



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**«Μοριακή χαρτογράφηση μικροβιακών κοινοτήτων υδάτινων
οικοσυστημάτων της Ηπείρου και μελέτη αξιοποίησής τους ως
πηγών πιθανών αντικαρκινικών παραγόντων»**

Αναστασία Τούκα
Βιολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**«Μοριακή χαρτογράφηση μικροβιακών κοινοτήτων υδάτινων
οικοσυστημάτων της Ηπείρου και μελέτη αξιοποίησής τους ως
πηγών πιθανών αντικαρκινικών παραγόντων»**

Αναστασία Τούκα
Βιολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)

Ημερομηνία αίτησης της κ. Τούκα Αναστασίας: 9-2-2011

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 708^α/8-3-2011

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Φριλίγγος Ευστάθιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη

Μπριασούλης Ευάγγελος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

John Halley, Αναπληρωτής Καθηγητής Λειτουργικής Οικολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 12-4-2011

«Μοριακή χαρτογράφηση μικροβιακών κοινοτήτων υδάτινων οικοσυστημάτων της Ηπείρου και μελέτη αξιοποίησής τους ως πηγών πιθανών αντικαρκινικών παραγόντων»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 794^α/31-1-2017

Παπαδοπούλου Χρυσάνθη	Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
Φριλίγγος Ευστάθιος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
Τζαβάρας Θεόδωρος	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
Καταπόδης Πέτρος	Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημικής Μηχανικής, του Τμήματος BET του Παν/μίου Ιωαννίνων
Τράγκα Θεώνη	Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος BET του Παν/μίου Ιωαννίνων
John Halley	Καθηγητής Οικολογίας του Τμήματος BET του Παν/μίου Ιωαννίνων
Χατζηκακού Σωτήριος	Καθηγητής Ανόργανης Χημείας του Τμήματος Χημείας του Παν/μίου Ιωαννίνων

ΑΝΑΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 846^α/27-3-2018

Παπαδοπούλου Χρυσάνθη	Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
Φριλίγγος Ευστάθιος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
Τζαβάρας Θεόδωρος	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων

Σταμάτης Χαράλαμπος

Καθηγητής Ενζυμικής Βιοτεχνολογίας του Τμήματος ΒΕΤ του Παν/μίου Ιωαννίνων

Τράγκα Θεώνη

Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος ΒΕΤ του Παν/μίου Ιωαννίνων

Χατζηκακού Σωτήριος

Καθηγητής Ανόργανης Χημείας του Τμήματος Χημείας του Παν/μίου Ιωαννίνων

Καταπόδης Πέτρος

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημικής Μηχανικής, του Τμήματος ΒΕΤ του Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 17-4-2018

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μηνάς Πασχόπουλος

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Αφιέρωσεις

Στην Οικογένειά μου,
στη Γιαγιά Αναστασία

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Διεπιστημονικό Εργαστήριο Μοριακής Ογκολογίας, Κέντρο Βιοτρόπεζας Καρκίνου, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Πολλές συνεργασίες δημιουργήθηκαν και πολλοί άνθρωποι συνεισέφεραν στην ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Ευστάθιο Φριλίγγο για το αμείωτο ενδιαφέρον του, τις σημαντικές συμβουλές και τη βοήθειά του όλα αυτά τα χρόνια που συνεργαστήκαμε, καθώς και για την απεριόριστη υπομονή του. Υπήρξε πάντα προσιτός και πρόθυμος να βοηθήσει σε όποια δυσκολία προέκυπτε.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βαθέων τον αείμνηστο Καθηγητή Ευάγγελο Μπριασούλη, εμπνευστή και δημιουργό της Βιοτρόπεζας Καρκίνου του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, που μου έδωσε την ευκαιρία αρχικά στα πλαίσια της πτυχιακής μου εργασίας και στη συνέχεια της Διδακτορικής μου διατριβής, να αποτελέσω μέλος της ερευνητικής ομάδας του νεοσύστατου τότε ερευνητικού εργαστηρίου και να συνεργαστώ μαζί του δημιουργικά για αρκετά χρόνια. Η επιμονή του, η σοφή καθοδήγησή του, το πάθος του για την Ιατρική επιστήμη και έρευνα, η διορατικότητά του αλλά και η ανεξάντλητη ενέργειά του, ήταν και είναι για μένα μαθήματα και βιώματα ζωής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Δρ κ. Ιωάννη Σαΐνη και στην Δρ. κ. Κατερίνα Βαρέλη για την έμπνευση, την καθοδήγηση και τις ατελείωτες ώρες που αφιέρωσαν για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Για την αμέριστη ψυχολογική υποστήριξη και συμπαράσταση όπου μετά από τόσα χρόνια καθημερινής επικοινωνίας αποτελούν για μένα οικογένεια.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. John Maxwell Halley για την αγαστή συνεργασία και τις συμβουλές του καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για τον χρόνο που διέθεσαν προκειμένου να κρίνουν την παρούσα εργασία.

Ευχαριστώ από καρδιάς τη φίλη μου Δρ. κ. Μαρία Ιγγλέζου για τη βοήθεια και την συμπαράστασή της, με την οποία μοιράστηκα ενθουσιασμό και προκλήσεις, δυσκολίες και ευχάριστες στιγμές δουλεύοντας παρέα σε ένα κλίμα που ήταν πάντα ιδανικό,

καθώς και τον Δρ. κ. Βαλεντίνο Κουννή για την στήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές ειδικά στο ξεκίνημα της διατριβής μου. Ευχαριστώ επίσης όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη στήριξή τους και για το ομαδικό πνεύμα εργασίας και ιδιαίτερα τις συναδέλφους Δήμητρα Κουμάση και Δέσποινα Βόγγολη.

Τον κ. Σωτήρη Σίμο για τη βοήθειά του στη λήψη των δειγμάτων από τη λίμνη Παμβώτιδα, τον Δρ. κ. Δημήτρη Αλίβερτη και τον κ. Γιώργο Βαγενά για τις μετρήσεις των φυσικοχημικών παραμέτρων, τον Δρ. κ. Αποστόλη Μέτσιο για τη βοήθειά του στα πειράματα κυτταροτοξικότητας και τη διάθεση των κυτταρικών σειρών, τον Δρ. κ. Νίκο Μονοκρούσο και τον Δρ. κ. Σάββα Γενίτσαρη για τις στατιστικές αναλύσεις, τον Δρ. κ. Γιώργο Βαρθολομάτο για την πραγματοποίηση της κυτταρομετρίας ροής, τους ευχαριστώ θερμά.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου Δημήτρη και Ανδρονίκη, και στις αδερφές μου Παναγιώτα και Ελένη, αλλά και στον σύζυγό μου Αλέξανδρο και την οικογένειά του για την απεριόριστη υποστήριξή τους σε όλα τα επίπεδα, την ενθάρρυνσή τους και την υπομονή τους. Με τη βοήθεια και την αγάπη τους κατάφερα να ξεπεράσω κάθε δυσκολία και να ολοκληρώσω την προσπάθειά μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1. Μικροοργανισμοί και Περιβάλλον	10
1.1.1. Προκαρυωτική ποικιλότητα-Βακτήρια.....	11
1.1.2. Προκαρυωτική ποικιλότητα-Αρχαία.....	13
1.1.3. Ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί.....	14
1.1.4. Μικροβιακά οικοσυστήματα.....	15
1.1.5. Μέθοδοι χαρακτηρισμού Βακτηρίων και Αρχαίων.....	16
1.1.5.1.Μοριακοί δείκτες	16
1.1.5.2. Αλληλούχιση DNA μετά από ενίσχυση με PCR.....	18
1.2. Μικροοργανισμοί υδάτινων οικοσυστημάτων και βιοδραστικές ουσίες που παράγονται από αυτούς	20
1.2.1. Παραγωγή βιοδραστικών μορίων από μικροοργανισμούς υδάτινων οικοσυστημάτων.....	23
1.2.1.1. Φυσικά προϊόντα με αντικαρκινική δράση.....	25
1.2.1.2. Κυανοτοξίνες στα υδάτινα οικοσυστήματα γλυκού νερού.....	27
1.3. Οι λίμνες ως οικοσυστήματα- Αρχαίες λίμνες	30
1.3.1. Αρχαίες λίμνες της Ηπείρου.....	32
1.4. Σκοπός της ερευνητικής εργασίας	39
2.ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	41
2.1. Μικροβιακή ποικιλότητα στη λίμνη Παμβώτιδα	42
2.1.1. Λήψη δειγμάτων για τη μοριακή χαρτογράφηση Βακτηρίων και Αρχαίων.....	42
2.1.1.1. Λήψη δειγμάτων νερού από την επιφάνεια και τον πυθμένα.....	42
2.1.1.2. Λήψη δειγμάτων ιλύος.....	43
2.1.2. Μέτρηση φυσικοχημικών παραμέτρων των δειγμάτων	43
2.1.3. Επεξεργασία και αποθήκευση δειγμάτων.....	45
2.1.4. Εκχύλιση DNA από τα δείγματα νερού και ιλύος.....	46
2.1.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction -PCR).....	46
2.1.5.1. Ανίχνευση Βακτηρίων στα δείγματα νερού και ιλύος.....	48
2.1.5.2. Ανίχνευση Αρχαίων στα δείγματα ιλύος	49
2.1.5.3. Μοριακός χαρακτηρισμός του κυανοβακτηρίου "Pamv7"	50

2.1.6. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα διαβάθμισης (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis-DGGE).....	52
2.1.6.1. Εκ νέου ενίσχυση των ζωνών από την ηλεκτροφόρηση DGGE και καθαρισμός προϊόντων	57
2.1.7. Κλωνοποίηση επιθυμητών τμημάτων DNA σε πλασμίδια.....	58
2.1.8. Γονιδιακές βιβλιοθήκες.....	60
2.1.9. Αλληλούχιση δειγμάτων DNA για ταυτοποίηση αλληλουχιών Βακτηρίων και Αρχαίων	61
2.1.9.1. Αλληλούχιση DNA επόμενης γενιάς σε δείγματα νερού της λίμνης Παμβώτιδας για την ανίχνευση Βακτηρίων (Next Generation Sequencing -NGS)	62
2.1.10. Διερεύνηση ομόλογων αλληλουχιών DNA μέσω αναλύσεων στοίχισης (Basic Local Alignment Tool -BLAST)	62
2.1.11. Κατασκευή φυλογενετικών δένδρων.....	64
2.1.12. Ποσοτικός προσδιορισμός 16S rDNA Βακτηρίων και Αρχαίων.....	65
2.1.13. Μεταβολικό προφίλ Βακτηρίων του νερού της λίμνης Παμβώτιδας.....	67
2.2. Βακτηριακές καλλιέργειες.....	69
2.2.1. Ανάπτυξη και απομόνωση ετερότροφων Βακτηρίων και κυανοβακτηρίων από δείγματα νερού και ιλύος της λίμνης Παμβώτιδας.....	69
2.2.2. Βακτηριακά εκχυλίσματα σε μεθανόλη και νερό.....	72
2.2.3. Μελέτη κυτταροτοξικότητας των βακτηριακών εκχυλισμάτων σε καρκινικές κυτταρικές σειρές	73
2.2.4. Περαιτέρω μελέτη του βιοδραστικού κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος-Μοριακός χαρακτηρισμός του κυανοβακτηρίου "Pamv7"	76
2.2.4.1. Δοκιμή ELISA για την ανίχνευση γνωστών κυανοτοξινών στο εκχύλισμα από το κυανοβακτήριο "Pamv7"	76
2.2.4.2. Μελέτη του τρόπου δράσης του βιοδραστικού εκχυλίσματος με χρήση κυτταρομετρίας ροής.....	78
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	81
3.1.Ποικιλότητα προκαρυωτικών οργανισμών στην ιλύ της λίμνης Παμβώτιδας- Μοριακή χαρτογράφηση Βακτηρίων και Αρχαίων.....	82
3.1.1. Φυσικοχημικές μετρήσεις δειγμάτων ιλύος.....	82
3.1.2. Βακτηριακή ποικιλότητα στα δείγματα ιλύος.....	83
3.1.2.1. Φυλογενετική κατάταξη των Βακτηρίων από τα δείγματα ιλύος.....	85
3.1.3. Ποικιλότητα Αρχαίων στα δείγματα ιλύος.....	92
3.1.3.1. Φυλογενετική κατάταξη των Αρχαίων από τα δείγματα ιλύος	93
3.1.4. Προκαρυωτική αφθονία στα δείγματα ιλύος, σύγκριση Βακτηρίων και Αρχαίων.....	97

3.1.5. Σχέσεις μεταξύ φυσικοχημικών παραμέτρων, αφθονίας και ποικιλότητας Βακτηρίων και Αρχαίων στα δείγματα ιλύος.....	98
3.2. Ποικιλότητα Βακτηρίων στο νερό της λίμνης Παμβώτιδας- Μοριακή χαρτογράφηση Βακτηρίων	101
3.2.1. Φυσικοχημικές μετρήσεις δειγμάτων νερού.....	101
3.2.2. Βακτηριακή ποικιλότητα στα δείγματα νερού.....	102
3.2.3. Προακαρυωτική αφθονία στα δείγματα νερού, σύγκριση Βακτηρίων και Αρχαίων.....	112
3.2.4. Μεταβολικό προφίλ των βακτηριακών κοινοτήτων στα δείγματα νερού (σύγκριση επιφάνειας και πυθμένα).....	113
3.2.4.1. Μεταβολικό προφίλ των βακτηριακών κοινοτήτων της επιφάνειας και του πυθμένα -αερόβιες συνθήκες.....	113
3.2.4.2. Μεταβολικό προφίλ των βακτηριακών κοινοτήτων της επιφάνειας και του πυθμένα- αναερόβιες συνθήκες.....	116
3.3. Βακτηριακές Καλλιέργειες.....	119
3.3.1. Απομόνωση και καλλιέργεια Βακτηρίων από τα δείγματα νερού υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες.....	119
3.3.2. Απομόνωση και καλλιέργεια Βακτηρίων από τα δείγματα ιλύος υπό αερόβιες συνθήκες.....	119
3.3.3. Μελέτη κυτταροτοξικότητας των βακτηριακών εκχυλισμάτων στις καρκινικές κυτταρικές σειρές A549, HepG2, MCF7 και σε φυσιολογικούς ινοβλάστες MRC5.....	121
3.3.3.1. Χαρακτηρισμός και φυλογενετική κατάταξη του κυανοβακτηρίου "Pamv7" που παράγει βιοδραστικό παράγοντα με κυτταροτοξική δράση.....	125
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	127
4.1. Φυσικοχημικές αναλύσεις δειγμάτων ιλύος.....	128
4.2. Ποικιλότητα Βακτηρίων στα δείγματα ιλύος.....	130
4.3 Ποικιλότητα Αρχαίων στα δείγματα ιλύος.....	133
4.4. Αφθονία προκαρυωτικών κυττάρων στα δείγματα ιλύος	135
4.5. Σχέσεις μεταξύ φυσικοχημικών παραμέτρων, αφθονίας και ποικιλότητας Βακτηρίων και Αρχαίων (δείγματα ιλύος).....	135
4.6. Φυσικοχημικές αναλύσεις νερού.....	140
4.7. Ποικιλότητα Βακτηρίων στα δείγματα νερού.....	140
4.8. Αφθονία προκαρυωτικών κυττάρων στα δείγματα νερού.....	143
4.9. Μεταβολικό αποτύπωμα των Βακτηρίων του νερού της λίμνης Παμβώτιδας.....	144
4.10. Μελέτη κυτταροτοξικότητας βακτηριακών/κυανοβακτηριακών εκχυλισμάτων	145

5. <u>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</u>	149
6. <u>ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ</u>	151
7. <u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	157
8. <u>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</u>	169

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

As: Αρσενικό (Arsenic)	Ni: Νικέλιο (Nickel)
bp: Ζεύγη βάσεων (base pairs)	NO₂: Νιτρώδη
Ca: Ασβέστιο (Calcium)	NO₃: Νιτρικά ιόντα
Cd: Κάδμιο (Cadmium)	OTUs: Λειτουργικές ταξινομικές ομάδες (Operational Taxonomic Units)
Chla: Χλωροφύλλη α (Chlorophyll a)	Pb: Μόλυβδος (Plumbum)
Cl: Χλώριο (Chlorium)	PCR: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)
Cr: Χρώμιο (Chromium)	RFLPs: Πολυμορφισμός μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (Restriction Fragment Length Polymorphisms)
Cu: Χαλκός (Cuprum)	rpm: Στροφές/λεπτό (round per minute)
DGGE: Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα διαβάθμισης (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)	RT: Θερμοκρασία δωματίου (Room Temperature)
Fe: Σίδηρος (Ferrum)	Sb: Αντιμόνιο (Antimony)
Hg: Υδράργυρος (Mercury/ Hydrargyrum)	Se: Σελήνιο (Selenium)
K: Κάλιο (Kalium)	SO₄: Θεικό άλας (Sulfate)
KCl: Χλωριούχο Κάλιο	TC: Ολικός Άνθρακας (Total Carbon)
Mg: Μαγνήσιο (Magnesium)	TKN: Ολικό Άζωτο με τη μέθοδο Kjeldahl (Total Kjeldahl Nitrogen)
Mn: Μαγγάνιο (Manganium)	TOC: Ολικός Οργανικός Άνθρακας (Total Organic Carbon)
Na: Νάτριο (Sodium/Natrium)	TP: Ολικός Φώσφορος (Total Phosphorus)
NH₄⁺: Ιόντα αμμωνίου	Zn: Ψευδάργυρος (Zincum)

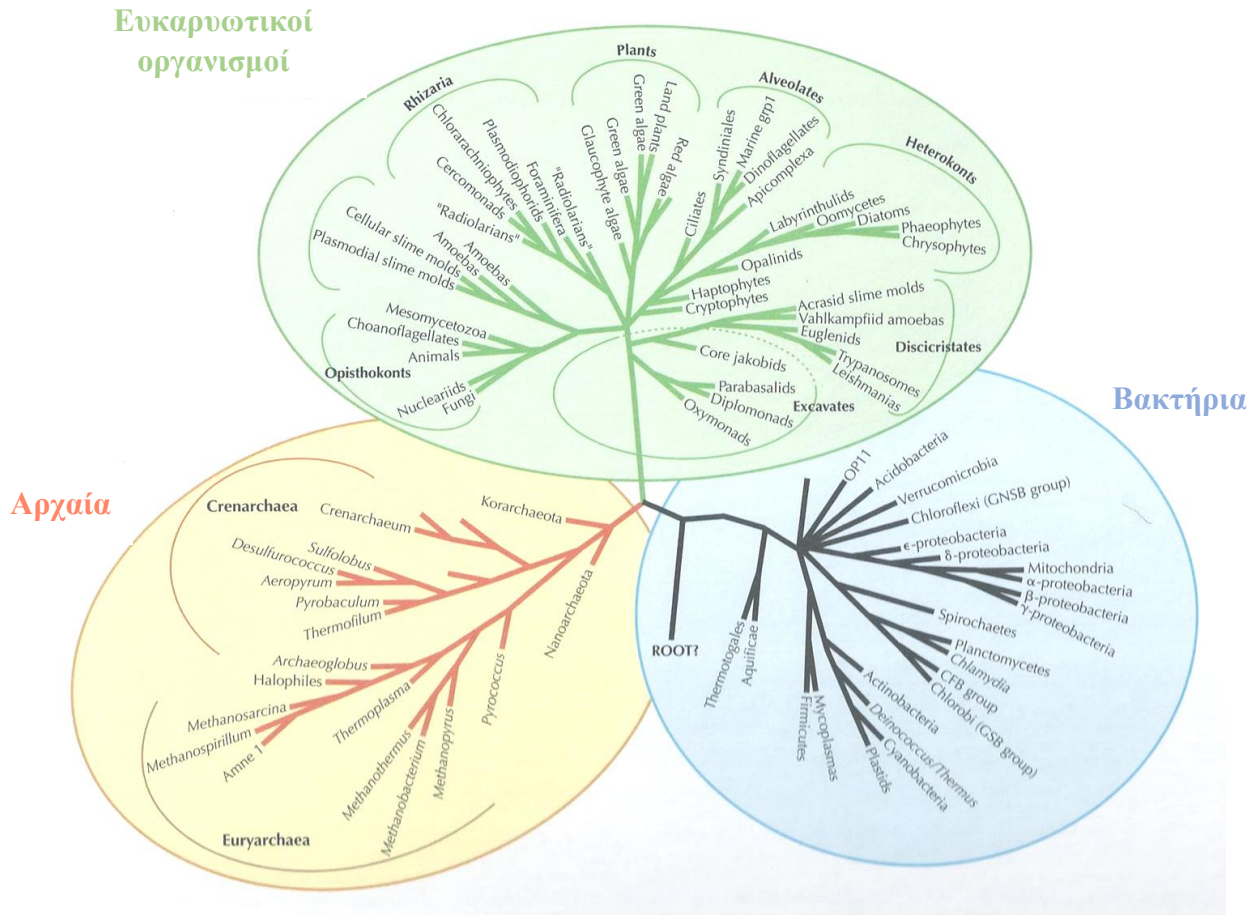
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Μικροοργανισμοί και περιβάλλον

Οι ιδιότητες ενός οικοσυστήματος ελέγχονται σε μεγάλο βαθμό από τη μικροβιακή δράση. Οι μικροοργανισμοί με τη μεταβολική τους δραστηριότητα αφαιρούν διαρκώς από το περιβάλλον θρεπτικές ουσίες για να σχηματίσουν νέα κύτταρα, ενώ ταυτόχρονα αποβάλλουν στο περιβάλλον τα άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού τους. Επομένως, ένα οικοσύστημα μπορεί σταδιακά να αλλάξει σε βάθος χρόνου, τόσο από χημικής όσο και από φυσικής πλευράς εξαιτίας της δράσης των μικροοργανισμών [1].

Οι μικροοργανισμοί παίζουν καίριο ρόλο τόσο στις ανθρώπινες δραστηριότητες όσο και σε όλο το πλέγμα της ζωής στη Γη. Αν δεν υπήρχαν μικροοργανισμοί, η ανάπτυξη και η συντήρηση των ανώτερων μορφών ζωής θα ήταν αδύνατη. Οι εκτιμήσεις της συνολικής ποσότητας προκαρυωτών (Βακτήρια και Αρχαία) στη Γη δείχνουν ότι είναι της τάξης των 5×10^{30} κύτταρα. Η ποσότητα άνθρακα που υπάρχει σε αυτό τον αριθμό κυττάρων είναι ίση με την ποσότητα άνθρακα όλων των φυτών στη Γη ενώ η συνολική περιεκτικότητα σε άζωτο και φώσφορο στους προκαρυώτες είναι 10 φορές μεγαλύτερη από εκείνη του συνόλου της φυτικής βιομάζας [1].

Η μελέτη της ποικιλότητας και των φυλογενετικών σχέσεων των διαφόρων ειδών προκαρυωτών σε ένα οικοσύστημα, αποτελεί το πρώτο βήμα στην κατανόηση των σχέσεων περιβάλλοντος και μικροβιακής ζωής. Η χρήση του 16S ριβοσωμικού RNA (16S rRNA) ως μέσου για την ανασύσταση των φυλογενετικών σχέσεων προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Carl Woese [2]. Από τη σύγκριση των αλληλουχιών του ριβοσωμικού RNA δημιουργήθηκε το «δέντρο της ζωής», το οποίο περιλαμβάνει τρεις εξελικτικούς «χώρους» (domains of life), τα Βακτήρια (Bacteria), τα Αρχαία (Archaea) και τα Ευκάρυα (Eukarya). Το «δέντρο της ζωής» υποδεικνύει πως οι προκαρυωτικοί οργανισμοί (Βακτήρια και Αρχαία) δεν συγγενεύουν στενά μεταξύ τους, αλλά και πως τα Αρχαία σχετίζονται με τα Ευκάρυα περισσότερο απ' ό,τι με τα Βακτήρια. Το «δέντρο της ζωής» παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1.1**.



Εικόνα 1.1: «Το δέντρο της ζωής» όπου φαίνονται οι εξελικτικές σχέσεις μεταξύ προκαρυωτών και ευκαρυωτών [3]

1.1.1. Προκαρυωτική ποικιλότητα- Βακτήρια

Ο κλάδος των Βακτηρίων στο δέντρο της ζωής περιλαμβάνει μια τεράστια ποικιλία προκαρυωτικών μικροοργανισμών που απαντώνται σε μια πληθώρα οικοσυστημάτων. Ο βαθμός ανίχνευσης των βακτηριακών φύλων αυξήθηκε από 11 φύλα που είχαν καταγραφεί το 1987, σε 30 το 2014 και αυξάνεται ακόμη περισσότερο αν συμπεριληφθούν και τα υποψήφια φύλα [2, 4].

Εξ αυτών, τα Πρωτεοβακτήρια (*Proteobacteria*) είναι το μεγαλύτερο φύλο των Βακτηρίων το οποίο περιλαμβάνει αρνητικούς κατά Gram μικροοργανισμούς που παρουσιάζουν ευρύτατη μεταβολική ποικιλομορφία. Στο φύλο Πρωτεοβακτήρια ανήκουν πορφυρά φωτότροφα Βακτήρια (*Rhodobacter*), νιτροποιητικά Βακτήρια (*Nitrobacter*), θειοοξειδωτικά και σιδηροοξειδωτικά Βακτήρια (*Beggiatoa*),

μεθανότροφα και μεθυλότροφα (*Methylomonas*, *Methylobacter*), ψευδομονάδες, εντεροβακτήρια (*Escherichia coli*, *Salmonella*), ρικέτσιες, σπειράματα κ.α.[1].

Μια άλλη μεγάλη ομάδα Βακτηρίων που αρχικά είχε θεωρηθεί ως ένα ενιαίο φύλο είναι αυτή των θετικών κατά Gram Βακτηρίων. Στην ομάδα αυτή περιλαμβάνονται οξυγαλακτικά Βακτήρια (*Staphylococcus*, *Lactobacillus*), ενδοσποριογονικά (*Bacillus*, *Clostridium*), μυκοπλάσματα, νηματοειδή (*Streptomyces*) κ.α. Σήμερα, η ομάδα έχει διαχωριστεί σε δύο τουλάχιστον διακριτά φύλα, τα *Actinobacteria* (είδη με υψηλό ποσοστό G+C), και τα *Firmicutes* (Bacilli και Clostridia, είδη με χαμηλό ποσοστό G+C), στα οποία, εκτός από τυπικά Gram-θετικά Βακτήρια, συμπεριλαμβάνονται και είδη που εμφανίζουν αρνητική χρώση κατά Gram, όπως τα φωτοσυνθετικά *Heliobacteria* και είδη που θεωρούνται ότι έχουν αποκτήσει Gram-αρνητικά κυτταρικά τοιχώματα λόγω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων από Πρωτεοβακτήρια (Negativicutes, π.χ. *Megasphaera*, *Sporomusa*) [1, 5].

Το φύλο Κυανοβακτήρια (*Cyanobacteria*), περιλαμβάνει Βακτήρια τα οποία υπήρξαν οι πρώτοι φωτότροφοι οργανισμοί στην ιστορία της Γης που είχαν τη δυνατότητα να παράγουν οξυγόνο. Σημαντικά γένη κυανοβακτηρίων είναι τα *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Nostoc*.

Άλλα φύλα Βακτηρίων με ευρεία εξάπλωση σε διάφορα οικοσυστήματα είναι τα Χλαμύδια (*Chlamydia*), Πλαγκτομύκητες (*Planctomyces*), Φλαβοβακτήρια (*Flavobacteria*), Σπειροχαίτες (*Spirochaetes*), Δεινόκοκκοι (*Deinococcus-Thermus*), *Nitrospira* κ.α. Παραδείγματα Βακτηρίων φαίνονται στην **Εικόνα 1.2**. Συνολικά, στα Βακτήρια βρίσκουμε πολλές διαφορετικές μεταβολικές και οικολογικές προσαρμογές, πολλά συμβιωτικά είδη, αρκετά είδη που είναι παρασιτικά ή παθογόνα και μεγάλη ευελιξία προσαρμογών μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους όπως στην περίπτωση της *Escherichia coli* κ.α. [6].



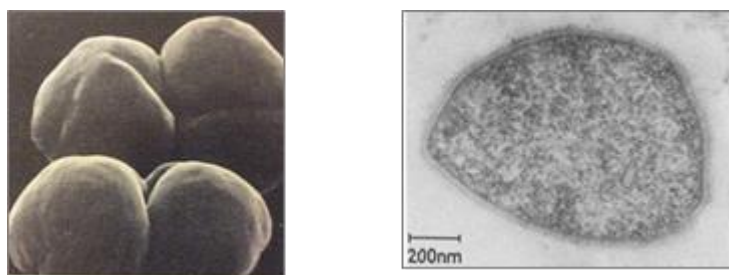
Εικόνα 1.2: Παραδείγματα Βακτηρίων. Α) *Nitrobacter winogradskyi* [1], Β) *Escherichia coli* [7], Γ) *Streptomyces* sp. [1], Δ) *Oscillatoria* sp. [1]

1.1.2. Προκαρυωτική ποικιλότητα- Αρχαία

Τα Αρχαία (Archaea) -η ονομασία τους προέρχεται από την ελληνική λέξη «αρχαίος»- αναγνωρίστηκαν σχετικά πρόσφατα (τέλος δεκαετίας 1970)[8]. Είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί οι οποίοι μικροσκοπικά μοιάζουν με Βακτήρια όμως διαφέρουν σημαντικά από αυτά στη δομή των λιπιδίων της μεμβράνης, στο κυτταρικό τοίχωμα, στον μεταβολισμό. Στα Αρχαία περιλαμβάνονται πολλοί ακραιόφιλοι οργανισμοί (extremophiles). Ορισμένα είδη έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες και άλλα σε ακραία pH. Τα αλόφιλα όπως το *Halobacterium* απαιτούν υψηλές ποσότητες άλατος για την ανάπτυξή τους. Ωστόσο, δεν είναι όλα τα Αρχαία ακραιόφιλα, καθώς γνωρίζουμε σήμερα ότι τα περισσότερα εξ αυτών διαβιούν σε «φυσιολογικά» και μη ακραία περιβάλλοντα (λίμνες, έδαφος, ωκεανοί) [9]. Μερικά Αρχαία χρησιμοποιούν οργανικές ενώσεις για τον μεταβολισμό τους όμως τα περισσότερα χρησιμοποιούν αέριο υδρογόνο (H_2) και διοξείδιο του άνθρακα (τα μεθανογόνα) ή άλλες ανόργανες ενώσεις (σιδήρου, θείου) ως πηγή ενέργειας. Τα μεθανογόνα διαθέτουν ιδιαίτερο μεταβολισμό καθώς προσλαμβάνουν την ενέργεια που χρειάζονται παράγοντας μεθάνιο (CH_4) και αποτελούν την μοναδική βιολογική πηγή μεθανίου (φυσικού αερίου) σήμερα στη Γη. Συνολικά, έχει προταθεί ότι τα Αρχαία έχουν προσαρμοστεί σε συνθήκες χρόνιου ενεργειακού στρες, που μπορεί να προέρχεται είτε από διαβίωση σε ακραία περιβάλλοντα (υπερθερμόφιλα, οξεόφιλα) είτε από διαβίωση σε περιβάλλοντα που προσφέρουν περιορισμένες πηγές θρέψης (π.χ. μεθανογόνα) [10].

Σύμφωνα με το φυλογενετικό δένδρο των Αρχαίων υπάρχουν δυο κυρίαρχα φύλα, τα Ευρυαρχαιωτά (*Euryarchaeota*) και τα Κρηναρχαιωτά (*Crenarchaeota*). Το φύλο των Ευρυαρχαιωτών περιλαμβάνει ακραία αλόφιλα (*Halobacterium*, *Haloferox*), μεθανογόνα (*Methanobacterium*, *Methanosarcina*), *Thermoplasmatales* (*Thermoplasma*, *Picrophilum*), υπερθερμόφιλα (*Thermococcus*) κ.α. Το φύλο των Κρηναρχαιωτών περιλαμβάνει κυρίως υπερθερμόφιλους μικροοργανισμούς όπως υπερθερμόφιλα χερσαίων ηφαιστειακών ενδιαιτημάτων (*Sulfolobus*), υπερθερμόφιλα υποθαλάσσιων ηφαιστειακών ενδιαιτημάτων (*Pyrodictium*, *Pyrolobus*) κ.α. [2]. Παραδείγματα Αρχαίων παρουσιάζονται στην **Εικόνα 1.3**. Καθώς οι έρευνες προχωρούν προστίθενται και άλλα φύλα (*Nanoarchaeota*, *Korarchaeota*,

Thaumarchaeota, *Aigarchaeota*), όμως οι πληροφορίες που υπάρχουν γι' αυτά είναι ακόμη περιορισμένες [11-13].



Εικόνα 1.3: Παραδείγματα Αρχαίων. Αριστερά: *Methanosarcina barkeri* [1], Δεξιά: *Sulfolobus* DSM 1617, λεπτή τομή [14]

1.1.3. Ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί

Οι Ευκαρυώτες εμφανίζουν μεγάλη ποικιλότητα μορφών και λειτουργιών, η οποία είναι ιδιαίτερα εμφανής μεταξύ των ευκαρυωτικών μικροοργανισμών. Τα Ευκάρυα έχουν παραδοσιακά χωριστεί σε 4 βασίλεια οργανισμών: φυτά, ζώα, μύκητες και πρῶτιστα [1].

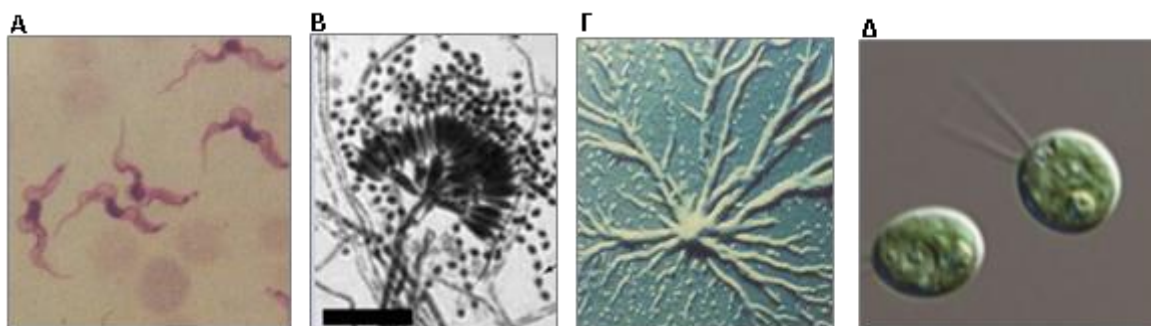
Οι σύγχρονες μοριακές μελέτες όμως δείχνουν πως υπάρχουν τουλάχιστον 40 κύριες γενεαλογικές γραμμές οι οποίες μπορούν να δημιουργήσουν 8 υπερομάδες Ευκαρυωτών: αυλακωτά (*excavates*), ευγληνοειδή (*discicristates*), ετεροκόντα (*heterokonts*), κυψελιδωτά (*alveolates*), ριζόποδα (*rhizaria*), φυτά (*plants*), αμοιβαδόζωα (*amoebzoa*) και οπισθωκόντα (*opisthoconts*) [3].

Παρατηρώντας το «δέντρο της ζωής» (**Εικόνα 1.1**) είναι φανερό ότι εξελικτικά όλες σχεδόν οι ομάδες ευκαρυωτικών οργανισμών περιλαμβάνουν μικροοργανισμούς, οι οποίοι αντιπροσωπεύουν και το μεγαλύτερο μέρος της φυλογενετικής ποικιλότητας.

Από τις πιο γνωστές ομάδες ευκαρυωτικών μικροοργανισμών είναι τα πρωτόζωα (*Amoeba*, *Trypanosoma*), οι μύκητες (*Penicillium*, *Aspergillus*), οι μυξομύκητες (*Dictyostelium*), τα φύκη (*Chlamydomonas*, *Euglena*) [1]. Παραδείγματα ευκαρυωτικών μικροοργανισμών παρουσιάζονται στην **Εικόνα 1.4**.

Ενδεικτικό της σημασίας τους είναι ότι, για παράδειγμα, τα φύκη, μια μεγάλη ανομοιογενής ομάδα φωτότροφων μικροοργανισμών που ζουν σε εδαφικά και υδάτινα

οικοσυστήματα, αποτελούν τους σημαντικότερους (από άποψη ποσότητας παραγωγής βιομάζας) πρωτογενείς παραγωγούς στη φύση, ενώ οι μύκητες συγκαταλέγονται στους σπουδαιότερους βιοαποικοδομητές στη φύση. Επίσης, τα πρωτόζωα είναι ευρέως διαδεδομένα σε υδάτινα οικοσυστήματα ή ως παθογόνα των ανθρώπων και των ζώων (πολλές σοβαρές λοιμώξεις ασθένειες όπως λεισμανιώσεις, ελονοσία, τρυπανοσωμίαση, οφείλονται σε παρασιτικά πρωτόζωα).



Εικόνα 1.4: Παραδείγματα ευκαρυωτικών μικροοργανισμών. Α: *Trypanosoma sp.* [15], Β: *Penicillium marneffei*, οριζ. γραμμή 10 μικρόμετρα [16], Γ: *Dictyostelium discoideum* [15], Δ: *Clamdomonas reinhardtii* [17]

1.1.4. Μικροβιακά οικοσυστήματα

Τα φυσικά ενδιαιτήματα των μικροοργανισμών παρουσιάζουν εξαιρετική ποικιλία. Όποιο ενδιαιτήμα επιτρέπει την ανάπτυξη ανώτερων οργανισμών μπορεί επίσης να υποστηρίξει και την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών εξαρτάται από τις διαθέσιμες πρώτες ύλες (θρεπτικές ουσίες) και από τις φυσικοχημικές συνθήκες του ενδιαιτήματος. Δυο από τα κυριότερα ενδιαιτήματα των μικροοργανισμών είναι το έδαφος και τα γλυκά νερά.

Όσον αφορά το έδαφος, η εντονότερη μικροβιακή ανάπτυξη παρατηρείται στην επιφάνεια των εδαφικών σωματιδίων συνήθως στην περιοχή της ριζόσφαιρας (ριζόσφαιρα είναι η περιοχή γύρω από το ριζικό σύστημα των φυτών). Ένα μικρό σωματίδιο εδάφους είναι δυνατό να περιέχει πολλά διαφορετικά μικροπεριβάλλοντα και επομένως πολλά είδη μικροοργανισμών. Οι δυο κυριότεροι παράγοντες καθορισμού της μικροβιακής δράσης στο έδαφος είναι η διαθεσιμότητα του νερού και η θρεπτική κατάσταση του εδάφους [1].

Οι λίμνες, οι μικρές υδατοδεξαμενές, τα ποτάμια και οι πηγές αποτελούν επίσης μικροβιακά ενδιαυτήματα. Στα περισσότερα υδάτινα περιβάλλοντα κυριαρχούν τα φωτότροφα. Στις περιοχές με οξυγόνο επικρατούν τα κυανοβακτήρια και τα φύκη ενώ σε ανοξικές περιοχές επικρατούν τα μη οξυγονοπαραγωγικά φωτότροφα.

Στους ωκεανούς, τα επίπεδα των θρεπτικών ουσιών είναι πολύ χαμηλά σε σύγκριση με τα οικοσυστήματα γλυκού νερού και κατά συνέπεια η δραστηριότητα των πρωτογενών παραγωγών είναι περιορισμένη. Ωστόσο η φωτοσύνθεση και η παραγωγή οξυγόνου που λαμβάνει χώρα στους ωκεανούς είναι ο καθοριστικότερος παράγοντας όσον αφορά την ισορροπία του άνθρακα της Γης καθώς οι ωκεανοί είναι πολύ μεγάλοι. Γενικά έχει υπολογιστεί πως στους ωκεανούς υπάρχουν συνολικά 1.3×10^{28} κύτταρα Αρχαίων και 3.1×10^{28} κύτταρα Βακτηρίων [1].

1.1.5. Μέθοδοι χαρακτηρισμού Βακτηρίων και Αρχαίων

Η ανάπτυξη διάφορων μοριακών εργαλείων εμπλούτισε πολύ γρήγορα τις γνώσεις μας σχετικά με την προκαρυωτική αφθονία, την ποικιλότητα και τη λειτουργία των προκαρυωτών στο περιβάλλον [18]. Οι πιο βασικοί μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιούνται κυρίως τα τελευταία χρόνια για τη μελέτη Βακτηρίων και Αρχαίων παρουσιάζονται στη συνέχεια.

1.1.5.1. Μοριακοί δείκτες

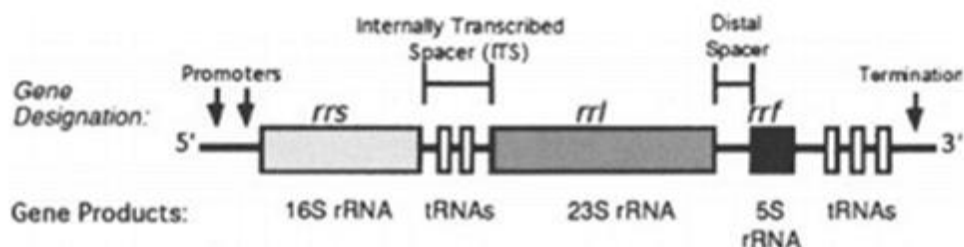
16S rRNA

Η ύπαρξη του σε κάθε κύτταρο και η εξελικτική του συντήρηση είναι εκείνα τα χαρακτηριστικά που κατέστησαν το γονίδιο 16S rRNA βασικό μοριακό δείκτη στη μικροβιακή οικολογία. Η μοριακή μικροβιακή οικολογία ξεκίνησε ουσιαστικά το 1990 με την ενίσχυση και αλληλούχιση του 16S rDNA από περιβαλλοντικά δείγματα [18].

Πιο συγκεκριμένα, τα προκαρυωτικά ριβοσώματα αποτελούνται από δυο υπομονάδες: τη μεγάλη υπομονάδα 50S η οποία περιλαμβάνει το 5S και το 23S rRNA (με μήκος περίπου 120 και περίπου 2906 νουκλεοτίδια αντίστοιχα, στην *Escherichia coli*) και τη μικρή υπομονάδα 30S η οποία περιλαμβάνει το 16S rRNA (με μήκος περίπου 1542 νουκλεοτίδια στην *Escherichia coli*). Το οπερόνιο προκαρυωτικών rRNA

παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1.5**. Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή του 16S rRNA εντοπίζονται σε μια περιοχή ιδιαίτερα συντηρημένη στο γονιδίωμα διαφορετικών ειδών και γι' αυτό το λόγο η περιοχή αυτή χρησιμοποιείται για τη φυλογενετική κατάταξη των Βακτηρίων και των Αρχαίων. Οι Carl Woese και George E. Fox ήταν οι πρώτοι ερευνητές που χρησιμοποίησαν και διέκριναν την αξία του 16S rRNA στη φυλογενετική εξελικτική ανάλυση [2, 8]. Βασικό μειονέκτημα, όμως, αυτού του μοριακού εργαλείου είναι ότι σε ένα Βακτήριο μπορεί να υπάρχουν πολλαπλά αντίγραφα του 16S [18], γεγονός που δυσχεραίνει την ερμηνεία των μοριακών αναλύσεων.

Για την ενίσχυση τμημάτων του 16S rDNA χρησιμοποιούνται διάφοροι εκκινητές [19]. Μοριακά εργαλεία που χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανάλυση των 16S rDNA αποτελούν οι γονιδιακές βιβλιοθήκες, ο φθορίζων υβριδισμός *in situ* (fluorescent *in situ* hybridization, FISH) και μέθοδοι αποτύπωσης όπως η αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα διαβάθμισης (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) και η ανάλυση του πολυμορφισμού μήκους τερματικών περιοριστικών θραυσμάτων (terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP) [18].



Εικόνα 1.5: Σχηματική απεικόνιση του οπερονίου προκαρυωτικών rRNA [20]

RNA πολυμεράση

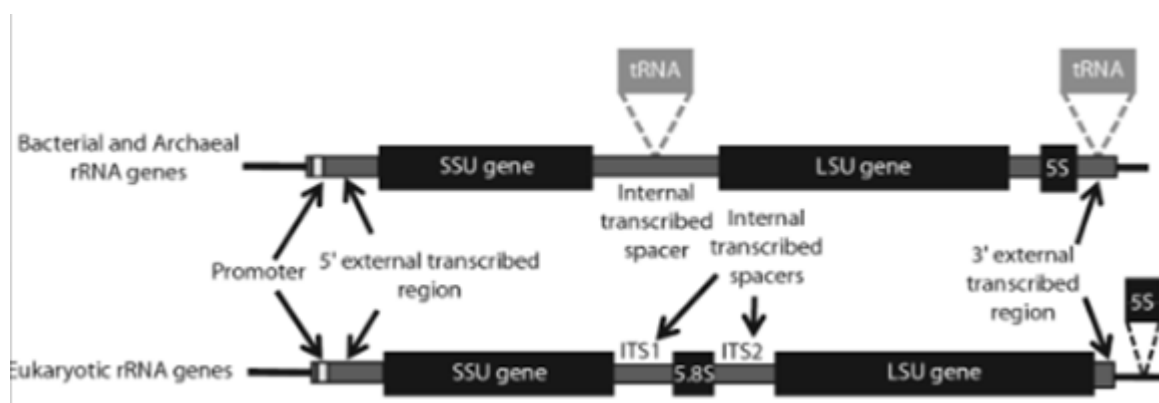
Ένα εναλλακτικό γονίδιο αναφοράς για τη μελέτη των προκαρυωτικών πληθυσμών είναι το γονίδιο της β-υπομονάδας της RNA πολυμεράσης (*proB*). Το γονίδιο αυτό εμφανίζει ορισμένες πολύ χρήσιμες ιδιότητες: α) υπάρχει σε όλα τα προκαρυωτικά κύτταρα και σε κάθε κύτταρο υπάρχει ένα μόνο αντίγραφο β) εμφανίζει περιοχές ιδιαίτερα συντηρημένες γ) είναι αρκετά μεγάλο σε μέγεθος.

Το γονίδιο *rpoB* είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της β-υπομονάδας της βακτηριακής RNA πολυμεράσης. Η RNA πολυμεράση των Βακτηρίων αποτελείται από 5 υπομονάδες και η β-υπομονάδα είναι η δεύτερη μεγαλύτερη, η οποία περιλαμβάνει και το μεγαλύτερο μέρος του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Μεταλλάξεις στη β-υπομονάδα, προσφέρουν αντοχή σε αντιβακτηριακούς παράγοντες.

Έχουν σχεδιαστεί διάφοροι ειδικοί εκκινητές για την ενίσχυση του γονιδίου *rpoB* όπως οι *rpoB1698F* και *rpoB2041R* [21].

Ενδιάμεση μεταγραφόμενη περιοχή (Internal Transcribed Spacer, ITS)

Η περιοχή ITS βρίσκεται μεταξύ των γονιδίων της μικρής και της μεγάλης υπομονάδας του ριβοσωμικού RNA. Στα Βακτήρια και στα Αρχαία η περιοχή ITS βρίσκεται μεταξύ των γονιδίων 16S και 23S rRNA και χρησιμοποιείται για τη φυλογενετική κατάταξη καθώς αποτελεί περιοχή καλά συντηρημένη [22]. Η περιοχή ITS παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1.6**. Μελετάται πολύ συχνά τόσο για την ταξινόμηση των βακτηριακών ειδών όσο και για τον χαρακτηρισμό διαφορετικών στελεχών.



Εικόνα 1.6: Σχηματική απεικόνιση των περιοχών ITS [23]

1.1.5.2. Αλληλούχιση DNA μετά από ενίσχυση με PCR

Αλληλούχιση κατά Sanger κάθε τμήματος ξεχωριστά

Μετά την ενίσχυση με PCR, του δείκτη της επιλογής μας, κατασκευάζονται γονιδιακές βιβλιοθήκες. Εναλλακτικά το τελικό προϊόν της PCR διαχωρίζεται μετά από αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση με πήκτωμα διαβάθμισης (DGGE). Τελικά το DNA από διαφορετικούς κλώνους (σε περίπτωση γονιδιακής βιβλιοθήκης) ή οι ζώνες που

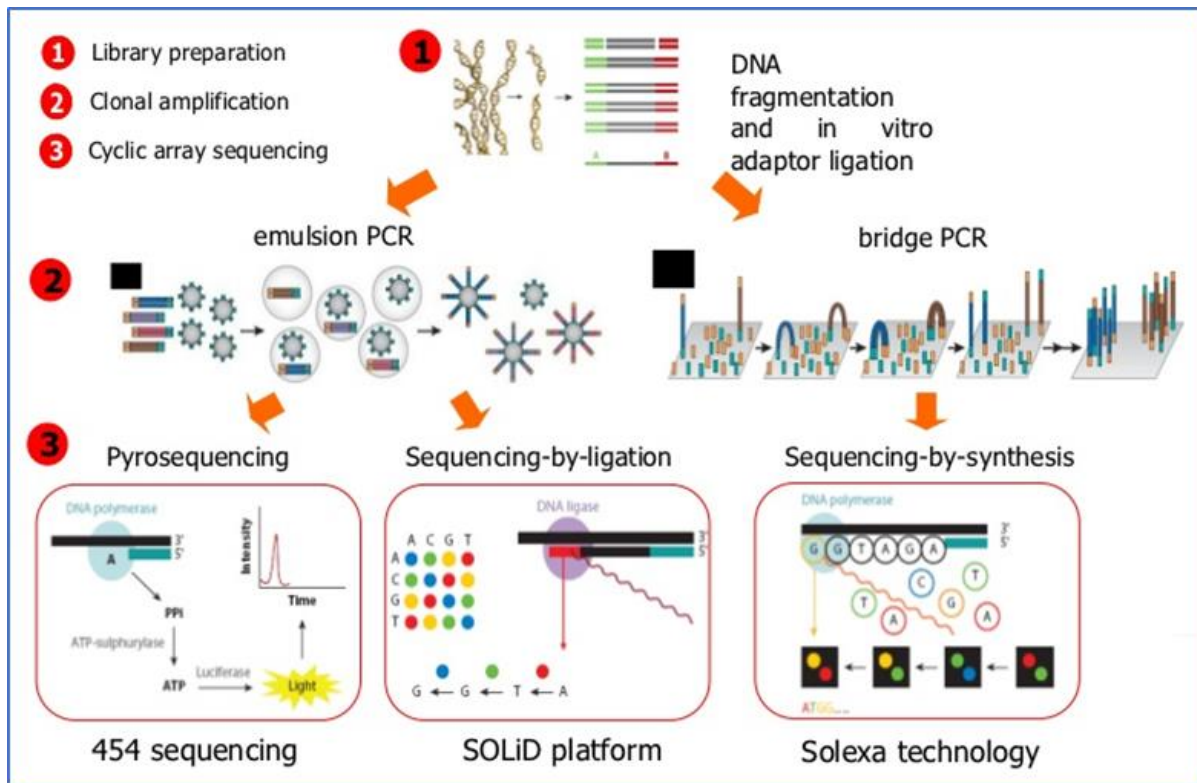
προκύπτουν μετά τη DGGE, αλληλουχούνται κατά Sanger. Με αυτόν τον τρόπο παίρνουμε μια εικόνα της μικροβιακής ποικιλότητας στο επίπεδο των κυρίαρχων ειδών/στελεχών.

Αλληλούχιση επόμενης γενιάς- Next Generation Sequencing (NGS)

Εξέλιξη της απλής αλληλούχισης δειγμάτων κατά Sanger είναι το NGS. Στην περίπτωση αυτή, δεν χρειάζεται διαχωρισμός των διαφορετικών αλληλουχιών μετά τη στοχευμένη αντίδραση PCR έναντι κάποιου στόχου-δείκτη. Η αλληλούχιση πραγματοποιείται στο μίγμα του προϊόντος της PCR. Η τεχνική αυτή από το 2005 και μετά εξελίχθηκε με γοργούς ρυθμούς και τα δεδομένα αλληλούχισης από 84 kilobase (kb) ανά αντίδραση έφτασαν τη 1 Gigabase (Gb) ανά αντίδραση. Τα μικρά τμήματα «ανάγνωσης» και η τεχνική της μαζικής παράλληλης αλληλούχισης ήταν μια ριζικά διαφορετική προσέγγιση που απογείωσε τις δυνατότητες της αλληλούχισης, με τα δεδομένα από μια μόνο αντίδραση να φτάνουν τα 1.8 terabases το 2014, μειώνοντας παράλληλα κατά μεγάλο ποσοστό το κόστος [24]. Η απεικόνιση δε της μικροβιακής ποικιλότητας ανά δείγμα είναι πολύ λεπτομερής και σε πολλές περιπτώσεις πλησιάζει τον σχεδόν πλήρη χαρακτηρισμό της. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνολογίες αλληλούχισης NGS (**Εικόνα 1.7**) όπως

- Illumina (Solexa)
- Roche 454
- Ion torrent: Proton / PGM sequencing
- SOLiD

Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς έχει συμβάλει σημαντικά στην ανίχνευση, στον χαρακτηρισμό και στην ταξινόμηση Βακτηρίων και Αρχαίων. Από ένα δείγμα μπορούν να ανιχνευτούν εκατοντάδες έως και χιλιάδες διαφορετικοί κλώνοι, περιλαμβάνοντας και αυτούς που δεν βρίσκονται σε κυριαρχία και είναι δύσκολος ο εντοπισμός τους με άλλη τεχνική.



