολογιστή ως μία τελεία (dot) ανάλογα με την ένταση που είχε σε κάθε έναν ανιχνευτή. Κάθε συνδυασμός τέτοιων σημάτων αναλογεί σε ένα κύτταρο και καταγράφεται ως count.

Παράρτημα II: Ανάλυση δειγμάτων με κυτταρομετρητή ροής

Συλλογή και συντήρηση δειγμάτων

1. Συντήρηση δειγμάτων με glutaraldehyde 0.5% τελική συγκέντρωση φιλτραρισμένη σε 0.2μm (40μl glutaraldehyde 25% σε όγκο δείγματος 2ml).
2. Παραμονή για περίπου 15 – 30 min στο σκοτάδι προκειμένου να δράσει το συντηρητικό.
3. Απότομη ψήξη σε υγρό άζωτο
4. Έπειτα τα δείγματα μπορούν να παραμείνουν για μακροχρόνια αποθήκευση στους -80 °C.
5. Τα δείγματα φυτοπλαγκτού είναι προτιμότερο να αναλύονται φρέσκα, χωρίς συντήρηση. Σε περίπτωση που αυτό δεν είναι εφικτό τότε τα δείγματα μπορούν να συντηρηθούν όπως παραπάνω ή χρησιμοποιώντας παραφορμαλδεΐδη ή απλά φορμαλδεΐδη.
6. Τα βακτήρια επίσης μπορούν να αναλυθούν φρέσκα, χωρίς συντήρηση. Οι ιοί είναι προτιμότερο να συντηρούνται καθώς ενισχύεται το καψίδιό τους και ο φθορισμός τους έχει μεγαλύτερη ένταση.

Ανάλυση δειγμάτων στον κυτταρομετρητή

Τα δείγματα των αυτότροφων κυττάρων δεν χρειάζονται καμία επεξεργασία πριν την ανάλυση. Για τα δείγματα των βακτηρίων πρέπει να ακολουθηθεί η παρακάτω διαδικασία

1. Τα δείγματα από τη στιγμή που αποψύχονται θα πρέπει να αναλυθούν ΑΜΕΣΑ καθώς η αφθονία των ιών μειώνεται στο μισό μέσα σε μία ώρα.
2. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιούνται δύο falcon tubes, ένα για τους ιούς και ένα για τα βακτήρια.

3. Ανάλογα με την πυκνότητα σε κύτταρα του δείγματος γίνεται και η αραιώσή του με autoclaved Tris-EDTA (10mM-0.5mM, pH=8) buffer solution (παρακάτω υπάρχει η «συνταγή»). Το events s^{-1} rate του οργάνου πρέπει να είναι μεταξύ 150 και 700 events s^{-1} . Συνηθέστερες αραιώσεις για τα δείγματα των ιών είναι από 1/20 (475μl TE σε 25μl δείγματος) έως 1/100 (990μl TE σε 10μl δείγματος). Συνηθέστερες αραιώσεις για τα δείγματα των βακτηρίων είναι από 1x (pure sample) έως 1/5 (400ml TE σε 100ml δείγματος). Γενικά να αποφεύγεται η χρήση δείγματος μικρότερου των 10μl λόγω μη ακρίβειας των πιπετών.
4. Σε κάθε δείγμα προστίθεται το SYBRGreen I. Σε 500μl δείγματος προστίθενται 10μl SYBRGreen I σε αραιώση 200x για τα βακτήρια και 5μl σε αραιώση 50x για τους ιούς.
5. Ακολουθεί επώαση για 10 min, σε θερμοκρασία δωματίου και σκοτάδι για τα βακτήρια και 80 °C για τους ιούς.
6. Με το πέρας των 10 min αφήνουμε τα δείγματα των ιών λίγα λεπτά να πέσει η θερμοκρασία τους πριν αναλυθούν στον κυτταρομετρητή.
7. Τα settings του οργάνου για κάθε μέτρηση είναι στον Πίνακα 4.
8. Κατά κανόνα η κάθε μέτρηση στον κυτταρομετρητή διαρκεί 1 min με flow rate προσαρμοζόμενο ανάλογα προκειμένου το events rate να είναι μεταξύ 150 και 700 events s^{-1} . Είναι πάντως καλύτερο να έχουμε για όλα τα δείγματα σταθερή ταχύτητα προκειμένου το σφάλμα λόγω flow rate να είναι κοινό παντού. Αυτό όμως δεν είναι καθόλου εύκολο να γίνει για δείγματα από διαφορετικά βάθη και περιοχές.