Εικόνα 1.7: Παραδείγματα μεθόδων αλληλούχισης επόμενης γενιάς [25]

1.2. Μικροοργανισμοί υδάτινων οικοσυστημάτων και βιοδραστικές ουσίες που παράγονται από αυτούς

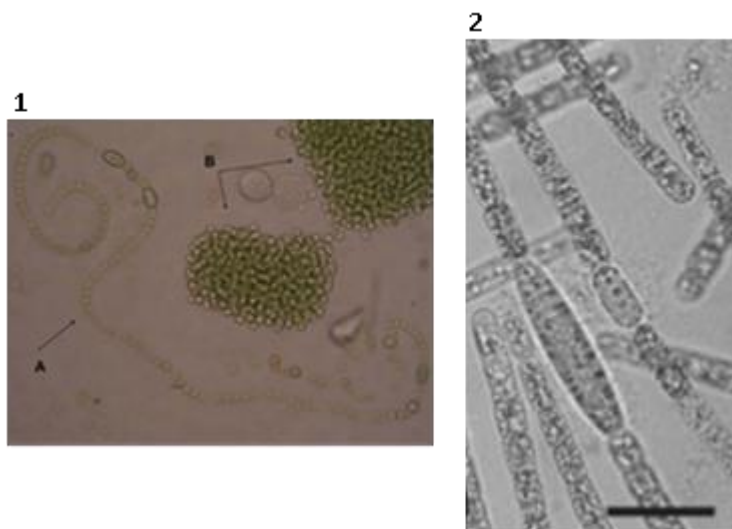
Ως υδάτινα οικοσυστήματα θεωρούνται οι λίμνες, τα ρέοντα ύδατα, οι θάλασσες, οι λιμνοθάλασσες και οι υγρότοποι. Τα φυσικά χαρακτηριστικά (θερμοκρασία, πυκνότητα, χρώμα, διαύγεια), τα χημικά χαρακτηριστικά (ανόργανα άλατα, αέρια, οργανικές ενώσεις) και τα βιολογικά χαρακτηριστικά (πλαγκτόν, νηκτόν, βένθος, φυτά, ζώα) κάνουν κάθε οικοσύστημα μοναδικό και ξεχωριστό.

Τα τελευταία χρόνια η προστασία των υδάτινων οικοσυστημάτων θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική και έχουν θεσπιστεί διάφορες Οδηγίες-Πλαίσια τόσο σε εθνικό επίπεδο όσο και σε Ευρωπαϊκό (http://www.kpe.gr/documents/kallisto/water_ecosystem.pdf).

Οι μικροοργανισμοί που συναντούμε κυρίως σε υδάτινα οικοσυστήματα είναι ετερότροφα Βακτήρια, κυανοβακτήρια, Αρχαία, χλωρόφυτα και διάτομα.

Μεταξύ των κυρίαρχων Βακτηρίων στα υδάτινα οικοσυστήματα συγκαταλέγονται αντιπρόσωποι των φύλων *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes* [26].

Σε ευτροφικά υδάτινα οικοσυστήματα αφθονούν φωτοαυτότροφα Βακτήρια, ιδίως κυανοβακτήρια. Τα κυανοβακτήρια ταξινομούνται σε 5 τάξεις (*Chroococcales*, *Pleurocapsales*, *Oscillatoriales*, *Nostocales*, *Stigonematales*) και έως σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 2000 είδη. Οι μαζικές συναθροίσεις τους προκαλούν «άνθιση του νερού» (water bloom), φαινόμενο που υποβαθμίζει το οικοσύστημα και προκαλεί σειρά προβλημάτων (παραγωγή κυανοτοξινών). Επίσης τα κυανοβακτήρια έχουν τη δυνατότητα να παράγουν διάφορους βιολογικά και χημικά δραστικούς παράγοντες, οι οποίοι τα τελευταία χρόνια μελετώνται εκτενώς. Η παραγωγή τοξινών είναι ένα μείζον πρόβλημα που επηρεάζει κάθε ζωντανό οργανισμό και από την άλλη μεριά το γεγονός ότι παράγουν ουσίες με φαρμακολογικές ιδιότητες καθιστά αυτούς τους μικροοργανισμούς πεδίο εκτεταμένης μελέτης. Τα πιο κοινά και καλά μελετημένα κυανοβακτήρια που απαντώνται στα Μεσογειακά οικοσυστήματα γλυκού νερού είναι τα *Microcystis sp.*, *Anabaena sp.*, *Aphanizomenon sp.*, παραδείγματα των οποίων παρουσιάζονται στην **Εικόνα 1.8** [27].



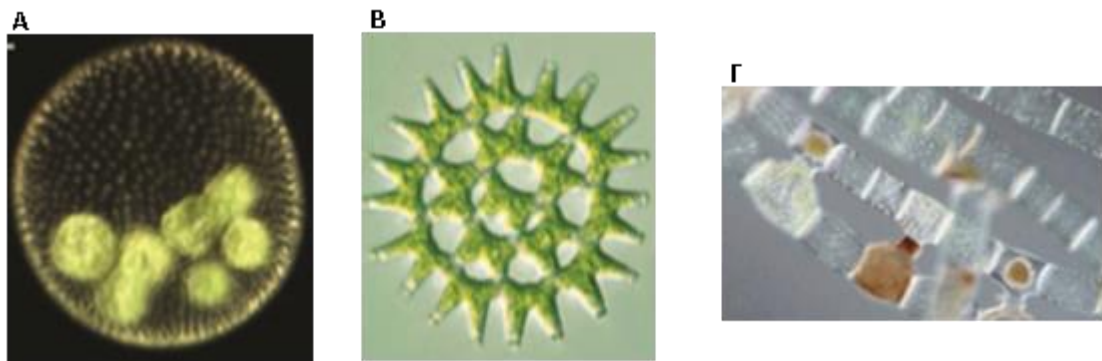
Εικόνα 1.8: 1.A) *Anabaena sp.* B) *Microcystis sp.* [28], 2. *Aphanizomenon flos-aquae* 1tu26s2, οριζ. γραμμή 10 μικρόμετρα [29]

Στα υδάτινα οικοσυστήματα απαντώνται σε μεγάλο βαθμό και τα χλωρόφυτα (chlorophyta). Σε αυτή την κατηγορία συμπεριλαμβάνονται μικροσκοπικά μονοκύτταρα φυτά, που ζουν μεμονωμένα ή σχηματίζουν αποικίες, καθώς και πολυκύτταροι νηματοειδείς φυτικοί οργανισμοί. Το 90% των χλωροφύτων ζει σε γλυκά νερά και τα διάφορα είδη τους κυριαρχούν στη σύνθεση του φυτοπλαγκτού [17].

Σήμερα είναι γνωστά περισσότερα από 400 γένη και 6000 είδη, μεταξύ των οποίων παρατηρείται εξαιρετικά μεγάλη μορφολογική ποικιλότητα.

Η υπερβολική ανάπτυξη των χλωροφύτων σε συνδυασμό με τον μαζικό πολλαπλασιασμό των κυανοβακτηρίων, συμβάλουν στη δημιουργία της «άνθισης» των υδάτινων οικοσυστημάτων.

Μερικά παραδείγματα χλωροφύτων αποτελούν τα *Volvox sp.*, *Pediastrum sp.*, *Spirogyra maxima* (Εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.9: Παραδείγματα χλωροφύτων. Α) *Volvox carteri* [17], Β) *Pediastrum sp.* [17], Γ) *Spirogyra maxima* [30]

Μια ακόμη ομάδα μικροοργανισμών που υπάρχουν σε αφθονία στα υδάτινα οικοσυστήματα είναι τα διάτομα. Τα διάτομα είναι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί με ιδιαίτερο χαρακτηριστικό το διοξείδιο του πυριτίου που έχει το κυτταρικό τους τοίχωμα και εμφανίστηκαν περίπου πριν από 185 εκατομμύρια χρόνια. Αποτελούν κύριο συστατικό του φυτοπλαγκτού και μέχρι σήμερα είναι γνωστά πάνω από 100 000 είδη. Οι κοινωνίες των διατόμων συχνά χρησιμοποιούνται ως βιολογικοί δείκτες σε προγράμματα παρακολούθησης της οικολογικής κατάστασης των υδάτων καθώς τα διάτομα είναι ευαίσθητα σε αλλαγές του περιβάλλοντος.

Τέλος, τα Αρχαία αν και ανιχνεύονται σχεδόν παντού, είναι συχνά κυρίαρχα σε ακραία περιβάλλοντα όπως υδροθερμικές πηγές, νερά με υψηλή αλατότητα, ανοξική λάσπη. Στα γλυκά νερά συναντάμε αντιπροσώπους των φύλων των Ευρυαρχαιωτών και των Κρηναρχαιωτών.

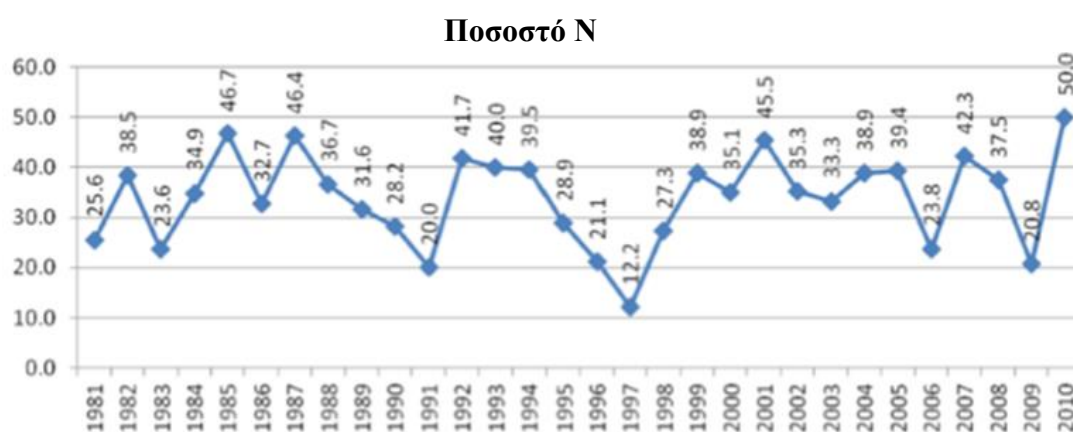
1.2.1. Παραγωγή βιοδραστικών μορίων από μικροοργανισμούς υδάτινων οικοσυστημάτων

Ως βιοδραστικοί παράγοντες χαρακτηρίζονται μόρια τα οποία ασκούν κάποιας μορφής επίδραση στους ζωντανούς οργανισμούς, στους ιστούς ή στα κύτταρα. Οι βιοδραστικοί παράγοντες διαφέρουν από τους θρεπτικούς παράγοντες καθώς δεν είναι αναγκαίοι για τη σωστή λειτουργία ή την επιβίωση ενός οργανισμού.

Παράδειγμα βιοδραστικών παραγόντων αποτελούν οι δευτερογενείς μεταβολίτες των μικροοργανισμών στους οποίους ανήκουν οι τοξίνες αλλά και τα αντιβιοτικά.

Γνωστοί για την παραγωγή πολλών αντιβιοτικών είναι οι μύκητες από τους οποίους προέρχεται η πενικιλίνη, η κεφαλοσπορίνη κ.α. Βακτήρια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή αντιβιοτικών ανήκουν στο φύλο των ακτινομυκήτων (ερυθρομυκίνη, στρεπτομυκίνη, τετρακυκλίνες) αλλά και στο φύλο των *Firmicutes* (πολυμυξίνη κ.α.), ενώ τοξίνες όπως η μικροκυστίνη, η κυλινδροσπερμοψίνη, η ανατοξίνη-α κ.α. παράγονται από κυανοβακτήρια [28, 31-33].

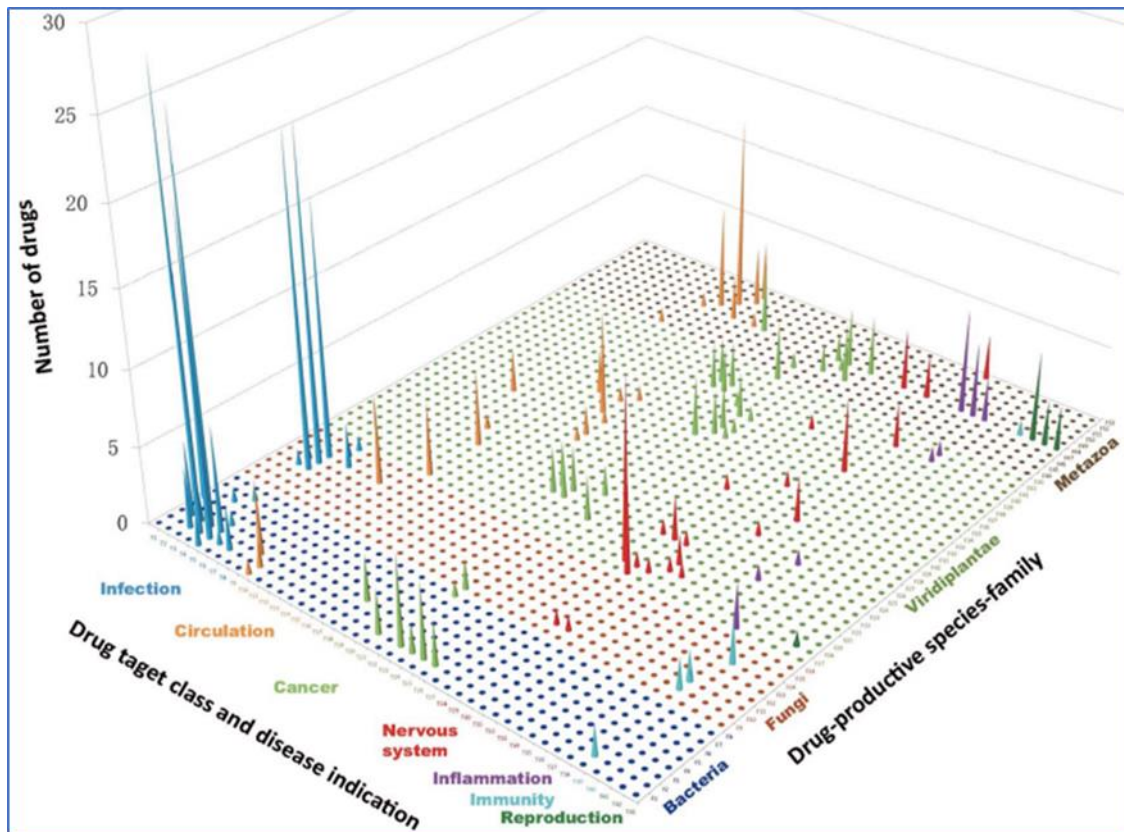
Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός πως το 50% των βιοδραστικών μορίων που εγκρίθηκαν το 2010 ανήκαν σε φυσικά προϊόντα και μάλιστα τα περισσότερα εμφάνιζαν αντινεοπλασματικές ιδιότητες (**Εικόνα 1.10**).



Εικόνα 1.10: Ποσοστό N/NB/ND εγκεκριμένων βιοδραστικών μορίων την περίοδο 1981-2010. N: Φυσικό προϊόν (Natural product), NB: Φυσικό προϊόν φυτικής προέλευσης (Natural product “Botanical”), ND: Προερχόμενο από φυσικό προϊόν (ημισυνθετικό) (Derived from natural product (semi-synthetic))[31]

Τα περισσότερα φυσικά βιοδραστικά μόρια έχουν απομονωθεί από θαλάσσιους μικροοργανισμούς. Οι πρώτες βιοδραστικές δομές από θαλάσσιους μικροοργανισμούς απομονώθηκαν το 1960. Μια πιθανή εξήγηση για τις αιτίες που οδηγούν τους θαλάσσιους μικροοργανισμούς στην παραγωγή τέτοιων μορίων, βασίζεται στις περιβαλλοντικές συνθήκες που καλούνται να αντιμετωπίσουν αυτοί οι μικροοργανισμοί. Οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί έχουν να αντιμετωπίσουν ακραίες συνθήκες όπως υψηλή πίεση, υψηλή αλατότητα, χαμηλή συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών, χαμηλή αλλά σταθερή θερμοκρασία, περιορισμένο φως και χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου. Για την προσαρμογή τους σε αυτές τις συνθήκες οι μικροοργανισμοί των θαλάσσιων ενδιαιτημάτων διαθέτουν μοναδικά χαρακτηριστικά που τους διαφοροποιούν από τους μικροοργανισμούς άλλων ενδιαιτημάτων, σε επίπεδο μεταβολισμού (ειδικές πορείες δευτερογενούς μεταβολισμού), συμπεριφοράς κ.α. [34]. Σε αντίθεση με τα θαλάσσια οικοσυστήματα, η μελέτη μικροοργανισμών για πιθανή παραγωγή βιοδραστικών μορίων σε λιμναία οικοσυστήματα είναι περιορισμένη.

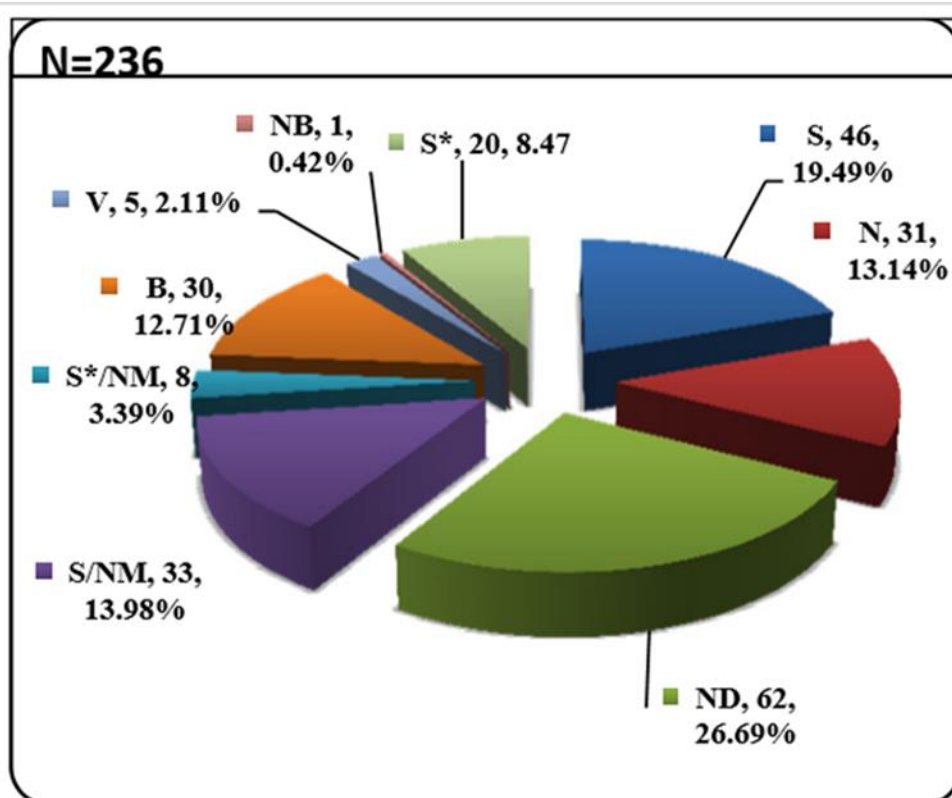
Η ομαδοποίηση των εγκεκριμένων φαρμάκων με βάση τις ασθένειες-στόχους και την ομάδα των μικροοργανισμών από την οποία παράγονται, με τρία ή περισσότερα φάρμακα έναντι κάθε στόχου, παρουσιάζονται στην **Εικόνα 1.11** [33].



Εικόνα 1.11: Κατανομή εγκεκριμένων φαρμάκων που σχετίζονται με φυσικά βιοδραστικά μόρια, με βάση τις ασθένειες-στόχους και την ομάδα μικροοργανισμών από την οποία παράγονται [33]

1.2.1.1. Φυσικά προϊόντα με αντικαρκινική δράση

Τα τελευταία 60 χρόνια έχουν ανιχνευθεί πολλά μόρια που προέρχονται από φυτικούς οργανισμούς, μικροοργανισμούς και οργανισμούς θαλάσσιων οικοσυστημάτων και έχουν εγκριθεί για τη θεραπεία του καρκίνου. Μέχρι το 2012, από τα 236 νέα αντικαρκινικά φάρμακα που είχαν εγκριθεί, περίπου το 80% προέρχεται από φυσικά προϊόντα ή βασίζεται σε δομές φυσικών προϊόντων, όπως παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα (**Εικόνα 1.12**) [32].



Εικόνα 1.12: Αντικαρκινικά φάρμακα που εγκρίθηκαν την περίοδο 1950-2012 κατηγοριοποιημένα με βάση την πηγή προέλευσής τους. N: Φυσικό προϊόν (unmodified natural product), ND: Προερχόμενο από φυσικό προϊόν (modified natural product), S: Συνθετικό μόριο χωρίς σχεδιασμό φυσικού προϊόντος (synthetic compound with no natural product conception), S/NM: Συνθετικό μόριο που βασίζεται σε φυσικό ανάλογο και εμφανίζει συναγωνιστική αναστολή (synthetic compound showing competitive inhibition of the natural product substrate), S*: Συνθετικό μόριο με φαρμακοφόρο που προέρχεται από φυσικό προϊόν (synthetic compound with a natural product pharmacophore), S*/NM: Συνθετικό μόριο με φαρμακοφόρο που προέρχεται από φυσικό προϊόν και εμφανίζει συναγωνιστική αναστολή (synthetic compound with a natural product pharmacophore showing competitive inhibition of the natural product substrate), B: Βιολογικό (Biological), V: Εμβόλιο (Vaccine)

Αξίζει να σημειωθεί ότι περισσότερα από 40 βιομόρια που βρέθηκε ότι έχουν πιθανή αντικαρκινική δράση έχουν απομονωθεί από κυανοβακτήρια. Παραδείγματα κυανοβακτηρίων που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή μεταβολιτών με πιθανή αντικαρκινική δράση ανήκουν στα γένη *Nostoc*, *Lyngbya*, *Symploca*, *Scytonema*, *Hepalosiphon* [35].

Ενδεικτικά παραδείγματα αντικαρκινικών παραγόντων που απομονώθηκαν από κυανοβακτήρια [32] είναι:

- Απρατοξίνη Α (Apratoxin A): απομονώθηκε από το θαλάσσιο κυανοβακτήριο *Lyngbya majuscula*. Είναι κυτταροτοξικό μόριο που στοχεύει υποδοχείς καρκινικών κυττάρων.
- Κρυπτοφυκίνη 1 (Cryptophycin 1): απομονώθηκε από κυανοβακτήριο του γένους *Nostoc*. Εμφανίζει κυτταροτοξική και αντιμιτωτική δραστηριότητα. Δοκιμάστηκε για τη θεραπεία καρκίνου των ωοθηκών.
- Κουρακίνη Α (Curacin A): απομονώθηκε από το κυανοβακτήριο *Lyngbya* sp. Δοκιμάστηκε για τη θεραπεία καρκίνου του μαστού.
- Δολαστατίνη 10 (Dolastatin 10): απομονώθηκε από κυανοβακτήριο του γένους *Symploca*. Παρεμποδίζει τη λειτουργία των μικροσωληνίσκων.

Η στοχευμένη δραστηριότητα κάποιων κυανοτοξινών προκαλεί έντονο ενδιαφέρον για περαιτέρω φαρμακευτικές μελέτες. Ιδιαίτερα τα κυκλοπεπτίδια που παράγονται από κυανοβακτήρια, έχουν μια φαρμακοφόρο δομή η οποία μπορεί να τροποποιηθεί εργαστηριακά με σκοπό τον σχεδιασμό αντικαρκινικών θεραπευτικών μορίων. Στην εποχή της στοχευμένης θεραπείας κατά του καρκίνου, οι κυανοτοξίνες αποτελούν μια πηγή φυσικών κυτταροτοξικών μορίων με δυνατότητα να στοχεύουν όγκους στους οποίους εκφράζονται συγκεκριμένοι μεταφορείς (π.χ. Organic Anion Transporting Polypeptides, OATPs) [28, 36, 37].

1.2.1.2. Κυανοτοξίνες στα υδάτινα οικοσυστήματα γλυκού νερού

Οι ανθίσεις των κυανοβακτηρίων (blooms) στα υδάτινα οικοσυστήματα αποτελούν σοβαρό πρόβλημα τα τελευταία χρόνια. Φαίνεται πως το 60% αυτών των ανθίσεων περιλαμβάνουν κυανοβακτήρια που παράγουν τοξίνες (κυανοτοξίνες) [38-40]. Εικάζεται πως πάνω από σαράντα γένη κυανοβακτηρίων παράγουν τοξίνες, αλλά τα κύρια είναι τα *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nostoc* και *Planktothrix*. Οι κυανοτοξίνες έχουν σοβαρότατες αρνητικές επιδράσεις στους υδρόβιους οργανισμούς, στα άγρια/οικόσιτα ζώα αλλά και στην δημόσια υγεία.

Με βάση τη χημική τους δομή, οι κυανοτοξίνες κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες [41]:

- α) Κυκλικά πεπτίδια. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν η μικροκυστίνη (microcystin) και η νοντουλαρίνη (nodularin). Οι τοξίνες αυτές απελευθερώνονται στο περιβάλλον μετά τη λύση του κυανοβακτηριακού κυττάρου. Τα μόρια αυτά είναι διαλυτά στο νερό και για να περάσουν τη λιπιδιακή μεμβράνη των κυττάρων χρησιμοποιούν πρωτεΐνες-μεταφορείς που φυσιολογικά μεταφέρουν θρεπτικά στοιχεία για το κύτταρο.
- β) Αλκαλοειδή. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τις τοξίνες ανατοξίνη-α (anatoxin-a), ανατοξίνη-α(S) (anatoxin-a(S)), σαξιτοξίνη (saxitoxin), κυλινδροσπερμοψίνη (cylindrospermopsin), απλυσιατοξίνη (aplysiatoxin), λυνγκμπυατοξίνη-α (lyngbyatoxin-a). Οι ανατοξίνες και οι σαξιτοξίνες είναι νευροτοξίνες ενώ η κυλινδροσπερμοψίνη είναι ηπατοτοξίνη.
- γ) Λιποπολισακχαρίτες (LPS). Είναι μεγάλα μόρια τα οποία βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη του κυτταρικού τοιχώματος των κυανοβακτηρίων. Συμπεριφέρονται ως ενδοτοξίνες και μπορούν να προκαλέσουν ερεθισμό και αλλεργικές αντιδράσεις όταν έρθουν σε επαφή με κάποιο ιστό.

Μικροκυστίνες (microcystins, MCs)

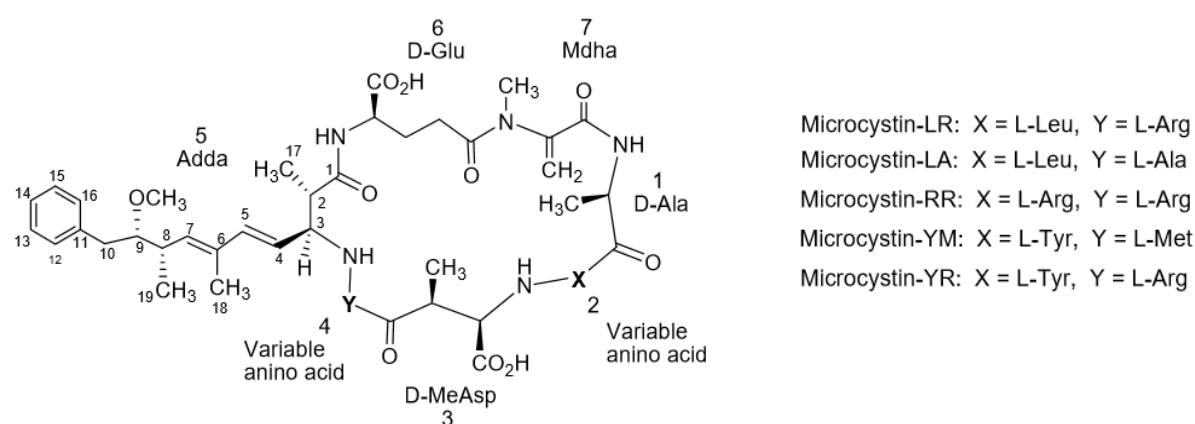
Η πιο γνωστή και η πιο καλά μελετημένη κυανοτοξίνη είναι η μικροκυστίνη. Έχουν καταγραφεί περιστατικά δηλητηρίασης από μικροκυστίνες τόσο σε ζώα όσο και σε ανθρώπους. Μαζικοί θάνατοι πτηνών φλαμίνγκο στη λίμνη Bogoria (Κένυα) το 2001 [42] αποδόθηκαν σε μικροκυστίνες ενώ το πρώτο επιβεβαιωμένο περιστατικό σε ανθρώπους ήταν ο θάνατος ασθενών στο Caruaru (Βραζιλία) το 1996 μετά από επιμόλυνση με μικροκυστίνες που περιείχε το υγρό αιμοκάθαρσης [43].

Μικροκυστίνες είναι γνωστό ότι παράγονται από κυανοβακτήρια που ανήκουν στα γένη *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix* και πιο σπάνια *Anabaenopsis* και *Nostoc*. Η παραγωγή μικροκυστινών από τα κυανοβακτήρια επηρεάζεται από φυσικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το άζωτο, ο φώσφορος, τα ίχνη μετάλλων, η θερμοκρασία, η ηλιακή ακτινοβολία και το pH [38]. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί περισσότερα από 90 ανάλογα μικροκυστίνης. Είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια καθώς παραμένουν αμετάβλητα ακόμη και μετά από βρασμό ή χημική υδρόλυση. Η πιο συχνή αλλά και η πιο τοξική φαίνεται να είναι η MC-LR για την οποία ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ.) έχει θεσπίσει όρια ασφαλείας (1μg/L ως ανώτατο

επιτρεπτό όριο της τοξίνης στο πόσιμο νερό, 20μg/L ως ανώτατο όριο στο νερό που χρησιμοποιείται για αναψυχή και 0.04mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα ως ανεκτή ημερήσια πρόσληψη) [38].

Δομή και δράση μικροκυστινών

Οι μικροκυστίνες είναι κυκλικά επταπεπτίδια με γενική δομή *cyclo*-(D)-Ala-X-(D)-*erythro*-β-methyl-*iso*-Asp-Y-Adda-(D)-*iso*-Glu-N-methyldehydro-Ala, όπου X, Y, αποτελούν θέσεις διάφορων αμινοξέων όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1.13**.



Εικόνα 1.13: Κυκλική δομή της μικροκυστίνης. Τα ανάλογά της δημιουργούνται από τον διαφορετικό συνδυασμό των αμινοξέων στις θέσεις X,Y

Το Adda ([2S,3S,8S,9S]-3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid) είναι μια ασυνήθιστη δομή και χαρακτηριστική των MCs και παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργότητα της τοξίνης [28, 38].

Η μεταφορά των MC μέσα στα κύτταρα πραγματοποιείται από ειδικές πρωτεΐνες-μεταφορείς τους OATPs (Organic Anion Transporting Polypeptides) [38, 44]. Μέλη της οικογένειας μεταφορέων OATPs εντοπίζονται κυρίως στο ήπαρ και αυτός είναι ο λόγος που ο κύριος στόχος των MCs είναι το συγκεκριμένο όργανο [36].

Παρόλο που έχει μελετηθεί η επίδραση της MC στα ηπατοκύτταρα, δεν είναι ακόμη γνωστός ο οικολογικός ρόλος που μπορεί να έχουν οι MC. Αρχικά υπήρχε η άποψη ότι οι MCs λειτουργούσαν σαν αμυντικοί μηχανισμοί των κυανοβακτηρίων έναντι της θήρευσης από το ζωοπλαγκτόν. Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι τα κυανοβακτήρια που παράγουν MC έχουν εμφανιστεί αρκετά νωρίς κατά την εξέλιξη

και προϋπήρχαν των μεταζώων και κατά συνέπεια αναζητείται κάποιος άλλος πιθανός οικολογικός ρόλος [38, 45]. Έχουν γίνει διάφορες υποθέσεις όπως ότι χρησιμεύουν σε λειτουργίες όπως η αντίδραση στις ουσίες (infochemicals) που απελευθερώνονται από το ζωοπλαγκτόν, η απομάκρυνση ιχνοστοιχείων, η σηματοδότηση ή/και η γονιδιακή ρύθμιση ή ακόμα και να έχουν ρόλο μεταβολίτη ο οποίος ρυθμίζει πρωτεΐνες και προστατεύει από το οξειδωτικό στρες [38, 46].

1.3. Οι λίμνες ως οικοσυστήματα- Αρχαίες λίμνες

Λίμνη θεωρείται μια μεγάλη ή μικρή μάζα νερού (γλυκού, υφάλμυρου, αλμυρού) συγκεντρωμένη σε κοιλότητα της επιφάνειας της γης χωρίς άμεση επικοινωνία με τη θάλασσα. Οι λίμνες δεν είναι απλά συλλογές νερού αλλά οικοσυστήματα με αλληλεπιδράσεις μεταξύ ζώων, φυτών, μικροοργανισμών και του φυσικού και χημικού περιβάλλοντος στο οποίο ζουν [47].

Οι λίμνες κατατάσσονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με το γενεσιουργό τους αίτιο: i) τεκτονικές (Βαϊκάλη, Τανγκανίκα κ.α.), ii) ηφαιστειακές (Crater Lake, Crater Butter Lake κ.α.), iii) Παγετωνικές (μεγάλες λίμνες Β.Αμερικής, Β.Ευρώπης κ.α.), iv) καρστικές (Παμβώτιδα, Καστοριάς, Πρέσπες κ.α.), v) παράκτιες (Αγουλινίτσας, λιμνοθάλασσες κ.α.).

Επίσης, υπάρχουν και βασικές παράμετροι που προσδιορίζουν τη δομή των λιμναίων οικοσυστημάτων. Τέτοιες είναι α) η γεωμορφολογία της λίμνης (έκταση, μήκος, βάθος, όγκος νερού, μήκος ακτογραμμής), β) η λεκάνη απορροής, γ) η κατανομή φυσικών και χημικών παραμέτρων (φως, χρώμα, οσμή, θερμοκρασία, ηλεκτρική αγωγιμότητα, διαλυμένο οξυγόνο, βιοχημική αποδόμηση, ενεργός οξύτητα, θρεπτικά στοιχεία, τοξικές ουσίες) και δ) η κατανομή βιολογικών παραμέτρων (οργανισμοί που ζουν στη λίμνη).

Ανάλογα με την ποιότητα των υδάτων τους, οι λίμνες διακρίνονται σε oligοτροφικές αν εμφανίζουν χαμηλές ποσότητες βιομάζας και μικρές συγκεντρώσεις θρεπτικών συστατικών και σε ευτροφικές αν εμφανίζουν μεγάλη παραγωγή βιομάζας (www.kpe.gr/documents/kallisto/water_ecosystem.pdf).

Αρχαίες λίμνες

Σύμφωνα με τον αρχικό γενικό ορισμό, αρχαίες θεωρούνται οι λίμνες που παρουσιάζουν διαρκή ύπαρξη για περισσότερα από ένα εκατομμύριο χρόνια. Στις πρόσφατες μελέτες όμως, ως «αρχαίες» θεωρούνται και οι λίμνες εκείνες που η ηλικία τους είναι εκατοντάδες χιλιάδες χρόνια αλλά εμφανίζουν αυξημένη ποικιλότητα και φιλοξενούν μεγάλο αριθμό ενδημικών ειδών [48, 49].

Λόγω της παρατεταμένης ζωής τους και της γεωγραφικής τους απομόνωσης οι αρχαίες λίμνες χρησιμοποιούνται σαν μοντέλα μελέτης της εξέλιξης των ειδών σε συσχέτιση με τις περιβαλλοντικές αλλαγές στην πορεία του χρόνου.

Μερικές από τις αρχαίες λίμνες ανά τον κόσμο είναι:

Κασπία Θάλασσα	5.5 εκατομμυρίων ετών
Λίμνη Βαϊκάλη (Σιβηρία)	25-30 εκατομμυρίων ετών
Λίμνη Μπίβα (Ιαπωνία)	4 εκατομμυρίων ετών
Λίμνη Οχρίδα (Βαλκάνια)	5 εκατομμυρίων ετών
Λίμνη Τανγκανίκα (Αφρική)	9-12 εκατομμυρίων ετών

Στην Ευρώπη, οι περισσότερες αρχαίες λίμνες ή δυνητικά αρχαίες λίμνες βρίσκονται στην περιοχή των Βαλκανίων. Τα Βαλκάνια θεωρούνται βιογεωγραφικά μια περιοχή υψηλής ποικιλότητας και ένα παγκόσμιο “hotspot” της ενδημικής ποικιλότητας των οικοσυστημάτων γλυκού νερού. Αρχαιότερη λίμνη θεωρείται η λίμνη Οχρίδα (5 εκατομ.ετών). Η λίμνη Οχρίδα είναι η βαθύτερη λίμνη των Βαλκανίων (μέγιστο βάθος 288m) και έχει τη μεγαλύτερη βιοποικιλότητα στον κόσμο σε σχέση με την επιφάνειά της [50, 51].

Σύμφωνα με μελέτες απολιθωμάτων καθώς και μοριακές εξελικτικές μελέτες, μεγάλες λίμνες που βρίσκονται εντός ακτίνας 300km με κέντρο τη λίμνη Οχρίδα και φιλοξενούν ενδημικά είδη, θεωρούνται επίσης αρχαίες λίμνες [51]. Σε αυτή την ακτίνα περιλαμβάνονται αρκετές ελληνικές λίμνες (**Εικόνα 1.14**).



Εικόνα 1.14: Μέσα σε ακτίνα 300km με κέντρο τη λίμνη Οχρίδα, βρίσκονται οι αρχαιότερες λίμνες της Ευρώπης στις οποίες περιλαμβάνεται η λίμνη Παμβώτιδα [51]

1.3.1. Αρχαίες λίμνες της Ηπείρου

Μερικές από τις σημαντικότερες λίμνες της Ηπείρου οι οποίες θεωρούνται αρχαίες είναι η λίμνη Ζηρού, η λίμνη Ζαραβίνα και η λίμνη Παμβώτιδα την οποία και μελετήσαμε στην παρούσα εργασία.

Λίμνη Ζηρού

Η Λίμνη Ζηρού (επίσης και "Λίμνη Ζηρός")(39°14'N, 20°50'E) βρίσκεται 2km δυτικά της επαρχιακής οδού Άρτας - Φιλιπιάδας – Ιωαννίνων και ανήκει στο δήμο Ζηρού. Έχει επιφάνεια 0.372km², υψόμετρο 56m και μέγιστο βάθος περίπου 60m, καθιστώντας την τη δεύτερη βαθύτερη φυσική λίμνη στην Ελλάδα. Η δημιουργία της λίμνης Ζηρού φαίνεται να οφείλεται στην τεκτονοκαρστική δραστηριότητα της περιοχής. Οι γεωλόγοι πιστεύουν ότι η λίμνη αποτελούσε λιμναίο σπήλαιο, αλλά η οροφή κατέρρευσε προ 10.000 ετών περίπου. Σήμερα χρησιμοποιείται για αρδευτικούς σκοπούς και για αναψυχή. Παρόλο που θεωρείται ολιγοτροφική, στα νερά της διαπιστώθηκε η άνθιση του κυανοβακτηρίου *Planktothrix rubescens* και ανιχνεύθηκαν

συγκεντρώσεις μικροκυστίνης [52]. Το έτος 1999 η λίμνη Ζηρού εντάχθηκε στο πρόγραμμα Natura 2000.

Λίμνη Ζαραβίνα

Η λίμνη Ζαραβίνα- απαντάται και με τα ονόματα Τζιραβίνα, Νεζερός, Νιζερός, λίμνη Δελβινακίου- βρίσκεται στο δήμο Πωγωνίου, στο νομό Ιωαννίνων, σε ένα λεκανοπέδιο 10km νοτιοδυτικά από το Δελβινάκι και σε υψόμετρο 458m. Το σχήμα της είναι σχεδόν κυκλικό με περίμετρο περίπου 2.2km και επιφάνεια 0.285km². Έχει βάθος 31.5m κατατάσσοντάς την 5^η βαθύτερη φυσική ελληνική λίμνη και 2^η βαθύτερη λίμνη στην Ήπειρο. Ανήκει στην ομάδα των καρστικών λιμνών και είναι αποτέλεσμα τεκτονικών κινήσεων. Λόγω του βάθους της, της διαύγειας των νερών και της απόστασης που έχει από οικισμούς και ανθρωπογενείς δραστηριότητες, θεωρείται oligοτροφική και δεν έχουν παρατηρηθεί κυανοβακτηριακές ανθίσεις. Όμως ανιχνεύθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις μικροκυστίνης στα νερά της κυρίως το φθινόπωρο και τον χειμώνα του 2006 [27]. Λόγω της σπουδαιότητάς της υπάγεται στο δίκτυο Natura 2000, με υψηλή προτεραιότητα προστασίας και με κωδικό GR2130010. (www.ydronautes.gr , www.naturagraeca.com , www.envifriends.blogspot.gr).

Λίμνη Παμβώτιδα

Η λίμνη Παμβώτιδα (39°40'N, 20°53'E) βρίσκεται σε 470m υψόμετρο στο λεκανοπέδιο Ιωαννίνων και περιβάλλεται από τα βουνά της Πίνδου. Η διάβρωση των υπόγειων ασβεστολιθικών υποστρωμάτων κατά την Πλειο-Πλειοστόκαινο εποχή (2.588.000 με 11.700 χρόνια περίπου πριν), δημιούργησε μια πίεση γνωστή ως πόλγη (rolje). Αυτή η πίεση σε συνδυασμό με καθιζήσεις λόγω τεκτονικής δραστηριότητας, είναι οι λόγοι εκείνοι που οδήγησαν στη δημιουργία της λεκάνης της λίμνης. Η μελέτη πυρήνων ιζημάτων της λίμνης από το Ελληνικό Ινστιτούτο Γεωλογικών και Μεταλλευτικών Ερευνών (IGME) αποκάλυψε πως ο πυθμένας της λίμνης αποτελείται από φερτά υλικά ποταμών. Επιπλέον, εντοπίστηκαν πολλές υπο-λεκάνες οι οποίες δημιουργήθηκαν από ξεχωριστά τεκτονικά γεγονότα.

Μια ομάδα οργανισμών που έχουν μελετηθεί εκτενώς στις αρχαίες λίμνες είναι τα γαστερόποδα (gastropod molluscs). Τα μαλάκια που εντοπίζονται στα Βαλκάνια (και

ιδιαίτερα στην Ελλάδα) έχουν μελετηθεί εκτενώς κατά τους τελευταίους δυο αιώνες. Τα απολιθώματα γαστερόποδων αλλά και τα ενδημικά είδη που έχουν εντοπισθεί, βοήθησαν στον προσδιορισμό της ηλικίας της λίμνης καθώς και στην αναγνώριση της αυξημένης βιολογικής της ποικιλότητας [53].

Ο Dollfus το 1922 περιέγραψε 9 είδη απολιθωμένων μαλακίων της Πλειοκαίνου εποχής τα οποία συλλέχθηκαν στη νότια πλευρά της λίμνης. Δείγματα από την ίδια περιοχή μελέτησαν οι Aubouin (1959), Gillet (1962) και Guernet (1977) συλλέγοντας συνολικά 18 διαφορετικά είδη απολιθωμένων μαλακίων [53].

Μελέτες σε πυρήνες ιζημάτων (βάθος 130m, 319m) [54] έφεραν στην επιφάνεια βραχώδη υποστρώματα που χρονολογήθηκαν και φαίνεται να ανήκουν στην Πλειο-Πλειστόκαινο εποχή καθώς επίσης και απολιθώματα ηλικίας τουλάχιστον 450.000 ετών (Holocene) [54, 55].

Η παλαιότερη μελέτη σχετικά με τη “μοντέρνα” πανίδα της λίμνης πραγματοποιήθηκε από τον Mousson (1859) ο οποίος περιέγραψε 38 είδη μαλακίων. Η πιο πρόσφατη μελέτη πραγματοποιήθηκε το 1994 και 1998 όπου ανακτήθηκαν 26 απολιθώματα υδρόβιων ειδών [53, 54]. Τουλάχιστον δυο είδη βρέθηκαν να είναι ενδημικά (*Paladhiliopsis janinensis*, *Gyraulus janinensis*) και άλλα 3 πιθανόν ενδημικά (*Bithynia graeca*, *Pseudobithynia westerlundii*, *Valvata sp.*) [56].

Οι Wilke και συνεργάτες το 2010 μελέτησαν το μαλάκιο *Dreissena sp.* στις αρχαίες λίμνες των Βαλκανίων και προσπάθησαν να προσδιορίσουν την κατανομή του. Ο υψηλός βαθμός βιοποικιλότητας των Βαλκανικών ασπονδύλων σχετίζεται με i) τον ρόλο που έπαιξαν τα Βαλκάνια ως ένα από τα σημαντικότερα ευρωπαϊκά καταφύγια κατά την Πλειστόκαινο Εποχή ii) τη μακρά γεωλογική ιστορία iii) τις ποικίλες βιογεωγραφικές ζώνες iv) τη μεγάλη ποικιλότητα ως προς τα φυσικοχημικά και γεωμορφολογικά χαρακτηριστικά αυτών των υδάτινων οικοσυστημάτων. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν δείγματα *Dreissena sp.* από 47 περιοχές των Βαλκανίων. Στα όρια της γεωγραφικής κατανομής του μαλακίου εντοπίστηκαν τέσσερις ξεχωριστές ομάδες-πληθυσμοί. Τα περισσότερα δείγματα από τις Πρέσπες σχηματίζουν μια ξεχωριστή ομάδα. Μια δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τα δείγματα από την Παμβώτιδα, ενώ δείγματα από την Οχρίδα και τις ανατολικές λίμνες (Δοϊράνη, Βεγορίτιδα, Βόλβη), σχηματίζουν δυο ξεχωριστές ομάδες αντίστοιχα [48]. Τα ευρήματα αυτά συμπληρώνουν τις πληροφορίες που έχουμε για την ηλικία αλλά και τη μοναδικότητα

της λίμνης Παμβώτιδας. Έτσι, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή οδηγία Habitats Directive, ΕΕ, 92/43, η λίμνη Παμβώτιδα συμπεριλαμβάνεται στις προστατευόμενες περιοχές Natura 2000.

Η λίμνη σήμερα έχει μέγιστο βάθος περίπου 9m (μέσο βάθος 4.3m) και επιφάνεια 23km². Το μέγιστο μήκος της είναι περίπου 8km και το μέγιστο πλάτος της είναι περίπου 5km. Παλαιότερα η λίμνη ήταν μεγαλύτερη αλλά στο τέλος του 19ου αιώνα, το βορειοδυτικό τμήμα της αποξηράνθηκε τεχνητά για γεωργικούς σκοπούς. Η Παμβώτιδα είναι μια λίμνη γλυκού νερού, ευτροφική, με pH περίπου 7.6. Θεωρείται πολυμεικτική [57] με εμφάνιση μιας ασταθούς θερμικής στρωμάτωσης κατά τη διάρκεια της καλοκαιρινής περιόδου. Γενικώς η λίμνη επηρεάζεται πολύ από τους ανέμους και παρουσιάζει φαινόμενα ανάδευσης ιζημάτων και αλγών. Επιπλέον, χρησιμοποιείται για διάφορους σκοπούς όπως αναψυχή, αλιεία και άρδευση [58].

Η τροφική κατάσταση της λίμνης και η ποιότητα των υδάτων της έχει εκτιμηθεί σε διάφορες μελέτες. Οι Kagalou και συνεργάτες [59] χρησιμοποίησαν λιμνολογικά δεδομένα από τρεις διαφορετικές περιόδους (1985-1988, 1998-1999, 2004-2005) με σκοπό να εκτιμηθεί η τροφική κατάσταση του οικοσυστήματος. Με βάση αυτά τα δεδομένα η λίμνη χαρακτηρίστηκε ευτροφική. Δεδομένου ότι περίπου το 40% της λεκάνης απορροής της λίμνης χρησιμοποιείται για γεωργικούς σκοπούς και ότι τα αστικά λύματα κατέληγαν στη λίμνη (μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του '90), τα επίπεδα αζώτου και φωσφόρου που ανιχνεύτηκαν ήταν υψηλά και δικαιολογούσαν την τροφική της κατάσταση. Μετά την εκτροπή των αποβλήτων και τη δημιουργία βιολογικού καθαρισμού (1994), τα επίπεδα αζώτου και φωσφόρου μειώθηκαν αισθητά, όμως εξακολουθούσαν να παραμένουν σε υψηλά επίπεδα και η λίμνη να εμφανίζει ευτροφισμό. Μπορεί οι εισροές αυτών των στοιχείων να σταμάτησαν, όμως το εσωτερικό φορτίο της λίμνης σε άζωτο και φώσφορο, τα οποία ίσως είναι συγκεντρωμένα στον πυθμένα, θα κάνουν δεκαετίες να μειωθούν.

Η ευτροφική κατάσταση της λίμνης επιβεβαιώθηκε και από μια ακόμη μελέτη που αφορούσε εννέα Ελληνικές λίμνες, κατά τα έτη 1994, 1995, 1999, 2000. Όσον αφορά τη λίμνη Παμβώτιδα, η τιμή CBV (cyanobacterial biovolume) ήταν η υψηλότερη απ' όλες τις λίμνες. Επιπλέον, οι τιμές CBV και Chla (chlorophyll a) ξεπερνούσαν σημαντικά το Alert Level 2 για το πόσιμο νερό και το Guidance Level 2 για τα ύδατα αναψυχής που έχει θεσπίσει ο Π.Ο.Υ. [60].

Η υπερβολική άνθιση κυανοβακτηρίων επιφέρει και άλλα προβλήματα όπως η απελευθέρωση κυανοτοξινών στο νερό. Το 2005 υπήρξε έντονη άνθιση κυανοβακτηρίων στη λίμνη και ανιχνεύτηκαν υψηλές συγκεντρώσεις μικροκυστίνης στο νερό, με τα υψηλότερα επίπεδα να καταγράφονται το φθινόπωρο. Επιπλέον, ανιχνεύτηκε μικροκυστίνη σε υψηλά επίπεδα στους ιστούς του *Carasius gibelio* [61] αλλά και σε δίθυρα που αλιεύτηκαν στη λίμνη [62].

Οι Vareli και συνεργάτες θέλησαν να προσδιορίσουν τόσο τα είδη των κυανοβακτηρίων που επικρατούν στη λίμνη όσο και τα κυανοβακτήρια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της μικροκυστίνης [62]. Από την μικροσκοπική ανάλυση των κυανοβακτηριακών δειγμάτων διαπιστώθηκε η ύπαρξη δυο κυρίαρχων ομάδων κυανοβακτηρίων. Η ομάδα *Microcystis sp.* που είναι καλώς χαρακτηρισμένη παγκοσμίως και βρέθηκε σε αφθονία τους φθινοπωρινούς μήνες και μια ομάδα νηματοειδών κυανοβακτηρίων (*Anabaena sp.* και/ή *Aphanizomenon sp.*) που βρέθηκε σε αφθονία τους καλοκαιρινούς μήνες. Με βάση τη φυλογενετική ανάλυση της ITS περιοχής των κυανοβακτηρίων, διαπιστώθηκε πως οι αλληλουχίες *Microcystis sp.* από τη λίμνη Παμβώτιδα έχουν υψηλή ομολογία με αλληλουχίες αντίστοιχες από άλλες λίμνες παγκοσμίως, ενώ οι αλληλουχίες των νηματοειδών κυανοβακτηρίων εμφανίζουν χαμηλή ομολογία με άλλες αντίστοιχες γνωστές αλληλουχίες DNA και σχηματίζουν μια ξεχωριστή ομάδα στο φυλογενετικό δένδρο. Τέλος, η μελέτη του γονιδίου *mcyE* (συνθετάση της μικροκυστίνης) φανέρωσε πως τα κυανοβακτήρια του γένους *Microcystis sp.* είναι τα μόνα υπεύθυνα για την παραγωγή μικροκυστίνης στη λίμνη Παμβώτιδα [62].

Η λίμνη Παμβώτιδα είναι ένα οικοσύστημα εξαιρετικής αξίας και διάφοροι τρόποι αποκατάστασης έχουν εφαρμοστεί κατά καιρούς. Όμως η αποκατάσταση των ρηχών λιμνών είναι πιο δύσκολη συγκριτικά με την αποκατάσταση των βαθέων λιμνών και απαιτεί πολλά χρόνια. Οι ρηχές λίμνες επηρεάζονται έντονα από τις κλιματικές αλλαγές, την αύξηση της θερμοκρασίας αλλά επιπλέον υπάρχει και έντονη αλληλεπίδραση των ιζημάτων με τον όγκο νερού [57, 59]. Μετά από πολλές προσπάθειες αποκατάστασης της λίμνης, έγινε αντιληπτό πως η σύνδεση μεταξύ ευτροφισμού και περιβαλλοντικών παραγόντων είναι πολύπλοκη. Το Artificial Neural Networks (ANNs) είναι ένα ισχυρό εργαλείο το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση του ευτροφισμού. Με τη λίμνη Παμβώτιδα ως μοντέλο μελέτης, έγινε προσπάθεια σύνδεσης των παραμέτρων που σχετίζονται με τον ευτροφισμό και τη

Ch1a. Οι συνδυασμοί των παραμέτρων που έχουν την πιο σημαντική επίδραση στις συγκεντρώσεις Ch1a βρέθηκε να είναι πρωτίστως η σχέση θερμοκρασία νερού-ενεργός διαλυτός φώσφορος (WT-SRP) και δευτερευόντως η σχέση WT-Secchi Disk, WT-pH [63].

1.4. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η Παμβώτιδα είναι μια αρχαία ευτροφική λίμνη με τεράστια σημασία για την ποικιλότητα στα Βαλκάνια και στην Ευρώπη. Η μικροβιακή της χλωρίδα εν πολλοίς παρέμενε άγνωστη μέχρι την έναρξη αυτής της εργασίας.

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η μελέτη των μικροβιακών κοινοτήτων της λίμνης Παμβώτιδας με τη χρήση τόσο κλασικών μοριακών τεχνικών όσο και τεχνικών επόμενης γενιάς. Επιπλέον, έγινε προσπάθεια απομόνωσης και καλλιέργειας ετερότροφων Βακτηρίων και κυανοβακτηρίων από το παραπάνω οικοσύστημα καθώς και δοκιμές εκχυλισμάτων αυτών με σκοπό την ανίχνευση πιθανών αντινεοπλασματικών παραγόντων.

Πιο συγκεκριμένα οι στόχοι ήταν:

- 1) **Φυλογενετική μελέτη** Βακτηρίων και Αρχαίων σε δείγματα νερού και ιλύος της λίμνης Παμβώτιδας και προσπάθεια ανίχνευσης νέων ειδών/στελεχών.
- 2) **Προσδιορισμός της προκαρυωτικής αφθονίας** στα δείγματα νερού και ιλύος της λίμνης Παμβώτιδας και προσπάθεια συσχετισμού της βιοποικιλότητας και της αφθονίας με τα φυσικοχημικά της χαρακτηριστικά.
- 3) **Απομόνωση και καλλιέργεια ετερότροφων Βακτηρίων και κυανοβακτηρίων** σε συνθήκες εργαστηρίου από τη λίμνη Παμβώτιδα και έλεγχο εκχυλισμάτων αυτών για πιθανή αντικαρκινική δράση.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Μικροβιακή ποικιλότητα στη λίμνη Παμβώτιδα

2.1.1. Λήψη δειγμάτων για τη μοριακή χαρτογράφηση Βακτηρίων και Αρχαίων

Για τη λήψη των δειγμάτων προς μελέτη επιλέξαμε δυο σταθμούς στη λίμνη Παμβώτιδα (SS1: Sample Station 1, SS2: Sample Station 2). Οι σταθμοί δειγματοληψίας παρουσιάζονται στην **Εικόνα 2.1**. Ο σταθμός 1 βρίσκεται στο κέντρο της λίμνης με συντεταγμένες $39^{\circ}39'39.4''\text{N}$ $20^{\circ}53'03.5''\text{E}$ και βάθος περίπου 7.5 μέτρα το οποίο αλλάζει ανάλογα με την εποχή. Ο σταθμός 2, στον οποίο μετρήθηκε το μέγιστο βάθος της λίμνης, βρίσκεται κοντά στο «Νησάκι» με συντεταγμένες $39^{\circ}40'41.5''\text{N}$ $20^{\circ}52'50.1''\text{E}$ και βάθος περίπου 9.5 μέτρα το οποίο επίσης αλλάζει ανάλογα με την εποχή.



Εικόνα 2.1: Λίμνη Παμβώτιδα. Απεικόνιση των σταθμών δειγματοληψίας. SS1: Σταθμός δειγματοληψίας 1 (Sample Station 1), SS2: Σταθμός δειγματοληψίας 2 (Sample Station 2)

2.1.1.1. Λήψη δειγμάτων νερού από την επιφάνεια και τον πυθμένα

Με τη χρήση αποστειρωμένων δοχείων συλλέξαμε επιφανειακό νερό (5εκ. κάτω από την επιφάνεια του νερού) και από τους δυο σταθμούς, το οποίο διατηρήσαμε σε φορητό ψυγείο μέχρι τη μεταφορά του στο εργαστήριο.

Με τη χρήση της συσκευής Windaus (Labortechnik, GmbH & Co.KG) συλλέξαμε νερό από τον πυθμένα των δυο σταθμών το οποίο τοποθετήσαμε σε αποστειρωμένα δοχεία και διατηρήσαμε σε φορητό ψυγείο μέχρι τη μεταφορά του στο εργαστήριο. Δείγματα συλλέχθηκαν από τις 4 εποχές του έτους (έτος 2010).

2.1.1.2. Λήψη δειγμάτων ιλύος

Για τη λήψη επιφανειακής ιλύος (5-10εκ.) από τον πυθμένα των δυο σταθμών της λίμνης Παμβώτιδας χρησιμοποιήσαμε συσκευή τύπου grabber. Τα δείγματα ιλύος τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα δοχεία και στη συνέχεια μοιράστηκαν σε αποστειρωμένα σωληνάρια τα οποία διατηρήσαμε σε φορητό ψυγείο μέχρι τη μεταφορά τους στο εργαστήριο. Δείγματα συλλέχθηκαν από τις 4 εποχές του έτους (έτος 2010).

2.1.2. Μέτρηση φυσικοχημικών παραμέτρων των δειγμάτων

Μέρος των δειγμάτων που συλλέχθηκαν από τη λίμνη Παμβώτιδα χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση φυσικοχημικών παραμέτρων.

Οι μετρήσεις των φυσικοχημικών παραμέτρων στα δείγματα νερού πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με το Εργαστήριο της Χημικής Υπηρεσίας Ηπείρου & Δυτ. Μακεδονίας.

Συνοπτικά, το διαλυμένο οξυγόνο O_2 (mg/L) μετρήθηκε με το πολυόργανο HACH HQ40d (μέθοδος Membrane Electrode) και σύμφωνα με την πρότυπη μέθοδο 4500-O G [64]. Τα ιόντα αμμωνίου NH_4^+ (mg/L) προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο ινδοφαινόλης η οποία είναι σύμφωνη με τα πρότυπα ISO 7150-1 και DIN 38406 E5-1. Χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα φιαλίδια προς μέτρηση της εταιρείας HACH-LANGE και συγκεκριμένα το LCK 304. Το εύρος των μετρήσεων για τα ιόντα αμμωνίου κυμαίνεται από 0.02-2.5 mg/L.

Τα νιτρώδη NO_2^- (mg/L), τα νιτρικά NO_3^- (mg/L) ιόντα καθώς και τα ορθοφωσφορικά (PO_4^{3-}) και ο ολικός φωσφόρος P_2O_5 (mg/L), μετρήθηκαν φασματοφωτομετρικά με τη

χρήση φασματοφωτόμετρου NOVA 60 της εταιρείας MERCK. Ο προσδιορισμός των NO_2^- (mg/L) έγινε σύμφωνα με την πρότυπη μέθοδο 4500- NO_2^- B [64] και DIN EN 26777 και το εύρος των μετρήσεων κυμαίνεται από 0.07-3.28 mg/L. Τα NO_3^- (mg/L) προσδιορίστηκαν με μέθοδο ανάλογη του προτύπου DIN 38405-9 με εύρος μετρήσεων από 0.4-110.7 mg/L. Τέλος, τα ορθοφωσφορικά και ο ολικός φωσφόρος προσδιορίστηκαν με μέθοδο ανάλογη της EPA 365.2+3 και των προτύπων 4500-P E [64] και ISO 6878. Το εύρος των τιμών κυμαίνεται από 0.11-11.46 mg/L.

Για τις παραπάνω μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα φιαλίδια προς μέτρηση της εταιρείας MERCK.

Επίσης, για τον προσδιορισμό των ιόντων K^+ , Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} χρησιμοποιήθηκε η συσκευή ιοντικής χρωματογραφίας METROHM 761 του Εργαστηρίου της Χημικής Υπηρεσίας Ηπείρου & Δυτ. Μακεδονίας.

Οι μετρήσεις των φυσικοχημικών παραμέτρων στα δείγματα ιλύος της λίμνης Παμβώτιδας πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με το εργαστήριο Περιβαλλοντικής Χημείας και Τεχνολογίας του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών με υπεύθυνο καθηγητή τον κ.Πηλίδη Γεώργιο, με τη βοήθεια του κ. Αλίβερτη Δ.

Για τη μέτρηση των φυσικοχημικών παραμέτρων, πραγματοποιήθηκε αρχικά ξήρανσή τους στους 70°C για 24h. Οι τιμές pH προσδιορίστηκαν προσθέτοντας στα δείγματα 1M KCl σε αναλογία 1:2 και χρησιμοποιώντας πεχάμετρο (Hanna Instruments ph211) [65].

Για τον προσδιορισμό της τιμής των ιόντων, 2gr από κάθε δείγμα εκχυλίστηκαν εις διπλούν με 20ml δις απεσταγμένου νερού για τη μέτρηση των ανιόντων Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} και με 20ml υδατικού διαλύματος 40mM νιτρικού οξέος για τη μέτρηση των κατιόντων Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , με τη χρήση συσκευής υπερήχων για 30 min. Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα φυγοκεντρήθηκαν, ενώθηκαν και διαλύθηκαν σε δις-απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 50ml. Κατόπιν, 20μl από κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε HPLC με ανιχνευτή αγωγιμότητας (Shimadzu CDD-10A VD). Για την ανίχνευση των κατιόντων χρησιμοποιήθηκε στήλη IC YK-421 σε συνδυασμό με στήλη Shodex IC YK-G. Για την ανίχνευση των ανιόντων χρησιμοποιήθηκε IC NI-424 στήλη σε συνδυασμό με στήλη IC NI-G. Σαν διαλύματα αναφοράς για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα με συγκεντρώσεις από 1-100mg/L σε 7 επίπεδα [66].

Η μέτρηση του ολικού άνθρακα (TOC) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αναλυτή Shimadzu TOC-VCPH (Shimadzu Corporation, Japan) και μιας μονάδας καύσης SM-5000A. Ο ολικός οργανικός άνθρακας προέκυψε αφαιρώντας τον ανόργανο άνθρακα από τον ολικό.

Η μέτρηση του ολικού αζώτου (TN) στα ιζήματα, προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά μέσω Total Kjeldahl (μέθοδος Nessler). Πραγματοποιήθηκε πέψη με HACH Digesdahl Apparatus μαζί με 3ml H₂SO₄ (98% v/v) στους 450°C. Η συγκέντρωση του TKN των δειγμάτων μετρήθηκε με φασματοφωτόμετρο HACH DR/2010 στα 460 nm.

Ο ολικός φώσφορος (TP) στα δείγματα ιλύος μετρήθηκε με τη μέθοδο molybdenum blue (HACH) [67].

Οι μετρήσεις των βαρέων μετάλλων πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Περιβαλλοντικών Αναλύσεων (Polyeco A.E. Βιομηχανία Διαχείρισης & Αξιοποίησης Αποβλήτων, Ασπρόπυργος).

Για τη μέτρηση βαρέων μετάλλων Sb, Ni, Hg, Se, Cd, Mn, Pb, Fe, Cu, Cr, Zn και As χρησιμοποιήθηκε το ICP-AES φασματοφωτόμετρο (Thermo Scientific iCAP 6300 ICP Spectrometer) [68].

2.1.3. Επεξεργασία και αποθήκευση δειγμάτων

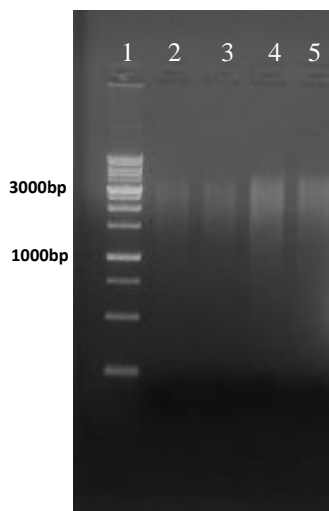
Τα δείγματα νερού φιλτραρίστηκαν με τη χρήση συσκευής φιλτραρίσματος (PALL CORPORATION) και φίλτρων 0.45μm (S-Pak Membrane Filters, Millipore Corporation, Billerica, USA). Τα φίλτρα (100ml νερό/φίλτρο) αποθηκεύτηκαν στους -20°C για μελλοντική χρήση.

Τα δείγματα ιλύος φυγοκεντρήθηκαν στις 8500 rpm/10 min/RT και το ίζημα αφού ζυγίστηκε, αποθηκεύτηκε στους -20°C για μελλοντική χρήση.

Μέρος των δειγμάτων διατηρήθηκε στους 4°C άνευ επεξεργασίας για τη μελέτη του βιοχημικού προφίλ των μικροοργανισμών καθώς και για την ανάπτυξη βακτηριακών καλλιεργειών.

2.1.4. Εκχύλιση DNA από τα δείγματα νερού και ιλύος

Η εκχύλιση του DNA πραγματοποιήθηκε με τη συσκευασία υλικών PowerSoil DNA Isolation (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA 92010) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το καθαρό DNA αποθηκεύτηκε στους -20°C για μελλοντική χρήση. Για τον έλεγχο της απομόνωσης αλλά και τον ποιοτικό έλεγχο του DNA πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0.7% w/v (**Εικόνα 2.2**).



Εικόνα 2.2: Παράδειγμα ηλεκτροφόρησης DNA σε πηκτή αγαρόζης 0.7%w/v.

1: ladder 1Kb

2,3: DNA από επιφανειακό νερό Παμβώτιδας SS1, φθινόπωρο, χειμώνας

4,5: DNA από επιφανειακό νερό Παμβώτιδας SS2, φθινόπωρο, χειμώνας

Για τον ποσοτικό έλεγχο του DNA που απομονώθηκε πραγματοποιήθηκε φωτομετρική μέτρηση με NanoDrop® ND-1000. Το φασματοφωτόμετρο μετρά την απορρόφηση του δείγματος στα 260 nm (A_{260}). Πριν από τη μέτρηση, οι κυψελίδες του μηχανήματος καθαρίζονται και το μηχάνημα μηδενίζεται χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης. Για τη μέτρηση της απορρόφησης είναι απαραίτητο μόνο 1μl από κάθε δείγμα. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται αυτόματα σε ng/μl. Το πηλίκο της απορρόφησης του δείγματος 260nm/280nm αποτελεί τον δείκτη καθαρότητας του DNA. Λόγος απορρόφησης A_{260}/A_{280} κοντά στο 1.8 υποδεικνύει ένα καθαρό DNA.

2.1.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction -PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική η οποία μας δίνει τη δυνατότητα να ενισχύσουμε in vitro εκατομμύρια φορές και σε ελάχιστο χρόνο ένα επιθυμητό τμήμα DNA. Η μέθοδος πραγματοποιείται σε

συγκεκριμένες θερμοκρασίες και κύκλους με τη βοήθεια των θερμοκυκλοποιητών. Για την πραγματοποίηση της PCR χρειαζόμαστε:

- Αποστειρωμένο νερό
- Ρυθμιστικό διάλυμα
- Χλωριούχο Μαγνήσιο ($MgCl_2$)
- Δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs)
- Εκκινητές forward, reverse
- Δείγμα
- DNA πολυμεράση

Τα στάδια και οι κύκλοι ενός απλού πρωτοκόλλου PCR περιλαμβάνουν:

Στάδιο 1

Ενεργοποίηση ενζύμου (94-95°C)

Στάδιο 2

- a) Αποδιάταξη κλώνων DNA (denaturation)
- b) Σύνδεση εκκινητών (annealing)
- c) Επιμήκυνση συμπληρωματικού κλώνου (extension)

Τα βήματα του σταδίου 2 συνήθως επαναλαμβάνονται για 20-30 κύκλους

Στάδιο 3

Τελική επιμήκυνση κλώνου (final extension)

Στάδιο 4

Διατήρηση θερμοκρασίας στους 4°C (cooling)

Η DNA πολυμεράση και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήσαμε ήταν της εταιρείας KAPA Biosystems (KAPATaq PCR Kit). Η συγκεκριμένη πολυμεράση προσθέτει στα προϊόντα της PCR και μια ουρά από αδενίνες. Τα προϊόντα PCR που περιέχουν ουρά από αδενίνες μπορούν να κλωνοποιηθούν σε TA πλασμίδια. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήσαμε για να ανιχνεύσουμε Βακτήρια και Αρχαία στα δείγματα από τη λίμνη Παμβώτιδα, καθώς και για να χαρακτηρίσουμε μοριακά, Βακτήρια που απομονώσαμε («Pamv7»).

2.1.5.1. Ανίχνευση Βακτηρίων στα δείγματα νερού και ιλύος

Για να ανιχνεύσουμε Βακτήρια στα δείγματα από τη λίμνη Παμβώτιδα πραγματοποιήσαμε PCR ενισχύοντας τμήμα του 16S ριβοσωμικού DNA των Βακτηρίων, χρησιμοποιώντας τους εξής εκκινητές [69]:

341F-GC: 5'-40GC-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'

907R : 5'-CCGTCAATTCMTTTGAGTTT-3'

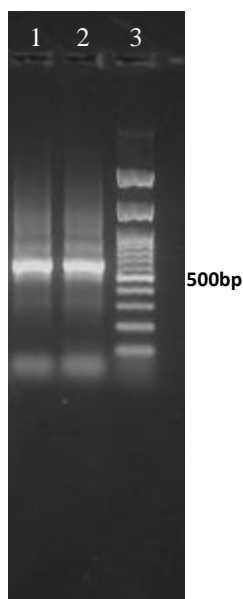
Η αλυσίδα -GC στον forward εκκινητή μας είναι χρήσιμη για την αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα διαβάθμισης (DGGE) που ακολουθεί.

Πραγματοποιήθηκε πρωτόκολλο touchdown PCR, όπου στο στάδιο της σύνδεσης των εκκινητών η θερμοκρασία μειώνεται σταδιακά σε κάθε κύκλο, σε θερμοκυκλοποιητή Biorad iCycler.

Οι συνθήκες της PCR περιλάμβαναν:

Συνθήκες PCR με σκοπό την ενίσχυση τμήματος βακτηριακού 16S rDNA		
Αποδιάταξη	95°C για 2 min	
20 κύκλοι	Αποδιάταξη	95°C για 1 min
	Σύνδεση εκκινητών	70°C για 1 min
	Επιμήκυνση νέου κλώνου	72°C για 3 min
Η θερμοκρασία σύνδεσης των εκκινητών μειωνόταν 0.5°C κάθε έναν κύκλο		
10 κύκλοι	Αποδιάταξη	95°C για 1 min
	Σύνδεση εκκινητών	60°C για 1 min
	Επιμήκυνση νέου κλώνου	72°C για 3 min
Τελική επιμήκυνση	72°C για 30 min	
Ψύξη	4°C	

Μετά το πέρας της αντίδρασης, τα προϊόντα της PCR ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v (**Εικόνα 2.3**).



Εικόνα 2.3: Παράδειγμα ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR σε 1% w/v πήγμα αγαρόζης. Ανίχνευση τμήματος 16S rDNA Βακτηρίων μεγέθους περίπου 600bp.

- 1: προϊόν από δείγμα ιλύος, SS2, φθινόπωρο
- 2: προϊόν από δείγμα ιλύος, SS2, χειμώνας
- 3: μοριακά μεγέθη DNA 100bp

2.1.5.2. Ανίχνευση Αρχαίων στα δείγματα ιλύος

Για να ανιχνεύσουμε Αρχαία στα δείγματα ιλύος της λίμνης Παμβώτιδας πραγματοποιήσαμε PCR ενισχύοντας τμήμα του 16S ριβοσωμικού DNA των Αρχαίων, χρησιμοποιώντας τους εξής εκκινητές [70]:

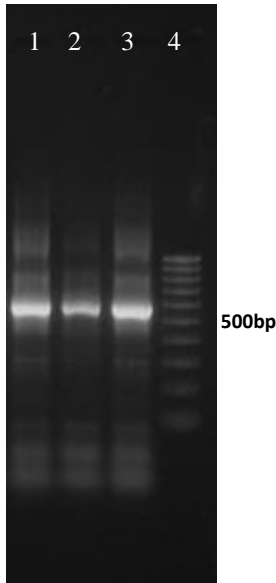
344F-GC: 5'-40GC-ACGGGGYGCAGCAGGCGCGA-3'

915R : 5' -GTGCTCCCCCGCCAATTCCT-3'

Πραγματοποιήθηκε και σε αυτή την περίπτωση πρωτόκολλο touchdown PCR, σε θερμοκυκλοποιητή Biorad iCycler. Οι συνθήκες της PCR περιλάμβαναν:

Συνθήκες PCR με σκοπό την ενίσχυση τμήματος 16S rDNA Αρχαίων		
Αποδιάταξη	95°C για 5 min	
20 κύκλοι	Αποδιάταξη	95°C για 1 min
	Σύνδεση εκκινητών	71°C για 1 min
	Επιμήκυνση νέου κλώνου	72°C για 3 min
Η θερμοκρασία σύνδεσης των εκκινητών μειωνόταν 0.5°C κάθε έναν κύκλο		
15 κύκλοι	Αποδιάταξη	95°C για 1 min
	Σύνδεση εκκινητών	61°C για 1 min
	Επιμήκυνση νέου κλώνου	72°C για 3 min
Τελική επιμήκυνση	72°C για 30 min	
Ψύξη	4°C	

Μετά το πέρας της αντίδρασης, τα προϊόντα της PCR ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v (Εικόνα 2.4).



Εικόνα 2.4: Παράδειγμα ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR σε 1% w/v πήγμα αγαρόζης. Ανίχνευση τμήματος 16S rDNA Αρχαίων μεγέθους περίπου 600bp.

- 1: προϊόν από δείγμα ιλύος, SS2, καλοκαίρι
 2: προϊόν από δείγμα ιλύος, SS2, φθινόπωρο
 3: προϊόν από δείγμα ιλύος, SS2, χειμώνας
 4: μοριακά μεγέθη DNA 100bp

2.1.5.3. Μοριακός χαρακτηρισμός του κυανοβακτηρίου «*Ramv7*»

Ενίσχυση τμήματος 16S rDNA-ITS

Το τμήμα ITS (Internal Transcribed Spacer) βρίσκεται μεταξύ της μικρής υπομονάδας (16S) και της μεγάλης υπομονάδας (23S) των γονιδίων rRNA στο χρωμόσωμα (βλ.εισαγωγή). Το τμήμα 16S rDNA-ITS περιλαμβάνει περιοχή του 16S ριβοσωμικού DNA και του ITS και μας επιτρέπει τον καλύτερο χαρακτηρισμό του κυανοβακτηρίου.

Για την ενίσχυση του τμήματος 16S rDNA-ITS χρησιμοποιήσαμε τους εκκινητές

8F: 5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' [71]

ULR: 5' - CCTCTGTGTGCCTAGGTATC-3' [72]

Το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων είναι περίπου 1800bp.

Συνθήκες PCR με σκοπό την ενίσχυση τμήματος 16S rDNA-ITS κυανοβακτηρίου		
Αποδιάταξη		95°C για 3 min
30 κύκλοι	Αποδιάταξη	95°C για 1 min
	Σύνδεση εκκινητών	52°C για 1 min
	Επιμήκυνση νέου κλώνου	72°C για 3 min
Τελική επιμήκυνση		72°C για 30 min
Ψύξη		4°C

Τα προϊόντα της PCR ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε 1% w/v πήγμα αγαρόζης.

Ανίχνευση γονιδίων PKS-NRPS

Οι συνθάσες πολυκετιδίων (Polyketide synthases-PKSs) είναι μια οικογένεια ενζύμων που σχηματίζουν σύμπλοκα και έχουν τη δυνατότητα να παράγουν πολυκετίδια. Τα πολυκετίδια αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια δευτερογενών μεταβολιτών κυρίως των Βακτηρίων, μυκήτων και φυτών και παραδείγματα αυτών είναι οι τετρακυκλίνες, τα μακρολίδια, η ερυθρομυκίνη, η αφλατοξίνη B1 κ.α.

Οι συνθετάσες πεπτιδίων (nonribosomal peptide synthetases-NRPS) αποτελούν μια οικογένεια ενζύμων που έχουν τη δυνατότητα να συνθέτουν πεπτίδια εκτός ριβοσωμάτων, δηλαδή χωρίς τη μεσολάβηση mRNA. Τα πεπτίδια αυτά ανήκουν σε δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από Βακτήρια και μύκητες (π.χ. κυκλοσπορίνη).

Οι συνθετάσες πεπτιδίων έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τις συνθάσες πολυκετιδίων και πολλοί δευτερογενείς μεταβολίτες παράγονται από τη μίξη PKS-NRPS. Παράδειγμα αποτελούν οι κυανοτοξίνες (μικροκυστίνη, νοντουλαρίνη).

Για την ανίχνευση γονιδίων PKS χρησιμοποιήσαμε τους παρακάτω εκφυλισμένους (degenerate) εκκινητές [73]:

DKF: 5'-GTGCCGGTNCC(AG)TGNG(TC)(TC)TC-3'

DKR:5'-GCGATGGA(TC)CCNCA(AG)CA(AG)(CA)G-3'

Το αναμενόμενο μέγεθος προϊόντων ήταν 650bp.

Για την ανίχνευση γονιδίων NRPS χρησιμοποιήσαμε τους εκφυλισμένους (degenerate) εκκινητές [74]:

MTF2: 5'-GCNNGG(CT)GG(CT)GCNTA(CT)GTNCC-3'

MTR: 5'-CCNCG(AGT)AT(TC)TTNAC(TC)TG-3'

Το αναμενόμενο μέγεθος προϊόντων ήταν 1150bp.

Οι συνθήκες της PCR περιλάμβαναν:

Συνθήκες PCR με σκοπό την ανίχνευση γονιδίων PKS-NRPS κυανοβακτηρίου		
Αποδιάταξη	95°C για 3 min	
35 κύκλοι	Αποδιάταξη	95°C για 1 min
	Σύνδεση εκκινητών	50°C για 1 min
	Επιμήκυνση νέου κλώνου	72°C για 1 min
Τελική επιμήκυνση	72°C για 10 min	
Ψύξη	4°C	

Τα προϊόντα της PCR ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε 1% w/v πήγμα αγαρόζης.

Ανίχνευση του γονιδίου της β-υπομονάδας της RNA πολυμεράσης *rpoB*

Για την ανίχνευση του γονιδίου της β-υπομονάδας της RNA πολυμεράσης *rpoB* χρησιμοποιήσαμε τους παρακάτω εκκινητές [21]:

*rpoB*1698F: 5'-AACATCGGTTTGATCAAC-3'

*rpoB*2041R: 5'-CGTTGCATGTTGGTACCCAT-3'

Το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων ήταν περίπου 340bp.

Οι συνθήκες της PCR περιλάμβαναν:

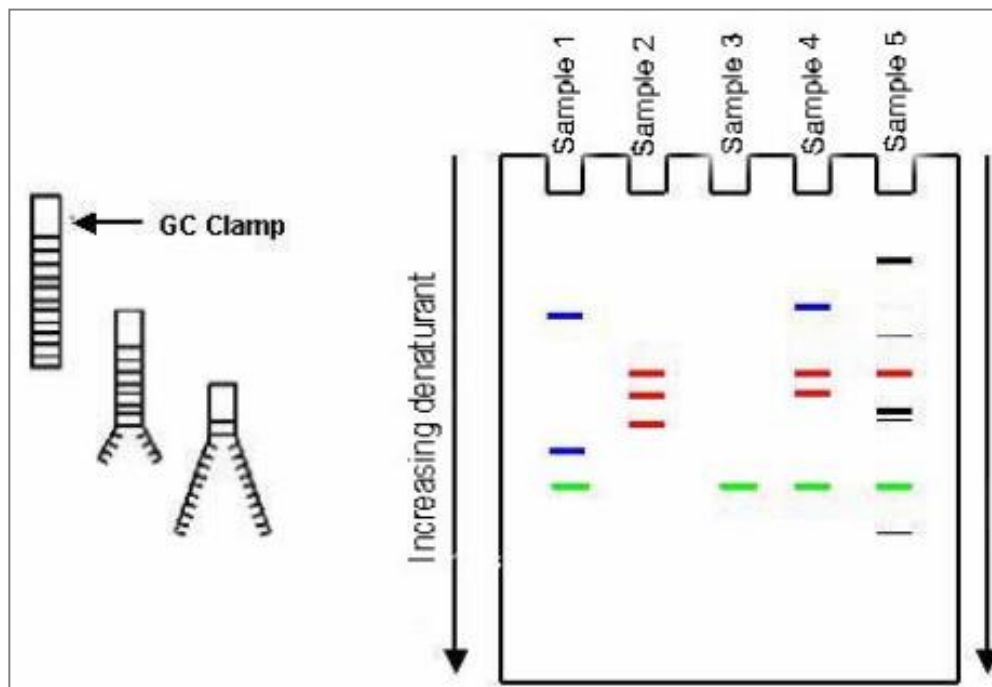
Συνθήκες PCR με σκοπό την ανίχνευση του γονιδίου <i>rpoB</i> κυανοβακτηρίου		
Αποδιάταξη	95°C για 5 min	
25 κύκλοι	Αποδιάταξη	95°C για 1 min
	Σύνδεση εκκινητών	50°C για 1.5 min
	Επιμήκυνση νέου κλώνου	72°C για 1.5 min
Τελική επιμήκυνση	72°C για 30 min	
Ψύξη	4°C	

Τα προϊόντα της PCR ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε 1% w/v πήγμα αγαρόζης.

2.1.6. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα διαβάθμισης (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis-DGGE)

Η DGGE είναι μια ηλεκτροφορητική μέθοδος μοριακής αποτύπωσης που διαχωρίζει ισομεγέθη γονίδια τα οποία διαφέρουν ως προς τη νουκλεοτιδική αλληλουχία τους. Τα προϊόντα που προκύπτουν μετά την PCR συνήθως περιέχουν πολλά θραύσματα DNA του ίδιου μεγέθους η αλληλουχία των οποίων μπορεί να διαφέρει. Με τη μέθοδο DGGE

τα προϊόντα αυτά μπορούν να διαχωριστούν με βάση το ποσοστό γουανίνης-κυτοσίνης (-GC) που περιέχουν. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με τη χρήση διαβάθμισης συγκέντρωσης αποδιατακτικών παραγόντων του DNA (φορμαμίδιο και ουρία). Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης DGGE, τα προϊόντα της PCR συναντούν όλο και υψηλότερες συγκεντρώσεις αποδιατακτικών παραγόντων καθώς μετακινούνται μέσα στην ηλεκτρική πολυακρυλαμίδιο. Όταν ένα θραύσμα δίκλωνου DNA φτάσει σε μια επαρκή συγκέντρωση αποδιατακτικών παραγόντων (ανάλογα με την αλληλουχία του), αρχίζει να αποδιατάσσεται και η κίνησή του επιβραδύνεται σημαντικά, πράγμα που το διαχωρίζει από τα υπόλοιπα του δείγματος, τα οποία συνεχίζουν να κινούνται. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα προϊόντα PCR έχουν και μια αλυσίδα γουανίνης-κυτοσίνης (-GC) η οποία ήταν προσδεμένη στον forward εκκινητή. Η αλυσίδα αυτή δίνει τη δυνατότητα καλύτερου διαχωρισμού των δειγμάτων αλλά και αποφυγής της πλήρους μετουσίωσης (Εικόνα 2.5). Με αυτόν τον τρόπο, διαφορετικές αλληλουχίες DNA θα μετουσιωθούν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αποδιατακτικών παραγόντων και το τελικό αποτέλεσμα θα είναι ένα πρότυπο με ζώνες. Κάθε ζώνη θεωρητικά αντιστοιχεί σε έναν διαφορετικό πληθυσμό (π.χ. Βακτηρίων) και μπορεί να απομονωθεί και τελικά να αλληλουχηθεί. [62, 72, 75-77].



Εικόνα 2.5: Σχηματικό παράδειγμα DGGE ηλεκτροφόρησης. Η συγκέντρωση αποδιατακτικών παραγόντων αυξάνεται κατακόρυφα προς τα κάτω και τα δείγματα διαχωρίζονται ανάλογα με το ποσοστό -GC που περιέχουν στην αλληλουχία τους, εμφανίζοντας ζώνες στην ηλεκτρική. Το GC Clamp υπάρχει στα δείγματα καθώς είναι τμήμα του forward εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε στην PCR

Για την πραγματοποίηση της DGGE

1. Υλικά

- Ακρυλαμίδιο (Acrylamide) (Bio-Rad Laboratories, MW:71.06)
- Δις-ακρυλαμίδιο (Bis-acrylamide) (Bio-Rad Laboratories, MW:154.17)
- Φορμαμίδιο (Formamide) (47647, SIGMA-ALDRICH,USA)
- Ουρία (Urea) (Bio-Rad Laboratories, MW:60.06)
- TEMED (N,N,N',N' –tetramethylenediamine) (Bio-Rad Laboratories)
- Διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου (APS) (Ammonium Persulfate Solution) 10% (Bio-Rad Laboratories, MW:228.20)
- 50X TAE (1X solution: 40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.3) (Bio-Rad Laboratories)
- DCode Control kit for DGGE/CDGE/TTGE 2X (Bio-Rad Laboratories)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (DGGE loading buffer 6X)
- Βουτανόλη κορεσμένη σε νερό (water saturated butanol)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium bromide)

2. Διαλύματα

- 40% Acrylamide/ Bis-acrylamide

• Acrylamide	38.93 gr
• Bis-acrylamide	1.07 gr
• Δις απεσταγμένο H₂O	Μέχρι όγκο 100 ml
<ul style="list-style-type: none"> • Ανάδευση • Απαέρωση για 10-15 min • Διήθηση από ηθμό 0.45μm (S-Pak Membrane Filters, Millipore Corporation, Billerica, USA) • Αποθήκευση στους 4°C 	

- 100 ml διάλυμα χωρίς αποδιατακτικούς παράγοντες (denaturant stock solution 0%)

• 40% Acrylamide/ Bis-acrylamide	16.6 ml
• 50X TAE	1 ml
• Δις απεσταγμένο H₂O	82.4 ml
<ul style="list-style-type: none"> • Ανάδευση • Απαέρωση για 10-15 min • Διήθηση από ηθμό 0.45μm (S-Pak Membrane Filters, Millipore Corporation, Billerica, USA) • Αποθήκευση στους 4°C 	

- 100 ml διάλυμα αποδιατακτικών παραγόντων (denaturant stock solution 100%)

• 40% Acrylamide/ Bis-acrylamide	16.6 ml
• 50X TAE	1 ml
• Φορμαμίδιο	40 ml
• Ουρία	42 gr
• Δις απεσταγμένο H₂O	Μέχρι όγκο 100 ml
<ul style="list-style-type: none"> • Ανάδευση με θέρμανση • Απαέρωση για 10-15 min • Διήθηση από ηθμό 0.45μm (S-Pak Membrane Filters, Millipore Corporation, Billerica, USA) • Αποθήκευση στους 4°C 	

- Stacking Gel

Διάλυμα χωρίς αποδιατακτικούς παράγοντες (Denaturant stock solution 0%)	5 ml
TEMED	5 μl
APS	50 μl

- APS 10%

Διάλυση 0.1gr APS σε 1ml δις απεσταγμένο H₂O. Αποθήκευση στους 4°C

- DGGE loading buffer 6X

Σακχαρόζη (Sucrose)	4 gr
Μπλε της βρωμοφαινόλης (Bromophenol blue)	1.25 ml
Κυανού του ξυλενίου (Xylene cyanol)	1.25 ml
Δις απεσταγμένο H₂O	Μέχρι όγκο 10 ml
Ανάδευση και αποθήκευση στους 4°C	

3. Πρωτόκολλο

- 1) Στήνουμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης (Bio-Rad DCode Universal Mutation Detection System) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- 2) Φτιάχνουμε τα διαλύματα διαβάθμισης ανάλογα με τη διαβάθμιση που επιθυμούμε. Για την ηλεκτροφόρηση DGGE με σκοπό τον διαχωρισμό των PCR προϊόντων των 16S rDNA Αρχαίων, χρειαζόμαστε διαβάθμιση 20%-70% ενώ αντίστοιχα για τα Βακτήρια χρειαζόμαστε διαβάθμιση 20%-60%. Για το διάλυμα 20% συγκέντρωσης αποδιατακτικών παραγόντων (LO) αναμειγνύουμε 16ml από το διάλυμα χωρίς αποδιατακτικούς παράγοντες (denaturant stock solution 0%) και 4ml από το διάλυμα αποδιατακτικών παραγόντων 100% (denaturant stock solution 100%). Για το διάλυμα 70% συγκέντρωσης αποδιατακτικών παραγόντων (HI) αναμειγνύουμε 6ml από το διάλυμα χωρίς αποδιατακτικούς παράγοντες και 14ml από το διάλυμα αποδιατακτικών παραγόντων 100%. Στο HI διάλυμα προσθέτουμε και 400μl ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης DGGE (loading buffer 6X).
- 3) Προσθέτουμε στα διαλύματα LO και HI 86 μl APS 10% και 7μl TEMED και αναδεύουμε
- 4) Ρίχνουμε τα διαλύματα στη συσκευή ανάμεσα στα τζαμάκια με τη βοήθεια του Gradient wheel μέχρι ένα εκατοστό πιο χαμηλά από το σημείο που θα μπουν τα χτενάκια για τη δημιουργία φρεατίων
- 5) Προσθέτουμε βουτανόλη κορεσμένη σε νερό για να δημιουργηθεί επίπεδη επιφάνεια στη πηκτή
- 6) Αφού η πηκτή σταθεροποιηθεί, αφαιρούμε τη βουτανόλη και ξεπλένουμε με απεσταγμένο νερό
- 7) Φτιάχνουμε και προσθέτουμε το stacking gel πάνω από την πηκτή πολυακρυλαμίδιου και τοποθετούμε τα χτενάκια
- 8) Όταν στερεοποιηθεί το stacking gel αφαιρούμε τα χτενάκια, ξεπλένουμε με απεσταγμένο νερό και τοποθετούμε την πηκτή στη συσκευή η οποία περιέχει 0.5X TAE ρυθμιστικό διάλυμα
- 9) Θερμαίνουμε στους 60°C
- 10) Τοποθετούμε τα δείγματά μας στα φρεάτια της πηκτής με τη χρήση σύριγγας Hamilton, αφού τα έχουμε επεξεργαστεί κατάλληλα: ξήρανση

δειγμάτων (pcr products) υπό κενό, επαναιώρηση σε 10μl milliQ H₂O, προσθήκη 10μl DCode 2X ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης

- 11) Πραγματοποιούμε ηλεκτροφόρηση στους 60°C, 70V για περισσότερες από 16 ώρες
- 12) Μετά το πέρας των 16 ωρών, αφαιρούμε την πηκτή από τη συσκευή
- 13) Αφαιρούμε μικρό τμήμα της πηκτής στην κάτω δεξιά γωνία για να ξεχωρίζουμε τη σειρά που τοποθετήσαμε τα δείγματα
- 14) Τοποθετούμε την πηκτή σε 0.5X TAE ρυθμιστικό διάλυμα
- 15) Προσθέτουμε 300μl βρωμιούχο αιθίδιο και ανακινούμε για 20min
- 16) Πραγματοποιούμε 3 πλύσεις με 0.5X TAE ρυθμιστικό διάλυμα με ενδιάμεση ανακίνηση
- 17) Φωτογραφίζουμε την πηκτή
- 18) Αφαιρούμε τις ζώνες που επιθυμούμε και τις τοποθετούμε σε σωληνάρια με 50μl milliQ H₂O
- 19) Αποθηκεύουμε στους 4°C ή στους -20 °C

Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα διαβάθμισης (DGGE) πραγματοποιήσαμε για τα προϊόντα της PCR 16S rDNA Βακτηρίων και Αρχαίων από τα δείγματα ιλύος της λίμνης Παμβώτιδος με διαβάθμιση συγκέντρωσης 20%-60% και 20%-70% αντίστοιχα.

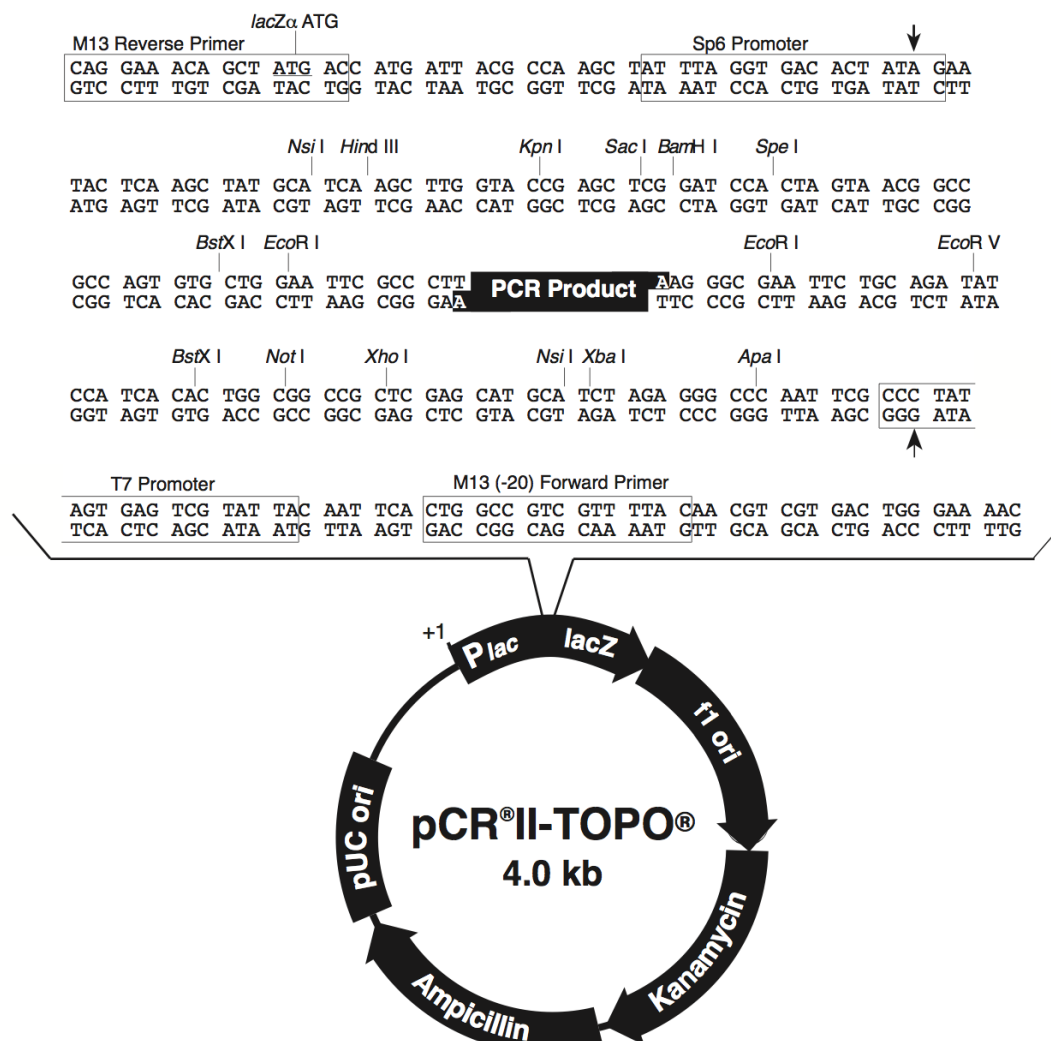
2.1.6.1. Εκ νέου ενίσχυση των ζωνών από την ηλεκτροφόρηση DGGE και καθαρισμός προϊόντων

Χρησιμοποιώντας σαν δείγμα την κάθε ζώνη που αφαιρέσαμε από το DGGE, πραγματοποιούμε εκ νέου PCR στις ίδιες συνθήκες και με τους ίδιους εκκινητές, χωρίς όμως την αλυσίδα -GC στους forward εκκινητές. Με αυτόν τον τρόπο, ενισχύουμε εκατομμύρια φορές την κάθε αλληλουχία που απομονώσαμε από την ηλεκτροφόρηση πολυακριλαμιδίου έτσι ώστε να μπορέσουμε να συνεχίσουμε τα βήματα ταυτοποίησης. Την αντίδραση PCR ελέγξαμε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v.

Για να επιτύχουμε μεγαλύτερη καθαρότητα των προϊόντων της PCR, πραγματοποιήσαμε και μια επιπλέον επεξεργασία καθαρισμού σύμφωνα με το πρωτόκολλο NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel.

2.1.7. Κλωνοποίηση επιθυμητών τμημάτων DNA σε πλασμίδια

Για την καλύτερη αλληλούχιση των δειγμάτων DNA, θα πρέπει αυτά να έχουν μια σταθερή δομή. Τη δυνατότητα αυτή μας τη δίνουν οι πλασμιδιακοί φορείς στους οποίους εισάγουμε την αλληλουχία-δείγμα που θέλουμε να αλληλουχίσουμε και στη συνέχεια μετασχηματίζουμε κύτταρα *E.coli*. Το πρωτόκολλο TOPO TA (TOPO TA Cloning kit, Invitrogen) διαθέτει έναν πλασμιδιακό φορέα (pCRII TOPO), ο οποίος είναι ευθύγραμμος και στο ένα άκρο του έχει μια ουρά από θυμίνες. Επίσης χαρακτηρίζεται ως ενεργός καθώς έχει συνδεδεμένη μια τοποϊσομεράση I. Η ουρά από θυμίνες αποτελεί πλεονέκτημα καθώς τα προϊόντα που προέκυψαν από την PCR διαθέτουν ουρά από αδενίνες. Ο χάρτης του πλασμιδίου pCRII-TOPO που χρησιμοποιήσαμε φαίνεται στην **Εικόνα 2.6**.



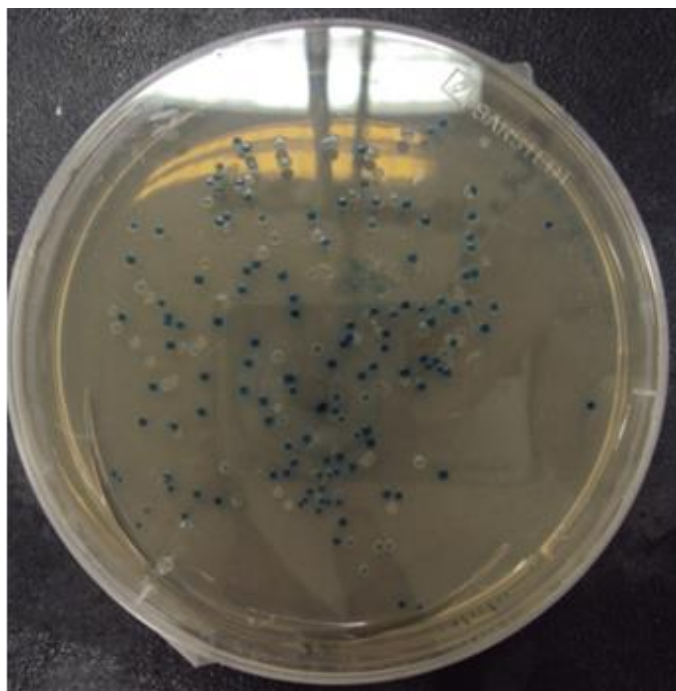
Εικόνα 2.6: Χάρτης του πλασμιδίου pCRII-TOPO που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση

Το πλασμίδιο μεταξύ άλλων διαθέτει αλληλουχίες εκκινήτων (M13) για να μπορεί να γίνει αλληλούχιση, θέσεις αναγνώρισης από το περιοριστικό ένζυμο EcoRI, το γονίδιο αναφοράς *lac-Z*, θέση έναρξης της αντιγραφής καθώς και γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και καναμυκίνη.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε χωρίζεται σε διάφορα στάδια σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Επιπλέον χρησιμοποιήσαμε αντιβιοτικό καναμυκίνη και χρωμοφόρο παράγοντα X-Gal ως δείκτες επιλογής.

Στο τέλος της κλωνοποίησης, στα τρυβλία περιμένουμε να αναπτυχθούν λευκές και μπλε αποικίες. Η ανάπτυξη αποικιών στα τρυβλία με αντιβιοτικό, μας δείχνει πως όλα τα κύτταρα έχουν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο (vector) που τους δίνει την ιδιότητα ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη. Οι λευκές αποικίες αντιστοιχούν στα

μετασχηματισμένα κύτταρα (επιθυμητές αποικίες) στα οποία το πλασμίδιο που έλαβαν περιέχει και το ένθεμά μας καθώς έχει εισαχθεί στο γονίδιο *lac-Z* και το έχει απενεργοποιήσει. Οι μπλε αποικίες αντιστοιχούν στα μετασχηματισμένα κύτταρα στα οποία το πλασμίδιο που έλαβαν δεν περιέχει το ένθεμά μας. Έτσι, το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης είναι ενεργό, και το κύτταρο έχει τη δυνατότητα να διασπά το X-Gal και να παράγεται μπλε χρώμα (Εικόνα 2.7).



Εικόνα 2.7: Ανάπτυξη μπλε και λευκών αποικιών *E.coli* σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο LB και καναμυκίνη. Επιλέγουμε τις λευκές αποικίες καθώς περιέχουν το πλασμίδιο με το επιθυμητό ένθεμα.

2.1.8. Γονιδιακές βιβλιοθήκες

Η δημιουργία βιβλιοθηκών πραγματοποιήθηκε με σκοπό να καταφέρουμε να ανιχνεύσουμε και να μελετήσουμε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο ποσοστό της μικροβιακής ποικιλότητας των οικοσυστημάτων που μας ενδιαφέρουν.

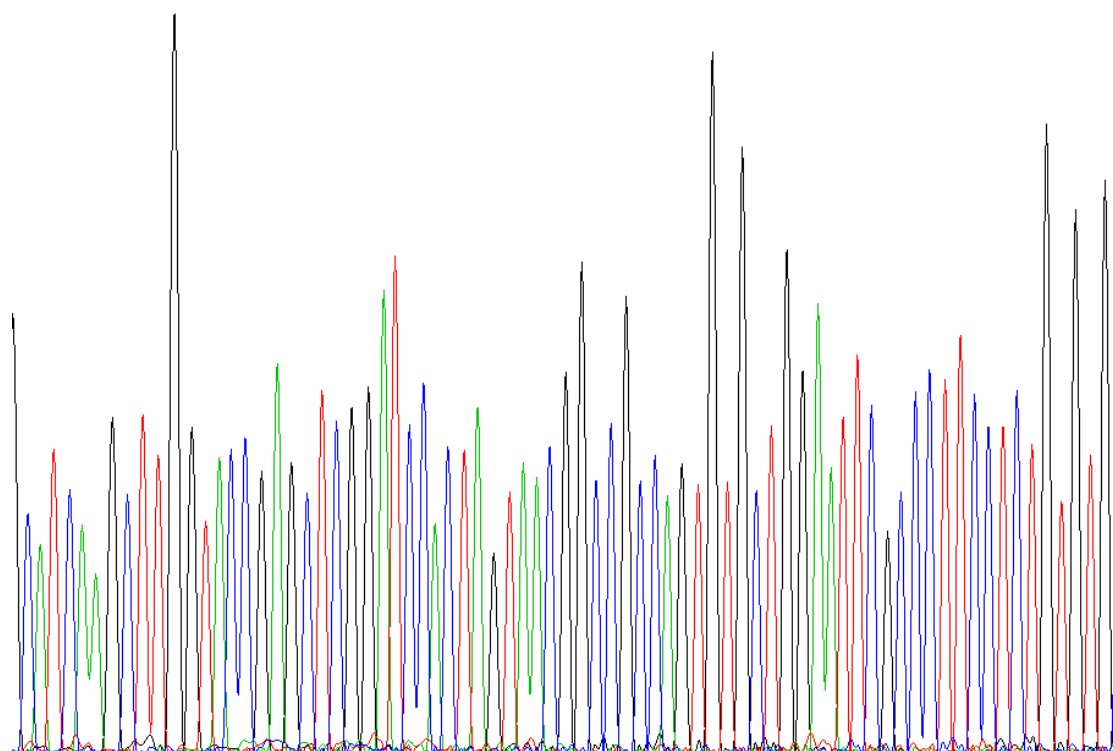
Στην περίπτωση της λίμνης Παμβώτιδας, από κάθε ζώνη από την DGGE ηλεκτροφόρηση (Αρχαία και Βακτήρια), δημιουργήσαμε μια βιβλιοθήκη μέσω της κλωνοποίησης όπου επιλέξαμε τυχαία 10 μετασχηματισμένες αποικίες για περαιτέρω ανάλυση. Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε πέψη των ενθεμάτων με το περιοριστικό ένζυμο HaeIII σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (HT Biotechnology Ltd, Cambridge, United Kingdom), για να ανιχνεύσουμε διαφορετικούς πολυμορφισμούς Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) [78]. Οι κλώνοι που

παρουσίαζαν διαφορετικά πρότυπα, στάλθηκαν για αλληλούχιση. (Eurofins Genomics/VBC Biotech, Austria) [52, 78].