Πίνακας 4. Τα settings του κυτταρομετρητή ροής για κάθε είδος μέτρησης

Measurement	Detectors	Voltage	Amp. Gain	Mode
Autotrophic cells	FSC	E01	1.00	Log
	SSC	450	1.00	Log
	FL1	600	1.00	Log
	FL2	600	1.00	Log
	FL3	600	1.00	Log
	Threshold at FL3 = 60			

Heterotrophic Bacteria	FSC	E02	1.00	Log
	SSC	525	1.00	Log
	FL1	466	1.00	Log
	FL2	550	1.00	Log
	FL3	450	1.00	Log
	Threshold at FL1 = 150			
Viruses	FSC	E02	1.00	Log
	SSC	628	1.00	Log
	FL1	590	1.00	Log
	FL2	500	1.00	Log
	FL3	500	1.00	Log
	Threshold at FL1 = 52			

Tris – EDTA (10mM – 0.5mM, pH=8) Buffer Solution

1. Αρχικά φτιάχνουμε το διάλυμα του 10mM TRIS:
 - Για 20ml του παραπάνω διαλύματος χρησιμοποιούμε 2.42gr TRIS (Sigma-Aldrich, Cat: 25,285-9)
 - Προσαρμόζουμε το pH κοντά στο 8 χρησιμοποιώντας πυκνό HCl (ενδεικτικά περίπου 2ml HCl 5M).
 - Πριν κάνουμε την τελική προσαρμογή του pH προσθέτουμε μια μικρή ποσότητα HCl και το αφήνουμε overnight για να διαλυθεί η σκόνη.
2. Έπειτα φτιάχνουμε το διάλυμα του 0.5 mM EDTA:
 - Για 100ml του παραπάνω διαλύματος προσθέτουμε 18.61 gr EDTA (Fluka – Sigma-Aldrich)
 - Προσαρμόζουμε το pH με NaOH. Προσθέτουμε αργά διότι η αλλαγή του pH θα είναι απότομη.
3. Για το τελικό διάλυμα του TE βάζουμε 5ml του Tris και 1ml του EDTA σε 500ml MilliQ. Προσαρμόζουμε το pH στο 8 (εδώ είναι κυρίως που μας ενδιαφέρει το pH).

Σε κάθε περίπτωση το νερό που θα χρησιμοποιήσουμε πρέπει να είναι MilliQ και αποστειρωμένο. Επίσης καλό είναι να είναι αποστειρωμένα και όλα τα γυαλικά πριν τα χρησιμοποιήσουμε.

Το TE χαλάει εύκολα (μόλυνση). ΠΟΛΥ ΕΥΚΟΛΑ. **ΚΑΘΕ 3 ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ ΠΕΡΙΠΟΥ ΘΕΛΕΙ ΝΕΟ ΔΙΑΛΥΜΑ.** Μπορούμε να χρησιμοποιούμε τα ήδη υπάρχοντα διαλύματα του TRIS και του EDTA αλλά το MilliQ θέλει ανανέωση (δηλαδή φρέσκο).

Πριν οποιαδήποτε χρήση του TE (κάθε πρωί δηλαδή) να αποστειρώνεται (από την προηγούμενη μέρα αλλά δεν το βγάζουμε από το αυτόκαυστο) **και να φιλτράρεται** σε φίλτρα – σβούρες των 0.2μm αμέσως πριν τη χρήση (ή ακόμα καλύτερα 0.02μm αλλά είναι ακριβά).

Κάθε μέρα παίρνουμε noise background από το TE (δηλαδή κανονική μέτρηση με σήμανση SYBRGreen I). Ένα καλό TE και με το όργανο σε καλή κατάσταση επίσης δεν θα πέπει να δίνει noise περισσότερα από 400 events σε low, 550 med και 900 σε high speed. Στα βακτήρια το noise πρέπει να είναι μονοψήφιο. Αυτό όμως εξαρτάται και από το που βρίσκονται (σε ποιά ένταση σε FL1 και SSC) τα gates. Αν κάτι από αυτά δεν μπορεί να επιτευχθεί, κάνουμε κατά σειρά: (1) καθαρίζουμε το όργανο (ακόμα και big clean), (2) ξανακάνουμε τη μέτρηση με bypassed το φίλτρο του flow (μπορεί να θέλει αλλαγή – βλέπε 100 κάτι ευρώ), (3) φτιάχνουμε καινούργιο TE, (4) ελέγχουμε το TE στο μικροσκόπιο φθορισμού (βλέπε rotation Δήμητρας Νουσιδίλη) και αν δεν βλέπουμε noise και στο μικροσκόπιο (5) παίρνουμε τηλέφωνο στην BD Hellas (ή αλλάζουμε project).

Τα διαλύματα του SYBRGreen I

Το SYBRGreen I έρχεται σε commercial dilution 10000x και συσκευασία συνήθως των 500μl. Γενικώς δεν αντέχει πολλούς κύκλους ψύξης – απόψυξης και για το λόγο αυτό το μοιράζουμε σε 10 erpendorfs (50μl σε κάθε ένα) stock solution. Παίρνουμε ένα κάθε φορά και από αυτό φτιάχνουμε τα dilutions που χρειαζόμαστε για τους ιούς και τα βακτήρια. Ό,τι περισσέψει το ξαναπαγώνουμε. Τα dilutions για τα δείγματα τα φτιάχνουμε σε ξεχωριστά erpendorfs. Δεν φτιάχνω πολύ κάθε φορά διότι το SYBRGreen σε μικρότερο dilution από το stock χαλάει με τον καιρό. Οπότε

φτιάχνω sample dilutions για περίπου 50 samples κάθε φορά.

- Dilution for Viruses: Θέλουμε από το 10000x να πάμε στο 50x οπότε χρησιμοποιούμε 1.25μl stock και 250μl TE.
- Dilution for Bacteria: Θέλουμε από το 10000x να πάμε στο 200x οπότε χρησιμοποιούμε 10μl stock και 500μl TE.