2.1.9. Αλληλούχιση δειγμάτων DNA για ταυτοποίηση αλληλουχιών Βακτηρίων και Αρχαίων

Τα δείγματά μας (πλασμιδιακό DNA με ένθεμα) στέλνονται για αλληλούχιση τύπου Sanger σε μικροπλάκες (plate sequencing) στην εταιρία Eurofins Genomics/ VBC Biotech Αυστρίας. Τα δείγματά μας έχουν μέγεθος 500-600 ζεύγη βάσεων. Τα αποτελέσματα ποιότητας για κάθε βάση που αλληλουχήθηκε παρουσιάζονται σε διάγραμμα (Εικόνα 2.8). Μετατρέπουμε την αλληλουχία σε μορφή FASTA, βρίσκουμε την αλληλουχία μεταξύ των εκκινήτων για να μπορέσουμε να την χρησιμοποιήσουμε για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για όλες τις αλληλουχίες Βακτηρίων και Αρχαίων που μελετήσαμε.

60 70 80 90 100 110 120 130
 ; C A T C A A G C T T G G T A C C G A G C T C G G A T C C A C T A G T A A C G G C C G C C A G T G T G C T G G A A T T C G C C C T T C C T C T G T G T G C



Εικόνα 2.8: Παράδειγμα διαγράμματος μετά από αλληλούχιση δείγματος

Επίσης, οι αλληλουχίες ελέγχθηκαν για πιθανές χίμαιρες με το πρόγραμμα Bellerophone (<http://comp-bio.anu.edu.au/bellerophon/bellerophon.pl>).

Οι αλληλουχίες που ανιχνεύθηκαν ως χίμαιρες, δεν χρησιμοποιήθηκαν στην περαιτέρω ανάλυση.

2.1.9.1. Αλληλούχιση DNA επόμενης γενιάς σε δείγματα νερού της λίμνης Παμβώτιδας για την ανίχνευση Βακτηρίων (Next Generation Sequencing-NGS)

Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς πραγματοποιήθηκε στο MRDNA Lab, Shallowater, TX, USA με πρωτόκολλο της Illumina. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης περιλαμβάνουν 16S γενότυπους, Operational Taxonomic Units (OTUs), που ανιχνεύτηκαν στα δείγματά μας, καθώς και σύγκρισή τους μέσω BLASTn στο NCBI. Η σύγκριση αυτή περιλαμβάνει ταξινομική κατάταξη και ποσοστά ταυτότητας.

Για αλληλούχιση επόμενης γενιάς στείλαμε DNA από δείγματα νερού επιφάνειας και πυθμένα από τη λίμνη Παμβώτιδα, από τις τέσσερις εποχές του έτους και από τους δυο σταθμούς δειγματοληψίας. Στα δείγματά μας θέλαμε να ανιχνεύσουμε αλληλουχίες Βακτηρίων. Ο όγκος των δεδομένων που λάβαμε ήταν μεγάλος και γι' αυτό το λόγο χρειάστηκε βιοπληροφορική ανάλυση για την επεξεργασία τους και την εξαγωγή συμπερασμάτων.

2.1.10. Διερεύνηση ομόλογων αλληλουχιών DNA μέσω αναλύσεων στοίχισης (Basic Local Alignment Tool-BLAST)

Επόμενο βήμα μετά την επεξεργασία των αλληλουχιών μας από την αλληλούχιση, είναι η σύγκρισή τους με άλλες αλληλουχίες που έχουν αναγνωριστεί και η εύρεση ομοιοτήτων και διαφορών. Αυτό το βήμα είναι απαραίτητο για να καταφέρουμε να κατατάξουμε τις αλληλουχίες μας σε ομάδες Βακτηρίων και Αρχαίων. Εκτός όμως από την κατάταξη, μας ενδιαφέρει και το ποσοστό ταυτότητας/ομολογίας (identity) καθώς μας δείχνει κατά πόσο οι αλληλουχίες μας είναι όμοιες με αλληλουχίες μικροοργανισμών που υπάρχουν σε οικοσυστήματα παγκοσμίως και είναι καλά

χαρακτηρισμένες ή είναι λιγότερο όμοιες, κάτι που υποδηλώνει διαφορετικότητα, μοναδικότητα ακόμα και ενδημισμό.

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιούμε σε αυτή την περίπτωση είναι το BLAST , ένα εργαλείο του NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), το οποίο αναζητά περιοχές με ομοιότητες μεταξύ αλληλουχιών. Το πρόγραμμα συγκρίνει πρωτεϊνικές ή νουκλεοτιδικές αλληλουχίες με βάσεις αλληλουχιών και υπολογίζει τη στατιστική σημαντικότητα των ομοιοτήτων. Το BLAST μπορεί να χρησιμοποιηθεί για λειτουργικές και εξελικτικές σχέσεις μεταξύ αλληλουχιών καθώς και για κατάταξη σε γονιδιακές οικογένειες.

Το εργαλείο BLAST μας παρέχει πέντε προγράμματα. Τα δυο πιο βασικά είναι:

- Nucleotide blast: σύγκριση της εξεταζόμενης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (nucleotide query) με ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες σε βάσεις δεδομένων
- Protein blast: σύγκριση της εξεταζόμενης πρωτεϊνικής αλληλουχίας (protein query) με ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες σε βάσεις δεδομένων

Εμείς στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήσαμε το nucleotide blast (blastn) για τη σύγκριση των αλληλουχιών μας.

Από το αποτέλεσμα της σύγκρισης λαμβάνουμε διάφορες πληροφορίες. Βλέπουμε το ποσοστό ταυτότητας/ομολογίας (ident.) της υπό μελέτη αλληλουχίας με την ήδη γνωστή, το ποσοστό κάλυψης μεταξύ των δυο αλληλουχιών (query cover), το e-value που μας δείχνει αν το αποτέλεσμα είναι στατιστικά σημαντικό, τον αριθμό καταχώρησης (accession number) που είναι μοναδικός για κάθε αλληλουχία και μας δίνει επιπλέον πληροφορίες (δημοσίευση, συγγραφείς, πληροφορίες δείγματος κλπ.).

Το ποσοστό ομολογίας είναι αυτό που σχολιάζουμε τελικά για την κάθε αλληλουχία. Ομολογίες μικρότερες από 97% στις αλληλουχίες 16S rDNA Βακτηρίων και Αρχαίων αξιολογούνται και σχολιάζονται περαιτέρω καθώς μπορούν να κατατάξουν την αλληλουχία μας σε νέο είδος, γένος, οικογένεια.

Ο παρακάτω πίνακας (**Πίνακας 2.1**) παραθέτει τα ποσοστά ομολογίας και την αντίστοιχη κατάταξη (MRDNA Lab, Shallowater, TX, USA):

Ταυτότητα με την αλληλουχία αναφοράς	Ταξινόμηση
>97%	Είδος (Species)
Μεταξύ 97% και 95%	Άγνωστο σε επίπεδο Γένους (unclassified Genus)
Μεταξύ 95% και 90%	Άγνωστο σε επίπεδο Οικογένειας (unclassified Family)
Μεταξύ 90% και 85%	Άγνωστο σε επίπεδο Τάξης (unclassified order)
Μεταξύ 85% και 80%	Άγνωστο σε επίπεδο Κλάσης (unclassified class)
Μεταξύ 80% και 77%	Άγνωστο σε επίπεδο Φύλου (unclassified phylum)
<77%	Άγνωστο (unknown)

Πίνακας 2.1: Ποσοστό ταυτότητας/ομολογίας μεταξύ δυο αλληλουχιών >97% υποδηλώνει ομοιότητα και κατάταξη στην ίδια ομάδα, όμως ποσοστό ταυτότητας/ομολογίας <97% υποδηλώνει νέο είδος, γένος κλπ. (MRDNA Lab, Shallowater, TX, USA)

Το εργαλείο BLAST το χρησιμοποιήσαμε για όλες τις υπό μελέτη αλληλουχίες μας και συλλέξαμε τις αντίστοιχες πληροφορίες. Προτιμήσαμε να κρατήσουμε τις συγκρίσεις εκείνες που παρέπεμπαν σε αλληλουχίες οι οποίες ανήκαν σε δημοσιευμένες εργασίες και είχαν χαρακτηριστεί από φυλογενετική ανάλυση.

Τις αλληλουχίες που μελετήσαμε τις καταθέσαμε στη βάση δεδομένων GenBank του NCBI. Οι αλληλουχίες που κατατίθενται, εξετάζονται ως προς την ορθότητά τους και λαμβάνουν έναν μοναδικό αριθμό καταχώρησης, ο οποίος παραπέμπει και σε περαιτέρω πληροφορίες σχετικές με την κάθε αλληλουχία.

2.1.11. Κατασκευή φυλογενετικών δένδρων

Για να ολοκληρώσουμε την μοριακή χαρτογράφηση των μικροοργανισμών που μελετάμε, θα πρέπει να κατασκευάσουμε φυλογενετικά δένδρα και να δούμε πως αυτοί κατατάσσονται στις επιμέρους ομάδες μικροοργανισμών.

Για την κατασκευή των φυλογενετικών δένδρων χρησιμοποιήσαμε το λογισμικό MEGA6.1 με τη μέθοδο Neighbor-Joining και τον αλγόριθμο υπολογισμού αποστάσεων Jukes-Cantor [79].

Για την κατασκευή ενός φυλογενετικού δένδρου χρειαζόμαστε τις τελικές μας αλληλουχίες σε μορφή FASTA με όλες να έχουν τον ίδιο προσανατολισμό και αλληλουχίες μικροοργανισμών που μοιάζουν περισσότερο ή λιγότερο με τις δικές μας (external sequences) για να φτιάξουμε τα τις φυλογενετικές ομάδες (clusters).

2.1.12. Ποσοτικός προσδιορισμός 16S rDNA Βακτηρίων και Αρχαίων

Για την ποσοτικοποίηση των γονιδίων 16S rRNA των Βακτηρίων και των Αρχαίων χρησιμοποιήσαμε real-time PCR. Τα δείγματά μας ήταν νερό (επιφάνεια-πυθμένας) και ιλύς από τη λίμνη Παμβώτιδα, για τους δυο σταθμούς δειγματοληψίας και τις τέσσερις εποχές του έτους.

Η real-time PCR αποτελεί ένα είδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, που μας δίνει τη δυνατότητα να παρακολουθήσουμε σε πραγματικό χρόνο την ενίσχυση του τμήματος DNA που μελετάμε. Μπορεί να πραγματοποιηθεί σχετική ή απόλυτη ποσοτικοποίηση των δειγμάτων προς μελέτη.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήσαμε απόλυτη ποσοτικοποίηση με τη χρήση πρότυπης καμπύλης. Η real-time PCR πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα LightCycler 480 (Roche) και χρησιμοποιήσαμε τη συσκευασία υλικών LightCycler 480 SYBR Green Master I (Roche) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Αρχικά κατασκευάσαμε πρότυπη καμπύλη τόσο για τα Αρχαία όσο και για τα Βακτήρια χρησιμοποιώντας πλασμιδιακό DNA με ένθεμα, τμήμα από το 16S rDNA Αρχαίων και Βακτηρίων αντίστοιχα, του οποίου τη συγκέντρωση την μετρήσαμε στο Nanodrop. Γνωρίζοντας τη συγκέντρωση αλλά και το μέγεθος του πλασμιδιακού DNA καθώς και το μοριακό βάρος του κάθε νουκλεοτιδίου, υπολογίσαμε τα αντίγραφα/μl του πλασμιδίου. Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε ήταν οι ίδιοι με τη συμβατική PCR χωρίς όμως την αλυσίδα –GC στον forward εκκινητή.

Συνθήκες για την ποσοτικοποίηση των γονιδίων 16S rRNA των Αρχαίων

Στάδιο		Συνθήκες	
Αρχική επώαση		5 min	95 °C
40 κύκλοι	Αποδιάταξη	45 sec	95 °C
	Πρόσδεση εκκινητών	45 sec	61 °C
	Επιμήκυνση	45 sec	72 °C
Τελική επιμήκυνση		10 min	72 °C
Καμπύλη τήξης		5 sec	95 °C
		1 min	65 °C
		συνεχής	97 °C
Ψύξη		10 sec	40 °C

Συνθήκες για την ποσοτικοποίηση των γονιδίων 16S rRNA των Βακτηρίων

Στάδιο		Συνθήκες	
Αρχική επώαση		5 min	95 °C
40 κύκλοι	Αποδιάταξη	45 sec	95 °C
	Πρόσδεση εκκινητών	45 sec	60 °C
	Επιμήκυνση	45 sec	72 °C
Τελική επιμήκυνση		10 min	72 °C
Καμπύλη τήξης		5 sec	95 °C
		1 min	65 °C
		συνεχής	97 °C
Ψύξη		10 sec	40 °C

Πραγματοποιήσαμε αραιώσεις των δειγμάτων 1:10 και αντίδραση σύμφωνα με το παραπάνω πρωτόκολλο. Αφού κατασκευάσαμε τις πρότυπες καμπύλες, στη συνέχεια ποσοτικοποιήσαμε τα δείγματά μας (DNA από επιφανειακό νερό, νερό από τον πυθμένα και ιλύος) από τη λίμνη Παμβώτιδα για τους δυο σταθμούς δειγματοληψίας και τις 4 εποχές του έτους για τα Βακτήρια και τα Αρχαία. Για κάθε δείγμα προς μελέτη, η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε εις διπλούν και στη συνέχεια υπολογίστηκε ο μέσος όρος κάθε μέτρησης.

Το μηχάνημα κατά τη διάρκεια της qPCR υπολογίζει τον κύκλο που άρχισε να ανιχνεύει φθορισμό. Και μέσω των προτύπων που έχουμε στην πρότυπη καμπύλη μας υπολογίζει τη συγκέντρωση του κάθε δείγματος.

Πραγματοποιήσαμε τις κατάλληλες αναγωγές για να μπορέσουμε τελικά να υπολογίσουμε τα 16S rDNA αντίγραφα Βακτηρίων και Αρχαίων ανά γραμμάριο ιζήματος και ανά ml νερού.

2.1.13. Μεταβολικό προφίλ Βακτηρίων του νερού της λίμνης Παμβώτιδας

Θέλοντας να μελετήσουμε ποια υποστρώματα μεταβολίζουν τα Βακτήρια στο νερό της επιφάνειας αλλά και του πυθμένα της λίμνης Παμβώτιδας, αλλά και να καταλήξουμε σε έναν πιθανό συσχετισμό μοριακού και μεταβολικού αποτυπώματος, πραγματοποιήσαμε καλλιέργειες σε EcoPlates. Η μελέτη του βιοχημικού προφίλ των Βακτηρίων μας βοηθά επίσης στην ανάπτυξη πιο σωστών βακτηριακών καλλιεργειών σε συνθήκες εργαστηρίου.

Τα Biolog-EcoPlates (Biolog, Inc., Hayward, CA) είναι πλάκες που περιλαμβάνουν τις 31 πιο χρήσιμες πηγές άνθρακα για ανάλυση βακτηριακών κοινοτήτων. Αυτές οι πηγές άνθρακα επαναλαμβάνονται τρεις φορές σε κάθε πλάκα για μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Τα θρεπτικά υποστρώματα του EcoPlate παρουσιάζονται στη **Εικόνα 2.9**.

EcoPlate™

A1 Water	A2 β-Methyl-D- Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D- Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D- Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine
B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D- Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D- Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D- Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine
C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L- Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L- Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L- Phenylalanine
D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine
E1 α- Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 γ- Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α- Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 γ- Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α- Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 γ- Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine
F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid
G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1- Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1- Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1- Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine
H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α- Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α- Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α- Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine

Εικόνα 2.9: Υποστρώματα άνθρακα που βρίσκονται στα μικροφρεάτια του EcoPlate. Τα υποστρώματα επαναλαμβάνονται τρεις φορές. Σαν έλεγχος χρησιμοποιείται το A1 που δεν περιέχει υπόστρωμα. (http://www.biolog.com/pdf/milit/00A_012_EcoPlate_Sell_Sheet.pdf)

Μαζί με τα υποστρώματα άνθρακα υπάρχει και μια χρωστική οξειδοαναγωγής (tetrazolium redox dye). Καθώς οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τα υποστρώματα, παράγεται ένα μωβ χρώμα και στη συνέχεια η πλάκα φωτομετρείται στα 590nm με τη χρήση φωτόμετρου (MicroStation System).

Πρωτόκολλο

Τα δείγματα που μελετήσαμε ήταν επιφανειακό νερό και νερό από τον πυθμένα της λίμνης Παμβώτιδας, από τους δυο σταθμούς για τις τέσσερις εποχές του χρόνου. Τα δείγματα επιφανειακού νερού επώαστηκαν σε αερόβιες συνθήκες ενώ τα δείγματα

νερού από τον πυθμένα επώαστηκαν σε αερόβιες αλλά και σε αναερόβιες συνθήκες (δείγμα από την καλοκαιρινή δειγματοληψία).

- Μικρή ποσότητα νερού (150μl) τοποθετήθηκε στα μικροφρεάτια
- Η πλάκα επώαστηκε στους 26°C και μετρήσεις στα 590nm λήφθηκαν σε 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 ώρες (αερόβιες συνθήκες)
- Η πλάκα επώαστηκε στους 26°C με χρήση του πρωτοκόλλου GENbox anaer (BIOMERIEUX) για τη δημιουργία αναερόβιων συνθηκών και μετρήσεις στα 590nm λήφθηκαν σε 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 ώρες (αναερόβιες συνθήκες)

Οι μετρήσεις επεξεργάζονται περαιτέρω πριν χρησιμοποιηθούν για στατιστική ανάλυση. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε υπολογισμός της μέσης απορρόφησης των σημείων ελέγχου (water wells) και αφαιρέθηκε από την απορρόφηση που παρουσίασε κάθε δείγμα. Στη συνέχεια υπολογίστηκε η μέση απορρόφηση των δειγμάτων (Average Well Color Development AWCD) και το ποσοστό AWCD της απορρόφησης κάθε δείγματος [80].

Πραγματοποιήσαμε στατιστική ανάλυση των δεδομένων με Principle Component Analysis (PCA) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα STATISTICA 7. Με αυτόν τον τρόπο καταφέραμε και εντοπίσαμε διαφορές και ομοιότητες μεταξύ των δειγμάτων μας και κατασκευάσαμε διαγράμματα ομαδοποίησης.

2.2. Βακτηριακές καλλιέργειες

Το δεύτερο τμήμα της παρούσας μελέτης περιλαμβάνει καλλιέργειες ετερότροφων Βακτηρίων και κυανοβακτηρίων και δοκιμή εκχυλισμάτων τους σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.

2.2.1. Ανάπτυξη και απομόνωση ετερότροφων Βακτηρίων και κυανοβακτηρίων από δείγματα νερού και ιλύος της λίμνης Παμβώτιδας

Για την ανάπτυξη ετερότροφων Βακτηρίων σε συνθήκες εργαστηρίου χρησιμοποιήσαμε το θρεπτικό μέσο R2A (LABM, UK), το οποίο χαρακτηρίζεται ως

μη επιλεκτικό θρεπτικό υλικό χαμηλής περιεκτικότητας σε θρεπτικά συστατικά. Αναπτύξαμε αερόβιες και αναερόβιες υγρές και στερεές καλλιέργειες και αποθηκεύσαμε μέρος αυτών. Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 20°C και 26°C.

Σύσταση θρεπτικού μέσου R2A		Σύσταση θρεπτικού μέσου BG11	
Yeast extract, 0.5 gr/L		Calcium chloride dihydrate, 36.7 mg/L	
Meat Peptone, 0.5 gr/L		Citric acid, 5.6 mg/L	
Casamino acids, 0.5 gr/L		Dipotassium hydrogen phosphate, 31.4 mg/L	
Glucose, 0.5 gr/L		Disodium magnesium EDTA, 1 mg/L	
Starch, 0.5 gr/L		Ferric ammonium citrate, 6 mg/L	
Dipotassium Hydrogen Phosphate, 0.3 gr/L		Magnesium sulfate, 36 mg/L	
Magnesium sulphate, 0.05 gr/L		Sodium carbonate, 20 mg/L	
Sodium pyruvate, 0.3 gr/L		Sodium nitrate, 1.5 g/L	

Πίνακας 2.2: Σύσταση των θρεπτικών μέσων R2A και BG11 που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη ετερότροφων Βακτηρίων και κυανοβακτηρίων αντίστοιχα

Για την ανάπτυξη κυανοβακτηρίων σε συνθήκες εργαστηρίου χρησιμοποιήσαμε το θρεπτικό μέσο BG11 (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich), ένα γενικό θρεπτικό μέσο. Αναπτύξαμε υγρές και στερεές καλλιέργειες. Οι καλλιέργειες κυανοβακτηρίων αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 26°C, 12 ώρες φως/12 ώρες σκοτάδι.

Παρασκευή θρεπτικών υλικών

1) Θρεπτικό υλικό BG11 (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich) υγρό

Τοποθετήσαμε σε φιάλη 495ml απεσταγμένο νερό και αποστειρώσαμε στους 121°C για 20min. Στη συνέχεια βάλαμε τη φιάλη στο υδατόλουτρο στους 55°C. Προσθέσαμε 5ml BG11 και αναδεύσαμε. Αποθηκεύσαμε στους 4°C.

2) Θρεπτικό υλικό BG11 1x με 0.7% άγαρ (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich) (τρυβλία)

Τοποθετήσαμε σε φιάλη 297ml απεσταγμένο νερό, προσθέσαμε 2.1gr άγαρ και αναδεύσαμε. Αποστειρώσαμε στους 121°C για 20min και τοποθετήσαμε τη φιάλη στο υδατόλουτρο στους 55°C. Στη συνέχεια προσθέσαμε 3ml BG11 και αναδεύσαμε. Μοιράσαμε το θρεπτικό υλικό σε τρυβλία και μετά τη στερεοποίηση αποθηκεύσαμε στους 4°C.

3) Θρεπτικό υλικό R2A (LABM, UK) υγρό

Τοποθετήσαμε σε φιάλη 1.5gr R2A και προσθέσαμε 500ml απεσταγμένο νερό. Αναδεύσαμε για 10min, αποστειρώσαμε στους 121°C για 20min και αποθηκεύσαμε στους 4°C.

4) Θρεπτικό υλικό R2A με 1.5% άγαρ (τρυβλία)

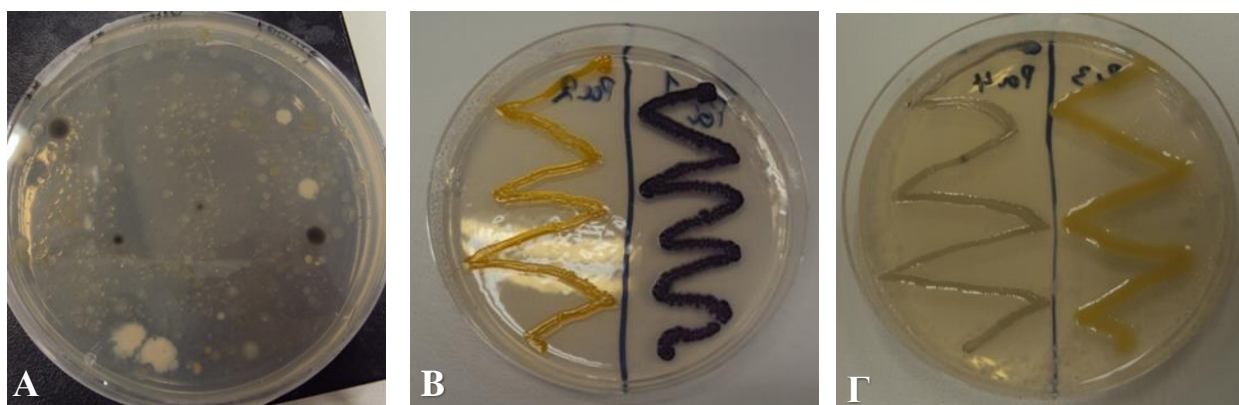
Τοποθετήσαμε σε φιάλη 1.5gr R2A, 7.5gr άγαρ και προσθέσαμε απεσταγμένο νερό μέχρι τα 500ml. Αναδεύσαμε για 10min, αποστειρώσαμε στους 121°C για 20min και μοιράσαμε το θρεπτικό υλικό σε τρυβλία. Αποθηκεύσαμε στους 4°C.

Διαδικασία καλλιέργειας

Επιστρώσαμε σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο R2A και BG11 100μl δείγματος νερού από τη λίμνη Παμβώτιδα και επώασαμε τα τρυβλία στους 20°C υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες για την ανάπτυξη ετερότροφων Βακτηρίων και στους 26°C υπό φως για την ανάπτυξη κυανοβακτηρίων. Για τη δημιουργία αναερόβιων συνθηκών χρησιμοποιήσαμε το πρωτόκολλο GENbox anaer (BIOMERIEUX).

Για την ανάπτυξη ετερότροφων Βακτηρίων από τα ιζήματα της λίμνης Παμβώτιδας, χρησιμοποιήσαμε δείγματα από την καλοκαιρινή δειγματοληψία και από τους δυο σταθμούς. Συγκεκριμένα διαλύσαμε 10gr δείγματος σε αποστειρωμένο νερό και πραγματοποιήσαμε δεκαδικές αραιώσεις. Στη συνέχεια επιστρώσαμε 100μl από κάθε αραιώση σε τρυβλία R2A, επώασαμε στους 26°C για 10 ημέρες στο σκοτάδι [81].

Μετά την ανάπτυξη αποικιών επιλέξαμε μεμονωμένες διαφορετικές αποικίες με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά (χρώμα, υφή) και ρυθμό ανάπτυξης, και πραγματοποιήσαμε επίστρωση σε νέο τρυβλίο (**Εικόνα 2.10**) [82]. Επαναλάβαμε τη διαδικασία αυτή 3 φορές και στη συνέχεια μεταφέραμε μέρος της καλλιέργειας σε υγρό θρεπτικό μέσο. Η ανάπτυξη των καλλιεργειών έγινε σε αρκετό όγκο θρεπτικού υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Οι αναερόβιες συνθήκες δημιουργήθηκαν με τη χρήση υγρής παραφίνης. Ακολούθησε αποθήκευση μέρους της καλλιέργειας στους -80°C (με γλυκερόλη συγκέντρωσης 20%), απομόνωση DNA και εκχύλιση.



Εικόνα 2.10: Α) Ανάπτυξη αποικιών υπό αερόβιες συνθήκες σε R2A θρεπτικό μέσο μετά από επίστρωση δείγματος νερού από τη λίμνη Παμβώτιδα. Β,Γ) Ανάπτυξη επιλεγμένων αποικιών υπό αερόβιες συνθήκες σε R2A θρεπτικό μέσο

2.2.2. Βακτηριακά εκχυλίσματα σε μεθανόλη και νερό

Διάφορες δραστικές ουσίες αλλά και δευτερογενείς μεταβολίτες που δυνητικά παράγουν τα ετερότροφα Βακτήρια και τα κυανοβακτήρια είναι δυνατόν να εκχυλιστούν σε οργανικούς ή σε ανόργανους διαλύτες. Για παράδειγμα η μικροκυστίνη εκχυλίζεται σε μεθανόλη ενώ η κυλινδροσπερμοψίνη σε νερό.

Για να καταφέρουμε να πραγματοποιήσουμε εκχύλιση πιθανών δραστικών ουσιών, χρησιμοποιήσαμε σαν διαλύτες τη μεθανόλη και το νερό σε συνδυασμό με υπερήχους με τη συσκευή Elmasonic S₁₅ (Elma).

Πρωτόκολλο εκχύλισης

1^η μέρα

Χρησιμοποιήσαμε ζυγισμένο ίζημα καλλιεργειών μετά από φυγοκέντησή τους στις 8500rpm/10 min

- Ομογενοποίηση του ιζήματος σε 10ml μεθανόλη 75% (ή νερό)
- Τοποθέτηση του δείγματος σε συσκευή υπερήχων για 15min
- Επώαση για 20 min σε RT
- Επανάληψη των βημάτων 2 και 3 τρεις φορές ακόμη
- Φυγοκέντρηση στις 8500rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου (RT)

- Συλλογή του υπερκειμένου και αποθήκευση στους 4°C
- Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 10ml μεθανόλη 75% (ή νερό)
- Επώαση στους 15°C O/N υπό ανάδευση 200rpm

2^η μέρα

- Επανάληψη του πρωτοκόλλου για 2 ακόμη φορές χωρίς όμως το στάδιο της O/N επώασης
- Αποθήκευση του υπερκειμένου στους 4°C (τελικός όγκος 30ml)

[62, 83]

Το παραπάνω πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκε για όλες τις καλλιέργειες ετερότροφων Βακτηρίων και κυανοβακτηρίων που απομονώσαμε από τα δείγματα νερού.

2.2.3. Μελέτη κυτταροτοξικότητας των βακτηριακών εκχυλισμάτων σε καρκινικές κυτταρικές σειρές

Στη συνέχεια της εργασίας αυτής, θέλαμε να μελετήσουμε τα εκχυλίσματα που απομονώσαμε ως προς τη δραστικότητά τους, σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. Για παράδειγμα, είναι ήδη γνωστό από προηγούμενες μελέτες πως η μικροκυστίνη έχει αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων [84].

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε χαρακτηρισμένες κυτταρικές σειρές.

- HepG2- Hepatocellular carcinoma
Τα κύτταρα προέρχονται από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα 15-χρονου καυκάσιου άντρα
- A549
Τα κύτταρα προέρχονται από καρκινικό ιστό πνεύμονα 58-χρονου καυκάσιου άντρα
- MCF-7- Michigan Cancer Foundation-7
Η κυτταρική σειρά MCF-7 προέρχεται από καρκίνο μαστού 69-χρονης καυκάσιας γυναίκας
- MRC-5-Fibroblasts
Φυσιολογικοί ινοβλάστες πνευμονικού παρεγχύματος που προέρχονται από έμβρυο 14άρων εβδομάδων

Κυτταροκαλλιέργειες-πρωτόκολλα

Προετοιμασία θρεπτικών υλικών για κύτταρα που σχηματίζουν ταπήτιο.

Χρησιμοποιήσαμε θρεπτικό Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (500ml) medium glucose (Gibco, life technologies). Στο θρεπτικό προσθέσαμε 2.5ml γλουταμίνη, 5ml πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη και 56ml εμβρυικό βόειο ορό (Fetal Bovine Serum-FBS τουλάχιστον 10%). Αναδεύσαμε και αποθηκεύσαμε στους 4°C.

Απόψυξη κυττάρων

Τα κύτταρά μας είναι αποθηκευμένα σε φιαλίδια στο υγρό άζωτο. Για να τα ξεπαγώσουμε χωρίς να μειώσουμε τη βιωσιμότητά τους, τα μεταφέραμε αρχικά στους -70°C και στη συνέχεια τα ξεπαγώσαμε σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, τοποθετήσαμε τα κύτταρα σε τρυβλίο που περιείχε 10 ml θρεπτικό DMEM. Ανακινήσαμε κυκλικά και επώασαμε στους 37°C/5% CO₂.

Ανακαλλιέργεια κυττάρων

- Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από το τρυβλίο
- Προσθήκη 10ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού άλατος (Phosphate Buffered Saline-PBS pH=7.4) (Gibco, life technologies), κυκλική ανάδευση και απομάκρυνση
- Προσθήκη 1 ml τρυψίνης
- Επώαση στους 37°C για 2-4 min
- Παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Αν δεν έχουν αποκολληθεί από το τρυβλίο η επώαση συνεχίζεται. Αν έχουν αποκολληθεί προχωρούμε σε προσθήκη 10ml θρεπτικού το οποίο απενεργοποιεί τη δράση της τρυψίνης
- Ανάδευση με τη χρήση σιφωνίου
- Τοποθέτηση 1ml κυττάρων στο τρυβλίο και προσθήκη 9ml νέου θρεπτικού υλικού
- Κυκλική ανάδευση
- Επώαση στους 37°C/5% CO₂

Σπορά κυττάρων

- Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού από το τρυβλίο
- Προσθήκη 10ml PBS, κυκλική ανάδευση και απομάκρυνση
- Προσθήκη 1 ml τρυψίνης

- Επώαση στους 37°C για 2-4 min
- Αφού αποκολληθούν τα κύτταρα από το τρυβλίο, προσθήκη 10ml θρεπτικού υλικού
- Ανάδευση με τη χρήση σιφωνίου
- Μεταφορά του θρεπτικού υλικού με τα κύτταρα σε αποστειρωμένο σωληνάριο
- Τοποθέτηση 10μl του υλικού σε πλάκα neubauer
- Μέτρηση των κυττάρων με τη χρήση μικροσκοπίου
- Για σπορά 100 000 κυττάρων σε τρυβλίο των 3 ml, χρησιμοποιήσαμε τον μέσο όρο από τη μέτρηση x 10 000 (συντελεστής neubauer) x 10.5ml (τρυβλίο) = αριθμός κυττάρων στα 10 000μl. Στη συνέχεια υπολογίσαμε την ποσότητα των κυττάρων και του νέου θρεπτικού υλικού.
- Τοποθέτηση αντίστοιχης ποσότητας κυττάρων και θρεπτικού σε νέο τρυβλίο
- Κυκλική ανάδευση
- Επώαση στους 37°C/5% CO₂ για 24ώρες

Για τη μελέτη των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήσαμε πολυτρυβλία με μικροφρεάτια που είχαν όγκο 1ml και κάναμε σπορά 25000 κύτταρα.

Προσθήκη εκχυλισμάτων στα μικροφρεάτια του πολυτρυβλίου

Πραγματοποιήθηκε ξήρανση υπό κενό (SAVANT SpeedVac concentrator, SPD2010) 500μl από κάθε εκχύλισμα (15mg ξηρού βάρους καλλιέργειας/ml διαλύτη) και επαναιώρηση σε 500μl θρεπτικού υλικού DMEM. Στη συνέχεια, αφού προηγήθηκε αλλαγή θρεπτικού υλικού στα μικροφρεάτια του πολυτρυβλίου, προστέθηκε το εκχύλισμα και τα κύτταρα επώαστηκαν στους 37°C/5% CO₂ για 24ώρες.

Μέτρηση βιωσιμότητας κυττάρων με δοκιμασία αποκλεισμού χρωστικής trypan blue

Το trypan blue αποτελεί χρωστική που δεν επηρεάζει τα ζωντανά κύτταρα σε αντίθεση με τα νεκρά που τα χρωματίζει μπλε. Με αυτόν τον τρόπο μετράμε βιωσιμότητα κυττάρων.

- Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού από τα κύτταρα
- Προσθήκη 1ml PBS σε κάθε μικροφρεάτιο, κυκλική ανάδευση και απομάκρυνση
- Προσθήκη 250μl τρυψίνης και επώαση στους 37°C για 2-4 min μέχρι να αποκολληθούν τα κύτταρα
- Προσθήκη 250μl PBS σε κάθε μικροφρεάτιο και ανάδευση
- Προσθήκη 500μl trypan blue σε κάθε μικροφρεάτιο και ανάδευση

- Επώαση των κυττάρων για 5 min σε RT
- Ανάδευση και τοποθέτηση 11μl από κάθε μικροφρεάτιο σε πλάκα Neubauer
- Μέτρηση κυττάρων που παραμένουν άχρωμα (ζωντανά κύτταρα)
- Σύγκριση μετρήσεων με το δείγμα ελέγχου

2.2.4. Περαιτέρω μελέτη του βιοδραστικού κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος - Μοριακός χαρακτηρισμός κυανοβακτηρίου «Pamv7»

Από τις δοκιμές βακτηριακών και κυανοβακτηριακών εκχυλισμάτων στις καρκινικές κυτταρικές σειρές, ένα εκχύλισμα βρέθηκε να έχει κάποια δραστικότητα και να αξίζει περαιτέρω μελέτης. Το εκχύλισμα αυτό ανήκει στο κυανοβακτήριο «Pamv7», το οποίο αρχικά παρατηρήσαμε μικροσκοπικά.

Για να καταφέρουμε να χαρακτηρίσουμε το συγκεκριμένο κυανοβακτήριο, πραγματοποιήσαμε PCR και αλληλούχιση για τμήμα 16S rDNA-ITS, του τμήματος ITS, του γονιδίου της β-υπομονάδας της RNA πολυμεράσης (rpoB) καθώς και για γονίδια NRPSs και PKSs (βλ. ενότητα 2.1.5). Στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε δοκιμή ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) για την ανίχνευση μικροκυστίνης/νοντουλαρίνης και κυλινδροσπερμοψίνης στο εκχύλισμα.

2.2.4.1. Δοκιμή ELISA για την ανίχνευση γνωστών κυανοτοξινών στο εκχύλισμα από το κυανοβακτήριο «Pamv7»

Υποθέτοντας ότι η δραστικότητα του εκχυλίσματος του κυανοβακτηρίου «Pamv7» στις κυτταρικές σειρές οφείλεται σε κάποια κυανοτοξίνη, ελέγξαμε την πιθανή ύπαρξη μικροκυστίνης-νοντουλαρίνης και κυλινδροσπερμοψίνης με τη χρήση δοκιμής ELISA. Η ELISA αποτελεί ένα διαγνωστικό εργαλείο το οποίο χρησιμοποιεί αντισώματα και χρωμοφόρα μόρια.

Ανίχνευση μικροκυστίνης-νοντουλαρίνης

Για την ανίχνευση μικροκυστίνης-νοντουλαρίνης χρησιμοποιήσαμε το πρωτόκολλο Microcystins-ADDA ELISA (Microtiter Plate), Abraxis 520011. Η συγκεκριμένη δοκιμή αποτελεί ELISA έμμεσης ανταγωνιστικότητας (indirect competitive ELISA) και βασίζεται στην ανίχνευση μικροκυστίνης και νοντουλαρίνης από συγκεκριμένα αντισώματα. Το όριο ανίχνευσης για την μικροκυστίνη-LR είναι 0.10 ppb (μg/L). Η

γενική αρχή έχει ως εξής: ανάλογα μικροκυστίνης έχουν ακινητοποιηθεί στην πλάκα και ανταγωνίζονται την τοξίνη στο δείγμα, για θέσεις δέσμευσης σε αντι-Microcystins/Nodularins αντισώματα. Ακολουθεί μια πλύση και προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος-HRP. Έπειτα μια δεύτερη πλύση και προσθήκη υποστρώματος για την παραγωγή χρώματος. Η ένταση του μπλε χρώματος είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης μικροκυστίνης στο δείγμα. Η αντίδραση παραγωγής χρώματος σταματά μετά από συγκεκριμένο χρόνο και ακολουθεί φωτομέτρηση σε φωτόμετρο ELISA.

Προετοιμασία δείγματος:

Τοποθετήσαμε 50μl από το εκχύλισμα του κυανοβακτηρίου σε σωληνάρια και πραγματοποιήσαμε ξήρανση υπό κενό (SAVANT SpeedVac concentrator, SPD2010) σε χαμηλή θερμοκρασία. Επαναιωρήσαμε το ίζημα σε 50μl MilliQ νερό. Ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Ανίχνευση κυλινδροσπερμοψίνης

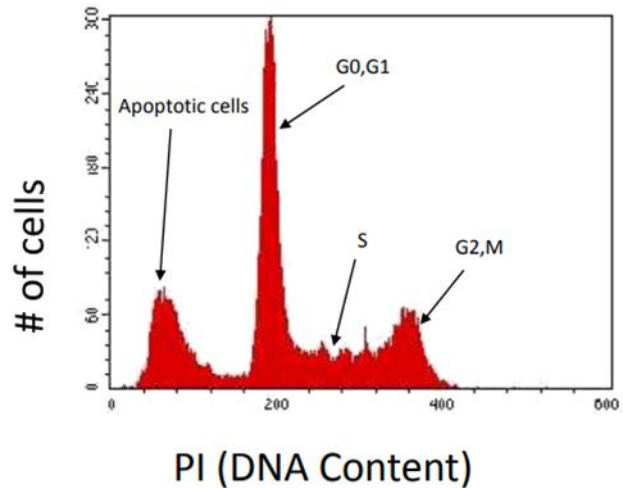
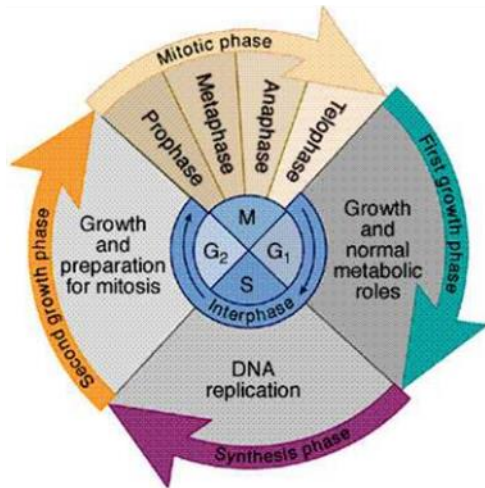
Για την ανίχνευση κυλινδροσπερμοψίνης χρησιμοποιήσαμε το πρωτόκολλο *Cylindrospermopsin* ELISA (Microtiter Plate), Abraxis 522011. Η συγκεκριμένη δοκιμή αποτελεί ELISA άμεσης ανταγωνιστικότητας (direct competitive) και βασίζεται στην αναγνώριση της κυλινδροσπερμοψίνης από συγκεκριμένα αντισώματα. Το όριο ανίχνευσης της τοξίνης είναι το 0.040 ppb (μg/L).

Η κυλινδροσπερμοψίνη που υπάρχει σε ένα δείγμα ανταγωνίζεται ένα *Cylindrospermopsin*-HRP ανάλογο για τις θέσεις πρόσδεσης στα αντισώματα rabbit anti-*Cylindrospermopsin*. Τα αντι-*Cylindrospermopsin* αντισώματα συνδέονται στη συνέχεια με ένα δεύτερο αντίσωμα το οποίο είμαι ακινητοποιημένο στην πλάκα. Ακολουθούν στάδια πλύσης και προσθήκη του διαλύματος υποστρώματος για την παραγωγή χρώματος. Η ένταση του μπλε χρώματος είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης κυλινδροσπερμοψίνης στο δείγμα. Η αντίδραση παραγωγής χρώματος σταματά μετά από συγκεκριμένο χρόνο και ακολουθεί φωτομέτρηση σε φωτόμετρο ELISA. Ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.2.4.2. Μελέτη του τρόπου δράσης του βιοδραστικού εκχυλίσματος με χρήση κυτταρομετρίας ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι η τεχνολογία με την οποία γίνονται ποικίλες μετρήσεις και προσδιορισμοί σε κατάλληλα προετοιμασμένα κύτταρα ή οργανίδια κυττάρων (πυρήνες, χρωμοσώματα κ.λ.π.). Η προετοιμασία των κυττάρων ή οργανιδίων αυτών έγκειται στη σήμανσή τους με φθορίζουσες χρωστικές. Τα υπό έλεγχο σωματίδια, ρέουν με μορφή εναιωρήματος μπροστά από μία φωτεινή ακτίνα LASER, δια μέσου θαλάμου με ταχύτητα αρκετών χιλιάδων ανά δευτερόλεπτο. Η μέτρηση, αναγνώριση και η διαλογή γίνεται με βάση τον εκπεμπόμενο φθορισμό και τη σκέδαση του φωτός. Τα εκπεμπόμενα φωτεινά σήματα από το κάθε κύτταρο ή οργανίδιο αναλύονται, κατευθύνονται στους ανιχνευτές και στη συνέχεια μετατρέπονται σε ηλεκτρικά σήματα. Αυτά τα σήματα ενισχύονται, μετρούνται και τέλος διοχετεύονται υπό μορφή ψηφιακών ενδείξεων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, ο οποίος με ειδικό λογισμικό τα επεξεργάζεται και τα παρουσιάζει. Στο κάθε κύτταρο ή οργανίδιο μετρούνται το μέγεθος, η κοκκίωση και τα άλλα χαρακτηριστικά της ενδοκυττάριας ή εξωκυττάριας επιφάνειας, που έχουν σημειωθεί με τις φθορίζουσες χρωστικές. Με βάση αυτά τα δεδομένα, τα κύτταρα ή τα σωματίδια ταξινομούνται σε σύνολα και υποσύνολα και στη συνέχεια γίνεται η στατιστική επεξεργασία τους [85].

Η μέτρηση του DNA με κυτταρομετρία ροής μελετά και το ποσοστό των κυττάρων τα οποία βρίσκονται σε διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου είναι τρεις: φάση ηρεμίας G0/G1 όπου βρίσκεται το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων, ένα μικρότερο ποσοστό μπαίνει στη φάση S όπου αντιγράφεται το DNA του κυττάρου (διπλασιάζεται ο αριθμός των χρωμοσωμάτων) και η τρίτη φάση G2/M της μίτωσης όπου το κύτταρο διαιρείται. Οι φάσεις αυτές παρουσιάζονται στην **Εικόνα 2.11**:



Εικόνα 2.11: Ιστογραμμική απεικόνιση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου G₀/G₁, S, και G₂/M μετά από χρώση με ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide) [85]

Για την ανίχνευση αποπτωτικών κυττάρων χρησιμοποιούνται διάφορες χρωστικές όπως η ανεξίνη V, το ιωδιούχο προπίδιο PI κ.α. Το ιωδιούχο προπίδιο έχει την ικανότητα να προσδένεται στο δίκλωνο DNA. Διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη, παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων και σχηματίζει σύμπλοκα.

Θέλοντας να διαπιστώσουμε εάν η τοξίνη που παράγει το κυανοβακτήριο «Pamv7» προκαλεί απόπτωση ή νέκρωση στα καρκινικά κύτταρα, πραγματοποιήσαμε κυτταρομετρία ροής με τη χρήση χρωστικής PI. Τα πειράματα κυτταρομετρίας ροής έγιναν στο Αιματολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (Π.Γ.Ν.Ι.), Μονάδα Μοριακής Βιολογίας, υπό την επίβλεψη του κ. Γεώργιου Βαρθολομάτου (Βιοχημικός PhD, EurClinChem, Επιστημονικός Υπεύθυνος Μονάδος Μοριακής Βιολογίας Αιματολογικού Εργαστηρίου, Π.Γ.Ν. Ιωαννίνων).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Ποικιλότητα προκαρυωτικών οργανισμών στην ιλύ της λίμνης Παμβώτιδας- Μοριακή χαρτογράφηση Βακτηρίων και Αρχαίων

3.1.1. Φυσικοχημικές μετρήσεις δειγμάτων ιλύος

Τα αποτελέσματα από τις φυσικοχημικές μετρήσεις των δειγμάτων ιλύος από τους δυο σταθμούς δειγματοληψίας (SS1, SS2) και τις τέσσερις εποχές του χρόνου παρουσιάζονται στον πίνακα 8.1 (Παράρτημα, Πίνακας 8.1). Μεταξύ άλλων αναφέρονται μετρήσεις άνθρακα, φωσφόρου, νιτρικών, ιόντων και βαρέων μετάλλων.

Οι συγκεντρώσεις των παραμέτρων Ολικός άνθρακας (TC), Ολικός οργανικός άνθρακας (TOC), Ολικό άζωτο με τη μέθοδο Kjeldahl (TKN) και Ολικός φώσφορος (TP) δείχνουν την ευτροφική κατάσταση της λίμνης.

Επίσης, οι δυο σταθμοί δειγματοληψίας διαφέρουν πολύ στα στοιχεία Ca^{2+} , Cl^- , As, Ni, TC, TOC κατά τη διάρκεια του χρόνου, με τον σταθμό 2 να εμφανίζεται πιο σταθερός στη συγκέντρωση των στοιχείων αυτών συγκριτικά με τον σταθμό 1. Αντίθετα οι συγκεντρώσεις του Ni είναι υψηλότερες στον σταθμό δειγματοληψίας 1.

Παρατηρούμε επίσης διαφορές στις φυσικοχημικές παραμέτρους στον ίδιο σταθμό σε διαφορετικές εποχές του έτους. Οι συγκεντρώσεις ιόντων χλωρίου μειώθηκαν και στους δυο σταθμούς τον χειμώνα ενώ οι συγκεντρώσεις TP αυξήθηκαν και στους δυο σταθμούς το φθινόπωρο και τον χειμώνα.

Επιπλέον, κατά καιρούς διάφορες κατευθυντήριες γραμμές για τη ποιότητα των ιζημάτων έχουν αναπτυχθεί (Sediment Quality Guidelines, SQGs). Κάποιες από αυτές είναι το όριο κάτω από το οποίο δεν αναμένονται επιδράσεις στους οργανισμούς των ιζημάτων (Threshold Effect Concentration, TEC), και το όριο πάνω από το οποίο αναμένονται συχνές αρνητικές επιδράσεις στους οργανισμούς των ιζημάτων (Probable Effect Concentration, PEC) [86]. Με βάση τον πίνακα των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των ιζημάτων της λίμνης Παμβώτιδας, και σύμφωνα με τα SQGs μόνο οι συγκεντρώσεις νικελίου φαίνεται να ξεπερνούν το PEC και στους δυο σταθμούς δειγματοληψίας της λίμνης Παμβώτιδας σε όλες τις εποχές του έτους. Επίσης, οι συγκεντρώσεις υδραργύρου ξεπερνούν το όριο PEC μόνο την άνοιξη. Δύο ακόμη βαρέα μέταλλα (Cr, Cu) φαίνεται να ξεπερνούν το TEC. (Ni PEC:48.6 mg kg⁻¹,

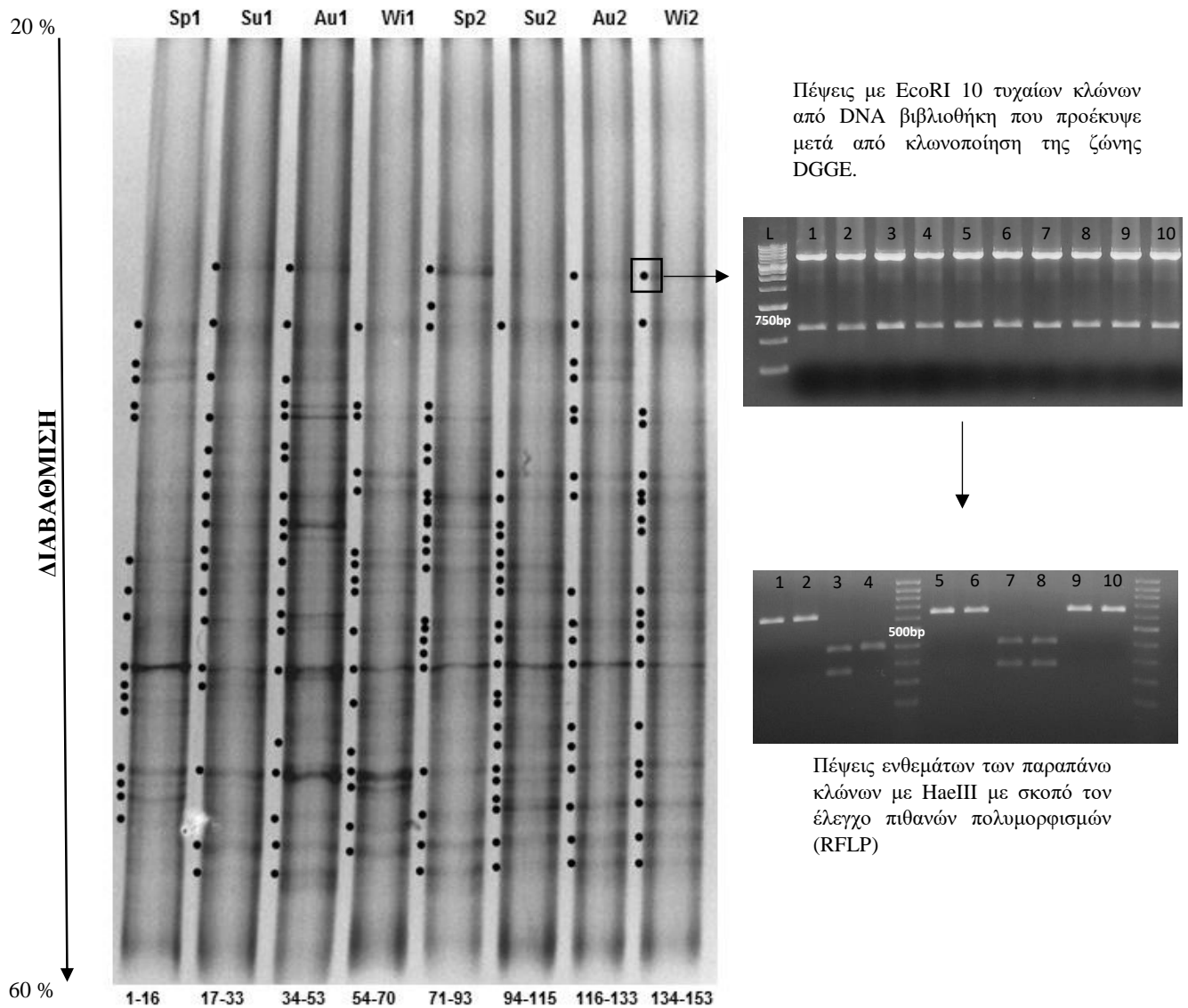
Hg PEC: 1.06 mg kg⁻¹, Hg TEC: 0.18 mg kg⁻¹, Cr TEC: 43.4 mg kg⁻¹, Cu TEC: 31.6 mg kg⁻¹).