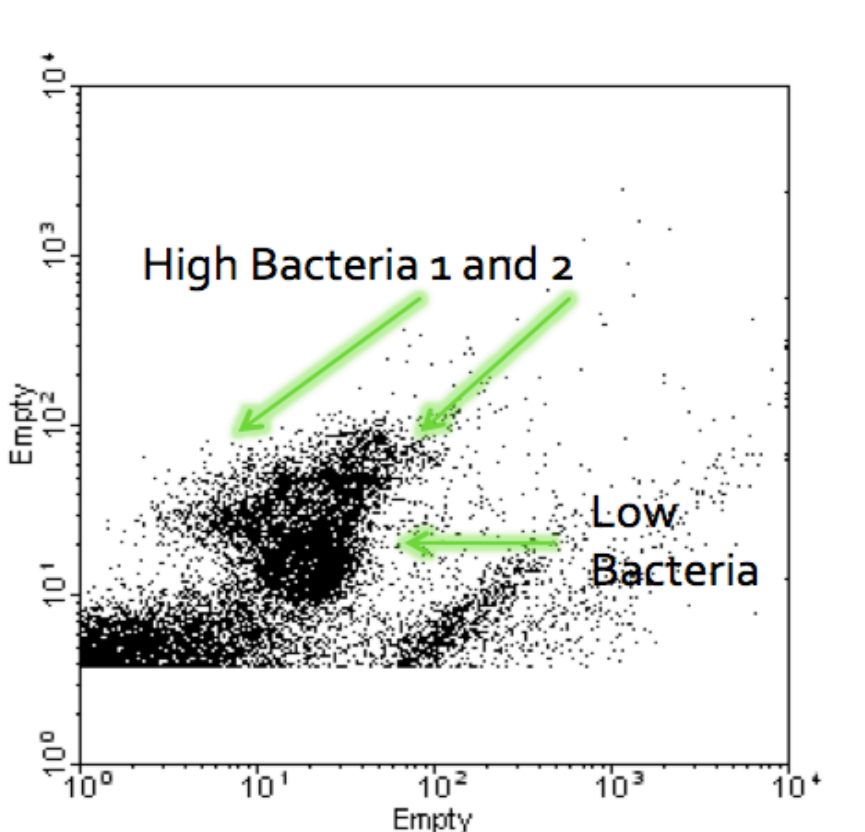
Όλα αυτά καλό είναι να γίνονται σε χαμηλό φωτισμό και **ΓΡΗΓΟΡΑ** (να μη μένει πολύ ώρα σε θερμοκρασία δωματίου). Πριν χρησιμοποιηθεί το SYBRGreen να έχει λιώσει τελείως και να έχει αναμειχθεί (πιπεταριστεί) **ΠΟΛΥ ΚΑΛΑ** προκειμένου να έχουμε ομοιόμορφο φθορισμό κάθε φορά (για να γίνεται και σύγκριση στο φθορισμό μεταξύ των δειγμάτων). **ΠΡΟΣΟΧΗ να μην έρθει σε επαφή με το δέρμα.**

Το κάθε sample dilution να μην μένει πολλή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και έντονο φωτισμό και να μην χρησιμοποιείται για περισσότερες από 4-5 φορές (κύκλους ψύξης – απόψυξης).