3.1.2. Βακτηριακή ποικιλότητα στα δείγματα ιλύος

Η βακτηριακή ποικιλότητα στα δείγματα ιλύος της λίμνης Παμβώτιδας αναδείχθηκε με τη χρήση DGGE στο οποίο αποτυπώνονται τα κυρίαρχα είδη.

Το αποτύπωμα DGGE της βακτηριακής ποικιλότητας φαίνεται στην **Εικόνα 3.1**.

Συνολικά εντοπίστηκαν 153 ζώνες, οι οποίες και εκχυλίστηκαν από την πηκτή. Τα εκχυλίσματα ενισχύθηκαν ξανά με PCR και κατασκευάστηκαν βιβλιοθήκες DNA για κάθε ένα από αυτά. Δέκα κλώνοι από κάθε βιβλιοθήκη (η οποία προήλθε από κάθε ζώνη της DGGE), αναλύθηκαν περαιτέρω με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων με σκοπό τον έλεγχο πιθανών πολυμορφισμών (RFLP). Από κάθε βιβλιοθήκη στάλθηκαν προς αλληλούχιση τόσοι κλώνοι όσα και τα διαφορετικά προφίλ RFLP. Μετά την αλληλούχιση, μόνο 57 διαφορετικές αλληλουχίες ανιχνεύθηκαν οι οποίες και χαρακτηρίστηκαν περαιτέρω μέσω σύγκρισής τους στη βάση δεδομένων του NCBI.



Εικόνα 3.1: 16S rDNA DGGE προφίλ Βακτηρίων. Όλες οι σημειωμένες ζώνες αποκόπηκαν και χαρακτηρίστηκαν. Διαβάθμιση αποδιατακτικών παραγόντων 20%-60%.
Sp:Spring, Su:Summer, Au:Autumn, Wi:Winter, 1:SS1, 2:SS2

Είκοσι εννέα (29) από αυτές τις αλληλουχίες (50.88%) βρέθηκαν να έχουν ομολογία <97% με ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων GenBank ενώ 5 από αυτές (8.77%) λιγότερο από 90%. Συγκρίνοντας τις αλληλουχίες μας με αλληλουχίες ήδη γνωστών καλλιεργούμενων βακτηριακών ειδών, διαπιστώσαμε ότι 48 από τις

αλληλουχίες μας (84.21%) έχουν ομολογία <97% με καλλιεργούμενα βακτηριακά είδη που είναι κατατεθειμένα στη GenBank, γεγονός που υποδηλώνει πως το μεγαλύτερο μέρος των αλληλουχιών μας ανήκει σε Βακτήρια μη καλλιεργούμενα. Επιπλέον, 32 από τις παραπάνω αλληλουχίες (56.14%) έχουν ομολογία <90% και 3 (5.26%) μικρότερη από 80% με γνωστά καλλιεργούμενα Βακτήρια (Παράρτημα, Πίνακας 8.3).

Καταθέσαμε τις 57 διαφορετικές αλληλουχίες στη βάση δεδομένων GenBank οι οποίες έλαβαν αριθμούς πρόσβασης (accession numbers) KP244158-KP244214 (Παράρτημα, Εικόνα 8.1).

3.1.2.1. Φυλογενετική κατάταξη των Βακτηρίων από τα δείγματα ιλύος

Με βάση το φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάσαμε (Εικόνες 3.3a,b,c), με τις αλληλουχίες που προέκυψαν από την DGGE (BacPamv), διαπιστώσαμε πως η βακτηριακή κοινότητα στα ιζήματα της λίμνης Παμβώτιδας αποτελείται από *Proteobacteria* (β -, γ -, δ - και α -*Proteobacteria*, 20 αλληλουχίες) σε ποσοστό 35.08%. Ακολουθούν αλληλουχίες που ανήκουν σε *Cyanobacteria* (9 αλληλουχίες, 15.79%), *Nitrospirae* (5 αλληλουχίες, 8.77%), *Acidobacteria* (4 αλληλουχίες, 7.01%), *Bacteroidetes* (3 αλληλουχίες, 5.26%), *Firmicutes* (3 αλληλουχίες, 5.26%), *Spirochaetes* (3 αλληλουχίες, 5.26%), *Planctomycetes* (2 αλληλουχίες, 3.51%), *Actinobacteria* (1 αλληλουχία, 1.75%), *Gemmatimonadetes* (1 αλληλουχία, 1.75%). Ανιχνεύσαμε επίσης και έξι (6) αλληλουχίες (10.52%) που δεν καταφέραμε να συσχετίσουμε με καμία γνωστή βακτηριακή κλάση και γι' αυτό τα χαρακτηρίσαμε ως "unclassified" Βακτήρια.

Πιο συγκεκριμένα, στο φύλο *Proteobacteria*, οι περισσότερες αλληλουχίες μας (9) ανήκουν στην κλάση β -*Proteobacteria*. Τέσσερις από αυτές έχουν πολύ χαμηλή ομολογία με ήδη γνωστές βακτηριακές αλληλουχίες (<94%) (Εικόνα 3.3a). Μέλη της κλάσης β -*Proteobacteria* ανιχνεύτηκαν σε όλες τις εποχές δειγματοληψίας και στους δυο σταθμούς (Παράρτημα, Πίνακας 8.5).

Μια κλάση Πρωτεοβακτηρίων αποτελούν τα γ -*Proteobacteria*. Στην παρούσα εργασία ανιχνεύσαμε μέλη των οικογενειών *Chromataceae*, *Aeromonadaceae*, *Moraxelaceae*,

Pseudomonadaceae και *Xanthomonadaceae*. Δύο από τις αλληλουχίες μας ομαδοποιήθηκαν με “unidentified γ -*Proteobacteria*”.

Επτά αλληλουχίες μας εμφανίζουν υψηλό ποσοστό ομολογίας (98%-99%) με ήδη γνωστά βακτηριακά είδη χαρακτηρισμένα ως *Reinheimera tilapiae*, *Aeromonas sp.*, *Acinetobacter parvus*, *Pseudomonas anguilliseptica*.

Τρεις από τους κλώνους των Βακτηρίων που ανιχνεύσαμε ανήκουν στο φύλο των *Bacteroidetes*. Όλοι οι κλώνοι έχουν χαμηλή ομολογία (<89%) με γνωστά μέλη της κατηγορίας αυτής. Ανιχνεύσαμε *Bacteroidetes* σε όλες τις εποχές και τους σταθμούς δειγματοληψίας (Παράρτημα, Πίνακας 8.5).

Όσον αφορά την κλάση δ -*Proteobacteria*, μόνο 3 DGGE αλληλουχίες ανιχνεύσαμε, οι οποίες είχαν πολύ χαμηλή ομολογία (<82%) με άλλα γνωστά μέλη της κλάσης αυτής. Στην κλάση α -*Proteobacteria*, οι αλληλουχίες μας ταξινομήθηκαν ως *Porphyrobacter sp.* ενώ στο φύλο *Actinobacteria* ταξινομήθηκαν ως *Micrococcus sp.*

Οι αλληλουχίες BacPamv2, BacPamv8 και BacPamv29 είναι αντιπρόσωποι του φύλου *Spirochaetes*, η αλληλουχία BacPamv34 του φύλου *Gemmatimonadetes* και οι αλληλουχίες BacPamv6, BacPamv14 του φύλου *Planctomycetes* και χαρακτηρίζονται από πολύ χαμηλές ομολογίες (82%-89%) με τις γνωστές αλληλουχίες που έχουν κατατεθεί στις βάσεις δεδομένων [87-89].

Ένα ακόμη φύλο των Βακτηρίων αποτελούν τα *Firmicutes* το οποίο περιλαμβάνει 3 κλάσεις (*Clostridia*, *Bacilli*, *Mollicutes*). Τρεις από τις αλληλουχίες μας ομαδοποιήθηκαν με αυτή την κατηγορία και μάλιστα οι δυο από αυτές (BacPamv51, BacPamv23) με χαμηλές ομολογίες (95%, 93% αντίστοιχα) συγκριτικά με ήδη γνωστές αλληλουχίες.

Συνεχίζοντας, τα *Cyanobacteria* αποτελούν ένα σημαντικό φύλο των Βακτηρίων. Κλώνους κυανοβακτηρίων ανιχνεύσαμε και στους δυο σταθμούς σε όλες τις εποχές δειγματοληψίας (Παράρτημα, Πίνακας 8.5). Εννέα διαφορετικές αλληλουχίες κυανοβακτηρίων ανιχνεύσαμε από τα ιζήματα που μελετήσαμε. Ένας κλώνος εμφάνισε μεγάλη ομολογία (99%) με *Microcystis sp.*, ένας άλλος κλώνος εμφάνισε ομολογία 98% με *Cyanobium sp.* και δυο ακόμη κλώνοι ομαδοποιήθηκαν με χαμηλές ομολογίες με *Nostocaceae Cyanobacteria* (92%, 95%). Οι υπόλοιποι 5 κλώνοι εμφάνισαν πολύ

χαμηλές ομολογίες (79%-85%) συγκριτικά με ήδη γνωστές αλληλουχίες (Παράρτημα, Πίνακας 8.3).

Έξι αλληλουχίες από την DGGE δεν καταφέραμε να τις ταυτοποιήσουμε, αλλά σχημάτισαν τρία διαφορετικά συμπλέγματα τα οποία περιλάμβαναν και άλλες εξωτερικές αλληλουχίες, επίσης μη ταυτοποιημένες (unclassified clusters I,II,III) **(Εικόνα 3.3a)**.

Ο κλώνος BacPamv43 (unclassified cluster I), προέκυψε από το σταθμό δειγματοληψίας 2 και βρέθηκε στα δείγματα από όλες τις εποχές (Παράρτημα, Πίνακας 8.5). Μαζί με τον κλώνο BacPamv43, ομαδοποιήθηκε και ο κλώνος TSBZ04 (AB186797) που απομονώθηκε από μικροβιακή κοινότητα (Polychlorinated-Dioxin-Dechlorinating) στην Ιαπωνία [90], παρόλο που οι δυο κλώνοι έχουν χαμηλή ομολογία (88%) **(Εικόνα 3.3a)**.

Το “unclassified cluster II” αποτελείται από 4 κλώνους (BacPamv8, BacPamv9A, BacPamv45, BacPamv47) που μοιάζουν μεταξύ τους κατά 99%. Οι περισσότερες από τις παραπάνω αλληλουχίες βρέθηκαν στα δείγματα και από τους δυο σταθμούς όλες τις εποχές του έτους (Παράρτημα, Πίνακας 8.5). Επίσης, οι αλληλουχίες αυτές ομαδοποιούνται με τον κλώνο TH-75 (AB185017) προερχόμενο από μια μικροβιακή κοινότητα στην Ιαπωνία που σχετίζεται με απονιτροποίηση [91], με ομολογία 94%-97% (Παράρτημα, Πίνακας 8.3).

Όσον αφορά την αλληλουχία BacPamv46 (unclassified III), βρέθηκε μόνο μια φορά στον σταθμό 2 στη θερινή δειγματοληψία (Παράρτημα, Πίνακας 8.5). Με βάση τη σύγκριση μέσω BLAST, βρέθηκε να έχει ομολογία 96% με μια αλληλουχία χαρακτηρισμένη ως *Spirochaetes* (κλώνος RLT34-41). Όμως μετά τη φυλογενετική ανάλυση, ο κλώνος RLT34-41 (GU236001) ομαδοποιήθηκε με τον κλάδο των *Spirochaetes* ενώ ο κλώνος BacPamv46 παρέμεινε φυλογενετικά μη ταυτοποιημένος.

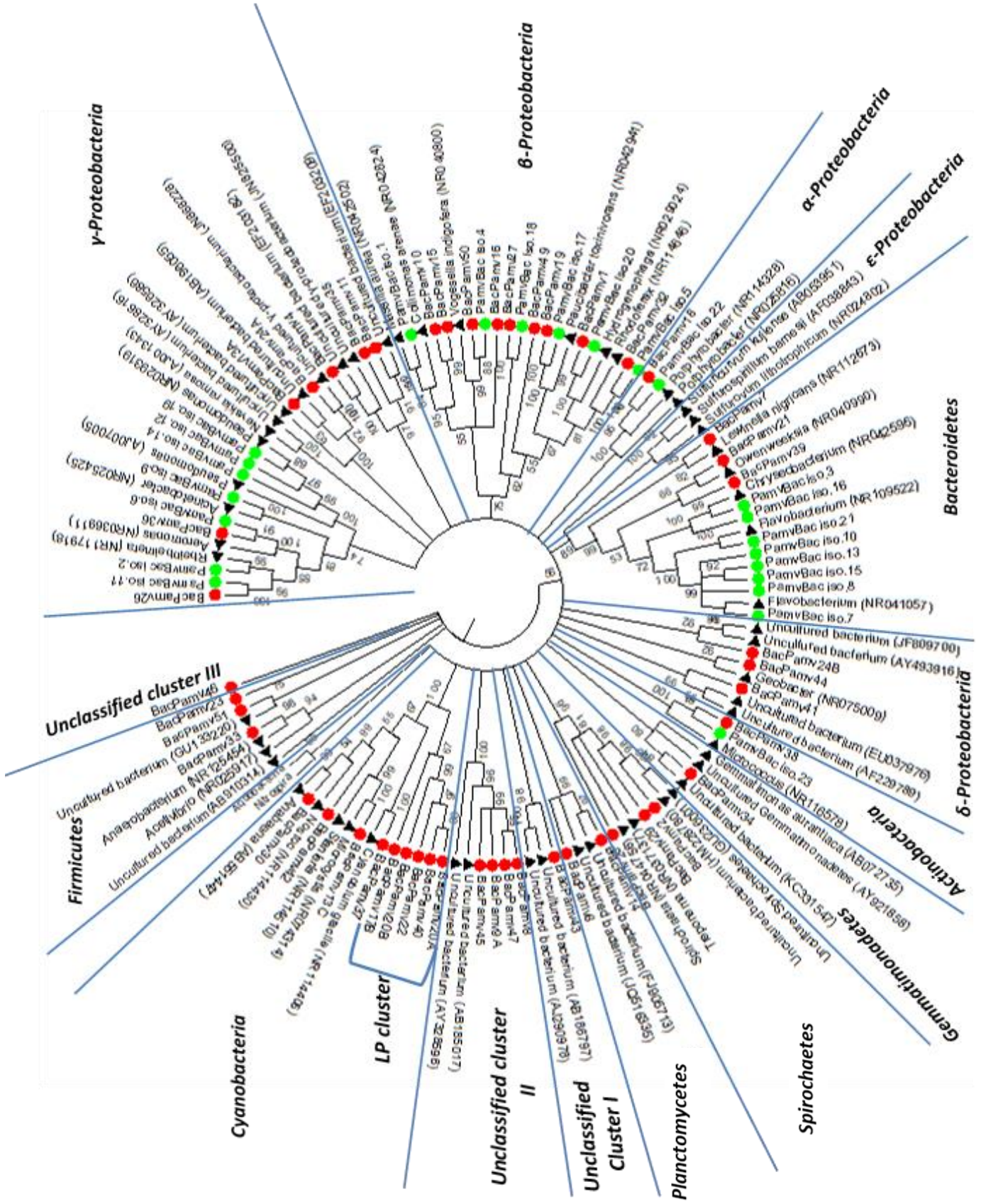
Εννέα από τις αλληλουχίες μας που έμοιαζαν με μέλη των φύλων *Nitrospirae* και *Acidobacteria* ήταν δύσκολο να συμπεριληφθούν στο βασικό φυλογενετικό δέντρο των Βακτηρίων κυρίως λόγω της χαμηλής ομολογίας με γνωστές αλληλουχίες *Nitrospirae* και *Acidobacteria* (89%-96%), με εξαίρεση τον κλώνο BacPamv12 ο οποίος εμφάνισε 99% ομολογία με ήδη χαρακτηρισμένο κλώνο *Nitrospira* H06_WMSP2 (DQ450808), που προέρχεται από έδαφος αλπικής τούνδρας [92]. Γι' αυτό το λόγο κατασκευάσαμε

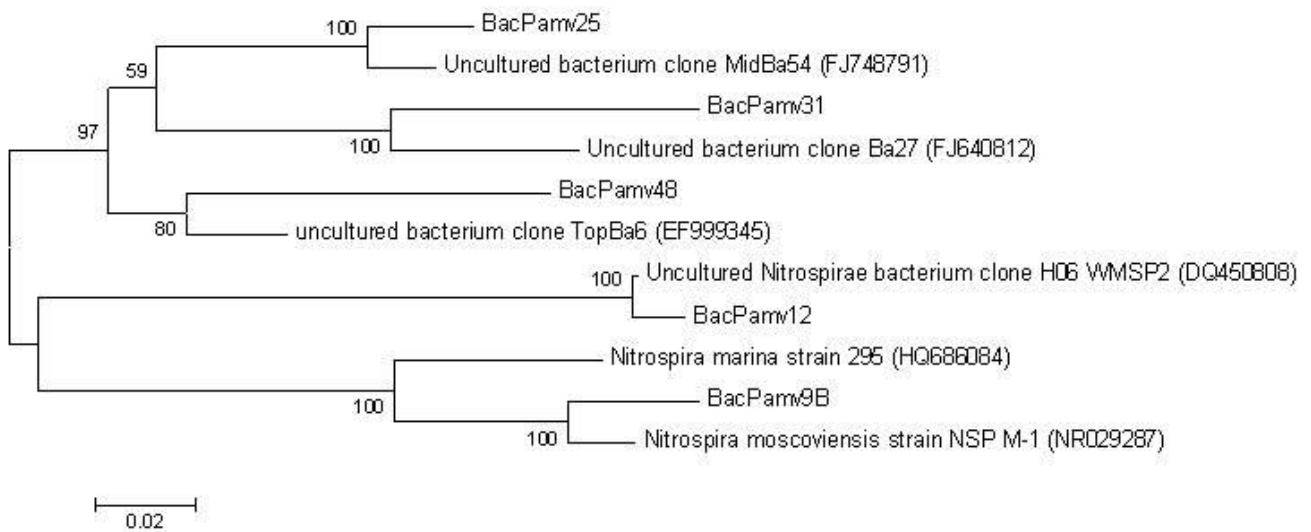
δυο διαφορετικά φυλογενετικά δένδρα, ένα για τις αλληλουχίες *Nitrospirae* (Εικόνα 3.3b) και ένα για τις αλληλουχίες *Acidobacteria* (Εικόνα 3.3c). Οι κλώνοι που μοιάζουν με *Nitrospira* παρουσιάζουν χαμηλές ομολογίες με ταυτοποιημένα είδη *Nitrospira* από το Pearl River [93] και το Juan de Fuca Ridge [94]. Οι κλώνοι που μοιάζουν με *Acidobacteria* (BacPamv17A, BacPmv5, BacPamv3, BacPamv13B) ομαδοποιήθηκαν σαν μέλη των ήδη γνωστών υποομάδων 3 (BacPamv17A), 8 (BacPmv5, BacPamv3) και 23 (BacPamv13B) [95-98] (Εικόνα 3.3c). Στην Εικόνα 3.2 παρουσιάζονται τα συνολικά αποτελέσματα από τις αναλύσεις DGGE, BLAST και τη φυλογενετική ανάλυση.

Βακτηριακή ποικιλότητα στα δείγματα ιλύος της λίμνης Παμβώτιδας σύμφωνα με DGGE και BLAST ανάλυση		Βακτηριακή ποικιλότητα στα δείγματα ιλύος της λίμνης Παμβώτιδας με βάση φυλογενετική ανάλυση	
Ζώνες DGGE	153	Βακτηριακά Φύλα	Αριθμός αλληλουχιών
Διαφορετικές αλληλουχίες	57	<i>Proteobacteria</i>	20
Αλληλουχίες με ομολογία <97% με εισαγωγές στη GenBank	29	<i>α-Proteobacteria</i>	1
Αλληλουχίες με ομολογία <90% με εισαγωγές στη GenBank	5	<i>β-Proteobacteria</i>	9
Αλληλουχίες με ομολογία <97% με βάση καλλιεργούμενα είδη (GenBank)	48	<i>γ-Proteobacteria</i>	7
Αλληλουχίες με ομολογία <90% με βάση καλλιεργούμενα είδη (GenBank)	32	<i>δ-Proteobacteria</i>	3
		<i>Cyanobacteria</i>	9
		<i>Nitrospirae</i>	5
		<i>Acidobacteria</i>	4
		<i>Bacteroidetes</i>	3
		<i>Firmicutes</i>	3
		<i>Spirochaetes</i>	3
		<i>Planctomycetes</i>	2
		<i>Actinobacteria</i>	1
		<i>Gemmatimonadetes</i>	1
		“unclassified”	6

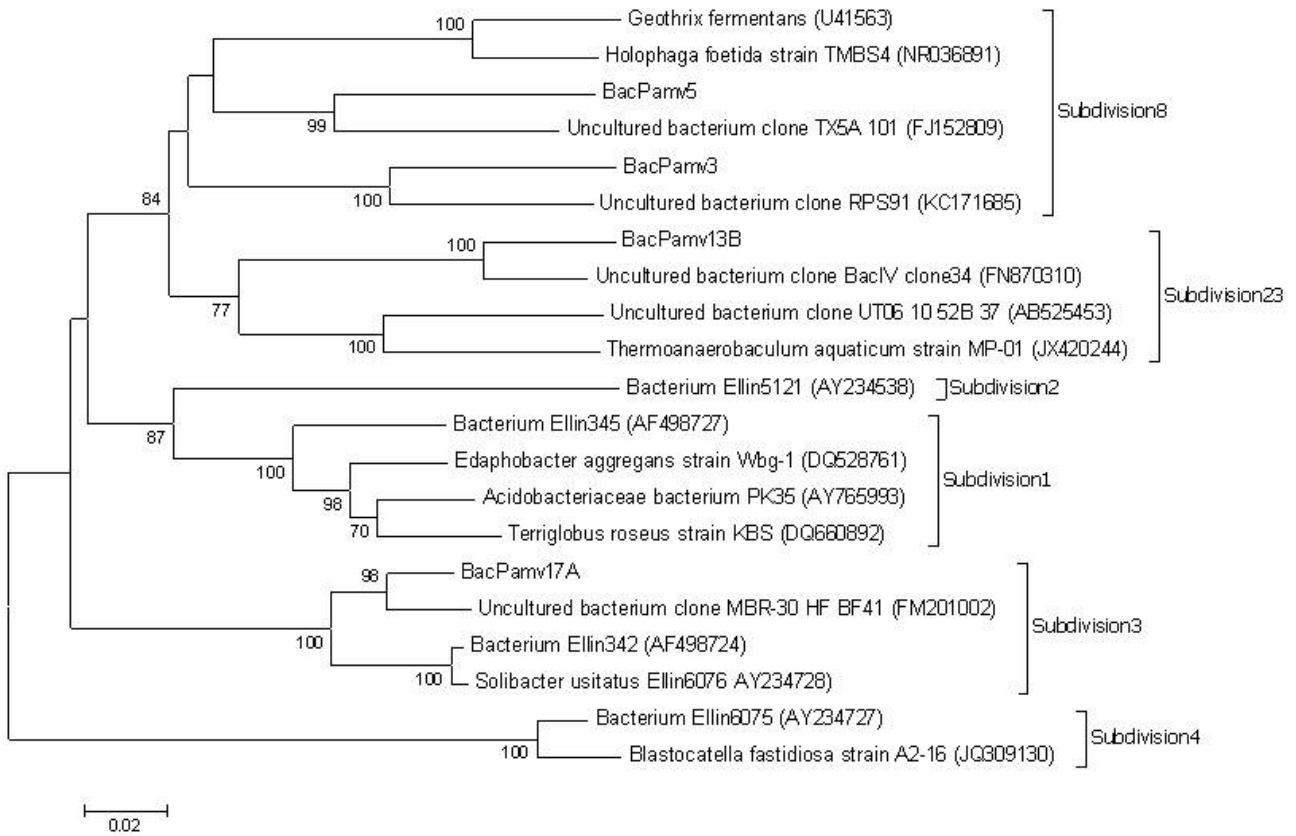
Εικόνα 3.2: Χαρακτηρισμός της βακτηριακής κοινότητας των ιζημάτων της λίμνης Παμβώτιδας όπως προέκυψε από τις αναλύσεις DGGE, BLAST (αριστερά) και τη φυλογενετική ανάλυση (δεξιά)

Εικόνα 3.3a: Φυλογενετικό δέντρο (Neighbor-Joining tree) με βάση την αντιστοίχιση των βακτηριακών 16S rDNA αλληλουχιών από τα δείγματα ιλύος της λίμνης Παμβώτιδας, με αλληλουχίες γνωστών ειδών που ανακτήθηκαν από τις βάσεις δεδομένων GenBank/EMBL/DDBJ. Αναφέρονται τιμές ομαδοποίησης >50% (Bootstrap values >50%). Με κόκκινο χρώμα σημειώνονται οι αλληλουχίες Βακτηρίων από τα δείγματα ιλύος (BacPamv), με πράσινο χρώμα σημειώνονται οι αλληλουχίες Βακτηρίων που προέκυψαν από καλλιέργειες (PamvBac iso) και με μαύρο χρώμα σημειώνονται οι ταυτοποιημένες αλληλουχίες Βακτηρίων (external sequences)





Εικονα 3.3b: Φυλογενετικό δέντρο (Neighbor-Joining tree) με βάση την αντιστοίχιση των βακτηριακών 16S rDNA αλληλουχιών από τα δείγματα ιλύος της λίμνης Παμβώτιδας, με αλληλουχίες γνωστών *Nitrospira* που ανακτήθηκαν από τις βάσεις δεδομένων GenBank/EMBL/DDBJ. Αναφέρονται τιμές ομαδοποίησης >50% (Bootstrap values >50%)



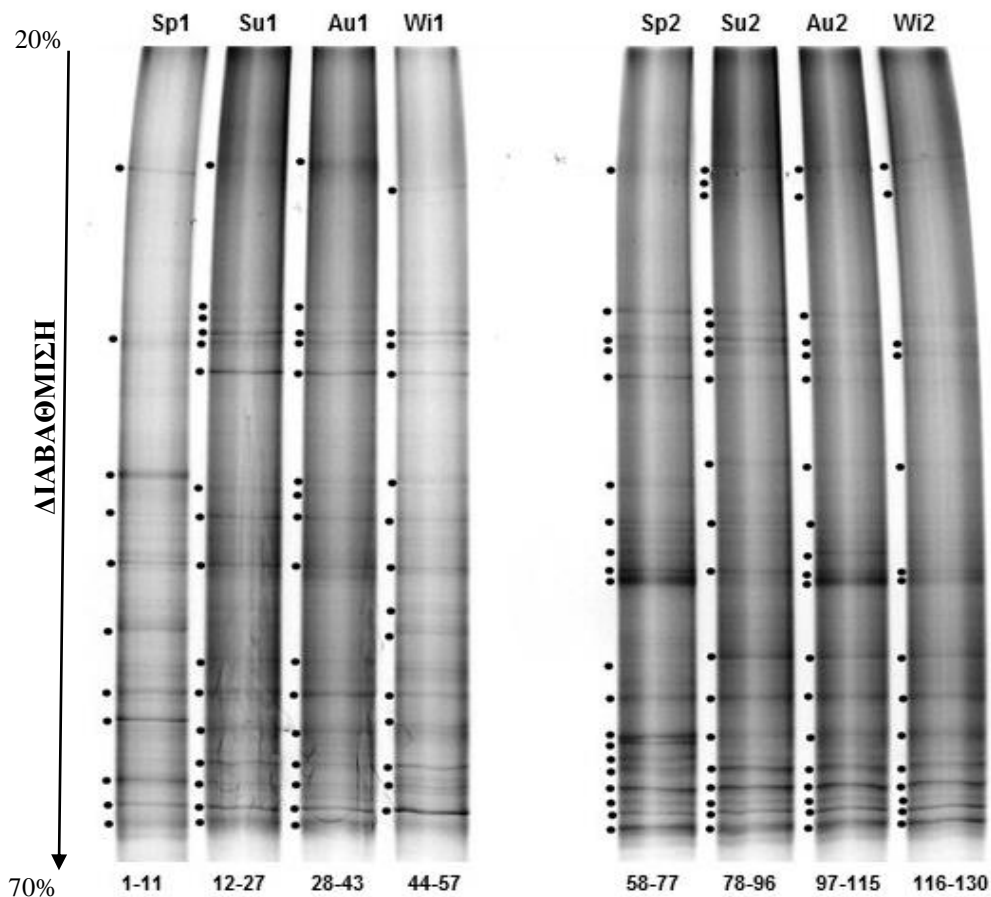
Εικόνα 3.3c: Φυλογενετικό δέντρο (Neighbor-Joining tree) με βάση την αντιστοίχιση των βακτηριακών 16S rDNA αλληλουχιών από τα δείγματα υλούς της λίμνης Παμβώτιδας, με αλληλουχίες γνωστών *Acidobacteria* που ανακτήθηκαν από τις βάσεις δεδομένων GenBank/EMBL/DDBJ. Αναφέρονται τιμές ομαδοποίησης >50% (Bootstrap values >50%)

3.1.3. Ποικιλότητα Αρχαίων στα δείγματα ιλύος

Η ποικιλότητα των Αρχαίων στα δείγματα ιλύος της λίμνης Παμβώτιδας αναδείχθηκε με τη χρήση DGGE στο οποίο αποτυπώνονται τα κυρίαρχα είδη.

Το αποτύπωμα DGGE των κοινοτήτων των Αρχαίων φαίνεται στην **Εικόνα 3.4**.

Στην περίπτωση των Αρχαίων εντοπίστηκαν 130 DGGE ζώνες με το πρότυπο ζώνωσης να εμφανίζει ιδιαίτερη ποικιλομορφία. Οι ζώνες αποκόπηκαν, ενισχύθηκαν ξανά με PCR, κλωνοποιήθηκαν και ελέγχθηκαν τα προφίλ τους μετά από πέψη και ηλεκτροφόρηση όπως και στην περίπτωση των Βακτηρίων (ενότητα 3.1.2.). Συνολικά ανακτήθηκαν 92 διαφορετικές DNA αλληλουχίες Αρχαίων τις οποίες καταθέσαμε στη βάση δεδομένων GenBank και έλαβαν αριθμούς πρόσβασης KC510289-KC510380 (Παράρτημα, Εικόνα 8.2).



Εικόνα 3.4: 16S rDNA DGGE προφίλ Αρχαίων. Όλες οι σημειωμένες ζώνες αποκόπηκαν και χαρακτηρίστηκαν. Διαβάθμιση αποδιατακτικών παραγόντων 20%-70%
Sp:Spring, Su:Summer, Au:Autumn, Wi:Winter, 1:SS1, 2:SS2

Δεκαεννέα (19) από τις 92 αλληλουχίες (20.65%) δεν ταίριαζαν με καμία άλλη εισαγωγή (ομολογία <97%) στη βάση δεδομένων GenBank και 3 από αυτές (3.26%) είχαν εξαιρετικά χαμηλή ομολογία <90%. Όταν συγκρίναμε τις αλληλουχίες Αρχαίων με γνωστά καλλιεργούμενα είδη Αρχαίων, βρήκαμε ότι 88 από αυτές (95.65%) είχαν <97% ομολογία, 32 (34.78%) είχαν <90% ομολογία και 30 (32.61%) είχαν <80% ομολογία (Παράρτημα, Πίνακας 8.6).

3.1.3.1. Φυλογενετική κατάταξη των Αρχαίων από τα δείγματα ιλύος

Οι περισσότερες αλληλουχίες που καταφέραμε να ανακτήσουμε ανήκουν στο φύλο *Euryarchaeota* και μόνο τρεις κατηγοριοποιούνται στο φύλο *Miscellaneous Crenarchaeota* (Εικόνες 3.5,3.6).

Τα μεθανογόνα Αρχαία που κατάγονται από τις τάξεις *Methanomicrobiales*, *Methanocellales* και *Methanosarcinales* ήταν επικρατέστερα στα δείγματά μας.

Μη καλλιεργούμενα είδη Αρχαίων βρέθηκαν σε αφθονία στη λίμνη Παμβώτιδα και ενδιαφέρον προκαλεί ότι η πιο συχνά εμφανιζόμενη ομάδα φυλοτυπικά φαίνεται να είναι μια ομάδα που έχει χαρακτηριστεί σαν “unknown”, “uncharacterized” (Εικόνα 3.6, “unknown cluster I”), (Παράρτημα, Πίνακας 8.7).

Επίσης, ο αριθμός των αλληλουχιών που ανήκουν στο Marine Benthic Group-D (MBG-D) και στο Rice Cluster V (RC-V) είναι συγκρίσιμος με αυτών που ανήκουν στο “unknown cluster I”. Οι εκπρόσωποι της ομάδας RC-V της Παμβώτιδας, σχηματίζουν έναν κλάδο με άλλες αλληλουχίες RC-V από ιζήματα λιμνών [99], ποταμών [100] και ηφαιστειακής λάσπης [101].

Επιπλέον, ανιχνεύσαμε μερικές μοναδικές αλληλουχίες από τα ιζήματα της λίμνης Παμβώτιδας (ArcPamv36, ArcPamv21C, ArcPamv71, ArcPamv3A, ArcPamv67A, ArcPamv3B), οι οποίες παρουσίαζαν πολύ χαμηλές ομολογίες με ήδη γνωστές κατατεθειμένες αλληλουχίες στις βάσεις δεδομένων (Παράρτημα, Πίνακας 8.6). Από τις παραπάνω αλληλουχίες, η ArcPamv3B, κατηγοριοποιήθηκε σαν μέλος της γενετικά ποικιλόμορφης ομάδας Lake Dagow Sediment (LDS) με ομολογία μόλις 89% (Εικόνα 3.6). Αξίζει να σημειωθεί πως το σύμπλεγμα LDS φάνηκε στη δική μας μελέτη να

σχετίζεται περισσότερο με το *Candidatus Parvarchaeum acidiphilum* (ARMAN-4) [102].

Η αλληλουχία ArcPamv76A εμφανίζει αυξημένη ομολογία (97%-99%) με τρεις αλληλουχίες από τις εισαγωγές στις βάσεις δεδομένων. Αυτές οι αλληλουχίες σχηματίζουν έναν μεγάλο κλάδο που χαρακτηρίστηκε πρόσφατα ως “unknown cluster V” (**Εικόνα 3.6**). Οι δυο από τις τρεις αλληλουχίες, CAR-F20 (HE796476.1) και CAR-B14 (HE796161.1), εμφανίζουν 99% ομολογία με τη δική μας ArcPamv76A και απομονώθηκαν από λίμνες σε υψηλό υψόμετρο [103]. Η τρίτη αλληλουχία RNA-C73 (LN864961) εμφανίζει ομολογία 97% με την αλληλουχία ArcPamv76A και απομονώθηκε από θερμική πηγή στην Ουγγαρία (μη δημοσιευμένο). Επιπλέον, αυτό το σπάνιο άγνωστο σύμπλεγμα, φαίνεται να εμφανίζει συσχέτιση με το *Micrarchaeum acidiphilum* (ARMAN-2) [102, 104].

Οι τέσσερις σπάνιες αλληλουχίες μας που ανήκουν στα *Euryarchaeota* (ArcPamv36, ArcPamv21C, ArcPamv71, ArcPamv3A), βρέθηκαν να σχετίζονται με τα *Thermoplasmatales* αλλά δεν ομαδοποιήθηκαν με καμία γνωστή συστοιχία *Thermoplasmatales* όπως είναι οι MGII, RCIII, MBG-D, RC-V ή *Methanoplasmatales* [105]. Παρόλα αυτά οι αλληλουχίες ArcPamv36, ArcPamv21C και ArcPamv3A δημιουργούν μια συστοιχία που σχετίζεται εξελικτικά με τα *Thermoplasmatales* (“unknown” clusters II, III και IV) ενώ η αλληλουχία ArcPamv71 φαίνεται να είναι φυλογενετικά μοναδική (**Εικόνα 3.6**).

Τέλος, μόνο τρεις αλληλουχίες Αρχαίων βρέθηκαν να μη σχετίζονται με τα *Euryarchaeota*. Αυτές οι αλληλουχίες, ArcPamv54, ArcPamv45 και ArcPamv114 ομαδοποιούνται σε τρεις διαφορετικές ομάδες που σχετίζονται μεταξύ τους και έχουν χαρακτηριστεί σαν *Miscellaneous Crenarchaeota* (MCG) [106, 107]. Στην **Εικόνα 3.5** παρουσιάζονται τα συνολικά αποτελέσματα από τις αναλύσεις DGGE, BLAST και τη φυλογενετική ανάλυση.

Ποικιλότητα Αρχαίων στα δείγματα ιλύος της λίμνης Παμβώτιδας σύμφωνα με DGGE and BLAST ανάλυση		Ποικιλότητα Αρχαίων στα δείγματα ιλύος της λίμνης Παμβώτιδας με βάση φυλογενετική ανάλυση	
Ζώνες DGGE	130	Φύλα Αρχαίων	Αριθμός αλληλουχιών
Διαφορετικές αλληλουχίες	92	<i>Methanomicrobiales</i>	55
Αλληλουχίες με ομολογία <97% με εισαγωγές στη GenBank	19	Unknown clusters I-V	15
Αλληλουχίες με ομολογία <90% με εισαγωγές στη GenBank	3	MBG-D	9
Αλληλουχίες με ομολογία <97% με βάση καλλιεργούμενα είδη (GenBank)	88	Rice cluster V	8
Αλληλουχίες με ομολογία <90% με βάση καλλιεργούμενα είδη (GenBank)	32	Miscellaneous <i>Crenarchaeota</i>	3
		LDS	1
		“unclassified”	1

Εικόνα 3.5: Χαρακτηρισμός της κοινότητας των Αρχαίων των ιζημάτων της λίμνης Παμβώτιδας όπως προέκυψε από τις αναλύσεις DGGE, BLAST (αριστερά) και τη φυλογενετική ανάλυση (δεξιά)

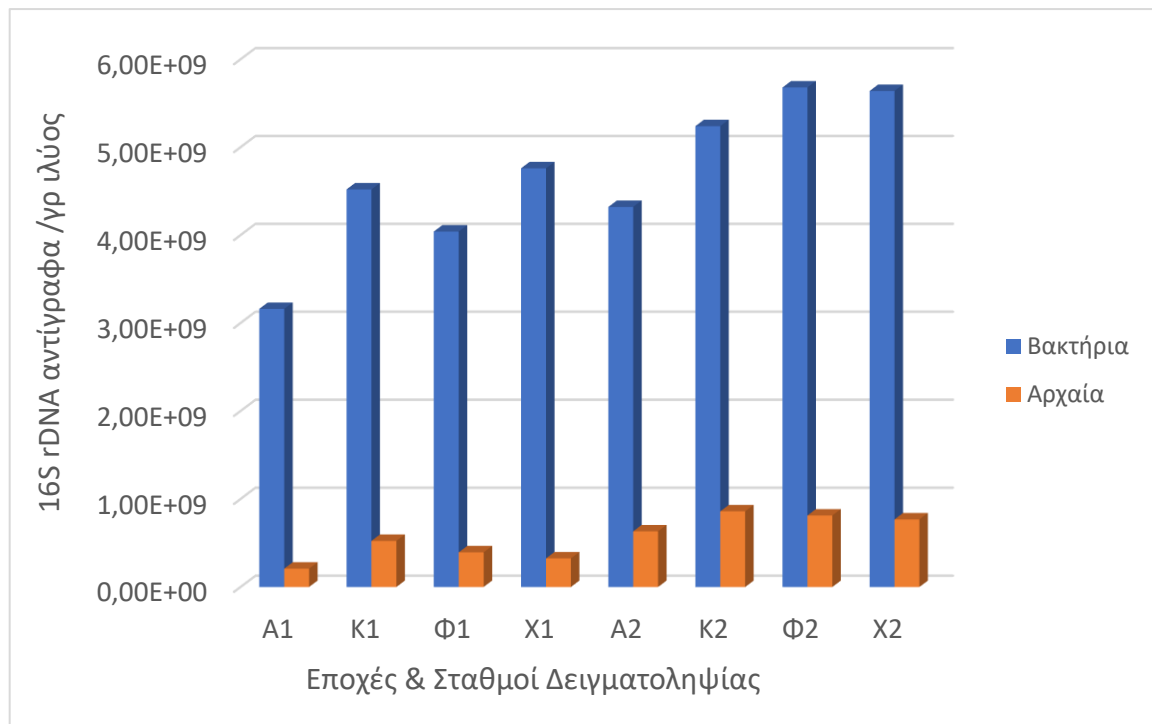
Εικόνα 3.6: Φυλογενετικό δέντρο (Neighbor-Joining tree) με βάση την αντιστοίχιση των 16S rDNA αλληλουχιών των Αρχαίων από τα δείγματα ιλύος της λίμνης Παμβώτιδας, με αλληλουχίες γνωστών ειδών που ανακτήθηκαν από τις βάσεις δεδομένων GenBank/EMBL/DDBJ. Αναφέρονται τιμές ομαδοποίησης >50% (Bootstrap values >50%). Με κόκκινο χρώμα σημειώνονται οι αλληλουχίες Αρχαίων από τα δείγματα ιλύος (ArcPamv) και με μαύρο χρώμα σημειώνονται οι ταυτοποιημένες αλληλουχίες Αρχαίων (external sequences). Τα *Methanomicrobiales* περιλαμβάνουν 55 αλληλουχίες ArcPamv

3.1.4. Προκαρυωτική αφθονία στα δείγματα ιλύος, σύγκριση Βακτηρίων και Αρχαίων

Πραγματοποιήσαμε ποσοτική PCR ανάλυση για να διαπιστώσουμε ποιο ποσοστό της μικροβιακής κοινότητας καταλαμβάνουν τα Βακτήρια και ποιο τα Αρχαία. Με βάση τα αποτελέσματά μας, η προκαρυωτική κοινότητα στα ιζήματα της λίμνης Παμβώτιδας απαρτίζεται κυρίως από Βακτήρια. Τα Αρχαία αποτελούν το 6.17% έως 14.09% του συνολικού αριθμού αντιγράφων 16S rDNA (**Πίνακας 3.1**). Σύμφωνα με τον μέσο όρο του αριθμού των αντιγράφων 16S rDNA στο γονιδίωμα των Βακτηρίων και των Αρχαίων που υπολογίζεται σε 3.8 και 2 αντίστοιχα [108], μπορούμε να υπολογίσουμε κατ'εκτίμηση ότι τα Αρχαία αντιπροσωπεύουν το 11.13% έως 23.88% του συνολικού αριθμού των προκαρυωτικών κυττάρων στη λίμνη Παμβώτιδα (**Πίνακας 3.1**).

	16S rDNA αντίγραφα Βακτηρίων/γρ ιλύος	16S rDNA αντίγραφα Αρχαίων/γρ ιλύος	% 16S rDNA αντίγραφα Αρχαίων	Εκτιμώμενος αριθμός κυττάρων Βακτηρίων/γρ ιλύος	Εκτιμώμενος αριθμός κυττάρων Αρχαίων/γρ ιλύος	% αριθμός κυττάρων Αρχαίων
SS1 Ανοιξη	3.16 ± 0.29 x 10 ⁹	2.08 ± 0.21 x 10 ⁸	6.17%	0.83 x 10 ⁹	1.04 x 10 ⁸	11.13%
SS1 Καλοκαίρι	4.52 ± 0.24 x 10 ⁹	5.24 ± 0.18 x 10 ⁸	10.38%	1.18 x 10 ⁹	2.62 x 10 ⁸	18.16%
SS1 Φθινόπωρο	4.04 ± 0.22 x 10 ⁹	3.94 ± 0.23 x 10 ⁸	8.88%	1.06 x 10 ⁹	1.97 x 10 ⁸	15.30%
SS1 Χειμώνας	4.76 ± 0.26 x 10 ⁹	3.25 ± 0.20 x 10 ⁸	6.39%	1.25 x 10 ⁹	1.62 x 10 ⁸	11.47%
SS2 Ανοιξη	4.32 ± 0.21 x 10 ⁹	6.32 ± 0.19 x 10 ⁸	12.76%	1.13 x 10 ⁹	3.16 x 10 ⁸	21.85%
SS2 Καλοκαίρι	5.24 ± 0.23 x 10 ⁹	8.60 ± 0.24 x 10 ⁸	14.09%	1.37 x 10 ⁹	4.30 x 10 ⁸	23.88%
SS2 Φθινόπωρο	5.68 ± 0.28 x 10 ⁹	8.12 ± 0.26 x 10 ⁸	12.54%	1.49 x 10 ⁹	4.06 x 10 ⁸	21.41%
SS2 Χειμώνας	5.64 ± 0.27 x 10 ⁹	7.68 ± 0.22 x 10 ⁸	11.98%	1.48 x 10 ⁹	3.84 x 10 ⁸	20.96%

Πίνακας 3.1: Ποσοτικοποίηση των αντιγράφων 16SrDNA των Βακτηρίων και Αρχαίων στα ζήματα της λίμνης Παμβώτιδας και εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων του κάθε προκαρυωτικού βασιλείου. SS1: Σταθμός Δειγματοληψίας 1, SS2: Σταθμός Δειγματοληψίας 2



Εικόνα 3.7: Συνολική απεικόνιση των αντιγράφων 16S rDNA των Βακτηρίων και των Αρχαίων όπως προέκυψαν από την ποσοτικοποίηση με qPCR. Α:Άνοιξη, Κ:Καλοκαίρι, Φ:Φθινόπωρο, Χ:Χειμώνας, 1: Σταθμός δειγματοληψίας 1, 2: Σταθμός δειγματοληψίας 2

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, στο σταθμό δειγματοληψίας 2 εμφανίζονται υψηλότερες αφθονίες τόσο Βακτηρίων όσο και Αρχαίων. Η άνοιξη είναι η περίοδος όπου τα Βακτήρια και Αρχαία εμφανίζονται σε χαμηλότερα επίπεδα, ενώ οι υψηλότερες τιμές αφθονίας εμφανίζονται το καλοκαίρι (**Πίνακας 3.1, Εικόνα 3.7**).

3.1.5. Σχέσεις μεταξύ φυσικοχημικών παραμέτρων, αφθονίας και ποικιλότητας Βακτηρίων και Αρχαίων στα δείγματα ιλύος

Πραγματοποιήσαμε ανάλυση συσχέτισης (correlation analysis) στα δεδομένα μας με σκοπό να καταλάβουμε ποιες φυσικοχημικές παράμετροι έχουν τη μεγαλύτερη επίδραση στον αριθμό των προκαρυωτικών κυττάρων στις μικροβιακές κοινότητες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.2**.

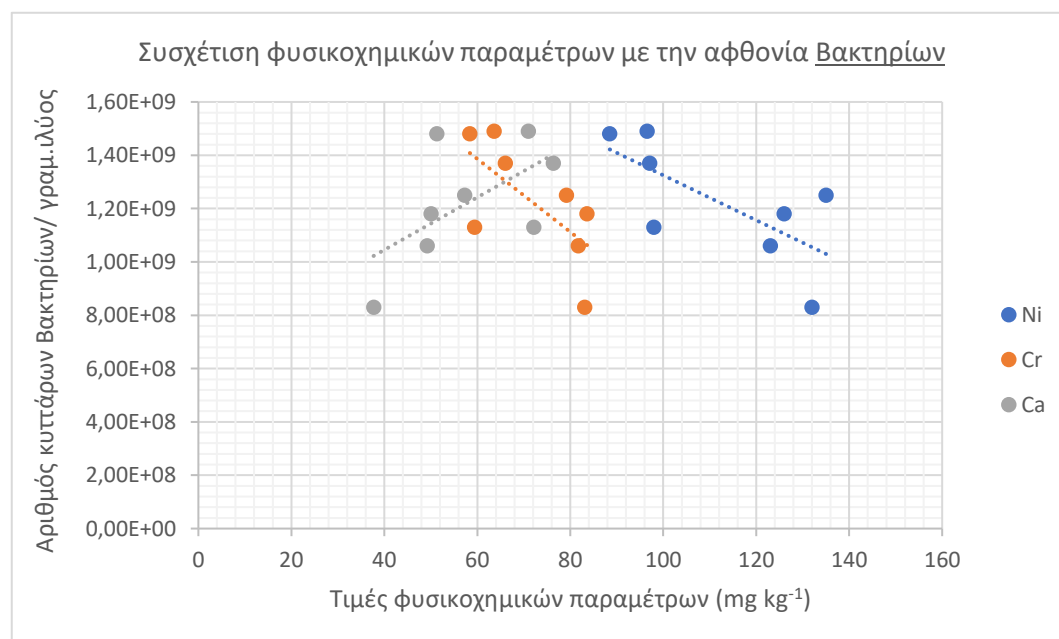
Η κυριότερη αρνητική συσχέτιση μεταξύ αφθονίας Βακτηρίων και φυσικοχημικών παραμέτρων παρατηρήθηκε για το Ni και το Cr, ενώ η κυριότερη θετική συσχέτιση

παρατηρήθηκε για το TKN και το Ca^{2+} . Όσον αφορά την αφθονία των Αρχαίων η κυριότερη αρνητική συσχέτιση με τις φυσικοχημικές παραμέτρους φαίνεται να είναι για τα pH, Ni και Cr, ενώ η κυριότερη θετική για τα Ca^{2+} και As.

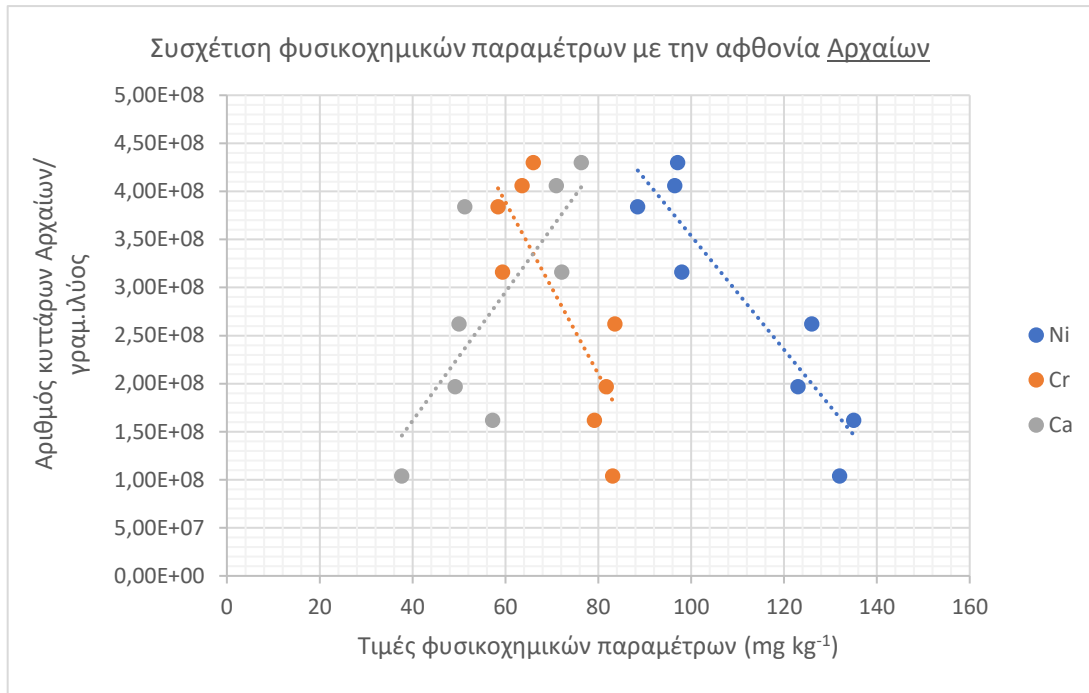
	Βακτήρια	Αρχαία
Depth	0.29	0.34
T	-0.34	0.07
pH	-0.57	-0.85
TC	0.12	0.55
TOC	0.27	0.65
TP	0.44	0.01
TKN	0.61	0.54
Na	-0.02	0.39
K	0.56	0.54
Ca	0.58	0.75
Mg	0.54	0.64
Cl	0.16	0.59
SO ₄	0.46	0.43
Sb	-0.53	-0.61
Ni	-0.69	-0.91
Hg	-0.32	0.07
Mn	-0.02	-0.08
Fe	-0.46	-0.52
Cu	0.40	0.19
Cr	-0.66	-0.81
Zn	0.20	0.09
As	0.55	0.80

Πίνακας 3.2: Αποτελέσματα από τις αναλύσεις συσχέτισης (correlation analysis) μεταξύ βιολογικών και φυσικοχημικών παραμέτρων στα ιζήματα της λίμνης Παμβώτιδας. (Τα αποτελέσματα από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων ύλως συσχετίστηκαν με τον αριθμό κυττάρων Βακτηρίων και Αρχαίων ανά γραμμάριο ιζήματος)

Η κίτρινη υπογράμμιση υποδεικνύει συσχέτιση στατιστικώς σημαντική ($p < 0.05$), ενώ η κόκκινη υπογράμμιση τις πιο σημαντικές συσχετίσεις ($p < 0.001$). Το αρνητικό πρόσημο παραπέμπει σε αρνητική συσχέτιση (αυτές οι μεταβλητές δεν ευνοούν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών).



A



B

Εικόνες 3.8 A,B: Διαγραμματική απεικόνιση της συσχέτισης Ni, Cr, Ca με την αφθονία βακτηριακών κυττάρων και κυττάρων Αρχαίων ανά γραμμάριο ιζήματος. Οι τιμές των παραμέτρων Ni, Cr, Ca παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.1 (Παράρτημα, Πίνακας 8.1). Οι τιμές όλων των παραμέτρων αναφέρονται στους δυο σταθμούς δειγματοληψίας όλες τις εποχές του έτους

Στην περίπτωση των θρεπτικών υλικών, το TKN σχετίζεται θετικά τόσο με τα Βακτήρια όσο και με τα Αρχαία. Αυτή η επίδραση είναι πιο έντονη στα Βακτήρια ενώ τα Αρχαία φαίνεται να επηρεάζονται περισσότερο από το TOC.

Σχετικά με τα βαρέα μέταλλα, το αρσενικό (As) φαίνεται να έχει πολύ θετική επίδραση στην αφθονία των Αρχαίων και λιγότερο στην αφθονία των Βακτηρίων. Σε αντίθεση με το As, το Ni και το Cr φαίνεται να επιδρούν αρνητικά στην αφθονία Βακτηρίων και Αρχαίων και η επίδραση είναι μεγαλύτερη στα Αρχαία. Τέλος, το pH έχει αρνητική επίδραση στις αφθονίες των Βακτηρίων και των Αρχαίων και μάλιστα φαίνεται να επηρεάζει περισσότερο τα Αρχαία (**Πίνακας 3.2**).

3.2. Ποικιλότητα Βακτηρίων στο νερό της λίμνης Παμβώτιδας-Μοριακή χαρτογράφηση Βακτηρίων

3.2.1. Φυσικοχημικές μετρήσεις δειγμάτων νερού

Πραγματοποιήσαμε φυσικοχημικές μετρήσεις σε δείγματα νερού της λίμνης Παμβώτιδας από τους δυο σταθμούς δειγματοληψίας (SS1,SS2), κατά τις τέσσερις εποχές του έτους καθώς και από την επιφάνεια και τον πυθμένα της λίμνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.2 (Παράρτημα, Πίνακας 8.2)

Σύμφωνα με τις μετρήσεις των φυσικοχημικών παραμέτρων του νερού, παρατηρούμε αρκετά χαμηλές τιμές διαλυμένου οξυγόνου το καλοκαίρι και ειδικότερα στον πυθμένα του SS2.

Υψηλότερες τιμές αμμωνίου συναντούμε το φθινόπωρο και σε γενικές γραμμές ο πυθμένας των σταθμών εμφανίζει μεγαλύτερες τιμές NH_4^+ σε σχέση με την επιφάνεια. Οι συγκεντρώσεις των νιτρικών δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των σταθμών και των εποχών δειγματοληψίας ενώ υψηλότερες τιμές νιτρικών έχουμε το καλοκαίρι και χαμηλότερες την άνοιξη.

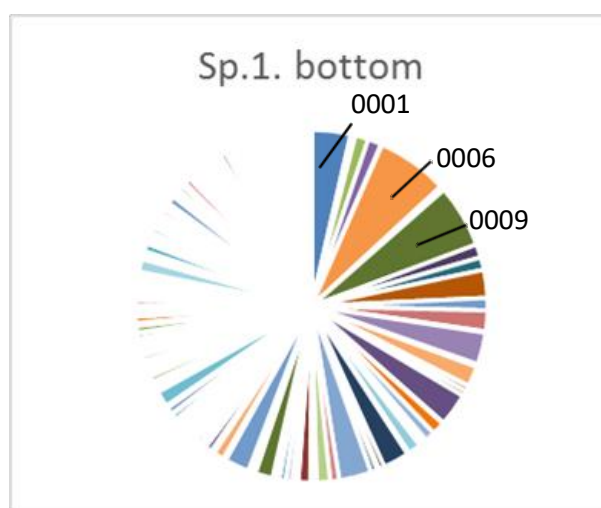
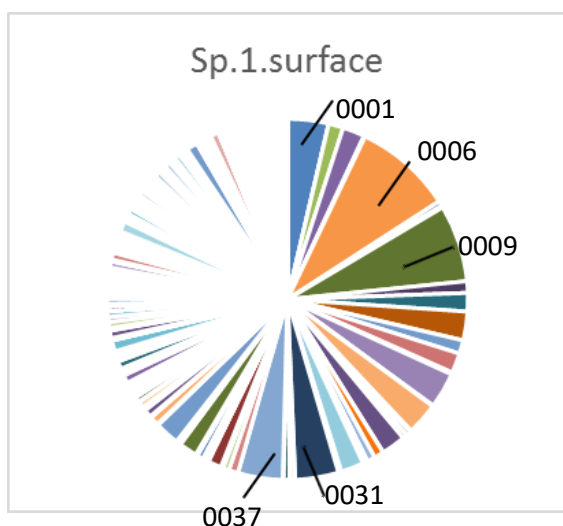
Στην περίπτωση του ολικού φωσφόρου μεγαλύτερες τιμές παρατηρούνται κατά τους καλοκαιρινούς μήνες χωρίς οι τιμές να υπερβαίνουν το ανώτατο όριο (11.46 mg/L).

3.2.2. Βακτηριακή ποικιλότητα στα δείγματα νερού

Σε DNA από δείγματα νερού επιφάνειας και πυθμένα από τη λίμνη Παμβώτιδα, από τις τέσσερις εποχές του χρόνου και από τους δυο σταθμούς δειγματοληψίας πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS). Στα δείγματα αυτά θέλαμε να ανιχνεύσουμε αλληλουχίες rDNA Βακτηρίων. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης περιλάμβαναν 2134 OTUs (16S rDNA γενότυποι) Βακτηρίων με μέγεθος περίπου 292bp, επεξεργασμένα με BLASTn όπου αναφέρονται τα ποσοστά ομοιότητας με ήδη γνωστές αλληλουχίες αλλά και η ταξινομική ομάδα κάθε αλληλουχίας. Μετά τη σχηματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων, αναφέρουμε και αναλύουμε ποσοστά βακτηριακών OTUs σε κάθε δείγμα τα οποία ήταν μεγαλύτερα από 4%. Στα διαγράμματα απεικονίζεται και η αντιστοίχιση των χρωμάτων με τα OTUs που εμφάνισαν τα μεγαλύτερα ποσοστά.

- Άνοιξη, Σταθμός 1, επιφάνεια (Sp.1. surface)

Ομάδα	Ομολογία (%)	Φύλο	Οικογένεια/Γένος	Αφθονία OTUs (%)
Otu0006	99,6575	Cyanobacteria	Synechococcus	9
Otu0009	98,6348	Actinobacteria	CL500-29 marine group	7
Otu0001	97,9452	Planctomycetes	uncultured	4
Otu0031	98,2935	Proteobacteria	A0839	4
Otu0037	99,3151	Proteobacteria	LD12 freshwater group	4

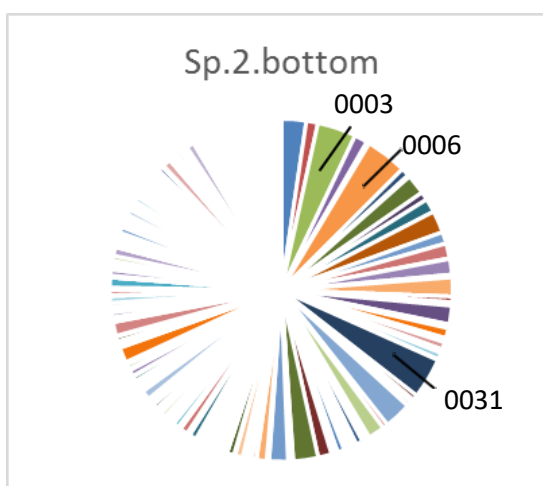
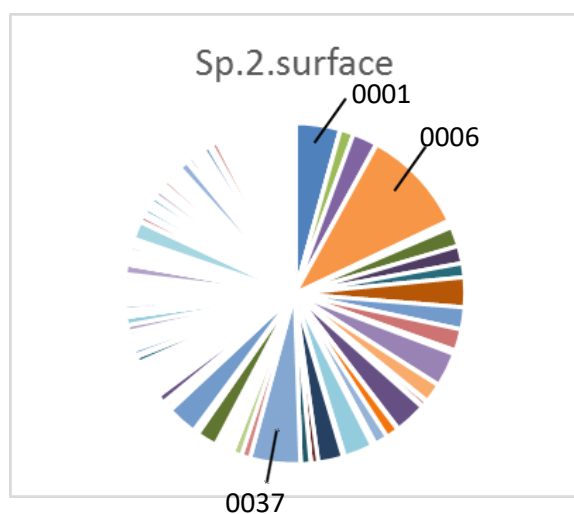


- Άνοιξη, Σταθμός 1, πυθμένας (Sp.1. bottom)

Ομάδα	Ομολογία (%)	Φύλο	Γένος	Αφθονία OTUs (%)
Otu0006	99,6575	Cyanobacteria	Synechococcus	7
Otu0009	98,6348	Actinobacteria	CL500-29 marine group	6
Otu0001	97,9452	Planctomycetes	uncultured	4

- Άνοιξη, Σταθμός 2, επιφάνεια (Sp.2. surface)

Ομάδα	Ομολογία (%)	Φύλο	Οικογένεια/Γένος	Αφθονία OTUs (%)
Otu0006	99,6575	Cyanobacteria	Synechococcus	10
Otu0037	99,3151	Proteobacteria	LD12 freshwater group	5
Otu0001	97,9452	Planctomycetes	uncultured	4



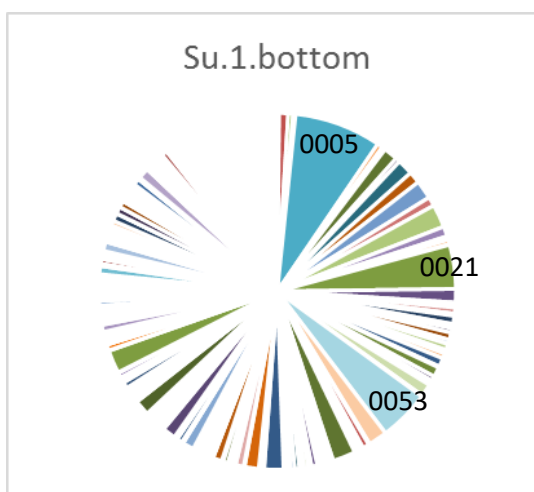
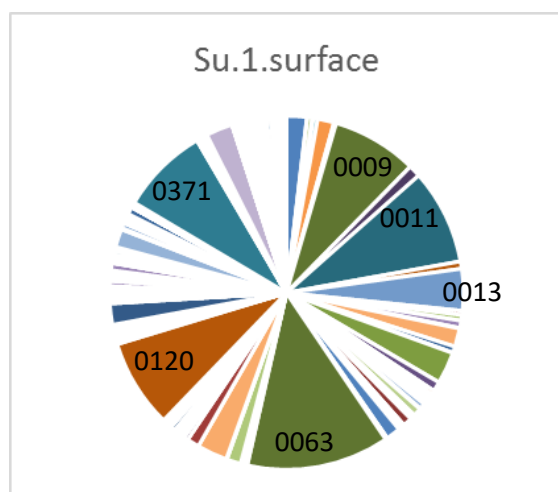
- Άνοιξη, Σταθμός 2, πυθμένας (Sp.2. bottom)

Ομάδα	Ομολογία (%)	Φύλο	Οικογένεια/Γένος	Αφθονία OTUs (%)
Otu0003	99,6575	Actinobacteria	uncultured	4
Otu0006	99,6575	Cyanobacteria	Synechococcus	4
Otu0031	98,2935	Proteobacteria	A0839	4

Σύμφωνα με αποτελέσματά μας, το Otu0006 φαίνεται να κυριαρχεί την άνοιξη στο νερό της λίμνης Παμβώτιδας και σε μεγαλύτερο ποσοστό στην επιφάνεια. Το Otu0006 αντιπροσωπεύει κυανοβακτήρια του γένους *Synechococcus* με υψηλή ομολογία με άλλες παρόμοιες αλληλουχίες. Τα *Proteobacteria* της άνοιξης ανήκουν στην κλάση των α -*Proteobacteria*.

- Καλοκαίρι, Σταθμός 1, επιφάνεια (Su.1.surface)

Ομάδα	Ομολογία (%)	Φύλο	Γένος	Αφθονία OTUs (%)
Otu0063	97,2603	Proteobacteria	Rubellimicrobium	13
Otu0011	94,863	Planctomycetes	Pirellula	9
Otu0009	98,6348	Actinobacteria	CL500-29 marine group	8
Otu0120	96,2329	Planctomycetes	Pirellula	8
Otu0371	93,1741	Cyanobacteria	Planktothrix	8
Otu0013	95,8904	Proteobacteria	Acidibacter	4

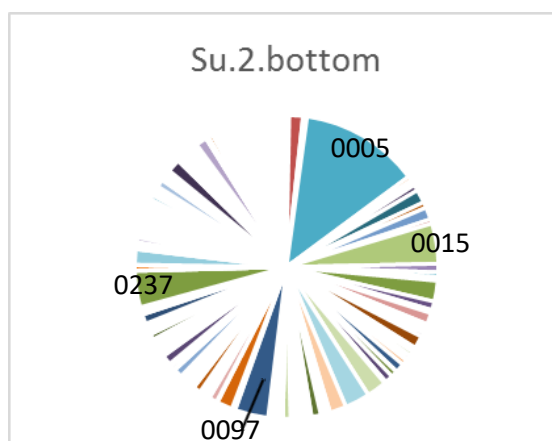
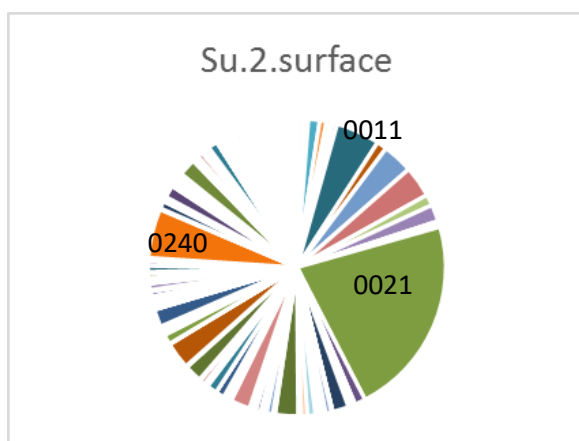


- Καλοκαίρι, Σταθμός 1, πυθμένας (Su.1.bottom)

Ομάδα	Ομολογία (%)	Φύλο	Γένος	Αφθονία OTUs (%)
Otu0005	98,9726	Proteobacteria	Methylomonas	8
Otu0053	93,8567	Proteobacteria	Methylocaldum	5
Otu0021	99,3151	Cyanobacteria	Microcystis	4

- Καλοκαίρι, Σταθμός 2, επιφάνεια (Su.2.surface)

Ομάδα	Ομολογία (%)	Φύλο	Γένος	Αφθονία OTUs (%)
Otu0021	99,3151	Cyanobacteria	Microcystis	22
Otu0240	98,9726	Cyanobacteria	Pseudanabaena	5
Otu0011	94,863	Planctomycetes	Pirellula	5



- Καλοκαίρι, Σταθμός 2, πυθμένας (Su.2.bottom)

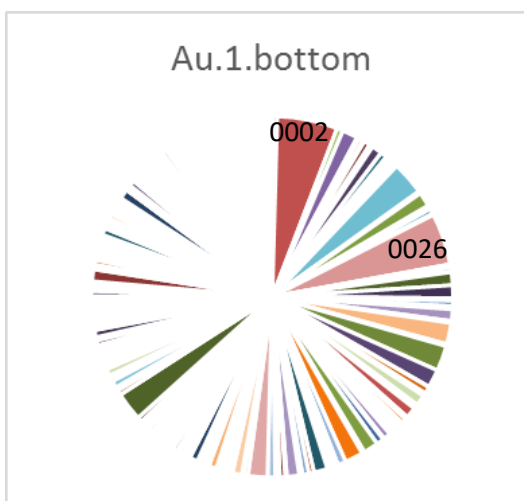
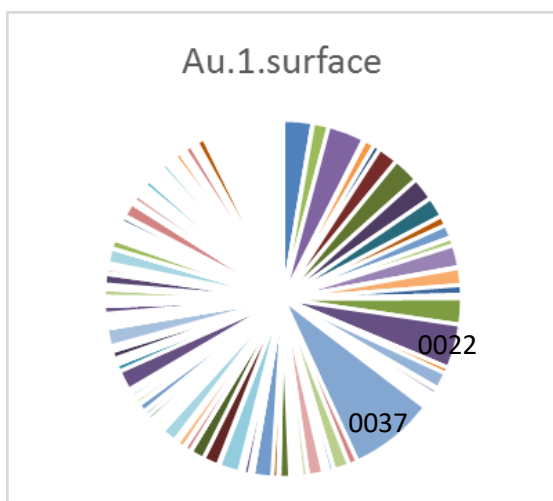
Ομάδα	Ομολογία (%)	Φύλο	Γένος	Αφθονία OTUs (%)
Otu0005	98,9726	Proteobacteria	Methylomonas	13
Otu0015	99,3151	Proteobacteria	Limnohabitans	4
Otu0097	96,9178	Proteobacteria	uncultured	4
Otu0237	99,3151	Proteobacteria	uncultured	4

Το καλοκαίρι στο νερό του πυθμένα της λίμνης Παμβώτιδας φαίνεται να κυριαρχεί το Otu0005 στο οποίο ανήκουν *Proteobacteria* του γένους *Methylomonas* με υψηλή ομολογία (98%) με άλλες γνωστές αλληλουχίες. Στην επιφάνεια των δυο σταθμών το κοινό Otu είναι το 0011 στο οποίο ανήκουν *Planctomycetes* με χαμηλό ποσοστό ομολογίας (94,8%). Στην επιφάνεια του σταθμού1 κυριαρχούν τα *Proteobacteria* (α -*Proteobacteria* 13%, γ -*Proteobacteria* 4%), ενώ αντίστοιχα στον σταθμό 2 κυριαρχούν τα κυανοβακτήρια (*Microcystis*) με ποσοστό 22%. Επίσης, ο πυθμένας του σταθμού 2

φαίνεται να απαρτίζεται κυρίως από *Proteobacteria* (γ -*Proteobacteria* 13%, β -*Proteobacteria* 12%).

- Φθινόπωρο, Σταθμός 1, επιφάνεια (Au.1.surface)

Ομάδα	Ομολογία (%)	Φύλο	Οικογένεια/Γένος	Αφθονία OTUs (%)
Otu0037	99,3151	Proteobacteria	LD12 freshwater group	8
Otu0022	99,3151	Actinobacteria	hgcI clade	4

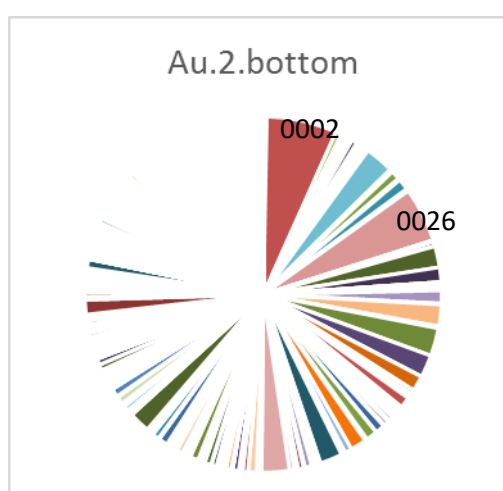
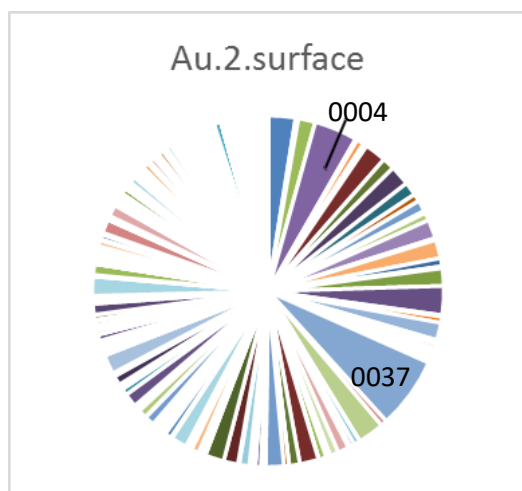


- Φθινόπωρο, Σταθμός 1, πυθμένας (Au.1.1bottom)

Ομάδα	Ομολογία (%)	Φύλο	Τάξη/Γένος	Αφθονία OTUs (%)
Otu0002	92,4658	Proteobacteria	uncultured	5
Otu0026	94,1781	Proteobacteria	SZB30	5

- Φθινόπωρο, Σταθμός 2, επιφάνεια (Au.2.surface)

Ομάδα	Ομολογία (%)	Φύλο	Οικογένεια/Γένος	Αφθονία OTUs (%)
Otu0037	99,3151	Proteobacteria	LD12 freshwater group	7
Otu0004	98,9726	Proteobacteria	Limnohabitans	4



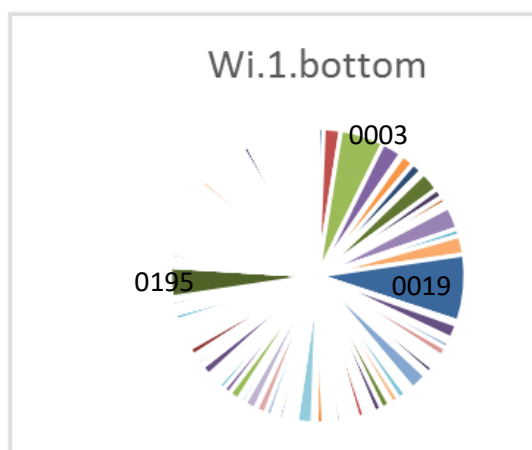
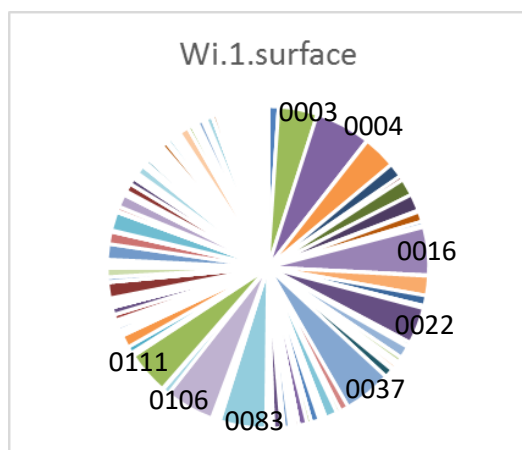
- Φθινόπωρο, Σταθμός 2, πυθμένας (Au.2.1bottom)

Ομάδα	Ομολογία (%)	Φύλο	Τάξη/Γένος	Αφθονία OTUs (%)
Otu0002	92,4658	Proteobacteria	uncultured	6
Otu0026	94,1781	Proteobacteria	SZB30	5

Το φθινόπωρο στον πυθμένα της λίμνης βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό τα Otu0002 και Otu0026 στα οποία ανήκουν *Proteobacteria*, δ - και γ - αντίστοιχα, με αρκετά χαμηλά ποσοστά ομολογίας με άλλα γνωστά μέλη του ίδιου φύλου. Από την άλλη μεριά, στο νερό της επιφάνειας επικρατεί το Otu0037 στο οποίο ανήκουν α -*Proteobacteria*. Από τα παραπάνω αποτελέσματα διαπιστώνουμε ότι το φθινόπωρο σε όλο τον όγκο νερού της λίμνης κυριαρχούν τα *Proteobacteria* και μάλιστα υπάρχουν αντιπρόσωποι από όλες τις κλάσεις (α -, β -, γ -, δ - *Proteobacteria*).

- Χειμώνας, Σταθμός 1, επιφάνεια (Wi.1.surface)

Ομάδα	Ομολογία (%)	Φύλο	Οικογένεια/Γένος	Αφθονία OTUs (%)
Otu0004	98,9726	Proteobacteria	Limnohabitans	6
Otu0016	98,9761	Actinobacteria	hgcI clade	5
Otu0037	99,3151	Proteobacteria	LD12 freshwater group	5
Otu0083	94,8805	Planctomycetes	uncultured	5
Otu0106	87,0307	Unclassified bacterium		5
Otu0003	99,6575	Actinobacteria	uncultured	4
Otu0022	99,3151	Actinobacteria	hgcI clade	4
Otu0111	85,274	Unclassified bacterium		4

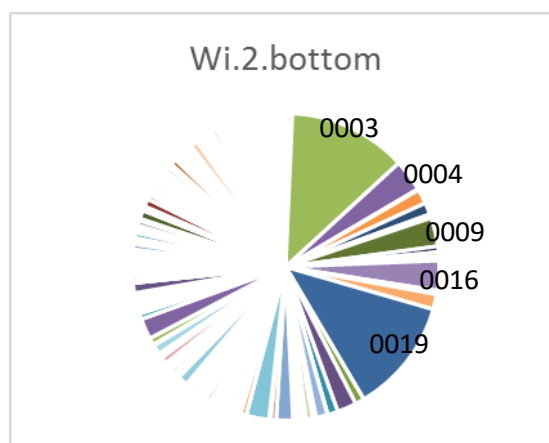
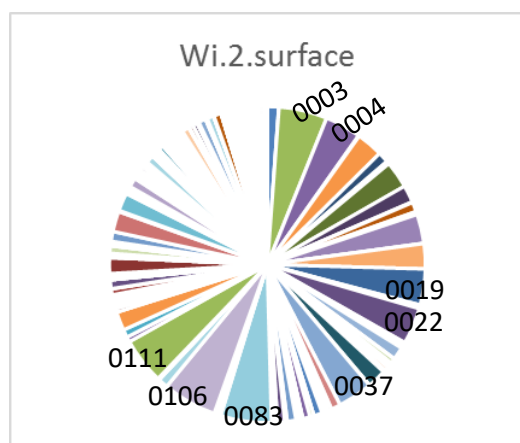


- Χειμώνας, Σταθμός 1, πυθμένας (Wi.1.bottom)

Ομάδα	Ομολογία (%)	Φύλο	Τάξη/Γένος	Αφθονία OTUs (%)
Otu0019	95,8904	Unclassified bacterium		7
Otu0003	99,6575	Actinobacteria	uncultured	5
Otu0195	94,5392	Chloreflexi	Anaerolineae	3

- Χειμώνας, Σταθμός 2, επιφάνεια (Wi.2.surface)

Ομάδα	Ομολογία (%)	Φύλο	Οικογένεια/Γένος	Αφθονία OTUs (%)
Otu0106	87,0307	Unclassified bacterium		6
Otu0111	85,274	Unclassified bacterium		5
Otu0003	99,6575	Actinobacteria	uncultured	5
Otu0083	94,8805	Planctomycetes	uncultured	5
Otu0004	98,9726	Proteobacteria	Limnohabitans	4
Otu0019	95,8904	Unclassified bacterium		4
Otu0022	99,3151	Actinobacteria	hgcI clade	4
Otu0037	99,3151	Proteobacteria	LD12 freshwater group	4

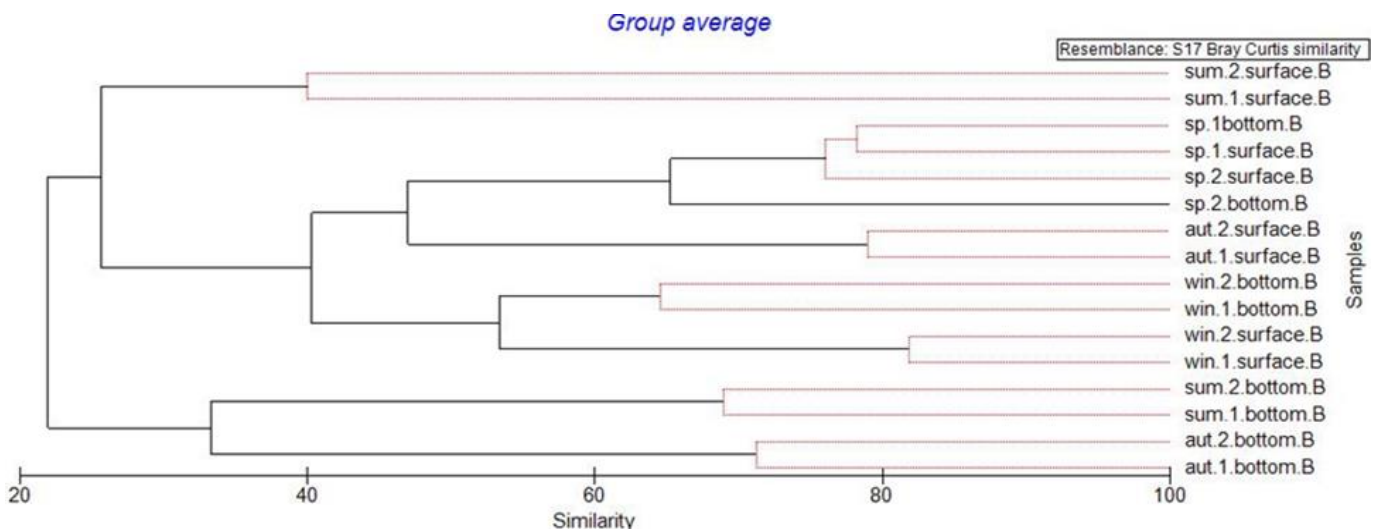


- Χειμώνας, Σταθμός 2, πυθμένας (Wi.2.bottom)

Ομάδα	Ομολογία (%)	Φύλο	Τάξη/Γένος	Αφθονία OTUs (%)
Otu0003	99,6575	Actinobacteria	uncultured	12
Otu0019	95,8904	Unclassified bacterium		12
Otu0004	98,9726	Proteobacteria	Limnohabitans	3
Otu0009	98,6348	Actinobacteria	CL500-29 marine group	3
Otu0016	98,9761	Actinobacteria	hgcI clade	3

Η επιφάνεια της λίμνης Παμβώτιδας στους δυο σταθμούς δειγματοληψίας το χειμώνα, είναι σχεδόν όμοια και απαρτίζεται κυρίως από *Proteobacteria* (α - β -), *Planctomycetes* και *Actinobacteria* και υπάρχει ένα σημαντικό ποσοστό “unclassified” Βακτηρίων. Στον πυθμένα, ανιχνεύτηκαν κυρίως *Actinobacteria* και “unclassified” Βακτήρια, ενώ σε ποσοστά <3% ανιχνεύονται στον σταθμό 1 Βακτήρια του φύλου *Chloroflexi* με χαμηλή ομοιότητα με γνωστούς αντιπροσώπους του φύλου (94%).

Σύμφωνα με το διάγραμμα ομοιότητας, που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.9**, το οποίο δημιουργήθηκε με βάση τις αλληλουχίες των Βακτηρίων που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα νερού της λίμνης Παμβώτιδας, φαίνεται ότι σχηματίζονται δυο μεγάλες ομάδες που αντιστοιχούν στην άνοιξη και τον χειμώνα. Οι δυο σταθμοί δειγματοληψίας ομαδοποιούνται με τα σημεία δειγματοληψίας και μοιάζουν κατά 70% περίπου- με βάση την ποικιλότητα των Βακτηρίων- την άνοιξη και αντίστοιχα τον χειμώνα έχουν ομοιότητα περίπου 50%. Αντίθετα, η ποικιλότητα των Βακτηρίων είναι πολύ διαφορετική το καλοκαίρι και το φθινόπωρο μεταξύ επιφάνειας και πυθμένα, ενώ ο σταθμός 1 και ο σταθμός 2 έχουν μεγάλο βαθμό ομοιότητας.



Εικόνα 3.9: Διάγραμμα ομοιότητας, ως προς τη σύσταση και αφθονία των OTUs, μεταξύ των διαφορετικών θέσεων δειγματοληψίας και μεταξύ των διαφορετικών εποχών. (Ανάλυση Bray-Curtis). Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι στατιστικώς σημαντικές σχέσεις (simpruf test) [109]. sp: Άνοιξη (spring), sum: Καλοκαίρι (summer), aut: Φθινόπωρο (autumn), win: Χειμώνας (winter), 1: Σταθμός δειγματοληψίας 1, 2: Σταθμός δειγματοληψίας 2, surface: νερό από την επιφάνεια, bottom: νερό από τον πυθμένα

3.2.3. Προκαρυωτική αφθονία στα δείγματα νερού, σύγκριση Βακτηρίων και Αρχαίων

Όπως στα δείγματα ιλύος, έτσι και στην περίπτωση των δειγμάτων νερού η προκαρυωτική αφθονία προσδιορίστηκε με ανάλυση qPCR. Το νερό (επιφάνεια και πυθμένας) της λίμνης Παμβώτιδας απαρτίζεται κυρίως από Βακτήρια. Τα Αρχαία καταλαμβάνουν ένα μικρό ποσοστό της μικροβιακής κοινότητας (0.14% - 9.77%) με τη μεγαλύτερη τιμή να σημειώνεται στον πυθμένα του SS2 το φθινόπωρο. Σύμφωνα με τα παρακάτω αποτελέσματα (Πίνακας 3.3) το ποσοστό αντιγράφων 16S rDNA των Αρχαίων είναι μεγαλύτερο στο νερό του πυθμένα των σταθμών συγκριτικά με το επιφανειακό νερό.

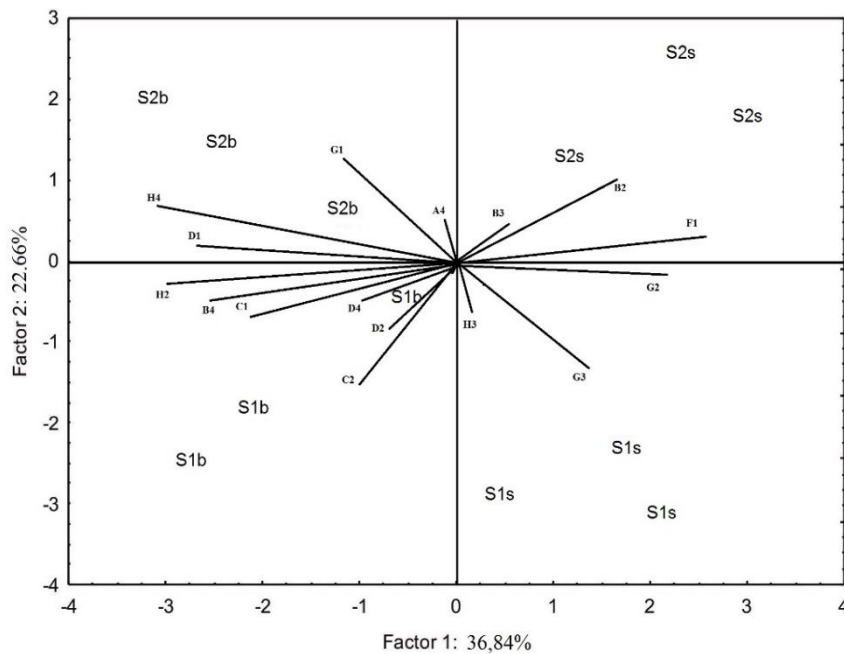
	16S rDNA αντίγραφα Βακτηρίων/ml νερού	16S rDNA αντίγραφα Αρχαίων/ml νερού	% 16S rDNA αντίγραφα Αρχαίων	Εκτιμώμενος αριθμός κυττάρων Βακτηρίων/ml νερού	Εκτιμώμενος αριθμός κυττάρων Αρχαίων/ml νερού	% αριθμός κυττάρων Αρχαίων
A1 επιφάνεια	$6.61 \pm 0.22 \times 10^7$	$6.13 \pm 0.28 \times 10^4$	0.09%	$1.74 \pm 0.06 \times 10^7$	$3.06 \pm 0.14 \times 10^4$	0.17%
A1 πυθμένας	$6.49 \pm 0.24 \times 10^7$	$2.84 \pm 0.26 \times 10^5$	0.43%	$1.70 \pm 0.07 \times 10^7$	$1.42 \pm 0.13 \times 10^5$	0.83%
K1 επιφάνεια	$9.96 \pm 0.24 \times 10^6$	$3.59 \pm 0.18 \times 10^4$	0.33%	$2.62 \pm 0.06 \times 10^6$	$1.79 \pm 0.09 \times 10^4$	0.68%
K1 πυθμένας	$4.61 \pm 0.21 \times 10^7$	$4.83 \pm 0.20 \times 10^5$	1.04%	$1.21 \pm 0.05 \times 10^7$	$2.33 \pm 0.10 \times 10^5$	1.89%
Φ1 επιφάνεια	$1.98 \pm 0.22 \times 10^7$	$9.33 \pm 0.23 \times 10^4$	0.47%	$0.52 \pm 0.06 \times 10^7$	$4.66 \pm 0.11 \times 10^4$	0.88%
Φ1 πυθμένας	$8.96 \pm 0.19 \times 10^7$	$2.99 \pm 0.22 \times 10^6$	3.23%	$2.35 \pm 0.05 \times 10^7$	$1.49 \pm 0.11 \times 10^6$	5.96%
X1 επιφάνεια	$2.88 \pm 0.20 \times 10^7$	$5.93 \pm 0.19 \times 10^4$	0.20%	$0.75 \pm 0.05 \times 10^7$	$2.96 \pm 0.09 \times 10^4$	0.39%
X1 πυθμένας	$3.46 \pm 0.22 \times 10^6$	$5.84 \pm 0.21 \times 10^4$	1.66%	$0.91 \pm 0.06 \times 10^6$	$2.91 \pm 0.10 \times 10^4$	3.10%
A2 επιφάνεια	$5.73 \pm 0.22 \times 10^7$	$7.52 \pm 0.25 \times 10^4$	0.13%	$1.50 \pm 0.05 \times 10^7$	$3.75 \pm 0.12 \times 10^4$	0.25%
A2 πυθμένας	$6.55 \pm 0.23 \times 10^7$	$6.71 \pm 0.21 \times 10^5$	1.01%	$1.72 \pm 0.06 \times 10^7$	$3.35 \pm 0.10 \times 10^5$	1.91%
K2 επιφάνεια	$3.64 \pm 0.25 \times 10^7$	$2.72 \pm 0.26 \times 10^4$	0.07%	$0.95 \pm 0.07 \times 10^7$	$1.36 \pm 0.13 \times 10^4$	0.14%
K2 πυθμένας	$3.28 \pm 0.22 \times 10^7$	$6.93 \pm 0.23 \times 10^5$	2.07%	$0.86 \pm 0.06 \times 10^7$	$3.46 \pm 0.11 \times 10^5$	3.87%
Φ2 επιφάνεια	$2.10 \pm 0.26 \times 10^7$	$9.30 \pm 0.21 \times 10^4$	0.44%	$0.55 \pm 0.07 \times 10^7$	$4.64 \pm 0.10 \times 10^4$	0.84%
Φ2 πυθμένας	$1.60 \pm 0.18 \times 10^8$	$9.11 \pm 0.22 \times 10^6$	5.39%	$0.42 \pm 0.05 \times 10^8$	$4.55 \pm 0.11 \times 10^6$	9.77%
X2 επιφάνεια	$2.30 \pm 0.22 \times 10^7$	$1.39 \pm 0.19 \times 10^5$	0.60%	$0.60 \pm 0.06 \times 10^7$	$0.69 \pm 0.09 \times 10^5$	1.13%
X2 πυθμένας	$8.14 \pm 0.21 \times 10^6$	$8.99 \pm 0.22 \times 10^4$	1.09%	$2.14 \pm 0.06 \times 10^6$	$4.49 \pm 0.11 \times 10^4$	2.05%

Πίνακας 3.3: : Ποσοτικοποίηση των αντιγράφων 16S rDNA των Βακτηρίων και Αρχαίων στα δείγματα νερού της λίμνης Παμβώτιδας και εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων του κάθε προκαρυωτικού βασιλείου. Α: Άνοιξη, Κ: Καλοκαίρι, Φ: Φθινόπωρο, Χ: Χειμώνας, 1: Σταθμός δειγματοληψίας 1, 2: Σταθμός δειγματοληψίας 2

3.2.4. Μεταβολικό προφίλ των βακτηριακών κοινοτήτων στα δείγματα νερού (σύγκριση επιφάνειας και πυθμένα)

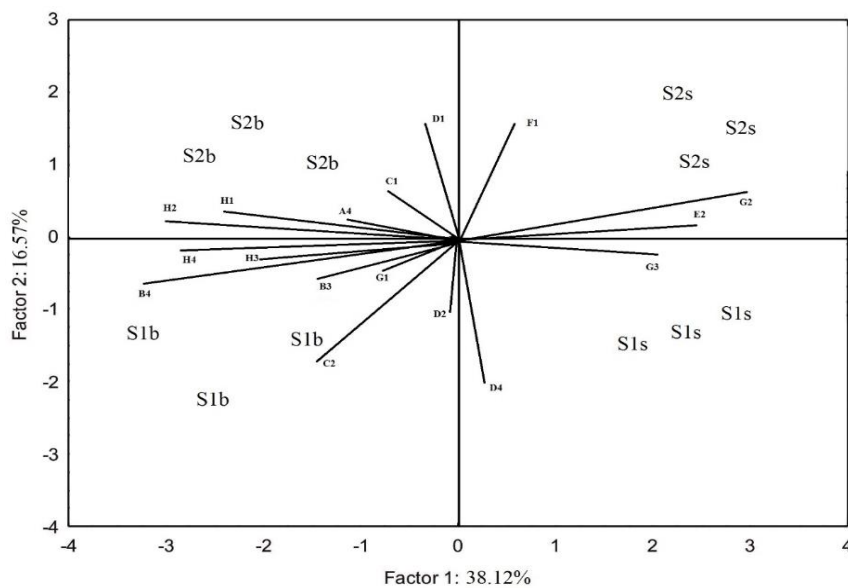
3.2.4.1. Μεταβολικό προφίλ των βακτηριακών κοινοτήτων της επιφάνειας και του πυθμένα- αερόβιες συνθήκες

Για να μελετήσουμε τα θρεπτικά υποστρώματα που καταναλώνουν τα Βακτήρια του νερού της λίμνης Παμβώτιδας χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο BIOLOG. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη στατιστική ανάλυση PCA για κάθε εποχή και για κάθε σταθμό δειγματοληψίας. Τα αποτελέσματα της PCA ανάλυσης παρουσιάζονται στις **Εικόνες 3.10-3.13**.



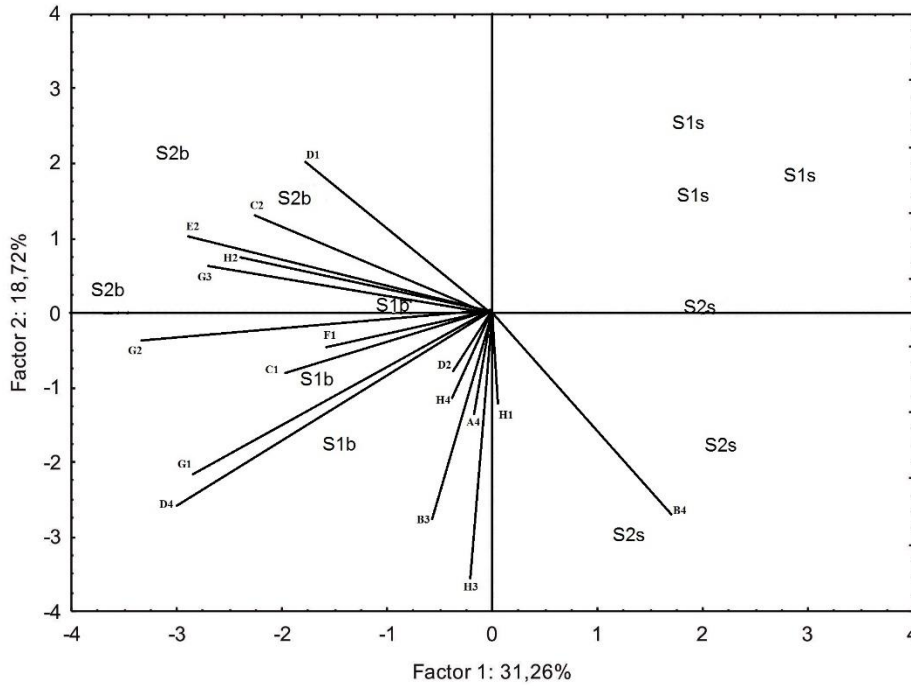
Εικόνα 3.10: Απεικονιστικό διάγραμμα των υποστρωμάτων που μεταβολίζουν τα Βακτήρια την **άνοιξη** υπό αερόβιες συνθήκες.

S1s: Στ.δειγμ.1 επιφάνεια (SS1surface), S1b: Στ.δειγμ. 1 πυθμένας (SS1 bottom), S2s: Στ.δειγμ.2 επιφάνεια (SS2 surface), S2b: Στ.δειγμ.2 πυθμένας (SS2 bottom)

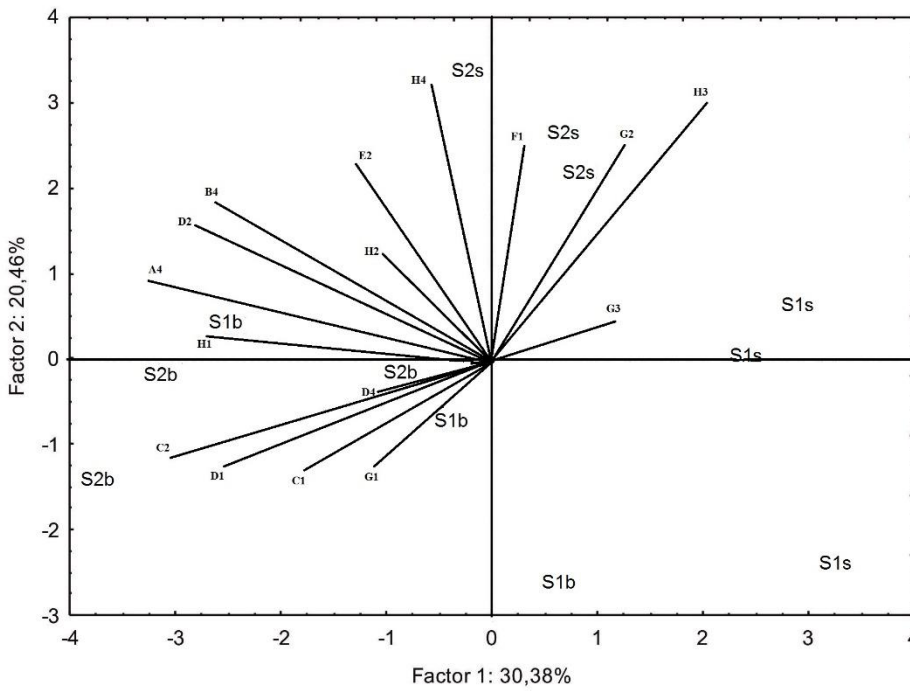


Εικόνα 3.11: Απεικονιστικό διάγραμμα των υποστρωμάτων που μεταβολίζουν τα Βακτήρια το **καλοκαίρι** υπό αερόβιες συνθήκες.

S1s: Στ.δειγμ.1 επιφάνεια (SS1surface), S1b: Στ.δειγμ.1 πυθμένας (SS1 bottom), S2s: Στ.δειγμ.2 επιφάνεια (SS2 surface), S2b: Στ.δειγμ.2 πυθμένας (SS2 bottom)



Εικόνα 3.12: Απεικονιστικό διάγραμμα των υποστρωμάτων που μεταβολίζουν τα Βακτήρια το φθινόπωρο υπό αερόβιες συνθήκες. S1s: Στ.δειγμ.1 επιφάνεια (SS1 surface), S1b: Στ.δειγμ. 1 πυθμένας (SS1 bottom), S2s: Στ.δειγμ.2 επιφάνεια (SS2 surface), S2b: Στ.δειγμ.2 πυθμένας (SS2 bottom)



Εικόνα 3.13: Απεικονιστικό διάγραμμα των υποστρωμάτων που μεταβολίζουν τα Βακτήρια τον χειμώνα υπό αερόβιες συνθήκες. S1s: Στ.δειγμ.1 επιφάνεια (SS1 surface), S1b: Στ.δειγμ. 1 πυθμένας (SS1 bottom), S2s: Στ.δειγμ.2 επιφάνεια (SS2 surface), S2b: Στ.δειγμ.2 πυθμένας (SS2 bottom)

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, τα Βακτήρια του νερού της λίμνης Παμβώτιδας φαίνεται να μεταβολίζουν σε αερόβιες συνθήκες κυρίως 6 υδατάνθρακες (D-Cellobiose, α-D-Lactose, D-Xylose, i-Erythritol, D-Mannitol, N-Acetyl-D-Glucosamine), 3 αμινοξέα (L-Arginine, L-Asparagine, L-Serine), 3 καρβοξυλικά οξέα (D-Galacturonic Acid, α-Ketobutyric Acid, D-Malic Acid), 3 πολυμερή (Tween40, Tween80, Glycogen), 2 φωσφορυλιωμένα χημικά (D,L-α-Glycerol Phosphate, Glucose-1-Phosphate) και μια πολυαμίνη (Putrescine) (Πίνακας 3.4). Η κατηγοριοποίηση των υποστρωμάτων παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.5.

	Σταθμός δειγμ.1 πυθμένος (SS1b)	Σταθμός δειγμ.1 επιφάνεια (SS1s)	Σταθμός δειγμ.2 πυθμένος (SS2b)	Σταθμός δειγμ.2 επιφάνεια (SS2s)
Άνοιξη	H2: D,L-α-Glycerol Phosphate	G2: Glucose-1-Phosphate	A4: L-Arginine	B3: D-Galacturonic Acid
	B4: L-Asparagine	G3: α-Ketobutyric Acid	G1: D-Cellobiose	B2: D-Xylose
	C1: Tween 40	H3: D-Malic Acid	H4: Putrescine	F1: Glycogen
	D4: L-Serine		D1: Tween 80	
	D2: D-Mannitol			
	C2: i-Erythritol			
Καλοκαίρι	H4: Putrescine	G3: α-Ketobutyric Acid	D1: Tween 80	F1: Glycogen
	H3: D-Malic Acid	D4: L-Serine	A4: L-Arginine	G2: Glucose-1-Phosphate
	B4: L-Asparagine		H2: D,L-α-Glycerol Phosphate	E2: N-Acetyl-D-Glucosamine
	B3: D-Galacturonic Acid		H1: α-D-Lactose	
	G1: D-Cellobiose		C1: Tween 40	
	C2: i-Erythritol			
Φθινόπωρο	D2: D-Mannitol			
	H3: D-Malic Acid		G3: α-Ketobutyric Acid	B4: L-Asparagine
	B3: D-Galacturonic Acid		H2: D,L-α-Glycerol Phosphate	H1: α-D-Lactose
	A4: L-Arginine		E2: N-Acetyl-D-Glucosamine	
	H4: Putrescine		C2: i-Erythritol	
	D2: D-Mannitol		D1: Tween 80	
	D4: L-Serine			
	G1: D-Cellobiose			
	C1: Tween 40			
	F1: Glycogen			
Χειμώνας	G2: Glucose-1-Phosphate			
	H4: Putrescine		C2: i-Erythritol	F1: Glycogen
	E2: N-Acetyl-D-Glucosamine		D1: Tween 80	G2: Glucose-1-Phosphate
	H2: D,L-α-Glycerol Phosphate		D4: L-Serine	H3: D-Malic Acid
	B4: L-Asparagine		C1: Tween 40	G3: α-Ketobutyric Acid
	D2: D-Mannitol		G1: D-Cellobiose	
	A4: L-Arginine			
H1: α-D-Lactose				

Πίνακας 3.4: Συγκεντρωτικός πίνακας υποστρωμάτων που μεταβολίζουν τα Βακτήρια ανά εποχή και σταθμό δειγματοληψίας

<u>Carbohydrates</u>	<u>Amino acids</u>	<u>Carboxylic acids</u>	<u>Polymers</u>	<u>Phosphorylated chemicals</u>	<u>Amines</u>
E2	B4	B3	F1	H2	H4
G1	D4	G3	D1	G2	
C2	A4	H3	C1		
H1					
D2					
B2					

Πίνακας 3.5: Κατηγοριοποίηση υποστρωμάτων [110]

Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα υποστρώματα από τα Βακτήρια της επιφάνειας είναι το *a*-Ketobutyric Acid που καταναλώνεται κυρίως στον SS1, το Glycogen και το Glucose-1-Phosphate που καταναλώνονται κυρίως στον SS2.