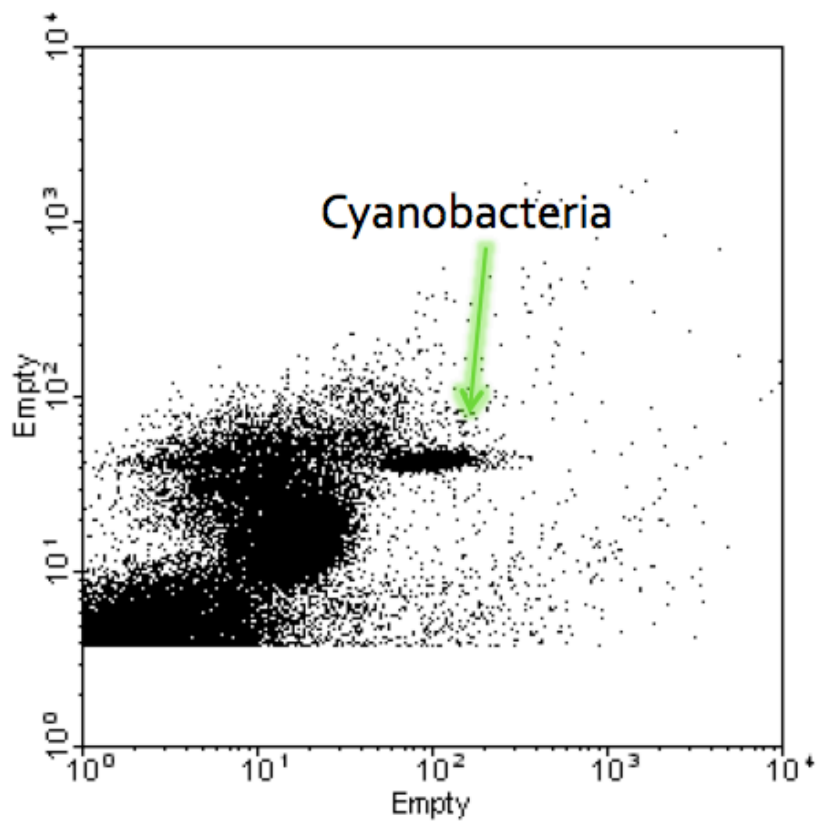
Παράρτημα III: Ανάλυση Δεδομένων

Τα δεδομένα του κυτταρομετρητή μπορούν να αναπαραστούν με dot plots (διαγράμματα σημείων), με ιστογράμματα και με density plots (εάν το πρόγραμμα που χρησιμοποιούμε είναι αρκετά καλό).

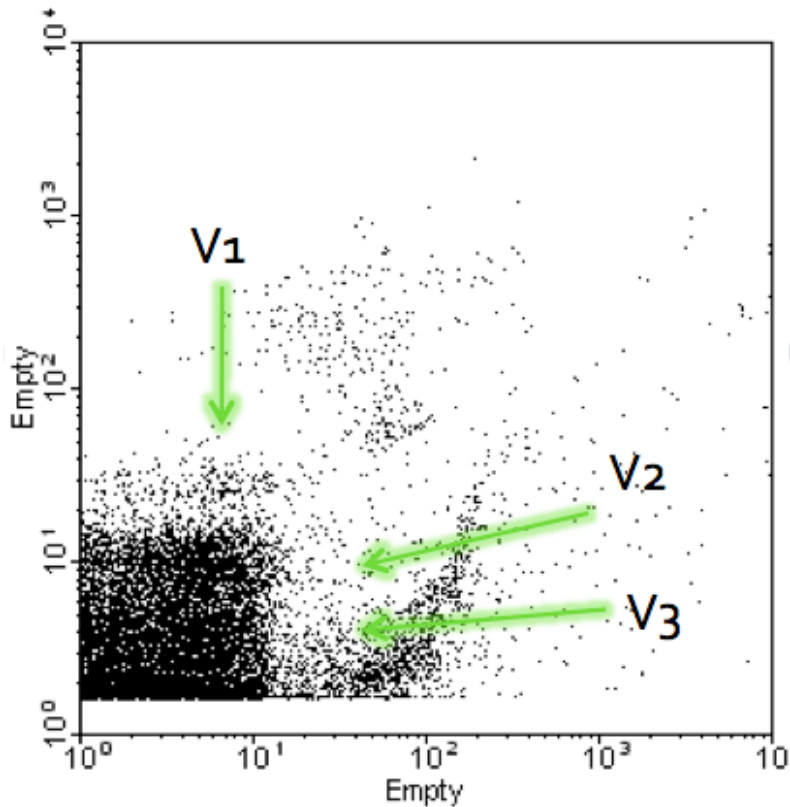
Παρακάτω είναι τρία χαρακτηριστικά dot plots (SSC vs FL1) όπου διακρίνονται οι δύο χαρακτηριστικοί πληθυσμοί βακτηρίων και οι τρεις των ιών. Το gate των ιών έχει οριστεί στα FL1 = $\sim 10 - 50$ και SSC = $\sim 0 - 10 + 1/3$.



Εδώ βλέπουμε τις ομάδες High και Low των βακτηρίων. Πολλές φορές είναι εμφανείς και επιμέρους ομάδες.



Στα ρηχά νερά πολλές φορές ξεχωρίζουν και τα κυανοβακτήρια. Αυτά πάντα εμφανίζονται μαζί με τα High βακτήρια. Καλύτερα διακρίνονται σε ένα διάγραμμα FL1 vs FL3.



Εδώ εμφανίζονται οι τρεις ομάδες των ιών. Ο διαχωρισμός τους δεν είναι πάντα εφικτός. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούμε σταθερά gates για την κάθε ομάδα.