Επίσης, τα περισσότερα υποστρώματα υδατανθράκων συνολικά καταναλώνονται από τα Βακτήρια το καλοκαίρι και το φθινόπωρο. Το υπόστρωμα N-Acetyl-D-Glucosamine (NAG), καταναλώνεται κυρίως το καλοκαίρι στον SS2 στην επιφάνεια, το φθινόπωρο και τον χειμώνα στον πυθμένα της λίμνης. Ενώ η D-Cellobiose καταναλώνεται όλες τις εποχές στον πυθμένα της λίμνης.

Τα πιο συχνά διασπώμενα υποστρώματα από τα Βακτήρια του πυθμένα της λίμνης Παμβώτιδας είναι η D-Mannitol και η L-Asparagine στον SS1 και τα Tween80 και L-Arginine στον SS2.

Από τα παραπάνω διαγράμματα μπορούμε επίσης να βγάλουμε συμπεράσματα και σχετικά με την ομοιότητα των σταθμών δειγματοληψίας. Την άνοιξη και το καλοκαίρι οι δυο σταθμοί δειγματοληψίας διαφέρουν καθώς ξεχωρίζουν στα τεταρτημόρια των διαγραμμάτων (**Εικόνες 3.10,3.11**). Το ίδιο συμβαίνει και με τα σημεία δειγματοληψίας (επιφάνεια-πυθμένας). Το φθινόπωρο και τον χειμώνα οι διαφοροποιήσεις μεταξύ των σταθμών δεν είναι τόσο ξεκάθαρες.

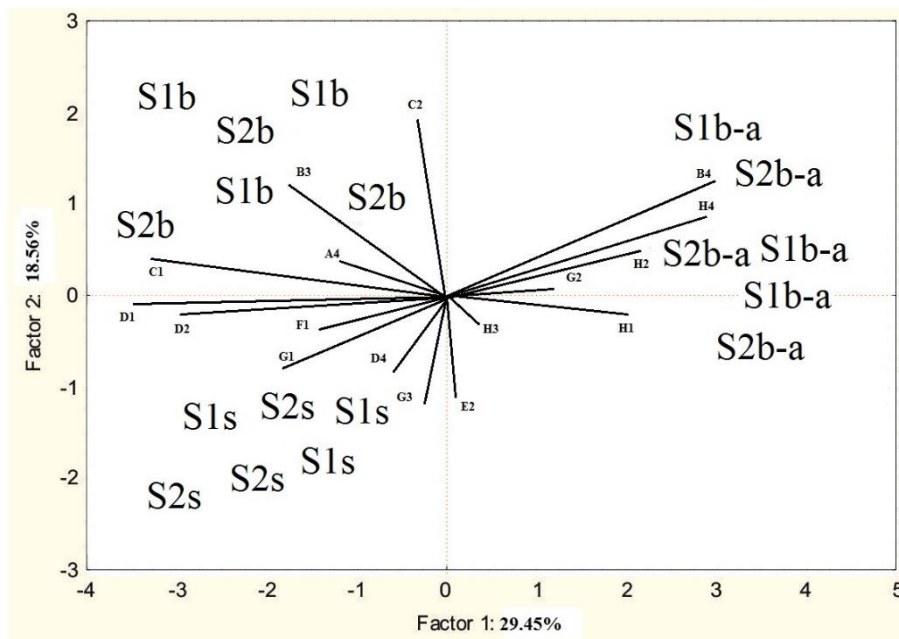
3.2.4.2. Μεταβολικό προφίλ των βακτηριακών κοινοτήτων της επιφάνειας και του πυθμένα- αναερόβιες συνθήκες

Σύμφωνα με τις μετρήσεις του διαλυμένου οξυγόνου στον πυθμένα της λίμνης Παμβώτιδας (Παράρτημα, Πίνακας 8.2), παρατηρούμε πως το καλοκαίρι η συγκέντρωση του οξυγόνου είναι χαμηλή. Θέλοντας να μελετήσουμε αναλυτικότερα

τα θρεπτικά υποστρώματα που καταναλώνουν τα Βακτήρια του νερού του πυθμένα της λίμνης Παμβώτιδας το καλοκαίρι, χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο BIOLOG και υπό αναερόβιες συνθήκες σε δείγματα νερού πυθμένα της εποχής αυτής. Επεξεργαστήκαμε τα αποτελέσματα με PCA ανάλυση και κατασκευάσαμε συγκριτικό διάγραμμα με τα υποστρώματα που καταναλώνουν τα Βακτήρια το καλοκαίρι υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες.

Καλοκαίρι, πυθμένας	B4: L-Asparagine	H1: a-D-Lactose
	H4: Putrescine	H3: D-Malic Acid
	H2: D,L-a-Glycerol Phosphate	E2: N-Acetyl-D-Glucosamine
	G2: Glucose-1-Phosphate	

Πίνακας 3.6: Υποστρώματα που καταναλώνουν τα Βακτήρια του πυθμένα της λίμνης Παμβώτιδας το καλοκαίρι, υπό αναερόβιες συνθήκες

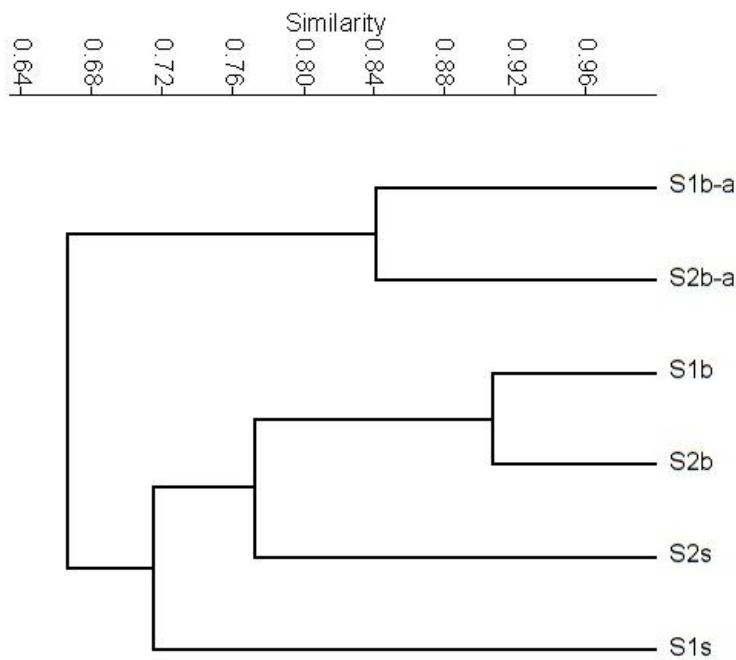


Εικόνα 3.14: Απεικονιστικό διάγραμμα των υποστρωμάτων που μεταβολίζουν τα Βακτήρια του πυθμένα το **καλοκαίρι** υπό αναερόβιες συνθήκες, συγκριτικά με τα Βακτήρια της ίδιας εποχής (επιφάνειας και πυθμένα) υπό αερόβιες συνθήκες. S1s: Στ.δειγμ.1 επιφάνεια (SS1surface), S1b: Στ.δειγμ. 1 πυθμένας (SS1 bottom), S2s: Στ.δειγμ.2 επιφάνεια (SS2 surface), S2b: Στ.δειγμ.2 πυθμένας (SS2 bottom), a: αναερόβια

Υπό αναερόβιες συνθήκες κατά την καλοκαιρινή περίοδο τα Βακτήρια καταναλώνουν κυρίως τα υποστρώματα L-Asparagine (B4), Putrescine (H4), Glucose-1-phosphate

(G2), a-D-Lactose (H1), D-Malic Acid (H3) (**Εικόνα 3.14**). Τα υποστρώματα αυτά φαίνεται πως καταναλώνονται από τα Βακτήρια και υπό αερόβιες συνθήκες.

Θέλοντας να διαπιστώσουμε τα ποσοστά ομοιότητας μεταξύ των σταθμών και των σημείων δειγματοληψίας σχετικά με τον μεταβολισμό των Βακτηρίων της καλοκαιρινής περιόδου υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, κατασκευάσαμε ένα διάγραμμα ομοιότητας το οποίο παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.15**.



Εικόνα 3.15: Βαθμοί ομοιότητας μεταξύ των μεταβολικών προφίλ των βακτηριακών κοινοτήτων της επιφάνειας και του πυθμένα υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες (πυθμένας). (UPGMA cluster analysis)

S1s: Στ.δειγμ.1 επιφάνεια (SS1 surface), S1b: Στ.δειγμ. 1 πυθμένας (SS1 bottom), S2s: Στ.δειγμ.2 επιφάνεια (SS2 surface), S2b: Στ.δειγμ.2 πυθμένας (SS2 bottom), a: αναερόβια

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε πως οι σταθμοί και τα σημεία δειγματοληψίας, σύμφωνα με τα υποστρώματα που καταναλώνουν τα Βακτήρια υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες κατά την καλοκαιρινή περίοδο, ομαδοποιούνται σε διαφορετικούς κλάδους. Οι δυο σταθμοί όσον αφορά το μεταβολικό μονοπάτι των Βακτηρίων που αναπτύχθηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες (S1b-a, S2b-a), μοιάζουν 84%. Στην περίπτωση των Βακτηρίων που αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες, οι επιφάνειες με τους πυθμένες των σταθμών διαχωρίζονται, με τους πυθμένες να εμφανίζουν ομοιότητα περίπου 90% και τις επιφάνειες να είναι αρκετά ανόμοιες.

3.3. Βακτηριακές καλλιέργειες

3.3.1. Απομόνωση και καλλιέργεια Βακτηρίων από τα δείγματα νερού υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες

Χρησιμοποιήσαμε βασικές αρχές καλλιέργειας Βακτηρίων με χρήση αρχικά στερεού και έπειτα υγρού θρεπτικού μέσου. Για την ανάπτυξη ετερότροφων Βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό R2A, ενώ για την ανάπτυξη κυανοβακτηρίων το θρεπτικό υλικό BG11. Συνολικά απομονώσαμε 50 αμιγείς (διακριτές) καλλιέργειες ετερότροφων Βακτηρίων από τα δείγματα επιφανειακού νερού οι οποίες αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες και 10 αμιγείς (διακριτές) καλλιέργειες ετερότροφων Βακτηρίων από τα δείγματα νερού του πυθμένα που αναπτύχθηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες. Επίσης, από τα δείγματα νερού απομονώθηκαν δυο αμιγείς (διακριτές) καλλιέργειες κυανοβακτηρίων.

Από όλες τις παραπάνω καλλιέργειες πραγματοποιήσαμε εκχύλιση πιθανών δραστικών ουσιών, σε νερό και μεθανόλη και τα κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμές κυτταροτοξικότητας.

3.3.2. Απομόνωση και καλλιέργεια Βακτηρίων από τα δείγματα ιλύος υπό αερόβιες συνθήκες

Στο πλαίσιο λεπτομερούς μελέτης των μικροβιακών κοινοτήτων των ιζημάτων της λίμνης Παμβώτιδας και με εύρημα τα πολύ μεγάλα ποσοστά βακτηριακών αλληλουχιών που ανήκουν σε νέα είδη/στελέχη, θελήσαμε να διαπιστώσουμε αν υπάρχει δυνατότητα απομόνωσης νέων βακτηριακών στελεχών έπειτα από καλλιέργεια.

Από τα δείγματα ιλύος της λίμνης απομονώσαμε 50 αμιγείς (διακριτές) καλλιέργειες Βακτηρίων που αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες, τις οποίες και χαρακτηρίσαμε μοριακά μέσω ενίσχυσης του 16S rDNA και αλληλούχισης. Από τις 50 αποικίες προέκυψαν 23 διαφορετικά στελέχη Βακτηρίων, τρία από τα οποία (13.04%) έχουν

ομολογία <97% με ήδη υπάρχουσες καταχωρήσεις στη GenBank (Παράρτημα, Πίνακας 8.4).

Τις αλληλουχίες αυτές τις καταθέσαμε στη βάση δεδομένων GenBank και έλαβαν αριθμούς καταχώρησης (accession numbers) KU862661- KU862683 (Παράρτημα, Εικόνα 8.3). Επίσης τις συμπεριλάβαμε στην κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου των Βακτηρίων (BacPamv iso).

Με βάση τη φυλογενετική ανάλυση, από τις 23 αλληλουχίες Βακτηρίων (BacPamv iso) που απομονώσαμε από τα ιζήματα της λίμνης Παμβώτιδας, 7 αλληλουχίες ανήκουν στα *γ-Proteobacteria*, έξι ανήκουν στα *β-Proteobacteria* και μάλιστα μια αλληλουχία (BacPamv iso.18) με 93% ομολογία (Παράρτημα, Πίνακας 8.4). Οκτώ (8) αλληλουχίες ανήκουν στα *Bacteroidetes* και πιο συγκεκριμένα οι 6 ομαδοποιούνται με τα *Flavobacteriia* (Εικόνα 3.3a). Συνεχίζοντας, μια αλληλουχία (PamvBac iso.22) ταξινομείται στα *α-Proteobacteria* και μια (PamvBac iso.23) στα *Actinobacteria*.

Συγκεντρωτικά οι καλλιέργειες Βακτηρίων από τα δείγματα νερού και ιλύος παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.7.

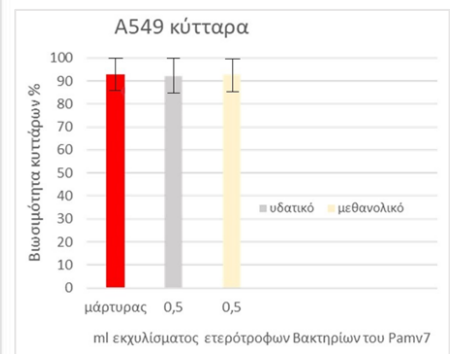
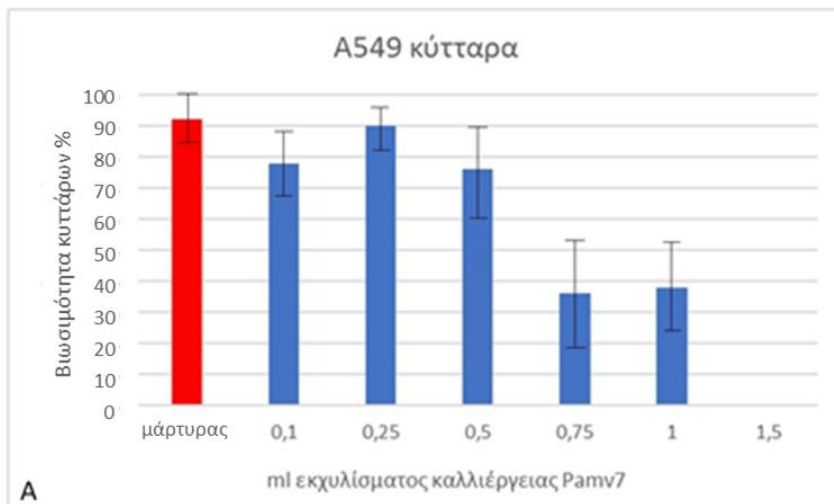
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΕΡΟΥ	Προέλευση δείγματος	Θρεπτικό υλικό ανάπτυξης	Συνθήκες καλλιέργειας	Σύνολο αποικιών	Κυτταρική εκχύλιση σε οργανικό και ανόργανο διαλύτη	Αποτέλεσμα δοκιμής εκχυλίσματος στις καρκινικές κυτ.σειρές	Μοριακός χαρακτηρισμός
Ετερότροφα βακτήρια	Σταθμοί 1,2 επιφάνεια, καλοκαίρι	R2A	Αερόβιες, 20°C	50	+	-	ND
	Σταθμοί 1,2 πυθμένας καλοκαίρι	R2A	Αναερόβιες, 20°C	10	+	-	ND
Κυανοβακτήρια	Σταθμοί 1,2 επιφάνεια καλοκαίρι	BG11	Αερόβιες, 26°C, φώς/σκοτάδι	2	+	+	+
						(Pamv7)	(Pamv7)
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΙΛΥΟΣ							
Ετερότροφα βακτήρια	Σταθμοί 1,2 καλοκαίρι	R2A	Αερόβιες, 26°C, σκοτάδι	50	-	-	+
ND:Not Done							

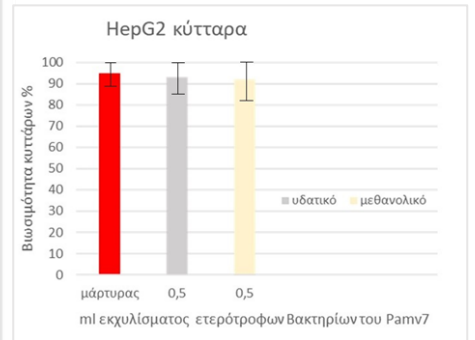
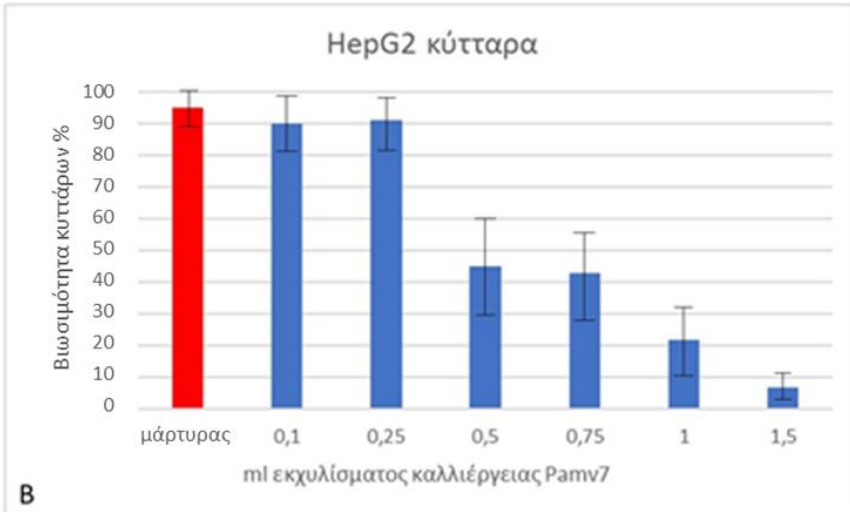
Πίνακας 3.7: Συγκεντρωτικές πληροφορίες για τις καλλιέργειες Βακτηρίων από τα δείγματα νερού και ιλύος

3.3.3. Μελέτη κυτταροτοξικότητας των βακτηριακών εκχυλισμάτων στις καρκινικές κυτταρικές σειρές A549, HepG2, MCF7 και σε φυσιολογικούς ινοβλάστες MRC5

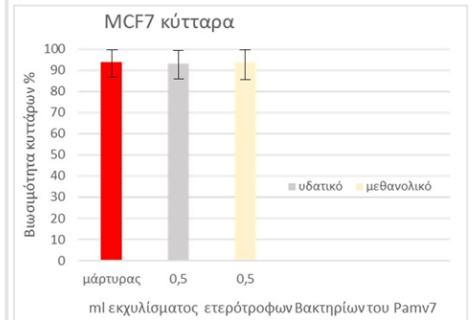
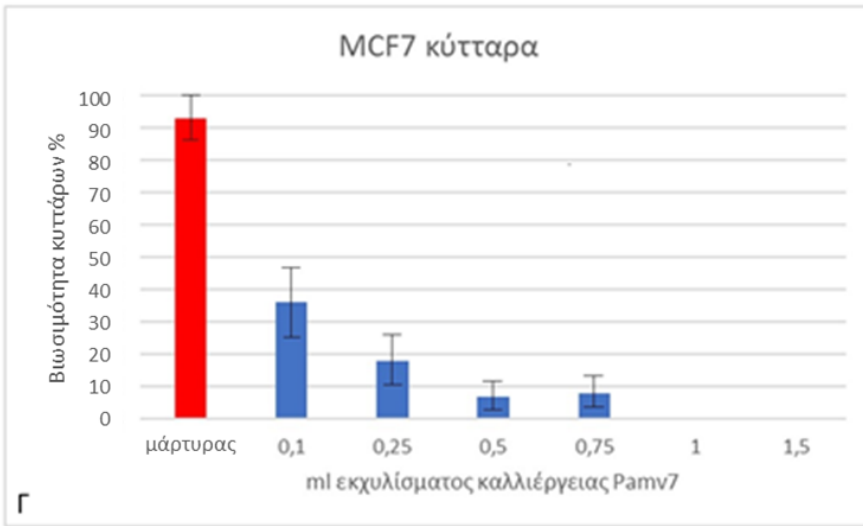
Είναι γνωστό πως τα Βακτήρια έχουν τη δυνατότητα να παράγουν βιοδραστικούς παράγοντες, οι οποίοι μπορούν να εκχυλισθούν με τη χρήση μεθανόλης ή ύδατος. Από τις καλλιέργειες ετερότροφων Βακτηρίων (60) και κυανοβακτηρίων (2) που αναπτύξαμε από τα δείγματα νερού της λίμνης Παμβώτιδας, δημιουργήσαμε μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα τα οποία δοκιμάστηκαν για πιθανή κυτταροτοξική δράση. (εν.Υλικά & Μέθοδοι)

Τα αποτελέσματα από τις δοκιμές τοξικότητας, κατέδειξαν ότι μόνο το μεθανολικό εκχύλισμα του κυανοβακτηρίου «Pamv7» είχε σημαντική κυτταροτοξική δράση. Πραγματοποιήσαμε επιπλέον δοκιμές του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος στις καρκινικές σειρές σε διαβαθμισμένες ποσότητες εκχυλίσματος (0.1ml, 0.25ml, 0.5ml, 0.75ml, 1ml, 1.5ml, συγκέντρωση 15mg ξηρού βάρους κυανοβακτηρίων «Pamv7»/ml διαλύτη). Τα αποτελέσματα λήφθηκαν 24 ώρες μετά την έναρξη της επώασης και παρουσιάζονται στις **Εικόνες 3.16 Α-Δ**.

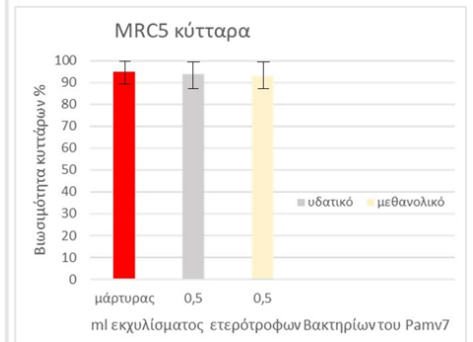
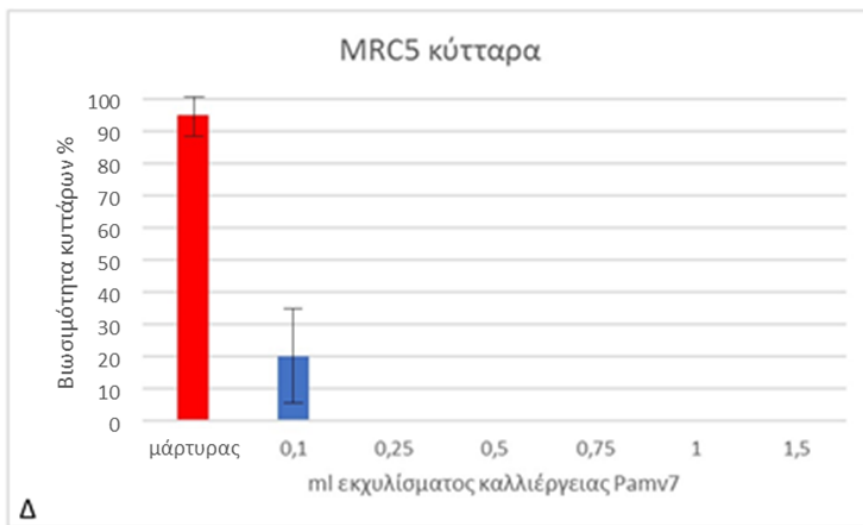




2



3



4

Εικόνες 3.16 A-Δ: Αποτελέσματα από τις δοκιμές τοξικότητας του μεθανολικού εκχυλίσματος του κυανοβακτηρίου «Pamv7» στις κυτταρικές σειρές. A: A549, B: HepG2, Γ: MCF7, Δ: MRC5. Μάρτυρας: κύτταρα χωρίς την προσθήκη κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος. Πραγματοποιήθηκε ξήρανση υπό κενό για κάθε ποσότητα κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος (15mg ξηρού βάρους κυανοβακτηρίων «Pamv7»/ml διαλύτη) και επαναδιαλυτοποίηση σε 500μl θρεπτικού υλικού DMEM. (βλ. ενότητα 2.2.3.)

Εικόνες 3.16 1-4: Ενδεικτικά αποτελέσματα από τις δοκιμές τοξικότητας των εκχυλισμάτων (υδατικό και μεθανολικό) των ετερότροφων Βακτηρίων που αναπτύσσονται παρουσία του κυανοβακτηρίου «Pamv7» στις κυτταρικές σειρές A: A549, B: HepG2, Γ: MCF7, Δ: MRC5. Μάρτυρας: κύτταρα χωρίς την προσθήκη βακτηριακών εκχυλισμάτων

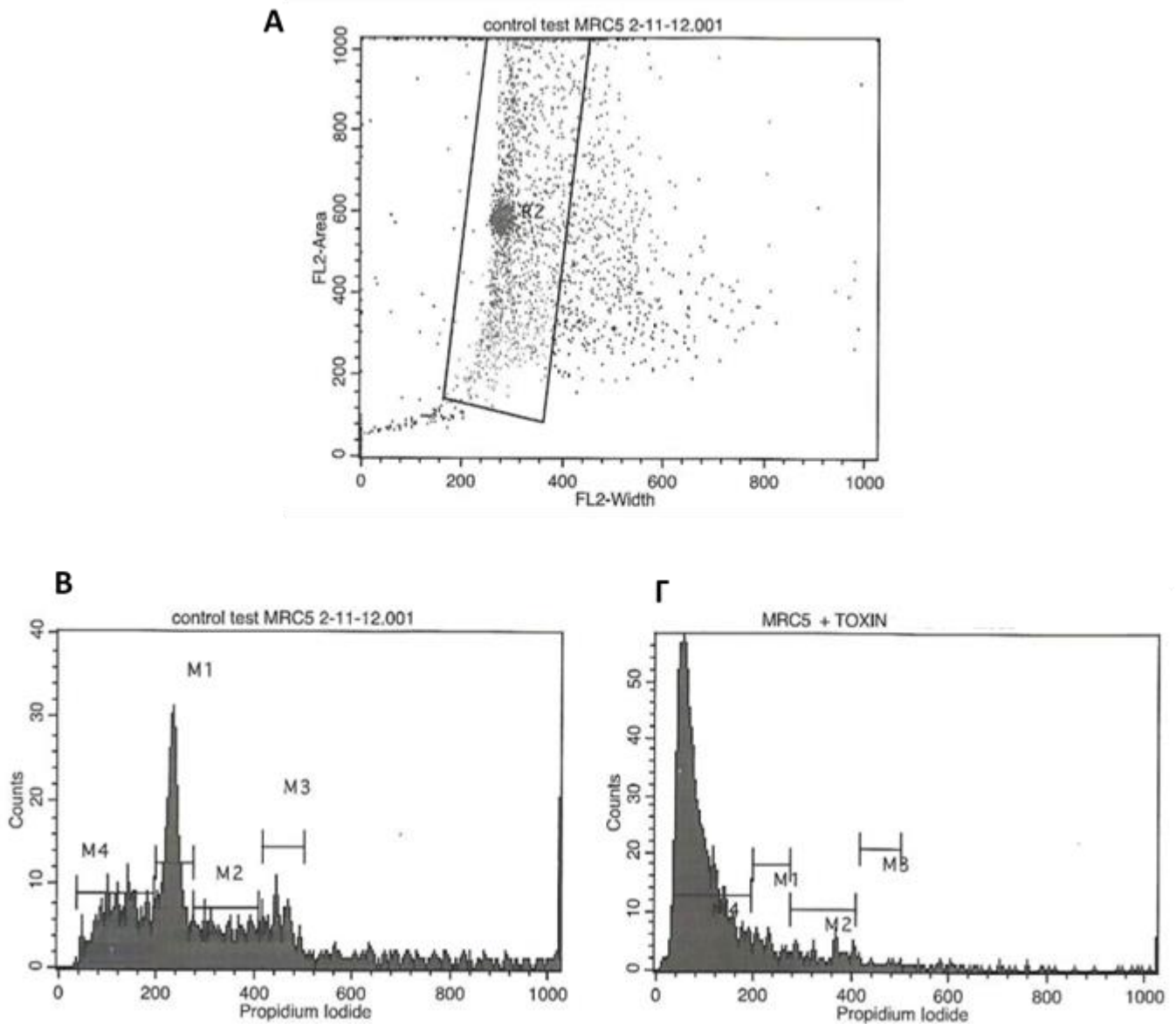
Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει πως το εκχύλισμα από το κυανοβακτήριο παρουσιάζει αυξημένη κυτταροτοξικότητα στα κύτταρα αδενοκαρκινώματος μαστού (MCF7) αλλά μειωμένη εκλεκτικότητα καθώς είναι ιδιαίτερα κυτταροτοξικό στα κύτταρα αναφοράς (MRC5).

Προσπαθώντας να προσδιορίσουμε την πιθανή δραστική ουσία που περιέχεται στο εκχύλισμα προχωρήσαμε σε δοκιμή ELISA για τις κυανοτοξίνες μικροκυστίνη και κυλινδροσπερμοψίνη, (εν.Υλικά & Μέθοδοι), χωρίς όμως να έχουμε κάποιο θετικό αποτέλεσμα. Πιθανόν μια άγνωστη προς εμάς τοξίνη ευθύνεται για το κυτταροτοξικό αποτέλεσμα ή ακόμα και ένας συνδυασμός δυνητικά τοξικών παραγόντων.

Η καλλιέργεια του κυανοβακτηρίου «Pamv7» είναι μια μονοκαλλιέργεια (όσον αφορά το κυανοβακτήριο) αλλά περιέχει και ετερότροφα Βακτήρια τα οποία πιθανόν αποτελούν απαραίτητο συμβιωτικό παράγοντα για την ανάπτυξη του κυανοβακτηρίου. Κάθε προσπάθεια εξάλειψης των ετερότροφων Βακτηρίων με τη χρήση αντιβιοτικών είχε σαν συνέπεια και τη δραματική μείωση της ανάπτυξης του κυανοβακτηρίου. Το ερώτημα που προέκυψε ήταν εάν τα ετερότροφα Βακτήρια είναι υπεύθυνα για την παραγωγή του βιοδραστικού παράγοντα και όχι το κυανοβακτήριο. Για να απαντήσουμε στο παραπάνω ερώτημα αναπτύξαμε τα ετερότροφα Βακτήρια σε R2A θρεπτικό μέσο, πραγματοποιήσαμε εκχυλίσματα σε νερό και μεθανόλη (75%) και δοκιμάσαμε τα εκχυλίσματα (0.5ml) στις τέσσερις καρκινικές σειρές, τα οποία τελικά δεν επηρέασαν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων (**Εικόνες 3.16 1-4**).

Μια ακόμη πληροφορία που μπορούμε να λάβουμε για τη δραστικότητα του εκχυλίσματος από το κυανοβακτήριο «Pamv7», είναι με πιο τρόπο προκαλεί τον θάνατο των καρκινικών κυττάρων και αυτό το πετύχαμε μέσω της κυτταρομετρίας

ροής. Το αποτέλεσμα που λάβαμε από την κυτταρομετρία ροής φανερώνει πως η τοξίνη του κυανοβακτηρίου «Pamv7» προκαλεί στα καρκινικά κύτταρα απόπτωση, δηλαδή προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (**Εικόνα 3.17**).



Εικόνα 3.17: Κυτταρομετρία ροής. Α) στο πλαίσιο απεικονίζεται ο πληθυσμός των άθικτων MRC5 κυτάρων μετά από χρώση με ιωδιούχο προπίδιο (PI). Β) Κατανομή των κυτάρων του πλαισίου (Α) με βάση την ένταση φθορισμού. Πληθυσμός M1: κύτταρα σε φάση G0/G1, M2: κύτταρα σε φάση S, M3: κύτταρα σε φάση G2/M, M4: κύτταρα σε απόπτωση. Γ) Ιστόγραμμα φθορισμού μετά από χρώση των κυτάρων MRC5 με PI στα οποία έχει προστεθεί 0.1ml μεθανολικού εκχυλίσματος (15mg ξηρού βάρους κυανοβακτηρίων «Pamv7»/ml διαλύτη) από το κυανοβακτήριο «Pamv7» και χρόνο επώασης 12 ώρες

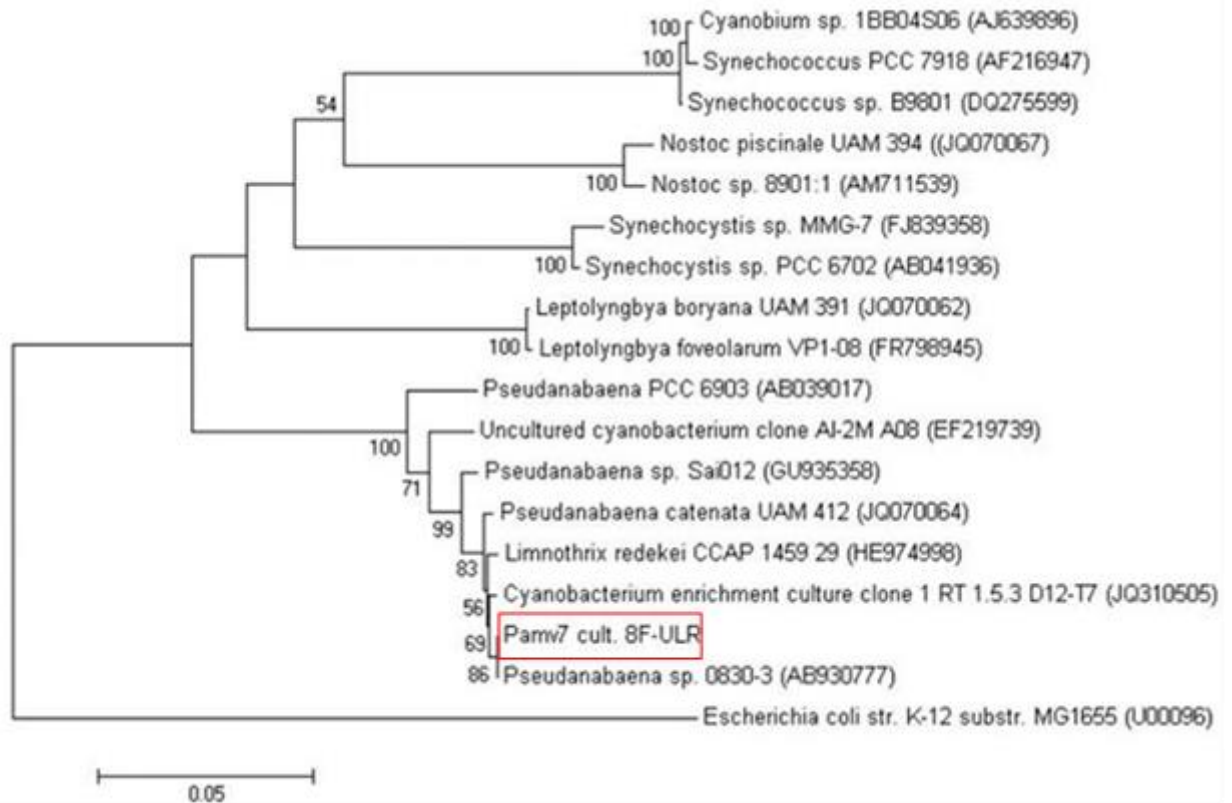
3.3.3.1. Χαρακτηρισμός και φυλογενετική κατάταξη του κυανοβακτηρίου «Pamv7» που παράγει βιοδραστικό παράγοντα με κυτταροτοξική δράση

Με σκοπό να χαρακτηρίσουμε και να κατατάξουμε φυλογενετικά το κυανοβακτήριο «Pamv7» που καλλιεργήσαμε και το οποίο παράγει κάποιο δυνητικά κυτταροτοξικό παράγοντα, ενισχύσαμε και αλληλουχίσαμε σχεδόν το πλήρες τμήμα του 16S rDNA και ολόκληρη την περιοχή ITS. Μετά από μικροσκοπική παρατήρηση το κυανοβακτήριο μοιάζει με μέλη της τάξης *Synechococcales* (Εικόνα 3.18).

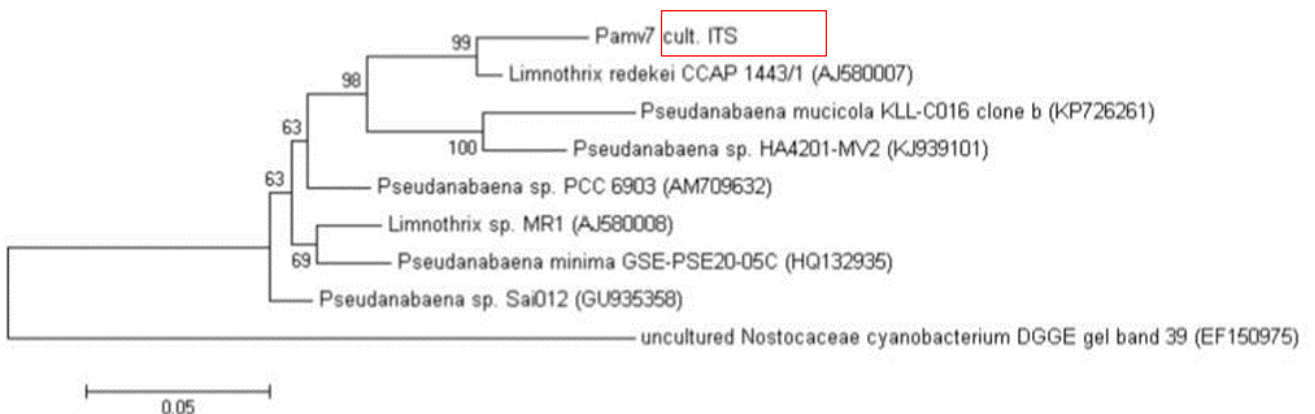


Εικόνα 3.18: Φωτογραφία του κυανοβακτηρίου «Pamv7» μετά από παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση 100x)

Το κυανοβακτήριο «Pamv7» με βάση την αλληλουχία του τμήματος 16S rDNA, παρουσιάζει ομολογία 100% με την αντίστοιχη αλληλουχία *Pseudanabaena sp.* 0830-3 (AB936777) και ομοιότητα 99% με την αντίστοιχη αλληλουχία *Limnothrix redekei* CCAP 1459/29 (HE974998) (Εικόνα 3.19). Επιπλέον, συγκρίνοντας την αλληλουχία ITS με άλλες αντίστοιχες αλληλουχίες, το κυανοβακτήριο «Pamv7» εμφανίζει ομολογία 88% με *Limnothrix redekei* CCAP 14413/1 (AJ580007) (Εικόνα 3.20). Μέσω φυλογενετικής ανάλυσης προκύπτει πως το κυανοβακτήριο «Pamv7» ανήκει στο γένος *Pseudanabaena/Limnothrix*.



Εικόνα 3.19: Φυλογενετικό δέντρο (Neighbor-Joining tree) με βάση την αντιστοίχιση της αλληλουχίας 16S rDNA του κυανοβακτηρίου «Pamv7» με αλληλουχίες γνωστών ειδών που ανακτήθηκαν από τις βάσεις δεδομένων GenBank/EMBL/DDBJ. Αναφέρονται τιμές ομαδοποίησης >50% (Bootstrap values >50%)



Εικόνα 3.20: Φυλογενετικό δέντρο (Neighbor-Joining tree) με βάση την αντιστοίχιση της αλληλουχίας ITS του κυανοβακτηρίου «Pamv7» με αλληλουχίες γνωστών ειδών που ανακτήθηκαν από τις βάσεις δεδομένων GenBank/EMBL/DDBJ. Αναφέρονται τιμές ομαδοποίησης >50% (Bootstrap values >50%)

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η λίμνη Παμβώτιδα είναι ένα οικοσύστημα που προσελκύει το επιστημονικό ενδιαφέρον λόγω της αρχαιότητάς της, μιας και υπάρχει από την Πλειο-Πλειστόκαινη περίοδο (2.588.000 με 11.700 χρόνια περίπου πριν). Θεωρείται δε ως ένα σημαντικό “hot spot” για την Ευρωπαϊκή βιοποικιλότητα [56, 111]. Η λίμνη Παμβώτιδα σήμερα είναι μια ευτροφική/υπερτροφική λίμνη ($TP > 30 \mu\text{g/L}$) που εμφανίζει δυο ανθίσεις κυανοβακτηρίων το χρόνο. Μια καλοκαιρινή κατά την οποία κυριαρχούν νηματοειδή κυανοβακτήρια (γένη: *Anabaena sp.*, *Aphanizomenon sp.*) και μια φθινοπωρινή κατά την οποία κυριαρχούν κυανοβακτήρια του γένους *Microcystis sp.* [62]. Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στη λίμνη είναι λιγοστές, ενώ καμία μελέτη δεν έχει πραγματοποιηθεί (μέχρι την έναρξη της παρούσης) η οποία να σχετίζεται με τη δομή των προκαρυωτικών κοινοτήτων της λίμνης αυτής.

4.1. Φυσικοχημικές αναλύσεις δειγμάτων ιλύος

Οι φυσικοχημικές παράμετροι είναι αυτές που καθορίζουν τις βιολογικές παραμέτρους. Στην παρούσα εργασία, οι συγκεντρώσεις του ολικού άνθρακα (TC), του ολικού οργανικού άνθρακα (TOC), του ολικού αζώτου (TKN) και του ολικού φωσφόρου (TP) συμφωνούν με αντίστοιχες μετρήσεις προηγούμενων μελετών που υποδεικνύουν την ευτροφική κατάσταση της λίμνης [67, 112, 113] ενώ οι συγκεντρώσεις των TKN, TP, TOC στα ιζήματα της λίμνης Παμβώτιδας είναι συγκρίσιμες με αντίστοιχες συγκεντρώσεις σε ιζήματα άλλων λιμνών παγκοσμίως [106, 114-116].

Οι φυσικοχημικές μετρήσεις παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ των σταθμών δειγματοληψίας. Ο σταθμός 2 (SS2) εμφανίζει υψηλές συγκεντρώσεις TC, TOC, Cl^- , Ca^{2+} σε σχέση με τον σταθμό 1 (SS1). Ο σταθμός δειγματοληψίας 2 είναι ο βαθύτερος σταθμός και οι υποξικές συνθήκες που επικρατούν κατά τη διάρκεια του έτους υποδηλώνουν μειωμένη ανάμειξη νερού (mixing conditions) σε σχέση με τον σταθμό 1. Επιπλέον, η ευρύτερη περιοχή πάνω από τα ιζήματα του σταθμού 2 συγκεντρώνει πυκνότερη άνθιση κυανοβακτηρίων σε σχέση με το κέντρο της λίμνης όπου εντοπίζεται ο σταθμός 1, καθώς προστατεύεται από τους δυτικούς ανέμους που φυσούν συνήθως στην περιοχή. Επομένως, η μειωμένη ανάμειξη νερού, οι συνθήκες αναερόβιας αποσύνθεσης και η αυξημένη άνθιση κυανοβακτηρίων θα μπορούσαν να εξηγήσουν τις υψηλές συγκεντρώσεις TC, TOC και Cl^- . Οι αυξημένες συγκεντρώσεις ασβεστίου

ίσως οφείλονται στην εγγύτητα του σταθμού 2 στο βουνό Μιτσικέλι το οποίο αποτελείται κυρίως από ασβεστολιθικά πετρώματα.

Είναι επίσης εμφανείς και οι διαφορές στις φυσικοχημικές παραμέτρους του ίδιου σταθμού μεταξύ των διαφορετικών εποχών του έτους. Αυτό παρατηρείται στην περίπτωση των ιόντων χλωρίου των οποίων η συγκέντρωση ελαττώνεται τον χειμώνα και στους δυο σταθμούς, όπως και στην περίπτωση του ολικού φωσφόρου του οποίου η συγκέντρωση αυξάνεται το φθινόπωρο και τον χειμώνα. Η μείωση των ιόντων χλωρίου τον χειμώνα φαίνεται λογική καθώς υπάρχουν πολλές εισροές νερού στη λίμνη. Οι συγκεντρώσεις του ολικού φωσφόρου αυξάνονται για δυο κυρίως λόγους: α) λόγω της αποικοδόμησης των κυανοβακτηρίων στο τέλος φθινοπώρου και β) λόγω των υψηλών εισροών νερού τον χειμώνα καθώς οι εισροές από τις τάφρους που βρίσκονται περιφερειακά της λίμνης είναι επιμολυσμένες με λιπάσματα.

Σχετικά με τις συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων, το Ni στα ιζήματα της λίμνης κυμάνθηκε από 122.83-135.22mg/kg στον σταθμό 1 και από 85.8-99.75 mg/kg στον σταθμό 2. Σε μια μελέτη που διεξήχθη τα έτη 1991-1993 οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων μετρήθηκαν σε επιφανειακά ιζήματα τα οποία λήφθηκαν από 28 διαφορετικούς σταθμούς δειγματοληψίας στη λίμνη Παμβώτιδα και οι συγκεντρώσεις Ni κυμάνθηκαν από 18-51 mg/kg [117]. Δυο σταθμοί από την παραπάνω μελέτη βρίσκονταν πλησίον των δικών μας σταθμών δειγματοληψίας 1 και 2. Η συγκέντρωση Ni κοντά στον σταθμό δειγματοληψίας 1 βρέθηκε να είναι 26mg/kg ενώ κοντά στον σταθμό 2 μετρήθηκαν 48mg/kg Ni. Φαίνεται λοιπόν πως η συγκέντρωση Ni από το 1991 έως το 2010, στον σταθμό 1 αυξήθηκε 4.7-5.1 φορές και στον σταθμό 2 1.8-2.0 φορές σε σχέση με τις μετρήσεις της μελέτης 1991-1993.

Ο εμπλουτισμός των ιζημάτων των λιμνών με νικέλιο και χρώμιο είναι γνωστό ότι ενισχύεται είτε από εξορυκτικές δραστηριότητες [118] ή από εν μέρει επεξεργασία βιομηχανικών και αστικών υγρών αποβλήτων, αγροχημικών και αποβλήτων υγειονομικής ταφής [119]. Στην περίπτωση της λίμνης Παμβώτιδας, υπάρχει βιολογικός καθαρισμός αστικών αποβλήτων από το 1994, οι βιομηχανικές και οι αγροτικές δραστηριότητες έχουν μειωθεί από το 1990, ενώ δεν υπάρχουν εξορυκτικές δραστηριότητες. Η μόνη λογική εξήγηση για τις αυξημένες ποσότητες νικελίου στην περίοδο που μελετάμε, είναι η συσσώρευση φερτών υλικών εξαιτίας της κατασκευής ενός τούνελ μήκους τεσσάρων χιλιομέτρων στο βουνό Μιτσικέλι την περίοδο 1999-

2007 και τα οποία αποστραγγίστηκαν μέσω της ΝΑ τάφρου. Όσον αφορά τις αυξημένες συγκεντρώσεις Ni στον σταθμό 1, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι οφείλονται στις εκροές που λαμβάνει ο σταθμός από τάφρους ΝΔ και ΝΑ της λίμνης οι οποίες αποστραγγίζουν ολόκληρη την αστική και γεωργική περιοχή γύρω από τη λίμνη.

Στην παρούσα εργασία οι συγκεντρώσεις υδραργύρου (Hg) κυμάνθηκαν κάτω από όριο ανίχνευσης έως και 1.59mg/kg ενώ οι συγκεντρώσεις αρσενικού (As) κυμάνθηκαν από 1.89-4.82mg/kg. Τα επίπεδα Hg στη λίμνη Παμβώτιδα παρέμειναν σταθερά συγκριτικά με τη μελέτη 1991-1993 και έχουν αποδοθεί σε δραστηριότητες μικρών βιοτεχνιών παράνομα συνδεδεμένων με τη λίμνη [117]. Ενδιαφέρον προκαλούν τα επίπεδα του As στον σταθμό 2 τα οποία βρέθηκαν υψηλότερα σε σχέση με τον σταθμό 1. Δυστυχώς, λόγω της έλλειψης προηγούμενων μετρήσεων αρσενικού στη λίμνη δεν μπορούμε να κάνουμε κάποια υπόθεση για την προέλευσή του.

Σε μια πρόσφατη μελέτη [120], τα ιζήματα της λίμνης Παμβώτιδας χαρακτηρίστηκαν από μέτρια έως σοβαρά επιμολυσμένα με βαρέα μέταλλα. Οι βασικότερες αιτίες αυτής της επιμόλυνσης είναι τα αστικά υγρά απόβλητα, η αργυροχοΐα και η λειτουργία βυρσοδεψείων από τον 17ο έως τα μέσα του 20ου αιώνα.

4.2. Ποικιλότητα Βακτηρίων στα δείγματα ιλύος

Η ανάλυση της βακτηριακής ποικιλότητας των ιζημάτων της λίμνης Παμβώτιδας αποκάλυψε την ύπαρξη ενός μεγάλου ποσοστού (50.88%) βακτηριακών αλληλουχιών με χαμηλή ομολογία με αλληλουχίες κατατεθειμένες σε βάσεις δεδομένων. Τα μη καλλιεργούμενα Βακτήρια που ανιχνεύθηκαν στα ιζήματα της λίμνης Παμβώτιδας ανέρχονται στο εντυπωσιακό ποσοστό 84.21%. Θα μπορούσε κανείς να υποστηρίξει πως το μεγάλο ποσοστό αλληλουχιών με χαμηλή ομολογία με τις αλληλουχίες βακτηρίων στην GenBank, οφείλεται σε σφάλματα της PCR. Παρόλο που κάτι τέτοιο φαντάζει απίθανο καθώς πανομοιότυπες αλληλουχίες με χαμηλή ομολογία με ήδη καταχωρημένες αλληλουχίες στην GenBank έχουν απομονωθεί από διαφορετικά δείγματα, προσπαθήσαμε να αποκλείσουμε ακόμη και την πιθανή υποψία λάθους κατά την PCR, μέσω της ανάπτυξης και του χαρακτηρισμού βακτηριακών καλλιεργειών από τα ιζήματα της λίμνης. Όπως αποκαλύφθηκε από τη μελέτη μας, ακόμα και στην

περίπτωση των καλλιεργούμενων Βακτηρίων ο αριθμός των αλληλουχιών 16S rDNA με ομολογία <97% με ήδη γνωστές αλληλουχίες ήταν αυξημένος (13.04%).

Στην παρούσα εργασία ανιχνεύθηκαν 16 βακτηριακές ομάδες. Το μεγαλύτερο ποσοστό αλληλουχιών ανήκει στο φύλο *Proteobacteria* (35.08%) και οι περισσότερες αλληλουχίες (15.79%) συγγενεύουν με την κλάση *β-Proteobacteria*. Αυτή η ομάδα των Βακτηρίων εμφανίζεται σε μεγάλη αφθονία στα οικοσυστήματα γλυκών νερών [121-124] ενώ η αναλογία των διαφορετικών ειδών ποικίλει τόσο μεταξύ διαφορετικών λιμνών όσο και μεταξύ διαφορετικών βαθών και εποχών στο ίδιο οικοσύστημα [26]. Το εύρημά μας συμφωνεί με μελέτες της δομής της βακτηριακής κοινότητας και σε άλλες λίμνες παγκοσμίως όπως η λίμνη Taihu και η λίμνη Geneva [99, 114]. Επίσης, αρκετές ήταν και οι αλληλουχίες που απομονώθηκαν και βρέθηκαν να συγγενεύουν με τα *γ-Proteobacteria* (12.28%). Τα *γ-Proteobacteria* συνήθως βρίσκονται σε αφθονία σε ύδατα με υψηλή αλατότητα παρά σε οικοσυστήματα γλυκού νερού [125, 126]. Επιπλέον θεωρείται ότι μέλη αυτής της ομάδας διασπείρονται από ανθρωπογενείς και ζωικές πηγές [26]. Τρεις αλληλουχίες ταξινομήθηκαν με την κλάση των *α-Proteobacteria* η μια εκ των οποίων φαίνεται να ανήκει στην ομάδα TA, η οποία γενικά αποτελείται από αλληλουχίες που απομονώθηκαν από ανοξικά περιβάλλοντα και σχετίζονται με Βακτήρια που μπορούν να αποδομούν αρωματικές ενώσεις [127]. Τα *Proteobacteria* βρέθηκαν να κυριαρχούν και στους δυο σταθμούς. Ίσοι αριθμοί αλληλουχιών *γ-* και *β-Proteobacteria* ανιχνεύτηκαν στον SS1 ενώ στον SS2 τα *β-Proteobacteria* και τα *Cyanobacteria* ήταν οι κυρίαρχες ομάδες (Παράρτημα, Πίνακας 8.5).

Πληθώρα μελετών αναφέρουν την επικράτηση των *Proteobacteria* στα ιζήματα των λιμνών [99, 114, 128] προτείνοντας ότι συμμετέχουν στις διαδικασίες ιζηματοποίησης [129]. Μεταξύ των *Proteobacteria*, τα *β-Proteobacteria* βρέθηκε να κυριαρχούν στα ιζήματα των λιμνών του οροπεδίου Yunnan [130].

Τμήμα της βακτηριακής κοινότητας των ιζημάτων της λίμνης Παμβώτιδας καταλαμβάνουν και τα *Bacteroidetes*, αλληλουχίες των οποίων ανιχνεύσαμε στα δείγματα ιλύος και στους δυο σταθμούς δειγματοληψίας σε όλες τις εποχές, αλλά και καλλιεργήσαμε από τα δείγματα του καλοκαιριού. Το φύλο *Bacteroidetes* ή *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes* (CFB) χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά υψηλή ποικιλότητα [26] ενώ μέλη του έχουν βρεθεί τόσο στο έδαφος, όσο και σε

υδάτινα περιβάλλοντα. Συνήθως αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια περιόδων οι οποίες χαρακτηρίζονται από αυξημένο διαλυτό οργανικό άνθρακα (DOC), χωρίς όμως να έχουν κάποιο συγκεκριμένο εποχιακά εξαρτώμενο πρότυπο [26, 131]. Επιπλέον, τα *Bacteroidetes* έχουν χαρακτηριστεί ως αποικοδομητές των πολυμερών κυρίως σε ανοξικό περιβάλλον [132, 133]. Η λίμνη Παμβώτιδα είναι μια ευτροφική λίμνη και διαθέτει κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη CFB.

Μια μεγάλη κατηγορία Βακτηρίων αποτελούν τα κυανοβακτήρια, στα οποία ανήκουν 9 από τις αλληλουχίες που ανιχνεύσαμε (15.79%). Πέντε από αυτούς τους κλώνους εμφάνισαν πολύ χαμηλές ομολογίες (79-85%) με αντίστοιχες γνωστές αλληλουχίες.

Αυτές οι αλληλουχίες αντιπροσωπεύουν είτε βενθικά κυανοβακτήρια είτε μορφές πλαγκτονικών κυανοβακτηρίων που διαχειμάζουν στα ιζήματα. Ένα τέτοιο φαινόμενο έχει δειχθεί ότι συμβαίνει στα ιζήματα της λίμνης Erie [134], τα οποία λειτουργούν ως αποθήκη πλαγκτονικών κυανοβακτηριακών κυττάρων. Τα κυανοβακτήρια σε αυτή την περίπτωση μπορούν και επιβιώνουν έχοντας πολύ χαμηλό μεταβολικό ρυθμό και όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες το επιτρέψουν, έχουν τη δυνατότητα να αποικίσουν τη στήλη του νερού.

Σε μια προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας είχαμε χαρακτηρίσει τους κυανοβακτηριακούς πληθυσμούς της λίμνης Παμβώτιδας χρησιμοποιώντας DGGE ανάλυση των ITS τμημάτων (Internal Transcribed Spacer) μεταξύ των 16S και 23S rDNA. Παρατηρήσαμε δυο διαφορετικούς πληθυσμούς κυανοβακτηρίων. Ο ένας χαρακτηρίστηκε ως *Microcystis sp.* και ο άλλος αποτελούνταν από διάφορα νηματοειδή κυανοβακτήρια και σχημάτιζε έναν φυλογενετικά διαφορετικό πληθυσμό από άλλους, παγκοσμίως [62]. Επιπλέον, με βάση τα δεδομένα από τα τμήματα ITS που αλληλουχήθηκαν, τα κυανοβακτηριακά είδη/στελέχη σε δυο άλλες λίμνες της περιοχής, βρέθηκαν να έχουν χαμηλές ομολογίες με άλλες γνωστές ITS αλληλουχίες με εξαίρεση κάποιες που ανήκουν σε γνωστά κοσμοπολίτικα είδη [52]. Αυτές οι παρατηρήσεις μας οδηγούν στο συμπέρασμα πως οι παραπάνω αλληλουχίες ανήκουν σε άγνωστα είδη, τα οποία ίσως είναι ενδημικά σε αυτές τις λίμνες.

Πρόσφατα προτάθηκε πως στην περίπτωση των αλγών η υπόθεση “everything is everywhere” θα πρέπει να καταρριφθεί, από τη στιγμή που οι άλγες δεν είναι ούτε κοσμοπολίτικα ούτε πανταχού παρόντα [135, 136]. Οι χαμηλές ομολογίες στις αλληλουχίες 16S rDNA των κυανοβακτηρίων σε συνδυασμό με τις χαμηλές ομολογίες

στις αλληλουχίες ITS της προηγούμενης μελέτης, ενισχύουν τη θεωρία ότι υποθετικά ενδημικά είδη κυανοβακτηρίων είναι παρόντα στη λίμνη Παμβώτιδα. Επιπλέον, οι συγκεκριμένες αλληλουχίες σχηματίζουν ξεχωριστή ομάδα στο φυλογενετικό δένδρο (Εικόνα 3.3a), την οποία ονομάσαμε “LPCluster” (Lake Pamvotis Cluster).

Τέλος, 6 από τις 57 διαφορετικές βακτηριακές αλληλουχίες που απομονώθηκαν (10.52%) δεν μπορέσαμε να τις εντάξουμε σε γνωστές ομάδες Βακτηρίων και ως εκ τούτου χαρακτηρίζονται ως άγνωστες.

4.3. Ποικιλότητα Αρχαίων στα δείγματα ιλύος

Στην παρούσα μελέτη προχωρήσαμε στην ανάλυση της ποικιλότητας των Αρχαίων στα ιζήματα της λίμνης Παμβώτιδας. Όπως και στα Βακτήρια έτσι και σε αυτή την περίπτωση το ποσοστό αλληλουχιών με ομοιότητα <97% με γνωστές αλληλουχίες 16S rDNA είναι μεγάλο (20.65%) και πολύ μεγαλύτερο το ποσοστό νέων μη καλλιεργούμενων Αρχαίων (95.65%).

Οι περισσότεροι κλώνοι Αρχαίων που ανιχνεύσαμε ανήκουν στα μεθανογόνα (59.78%) και αυτό δείχνει πως η κυριότερη μεταβολική διαδικασία στα επιφανειακά ιζήματα της λίμνης Παμβώτιδας είναι η μεθανογένεση, η οποία έχει αναφερθεί και σε ιζήματα άλλων λιμνών [106]. Τα *Methanomicrobiales* που μεταβολίζουν το μοριακό υδρογόνο σε μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα (hydrogenotrophic) και τα *Mathanosaetaceae* που μεταβολίζουν το οξικό άλας σε μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα (acetotrophic), είναι τα κύρια μεθανογόνα που σχετίζονται με τη μεθανογένεση στη λίμνη Παμβώτιδα.

Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι το 16.30% ανήκει σε “unknown clusters”. Επίσης, περίπου 10% καταλαμβάνουν οι αλληλουχίες που ανήκουν στο MBG-D και στο RC-V. Η ομάδα MBG-D αποτελεί ένα μεγάλο κομμάτι της μικροβιακής κοινότητας σε ιζήματα οικοσυστημάτων με αυξημένη αλατότητα και μαζί με τις ομάδες RC-V και Lake Dagow Sediment (LDS), αντιπροσωπεύουν τον πιο ευρέως κατανομημένο εξελικτικό κλάδο μη καλλιεργούμενων Αρχαίων στα ιζήματα οικοσυστημάτων γλυκών νερών [137]. Η οικολογία αλλά και τα μεταβολικά μονοπάτια που ακολουθούν τα Αρχαία της ομάδας MBG-D παραμένουν άγνωστα. Εικάζεται όμως πως ίσως είναι

αποικοδομητές των συστατικών που απελευθερώνονται από μικροοργανισμούς που αποσυνθέτουν οργανική ύλη [138, 139]. Η ομάδα RC-V αντιπροσωπεύει μη μεθανογόνα αναερόβια Αρχαία [99, 140]. Έχει δειχθεί ότι το RC-V και σε μικρότερο βαθμό η ομάδα LDS εμφανίζουν σαφή γενετική ποικιλότητα και χαρακτηρίζονται από μακρούς εξελικτικούς βραχίονες [137]. Αυτό απεικονίζεται και στο δικό μας φυλογενετικό δέντρο (**Εικόνα 3.6**).

Ένα ακόμη εύρημα της δικής μας μελέτης από τη φυλογενετική ανάλυση είναι πως το σύμπλεγμα LDS φαίνεται να συγγενεύει περισσότερο με το *Candidatus Parvarchaeum acidiphilum* (ARMAN-4) και το σύμπλεγμα “unknown cluster V” φαίνεται να σχετίζεται με το *Micrarchaeum acidiphilum* (ARMAN-2). Τα ARMANS είναι πολύ μικρού μεγέθους Αρχαία (nanosized), τα οποία ανακαλύφθηκαν αρχικά σε όξινο χημειοαυτότροφο φιλμ του ορυχείου Richmond στο Iron Mountain της Καλιφόρνια [102]. Αναπτύσσονται σε συνεργασία με τα *Thermoplasmatales* και περιέχουν διακεκομμένα γονίδια και υψηλό ποσοστό Αδενίνης και Θυμίνης (AT) [102], τα οποία είναι τυπικά χαρακτηριστικά συμβιωτών που εξελίσσονται με γρήγορους ρυθμούς. Θα μπορούσαν τα LDS ή το “unknown cluster V” να αντιπροσωπεύουν οξεόφιλους πολύ μικρού μεγέθους συμβιώτες που να έχουν σχέση με τα *Thermoplasmatales*; Αυτό θα πρέπει να διερευνηθεί. Είναι ενδιαφέρον ότι σύμφωνα με τα διαθέσιμα τμήματα 16S rDNA της παρούσης μελέτης οι αντιπρόσωποι των LDS και “unknown cluster V” χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε AT συγκριτικά με τα ARMANS.

Επιπρόσθετα, μόνο τρεις από τις αλληλουχίες μας βρέθηκαν να μην ανήκουν στα *Euryarchaeota* και να σχετίζονται με τα Miscellaneous *Crenarchaeota* (MCG). Αυτή η παρατήρηση είναι σε συμφωνία με προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες από τη λίμνη Taihu [99], Kivu [116], Wivenhoe [141] και Geneva [114], στις οποίες τα *Euryarchaeota* ήταν κυρίαρχα. Αντίθετα, τα *Crenarchaeota* βρέθηκαν να κυριαρχούν στη λίμνη Hovsgol [142]. Επιπλέον, τα *Crenarchaeota* βρέθηκαν να υπερισχύουν των *Euryarchaeota* στις περισσότερες λίμνες του οροπεδίου Yunnan [130]. Στη φυλογενετική ανάλυση που πραγματοποιήσαμε οι ομάδες MCG φαίνεται να βρίσκονται πιο κοντά εξελικτικά με τα *Korarchaeota/Thaumarchaeota*. Αυτή η διαπίστωση συμφωνεί με προηγούμενες δημοσιευμένες εργασίες που αναφέρουν πως η σύνδεση των MCG και MBG-D με τα *Crenarchaeota* είναι υπό συζήτηση και προτείνεται μια εναλλακτική φυλογενετική σχέση είτε με τα *Thaumarchaeota* είτε με τα *Aigarchaea* [143, 144].

Σε κάθε περίπτωση, το MCG είναι μια ευρέως διαδεδομένη ομάδα, η οποία ανιχνεύεται συχνά σε ανοξικά ενδιαιτήματα [139, 145], τα μέλη της θεωρούνται ετερότροφα αναερόβια και ίσως αντλούν ενέργεια από αναερόβια οξείδωση του μεθανίου στα ιζήματα μεγάλου βάθους [146]. Τα MCG βρέθηκαν να είναι επικρατέστερα στα ενδιάμεσα στρώματα ιλύος στη λίμνη Pavin και η αφθονία τους σχετίζεται με τη μείωση της συγκέντρωσης μεθανίου [106].

Στην παρούσα μελέτη ο πολύ χαμηλός αριθμός αλληλουχιών MCG που ανακτήθηκαν θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα δείγματά μας προέρχονταν από επιφανειακά ιζήματα

4.4. Αφθονία προκαρυωτικών κυττάρων στα δείγματα ιλύος

Από την qPCR ανάλυση που πραγματοποιήσαμε, διαπιστώσαμε ότι στα ιζήματα της λίμνης κυριαρχούν τα Βακτήρια ενώ τα Αρχαία αντιπροσωπεύουν το 11.13%-23.88% του συνολικού αριθμού προκαρυωτικών κυττάρων. Τα δεδομένα μας συμφωνούν με ορισμένες μελέτες οι οποίες δείχνουν πως τα Αρχαία αποτελούν σημαντικό τμήμα της προκαρυωτικής κοινότητας στα ιζήματα γλυκών νερών. Στα ιζήματα της λίμνης Pavin, η qPCR ανάλυση αποκάλυψε πως τα Αρχαία αποτελούν το 5-18% της προκαρυωτικής κοινότητας [106], ενώ στα ιζήματα της λίμνης Taihu, τα αντίγραφα 16SrDNA των Αρχαίων κυμαίνονταν από 14.7%-96.9% [99]. Αυτό αποτελεί ένα πολύ μεγάλο ποσοστό, παρόλο που παλαιότερα είχε διατυπωθεί η άποψη πως τα Αρχαία αντιπροσωπεύουν μόνο ένα πολύ μικρό τμήμα της προκαρυωτικής κοινότητας στα ιζήματα (περ.1%) [147]. Σε γενικές γραμμές τα Αρχαία είναι κυρίαρχα σε επιφανειακά ιζήματα βαθιών θαλάσσιων οικοσυστημάτων και αλμυρών λιμνών [99, 106, 145, 148, 149].

4.5. Σχέσεις μεταξύ φυσικοχημικών παραμέτρων, αφθονίας και ποικιλότητας Βακτηρίων και Αρχαίων (δείγματα ιλύος)

Στην παρούσα μελέτη, προσπαθήσαμε να απαντήσουμε στο ερώτημα εάν υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ των φυσικοχημικών παραμέτρων της ιλύος και της αφθονίας

ή/και της ποικιλότητας Βακτηρίων και Αρχαίων. Σύμφωνα με την ανάλυση συσχέτισης που πραγματοποιήσαμε, φαίνεται πως ο πληθυσμός των Βακτηρίων επηρεάζεται θετικά σε μεγάλο βαθμό από τις συγκεντρώσεις TKN και Ca^{2+} και αρνητικά από τις συγκεντρώσεις Ni, Cr και τις τιμές pH, ενώ ο πληθυσμός των Αρχαίων επηρεάζεται θετικά από τις συγκεντρώσεις TOC, Ca^{2+} και As και αρνητικά από τις συγκεντρώσεις Ni, Cr και τις τιμές pH και μάλιστα σε μεγαλύτερο βαθμό από τα Βακτήρια.

Τα επίπεδα συγκέντρωσης του ασβεστίου φαίνεται να επηρεάζουν θετικά και τους δυο πληθυσμούς. Έτσι, μπορούμε να υποθέσουμε πως υπάρχει μια πιθανή προτίμηση των προκαρυωτικών κοινοτήτων της λίμνης Παμβώτιδας σε περιβάλλον με υψηλή περιεκτικότητα ασβεστίου. Αυτό είναι πιθανό καθώς τέτοια χαρακτηριστικά υπάρχουν στα ιζήματα της λίμνης από την εποχή του σχηματισμού της καθώς αυτή περιβάλλεται από ασβεστολιθικά πετρώματα.

Στην περίπτωση των θρεπτικών συστατικών, το TKN φαίνεται να επηρεάζει θετικά περισσότερο τον πληθυσμό των Βακτηρίων, ενώ το TOC περισσότερο τον πληθυσμό των Αρχαίων. Έτσι μπορούμε να υποθέσουμε πως τα Βακτήρια είναι κυρίως υπεύθυνα για τον κύκλο του αζώτου στα ιζήματα της λίμνης Παμβώτιδας. Αντίθετα τα Αρχαία ίσως παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση του άνθρακα. Αυτή η υπόθεση ενισχύεται από το γεγονός ότι στον σταθμό δειγματοληψίας 2 ο οποίος έχει μεγαλύτερες τιμές TC και TOC από τον σταθμό δειγματοληψίας 1, οι φυλότυποι των μεθανογόνων είναι πολύ περισσότεροι. (Παράρτημα, Πίνακας 8.7). Σε κάθε περίπτωση, για να μπορέσει να στηριχτεί αυτή η υπόθεση θα πρέπει να γίνει μελέτη των λειτουργικών γονιδίων Βακτηρίων και Αρχαίων που είναι υπεύθυνα για τον μεταβολισμό του αζώτου και του άνθρακα [150, 151].

Σχετικά με τα βαρέα μέταλλα, είναι εντυπωσιακή η θετική επίδραση που έχει το αρσενικό στις αφθονίες Βακτηρίων και Αρχαίων και ιδιαίτερα στον αριθμό των Αρχαίων. Αυτή η θετική επίδραση μπορεί να σχετίζεται με την επικράτηση μικροβίων ανθεκτικών στο αρσενικό στα ιζήματα της λίμνης και ιδιαίτερα στον σταθμό 2. Το σύστημα γονιδίων το οποίο κωδικοποιεί για την αναγωγή του αρσενικού (*arsC* gene) είναι απαραίτητο για την ανθεκτικότητα στο αρσενικό και φαίνεται να είναι φυλογενετικά διαδεδομένο. Η φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών *arsC* δείχνει την πρώιμη προέλευση του γονιδίου [152]. Μια συγκριτική μελέτη της αφθονίας των

arsC γονιδίων στα Βακτήρια και στα Αρχαία στα ιζήματα της λίμνης Παμβώτιδας θα πρέπει να πραγματοποιηθεί για να για να στηριχθεί αυτή η υπόθεση.

Σε αντίθεση με το As, το νικέλιο και το χρώμιο έχουν αρνητική επίδραση στους δυο πληθυσμούς και ιδιαίτερα στα Αρχαία. Δεδομένου ότι τα γονίδια μεταβολισμού και ανθεκτικότητας στα μέταλλα είναι ευρέως διαδεδομένα στα Βακτήρια και στα Αρχαία [153-155], η διαφορετική επίδραση του As και των Ni και Cr στις αφθονίες των προκαρυωτικών οργανισμών στη λίμνη Παμβώτιδα αποτελούν μυστήριο. Μια πιθανή εξήγηση για τη θετική επίδραση του As είναι ίσως η χρονική διάρκεια της έκθεσης. Φαίνεται πιθανό οι προκαρυωτικοί πληθυσμοί να αναγκάστηκαν να επιβιώσουν περισσότερο καιρό στο αρσενικό απ' ότι στο Ni ή στο Cr και αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την προσαρμογή των Βακτηρίων και των Αρχαίων στο αρσενικό. Επιπλέον αποτελεί ενδιαφέρον ότι οι τιμές νικελίου ξεπερνούν το όριο PEC στα ιζήματα της λίμνης, ενώ οι τιμές χρωμίου ξεπερνούν το όριο TEC σε όλες τις εποχές δειγματοληψίας και οι τιμές για το As δεν ξεπερνούν ούτε το όριο TEC ούτε το όριο PEC (Παράρτημα, Πίνακας 8.1).

Όσον αφορά το pH, τα δεδομένα από τη βιβλιογραφία είναι ιδιαίτερα αντιφατικά και περίπλοκα. Πρόσφατα [156], δυο διακριτές και αντίθετες επιδράσεις του pH στην αφθονία των Αρχαίων διαπιστώθηκαν σε καλλιεργήσιμο έδαφος. Σε τιμές pH 4.0-4.7 δεν υπήρξε κάποια συσχέτιση, αλλά πάνω από αυτό το όριο η αφθονία των Αρχαίων μειώθηκε κατά 4 φορές, ενώ ελαχιστοποιήθηκε σε τιμές pH 5.1-5.2. Η κατάσταση αυτή αντιστρέφεται σε τιμές pH από 5.2-8.0, όπου η αφθονία των Αρχαίων βρέθηκε ότι αυξάνεται 150 φορές. Αυτά τα δεδομένα βρίσκονται σε αντίθεση με τα δικά μας αποτελέσματα, όπου οι υψηλότερες τιμές pH στον SS1 σχετίζονται με χαμηλές αφθονίες Αρχαίων (Πίνακας 3.1, Παράρτημα Πίνακας 8.1).

Είναι γνωστό ότι το pH του εδάφους επηρεάζει τη χημική σύσταση, τη συγκέντρωση και τη διαθεσιμότητα διάφορων υποστρωμάτων [157] και αποτελεί σημαντικό καθοριστικό παράγοντα της δομής της προκαρυωτικής κοινότητας [158]. Ήταν γενικώς αποδεκτό πως χαμηλές τιμές pH μειώνουν την ανάπτυξη και τη δραστηριότητα των Ammonia Oxidizers μέσω ιονισμού του NH_3 σε NH_4^+ το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της διάχυσης του NH_3 [159]. Όμως, η ποσοτικοποίηση μέσω qPCR των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* έδειξε αντίθετες επιδράσεις του pH στην αφθονία *amoA* Βακτηρίων και Αρχαίων [160]. Η αύξηση του pH του εδάφους, επηρεάζει

αρνητικά την αφθονία των γονιδίων *amoA* των Αρχαίων ενώ η αφθονία των γονιδίων *amoA* των Βακτηρίων δεν επηρεάζεται τόσο πολύ [160]. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να σημαίνει πως η χαμηλή αφθονία των Αρχαίων στον σταθμό με τις υψηλότερες τιμές pH (SS1), μπορεί να συμβαίνει λόγω του χαμηλού αριθμού των AOA (Ammonia Oxidizing Archaea) σε αυτόν τον σταθμό. Δυστυχώς, στη συγκεκριμένη εργασία δεν μετρήσαμε τον αριθμό των γονιδίων *amoA* των Βακτηρίων και των Αρχαίων, οπότε η πιθανή συσχέτιση των *amoA* γονιδίων με το pH απομένει να διερευνηθεί. Επιπλέον, τα AOA βρέθηκαν να κυριαρχούν έναντι των AOB στα ιζήματα της ολιγοτροφικής λίμνης Superior, ενώ συμβαίνει το αντίθετο στη μεσοτροφική λίμνη Erie [161]. Συμπερασματικά, φαίνεται απίθανο αυτές οι διαφορές στις αφθονίες Αρχαίων μεταξύ των δυο σταθμών να μπορούν να αποδοθούν μόνο σε διαφορές στις αφθονίες των AOA, αφού ο SS1 με τις υψηλότερες τιμές pH έχει λιγότερο οργανικό φορτίο, οπότε θα αναμέναμε μεγαλύτερο αριθμό AOA. Από την άλλη μεριά, δεν ανιχνεύσαμε καμία αλληλουχία δυνητικών AOA όπως είναι τα *Thaumarchaeota* 1.1a, 1.1b [162].

Επιπλέον, το pH είναι γνωστό ότι επηρεάζει και τη μεθανογένεση. Σε ήπιες όξινες συνθήκες (pH 6.5) παρεμποδίζεται η acetoclastic μεθανογένεση (*Methanosaetaceae*), σε αντίθεση με τη hydrogenotrophic μεθανογένεση (*Methanomicrobiales*) που επηρεάζεται ελάχιστα [163]. Δεδομένου ότι οι περισσότεροι φυλότυποι Αρχαίων που απομονώθηκαν ανήκουν στα μεθανογόνα, η μεγαλύτερη αφθονία Αρχαίων στον σταθμό με το χαμηλότερο pH (SS2), θα μπορούσε να αποδοθεί στην επικράτηση των hydrogenotrophic μεθανογόνων. Ακόμη, οι περισσότερες αλληλουχίες που συγγενεύουν με το *Methanoregula boonei* [164], ένα αποκλειστικά hydrogenotrophic αρχαίο, έχουν απομονωθεί από τον SS2. Με βάση τα δεδομένα μας, (Παράρτημα, Πίνακας 8.7) αντιπρόσωποι του RC-V είναι περισσότεροι στον SS2 απ' ό τι στον SS1 και αφού τα RC-V φαίνεται πως δεν ανήκουν στα μεθανογόνα, μπορούμε να υποθέσουμε πως δεν υπάρχει μια απλή αρνητική σχέση μεταξύ του pH και της αφθονίας των μικροβίων στα ιζήματα.

Συμπερασματικά, διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες έχουν χαρακτηριστεί ως καθοριστικοί για τη δομή της προκαρυωτικής κοινότητας όπως το pH [158] και τα βαρέα μέταλλα [165]. Το νιτρικό άζωτο επηρέασε αρνητικά τη βακτηριακή ποικιλότητα στις λίμνες του οροπεδίου Yunnan ενώ η κοινότητα των Αρχαίων δεν ήταν ευαίσθητη στους περιβαλλοντικούς παράγοντες που εξετάστηκαν [130]. Με βάση τις διαφορές στις περιβαλλοντικές παραμέτρους που προσδιορίστηκαν μεταξύ των δυο

σταθμών δειγματοληψίας στη λίμνη Παμβώτιδα και τους ίσους αριθμούς των βακτηριακών αλληλουχιών μεταξύ των δυο σταθμών, φαίνεται ότι η βακτηριακή ποικιλότητα δεν είναι ευαίσθητη σε αυτούς τους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Αντίθετα, η ποικιλότητα των Αρχαίων ήταν μεγαλύτερη στον SS2 (Παράρτημα, Πίνακας 8.7). Χαμηλότερες τιμές pH, Ni και Cr σε συνδυασμό με υψηλότερες συγκεντρώσεις As και TC είναι οι βασικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες που χαρακτηρίζουν τον SS2 συγκριτικά με τον SS1. Αυτοί οι παράγοντες φαίνεται να δρουν καθοριστικά στην ποικιλότητα των Αρχαίων. Σημαντική μείωση της μικροβιακής ποικιλότητας και ειδικότερα των Αρχαίων λόγω της μόλυνσης από μέταλλα έχει δειχθεί στα ιζήματα [115]. Επιπλέον, σε ρηχά υδάτινα οικοσυστήματα με υψηλό As, μια μείωση της συγκέντρωσης As, μετατοπίζει τους κυρίαρχους πληθυσμούς Αρχαίων από *Thaumarchaeota* σε *Euryarchaeota* [166]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και τα δικά μας αποτελέσματα, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η μειωμένη ποικιλότητα Αρχαίων στον SS1 συγκριτικά με τον SS2 μπορεί να αποδοθεί στις υψηλές συγκεντρώσεις Ni και Cr σε αυτόν τον σταθμό. Επομένως, φαίνεται πως ο συνδυασμός υψηλότερων επιπέδων As και TC και χαμηλότερων τιμών pH στον SS2 (Παράρτημα, Πίνακας 8.1) ίσως ευθύνεται για την αυξημένη ποικιλότητα των μεθανογόνων και RC-V αντιπροσώπων σε αυτόν τον σταθμό.

Αναλύοντας τη δομή και την ποικιλότητα της μικροβιακής κοινότητας, δεν υπάρχουν εμφανείς διαφορές μεταξύ των δυο σταθμών, σε σχέση με τους κυρίαρχους βακτηριακούς φυλότυπους (Παράρτημα, Πίνακας 8.5). Αντίθετα, με βάση τους φυλότυπους των Αρχαίων, περισσότερους αντιπροσώπους μεθανογόνων και RC-V συναντούμε στον SS2 σε σχέση με τον SS1 (Παράρτημα, Πίνακας 8.7). Συνολικά, η ποικιλότητα των Αρχαίων στα ιζήματα της λίμνης Παμβώτιδας υπερισχύει της ποικιλότητας των Βακτηρίων. Όμως οι αριθμητικές διαφορές μεταξύ Βακτηρίων και Αρχαίων δεν είναι ξεκάθαρες. Κάποιες πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν μεγαλύτερη ποικιλότητα Βακτηρίων στα ιζήματα λιμνών [99, 142], ενώ άλλες υποδεικνύουν το αντίθετο [167, 168].

4.6. Φυσικοχημικές αναλύσεις νερού

Οι τιμές των φυσικοχημικών παραμέτρων που μετρήθηκαν στην παρούσα μελέτη και αφορούν στη στήλη του νερού της λίμνης Παμβώτιδας, συμφωνούν με αυτές που έχουν ήδη δημοσιευθεί [57, 62]. Σύμφωνα με τον Πίνακα 8.2 (Παράρτημα, Πίνακας 8.2) δεν παρατηρούνται μεγάλες διαφορές μεταξύ των σταθμών δειγματοληψίας.

Οι τιμές διαλυμένου οξυγόνου (D.O.) δείχνουν πως υπάρχει διαστρωμάτωση μεταξύ επιφάνειας και πυθμένα την άνοιξη και το καλοκαίρι, ενώ το χειμώνα η διαστρωμάτωση αυτή παύει να υφίσταται. Οι χαμηλές τιμές D.O. κυρίως το καλοκαίρι στον πυθμένα τη λίμνης, μπορούν να εξηγηθούν με την υπόθεση πως το οξυγόνο καταναλώνεται εξαιτίας της έντονης διαδικασίας αποσύνθεσης την εποχή αυτή [57].

Οι συγκεντρώσεις φωσφόρου στη λίμνη επηρεάζονται από τις εισροές, την έντονη εμφάνιση αλγών καθώς και της επαναιώρησης των ιζημάτων. Κατά τη διάρκεια της θερινής περιόδου, το χαμηλό D.O. και οι υψηλές τιμές pH στον πυθμένα ευνοούν τις διαδικασίες απελευθέρωσης φωσφόρου από το ίζημα (internal loading process) [57].

Υψηλές συγκεντρώσεις NH_4^+ εμφανίζονται κυρίως στον πυθμένα της λίμνης και οι μεγαλύτερες τιμές εντοπίζονται το φθινόπωρο, πιθανότατα λόγω αυξημένων εισροών στη λίμνη. Μια επίσης μεγάλη συγκέντρωση σημειώνεται στον πυθμένα του σταθμού 2 το καλοκαίρι, λόγω της αποικοδόμησης του οργανικού φορτίου [57, 62].

4.7. Ποικιλότητα Βακτηρίων στα δείγματα νερού

Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς αποκάλυψε πως τα φύλα των Βακτηρίων που κυριαρχούν στο νερό της λίμνης Παμβώτιδας είναι τα *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Bacteroidetes* και *Chloroflexi* καθώς και “unclassified” Βακτήρια.

Με βάση τις βιβλιογραφικές αναφορές, πέντε φύλα Βακτηρίων είναι πιο συχνά στο νερό των λιμνών: *Proteobacteria* (β -*Proteobacteria* κυρίως), *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Verrucomicrobiota*. Επιπλέον, 16 ακόμα φύλα που αντιπροσωπεύουν περίπου το 2.6% όλων των αλληλουχιών περιλαμβάνουν τα

Acidobacteria, *BRC1*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Fibrobacteres*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Nitrospirae*, *OD1*, *OP10*, *Planctomycetes*, *Spirochaetes*, *SRI* και *TM7*. Τέλος, μεγάλο ποσοστό των αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε Βακτήρια του γλυκού νερού αντιπροσωπεύουν τα "unclassified" Βακτήρια [26].

Σύμφωνα με τα δικά μας αποτελέσματα, τα φύλα *Proteobacteria* και *Actinobacteria* εντοπίστηκαν σχεδόν σε όλες τις εποχές και τους σταθμούς δειγματοληψίας της λίμνης Παμβώτιδας. Μεγαλύτερα ποσοστά *Protobacteria* ανιχνεύθηκαν το καλοκαίρι και αντιπρόσωποι όλων των κλάσεων (α -, β -, γ -, δ -) εντοπίζονται μόνο το φθινόπωρο ενώ μεγαλύτερα ποσοστά *Actinobacteria* ανιχνεύθηκαν τον χειμώνα. Το καλοκαίρι στην επιφάνεια της λίμνης φαίνεται να κυριαρχεί και το φύλο *Planctomycetes*, το οποίο είναι ελάχιστα μελετημένο και μέλη του ίσως να συμβάλουν στην αποικοδόμηση των υδατανθράκων που προέρχονται από το φυτοπλαγκτόν. Ακόμη, σε ποσοστό περίπου 15% ανιχνεύσαμε "unclassified" Βακτήρια στη επιφάνεια της λίμνης τον χειμώνα.

Στη λίμνη Taihu, κυριαρχούν τα *Cyanobacteria*, *Proteobacteria* και *Actinobacteria* στο νερό ενώ τα *Proteobacteria*, *Chloroflexi* και *Verrucomicrobiota* κυριαρχούν στα ιζήματα [169]. Στην αλπική υφάλμυρη λίμνη Chaiworu, από την οποία ανιχνεύτηκαν 35 βακτηριακοί φυλότυποι, βρέθηκε να επικρατούν τα *Proteobacteria* (α -, β -, γ -, δ -, ϵ -) σε ποσοστό 58.1% και τα *Cyanobacteria* σε ποσοστό 17.2% [170]. Το φύλο *Actinobacteria* σε ποσοστό περίπου 30% ήταν το κυρίαρχο στο επιφανειακό νερό της ολιγοτροφικής λίμνης Κίνυ, ενώ διαπιστώθηκε πως ο αριθμός των βακτηριακών OTUs αυξάνεται με το βάθος [171]. Τα *Proteobacteria*, *Actinobacteria* και *Bacteroidetes* αποτελούν το 97% της βακτηριακής αφθονίας στις λίμνες Batak και Tsankov Kamav στη Βουλγαρία. Ανιχνεύτηκαν συνολικά 1999 OTUs Βακτηρίων και τα *Proteobacteria* αποτελούσαν το 70-86.6% των συνολικών βακτηριακών κοινοτήτων [172].

Τα *Proteobacteria* αποτελούν το πιο συχνό και το πιο σημαντικό τμήμα των βακτηριακών κοινοτήτων. Αριθμούν το 60-70% των απομονωμένων στελεχών από υδάτινα οικοσυστήματα γλυκών νερών [172]. Τα *Actinobacteria* αποτελούν κοσμοπολίτικο φύλο που συναντάται σε όλα τα οικοσυστήματα γλυκών νερών. Αριθμητικά συνήθως συνεπικρατούν στις λίμνες μαζί με τα *Proteobacteria*. Μπορούν να αποφεύγουν τη θήρευση λόγω του πολύ μικρού μεγέθους τους. Η αφθονία τους

μειώνεται με τη μείωση του διαλυμένου οξυγόνου και φαίνεται να συμμετέχουν στην αποικοδόμηση του οργανικού υλικού [26, 172].

Μερικές αλληλουχίες που προκαλούν ιδιαίτερο ενδιαφέρον από τα δικά μας αποτελέσματα είναι το Otu0006 που ανιχνεύθηκε την άνοιξη σε όλα τα δείγματά μας, το Otu0037 το οποίο ανιχνεύθηκε στην επιφάνεια όλων των σταθμών σε όλες τις εποχές εκτός από το καλοκαίρι και το Otu0004 το οποίο εντοπίστηκε την επιφάνεια των σταθμών το φθινόπωρο και τον χειμώνα.

Πιο συγκεκριμένα, η ταξινομική ομάδα 0006 ανήκει στο γένος *Synechococcus*. Τα *Synechococcus sp.* είναι αντιπρόσωποι κυανοβακτηρίων, ευρέως διαδεδομένων στο θαλάσσιο περιβάλλον ενώ τα τελευταία χρόνια ανιχνεύθηκαν και σε λιμναία οικοσυστήματα. Αποτελούν φωτοαυτότροφα κυανοβακτήρια και αποικίζουν κυρίως την ευφωτική ζώνη των οικοσυστημάτων. Έχουν βρεθεί όμως και σε βαθύτερα στρώματα λιμνών εμφανίζοντας μειωμένο μεταβολικό ρυθμό. Μετά από φυλογενετική μελέτη του 16S rDNA έχουν χαρακτηριστεί ως “polyphyletic”, ενώ σύμφωνα με οικολογικού περιεχομένου μελέτες φαίνεται να παρουσιάζουν τη δυνατότητα εύκολης προσαρμογής και ανάπτυξης σε διαφορετικά περιβάλλοντα [173].

Παρατηρώντας τα OTUs των κυανοβακτηρίων (*Cyanobacteria*) διαπιστώσαμε πως στη λίμνη Παμβώτιδα συμβαίνουν δυο ανθίσεις (blooms). Μια την άνοιξη όπου κυριαρχεί το γένος *Synechococcus* (Otu0006) και μια το καλοκαίρι στην οποία κυριαρχούν τα γένη *Microcystis* (Otu0021) και *Planktothrix* (Otu0371). Αυτό είναι ένα εύρημα που αναφέρεται για πρώτη φορά.

Τα κυανοβακτήρια συνυπάρχουν και αλληλεπιδρούν με ετερότροφα Βακτήρια που απαντώνται στα υδάτινα οικοσυστήματα. Εφοδιάζουν τα ετερότροφα Βακτήρια με απαραίτητα για την ανάπτυξή τους υποστρώματα όπως οργανικές ενώσεις και άζωτο. Τα βακτηριακά φύλα *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Thermomicrobiota* είναι πολύ συχνά συνοδά φύλα αυτών [174, 175].

Συνεχίζοντας, η ταξινομική ομάδα 0037 ανήκει στα α -*Proteobacteria* και συγκεκριμένα στην ομάδα LD12, η οποία είναι η πιο ευρέως διαδεδομένη ομάδα (alfIV εξελικτικός κλάδος) στα οικοσυστήματα γλυκού νερού. Όμως δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες σχετικά με την οικολογία και τον λειτουργικό τους ρόλο, παρόλο που

έχουν ανιχνευθεί σε λίμνες σε όλο τον κόσμο. Πρόσφατη φυλογενετική μελέτη φανέρωσε μικρή ποικιλότητα των αντιπροσώπων της ομάδας αυτής [26].

Τέλος, η ταξινομική ομάδα 0004 ανήκει στην κλάση *β-Proteobacteria* και στο γένος *Limnohabitans*. Το γένος αυτό περιλαμβάνει 4 είδη που αντιπροσωπεύουν πλαγκτονικά Βακτήρια τα οποία αναπτύσσονται στα οικοσυστήματα γλυκών νερών. Ο πρώτος αντιπρόσωπος του γένους απομονώθηκε το 2010 από το νερό της λίμνης Mondsee (Αυστρία) και κατατάσσεται στην οικογένεια *Comamonadaceae* [176].

Ενδιαφέρον προκαλούν τα μεγάλα ποσοστά OTUs που εμφανίζονται με χαμηλές ομολογίες με άλλες γνωστές αλληλουχίες, γεγονός που υποδηλώνει πως νέα είδη/στελέχη Βακτηρίων απαντώνται στο νερό της λίμνης Παμβώτιδας. Για παράδειγμα, 13 αλληλουχίες βρέθηκαν να κυριαρχούν (>4%) το καλοκαίρι στο νερό της λίμνης από τις οποίες οι 6 εμφανίζουν χαμηλά ποσοστά ομολογίας (93%-96%) με άλλες γνωστές αλληλουχίες. Το φθινόπωρο αντίστοιχα, δυο από τις 5 κυρίαρχες αλληλουχίες που ανιχνεύσαμε έχουν χαμηλό ποσοστό ομολογίας (92%-94%) με άλλες αλληλουχίες ήδη γνωστές ενώ τον χειμώνα οι αλληλουχίες που ανήκουν σε νέα είδη/στελέχη είναι 2 από τις 11 κυρίαρχες που ανιχνεύσαμε συνολικά. Όμως τον χειμώνα ανιχνεύουμε και μεγάλα ποσοστά “unclassified” Βακτηρίων (9%-15%) με κάποια να εμφανίζουν ποσοστά ομολογίας ιδιαίτερα χαμηλά (85%-87%).

4.8. Αφθονία προκαρυωτικών κυττάρων στα δείγματα νερού

Όπως στα δείγματα ιλύος, έτσι και στα δείγματα νερού πραγματοποιήσαμε qPCR ανάλυση για να δούμε ποιο ποσοστό της μικροβιακής κοινότητας καταλαμβάνουν τα Βακτήρια και ποιο τα Αρχαία. Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.3 στο νερό της λίμνης Παμβώτιδας κυριαρχούν τα Βακτήρια ενώ τα Αρχαία αποτελούν το 0.14%-9.77% του συνολικού αριθμού προκαρυωτικών κυττάρων.

Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με τα ευρήματα άλλων μελετών σε νερά λιμνών, όπου φαίνεται πως οι πληθυσμοί των Αρχαίων καταλαμβάνουν κατά μέσο όρο το 1% των μικροβιακών κοινοτήτων, με τις υψηλότερες αφθονίες να καταγράφονται τους ψυχρούς μήνες κατά τους οποίους υπάρχει αύξηση του TOC [177]. Η μελέτη μικροβιακών κοινοτήτων σε δυο ρηχές λίμνες στην Ολλανδία έδειξε πως τα Βακτήρια

αποτελούν το 70-80% των προκαρυωτικών κοινοτήτων στο νερό με τα μεγαλύτερα ποσοστά να καταγράφονται την άνοιξη. Σε αντίθεση, οι μεγαλύτερες αφθονίες Αρχαίων μετρήθηκαν το χειμώνα [178].

Στη λίμνη Παμβώτιδα, ο πυθμένας του σταθμού 2 εμφανίζει μεγαλύτερα ποσοστά Αρχαίων (cell number) συγκριτικά με τον σταθμό 1 σχεδόν σε όλες τις εποχές του έτους, πιθανώς λόγω του μεγαλύτερου βάθους και των ανοξικών συνθηκών που επικρατούν.

Γενικά, αυξημένη προκαρυωτική αφθονία και ποικιλότητα ανιχνεύεται στα ιζήματα σε σχέση με το νερό και η βακτηριακή αφθονία είναι μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή των Αρχαίων [179].

4.9.Μεταβολικό αποτύπωμα των Βακτηρίων του νερού της λίμνης Παμβώτιδας

Οι βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τη μελέτη του μεταβολικού αποτυπώματος των Βακτηρίων σε υδάτινα οικοσυστήματα γλυκών νερών είναι εξαιρετικά περιορισμένες. Οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στο μεταβολικό προφίλ των Βακτηρίων του εδάφους αλλά και των θαλάσσιων οικοσυστημάτων.

Γενικότερα οι προσεγγίσεις που βασίζονται σε καλλιέργειες όπως το BIOLOG, χρησιμοποιούνται για την κατανόηση του βιοχημικού δυναμικού αλλά δεν προσφέρουν πληροφορίες σχετικά με την ποικιλότητα των μικροβιακών κοινοτήτων στα οικοσυστήματα [180].

Σχετικά με τα υποστρώματα που μεταβολίζονται από τις βακτηριακές κοινότητες της λίμνης Παμβώτιδας, οι υδατάνθρακες καταναλώνονται κυρίως στα μέσα και στο τέλος της καλοκαιρινής περιόδου, δηλαδή σε ζεστές περιβαλλοντικές συνθήκες και μετά την άνθιση των κυανοβακτηρίων. Η καταστροφή και η αποδόμηση των κυτάρων απελευθερώνουν υδατάνθρακες στο νερό [181]. Παραδείγματα υδατανθράκων που συναντώνται συχνά στα υδάτινα οικοσυστήματα και συμφωνούν με τα δικά μας ευρήματα, αποτελούν η N-acetyl-D-glycosamine (NAG) η οποία είναι βασικό στοιχείο των δομικών πολυμερών (χιτίνη) Βακτηρίων, αλγών, ζωοπλαγκτού, μυκήτων και η D-cellobiose η οποία επίσης αποτελεί δομικό στοιχείο των αλγών [182]. Επιπλέον, τα

Βακτήρια που είναι υπεύθυνα για την κατανάλωση χιτίνης και NAG είναι τα *Bacteroidetes* [182, 183], τα οποία απαντώνται στο νερό της λίμνης Παμβώτιδας σε ποσοστό περίπου 3%. Σύμφωνα με τους Cottrell και συνεργάτες, τα β -, γ -*Proteobacteria* καταναλώνουν επίσης NAG αλλά περισσότερο πρωτεΐνες και αμινοξέα, ενώ τα α -*Proteobacteria* καταναλώνουν περισσότερο αμινοξέα [183]. Στο νερό της λίμνης Παμβώτιδας απαντώνται α -*Proteobacteria* (9-17%), β -*Proteobacteria* (4-12%) και γ -*Proteobacteria* (10-30%).

Τα Βακτήρια της επιφάνειας της λίμνης Παμβώτιδας φαίνεται να μεταβολίζουν κυρίως *a*-Ketobutyric acid το οποίο αποτελεί ένα από τα προϊόντα διάσπασης της θρεονίνης, παράγεται από τη διάσπαση της ομοκυστεΐνης και τον καταβολισμό της μεθειονίνης. Επίσης σαν υποστρώματα το Glycogen και glucose-1-phosphate που είναι το πρώτο προϊόν κατά τον καταβολισμό του γλυκογόνου.

Ενδιαφέρον αποτελούν οι ενώσεις Tween 40 και Tween 80 οι οποίες χρησιμοποιούνται από τα Βακτήρια του πυθμένα της λίμνης. Οι ενώσεις αυτές αποτελούν συντηρητικά τροφίμων και συστατικά καλλυντικών και περιέχουν μακριές αλυσίδες λιπαρών οξέων.

Σύμφωνα λοιπόν με τα αποτελέσματα από τη μελέτη του βιοχημικού προφίλ των Βακτηρίων της λίμνης Παμβώτιδας, φαίνεται πως ο πυθμένας της λίμνης είναι πλούσιος σε οργανικό φορτίο και αποτελεί δεξαμενή ανακύκλωσης οργανικού υλικού.

4.10.Μελέτη κυτταροτοξικότητας βακτηριακών/ κυανοβακτηριακών εκχυλισμάτων

Πολλά βιοδραστικά φυσικά μόρια έχουν απομονωθεί από Βακτήρια τα τελευταία χρόνια. Μερικές ενώσεις έχουν ιατρικό/φαρμακολογικό ενδιαφέρον καθώς εμφανίζουν αντιμικροβιακές, αντιμυκητιακές, αντιαρτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες [184-186].

Υπολογίζεται ότι >60% των χημειοθεραπευτικών μορίων που έχουν εγκριθεί ή βρίσκονται σε τελευταίο στάδιο ανάπτυξης προέρχονται από φυσικές πηγές [187, 188]. Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον για την ανίχνευση βιοδραστικών παραγόντων έχει εστιαστεί στο θαλάσσιο περιβάλλον.

Ιδιαίτερα για τα κυανοβακτήρια, η αυξημένη ποικιλότητα των βιοδραστικών μορίων που παράγονται από αυτά, οφείλεται στο ευρύ φάσμα των δευτερογενών μεταβολιτών

το οποίο περιλαμβάνει 40.2% λιποπεπτίδια, 5.6% αμινοξέα, 4.2% λιπαρά οξέα, 4.2% μακρολίδια, 9.4% αμίνες και άλλα [189].

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες των κυανοβακτηρίων προκαλούν βλάβες στα κύτταρα με διάφορους μηχανισμούς. Ενδεικτικά αναφέρουμε την μεταβολή του κυτταρικού κύκλου, τη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, το οξειδωτικό στρες, τις αλλαγές στο μονοπάτι των κασπασών, τις μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες Bcl-2. Βλάβες στα παραπάνω μονοπάτια οδηγούν το κύτταρο κυρίως προς απόπτωση [190].

Για παράδειγμα, η κουρακίνη A (Curacin A), που φαίνεται να έχει κυτταροτοξικές ιδιότητες έναντι των καρκινικών κυττάρων και η απρατοξίνη A (Apratoxin A), που αναστέλλει την ανάπτυξη καρκίνου του εντέρου, έχουν απομονωθεί από τα θαλάσσια κυανοβακτήρια *L.majuscula* και *Lyngbya sp.* αντίστοιχα. Συνθετικά ανάλογα της δολαστατίνης 10 (Dolastatin 10) από το κυανοβακτήριο *Symploca sp.* (Ινδικός Ωκεανός) είναι σε διάφορες φάσεις κλινικών δοκιμών για τη θεραπεία αιματολογικών καρκίνων [187].

Λίγες είναι οι μελέτες που αφορούν την ανίχνευση κυτταροτοξικών/αντινεοπλασματικών παραγόντων από κυανοβακτήρια υδάτινων οικοσυστημάτων γλυκού νερού. Οι περισσότερες μελέτες εστιάζουν στις περιβαλλοντικές επιπτώσεις των τοξινών που παράγονται από τα κυανοβακτήρια ή στην αντιμικροβιακή δράση αυτών των τοξινών.

Υπάρχουν ελάχιστες αναφορές πως κυανοβακτήρια του γένους *Microcystis*, *Cyanobium*, *Synechococcus*, *Leptolyngbya*, *Pseudanabaena* και *Romeria* παράγουν βιοδραστικούς παράγοντες με πιθανή αντινεοπλασματική δράση [187, 191].

Οι Ivanka Teneva και συνεργάτες, μελέτησαν εκχυλίσματα από το κυανοβακτήριο γλυκού νερού *Lyngbya aeruginoso-coerulea*. Μεθανολικά εκχυλίσματα συγκέντρωσης 15mg/mL δοκιμάστηκαν σε ποντίκια αλλά και σε διάφορες κυτταρικές σειρές. Η ιστολογική εξέταση ήπατος από τα ποντίκια έδειξε σημάδια ηπατοτοξικότητας παρόλο που το εκχύλισμα λειτούργησε σαν νευροτοξίνη. Μετά από 24ώρες έκθεσης του εκχυλίσματος στις κυτταρικές σειρές μετρήθηκαν τα ποσοστά βιωσιμότητας. Η κυτταρική σειρά FL (normal amniotic cells, human) παρουσίασε βιωσιμότητα 32% σε σχέση με τη κυτταρική σειρά αναφοράς (control), η κυτταρική σειρά A2058 (human metastatic melanoma) παρουσίασε βιωσιμότητα περίπου 30%, ενώ οι κυτταρικές

σειρές RD (rhabdomyosarcoma, human) και 3T3 (fibroblast, mouse) παρουσίασαν βιωσιμότητα περίπου 30% και 60% αντίστοιχα. Η ανάλυση του εκχυλίσματος μέσω ELISA έδειξε πως το κυανοβακτήριο *Lyngbya aeruginosa-coerulea* δεν παράγει σαξιτοξίνη ή μικροκυστίνη [192].

Το γένος των κυανοβακτηρίων *Pseudanabaena*, στο οποίο ανήκει και το κυανοβακτήριο «Pamv7» που απομονώσαμε, περιλαμβάνει μικρά νηματοειδή κυανοβακτήρια που συμμετέχουν στις ανθίσεις (blooms) και απαντώνται σε οικοσυστήματα υφάλμυρων και γλυκών νερών, αλλά δεν είναι ακόμη πλήρως μελετημένα [193].

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Felczykowska και συνεργάτες, κυανοβακτήριο γένους *Pseudanabaena* φάνηκε πως παράγει βιοδραστικούς παράγοντες. Το μεθανολικό εκχύλισμα του κυανοβακτηρίου δοκιμάστηκε στις καρκινικές κυτταρικές σειρές MCF-7 και HeLa σε συγκεντρώσεις 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ και προκάλεσε απόπτωση των κυττάρων με δόσοεξαρτώμενο τρόπο (IC_{50} περίπου 50 $\mu\text{g/ml}$). Τα κύτταρα HDFa (human dermal fibroblasts) που χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα αναφοράς (control), ήταν περισσότερο ανθεκτικά στη δράση του εκχυλίσματος [187].

Στη δική μας μελέτη, το μεθανολικό εκχύλισμα του κυανοβακτηρίου «Pamv7» είχε ισχυρή επίδραση στα κύτταρα MCF-7, και μέτρια επίδραση στα HepG2 (**Εικόνα 3.16**) αλλά εμφάνιζε μεγαλύτερη τοξικότητα στους φυσιολογικούς ινοβλάστες. Όπως αποδείξαμε η τοξικότητα αυτή οφείλεται στην ισχυρή αποπτωτική δράση του εκχυλίσματος (**Εικόνα 3.17**). Κοινές γνωστές τοξίνες που να παράγονται από το κυανοβακτήριο «Pamv7» δεν ανιχνεύθηκαν.

Σε πρόσφατη μελέτη, εκχυλίσματα κυανοβακτηρίων του γένους *Pseudanabaena* έχουν δοκιμαστεί και σε ποντίκια προκαλώντας βλεφαρόπτωση, πόνο, αιμορραγία στο ήπαρ, αποδιοργάνωση του ηπατικού παρεγχύματος και νέκρωση, ενώ στο εκχύλισμα δε βρέθηκαν γνωστές τοξίνες όπως μικροκυστίνη, σαξιτοξίνη, ανατοξίνη-α. [184]. Ομοίως, εκχυλίσματα από τα γένη *Oscillatoria*, *Synechocystis*, *Synechococcus* είχαν τοξική επίδραση σε ποντίκια προκαλώντας θάνατο μετά από μερικές ώρες και βλάβη στο ήπαρ και στα νεφρά. Οι συνέπειες που είχαν τα εκχυλίσματα στα ποντίκια έδειξαν πως πιθανότατα δεν πρόκειται για μια τοξίνη αλλά για διάφορα δραστικά μόρια που δρουν ταυτόχρονα [194]. Γνωστές τοξίνες όπως κυλινδροσπερμοψίνη, μικροκυστίνη

και νοντουλαρίνη δε βρέθηκαν ούτε σε εκχυλίσματα από κυανοβακτήρια του γένους *Limnothrix/Geitlerinema* [195].

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα κυανοβακτήρια του γένους *Pseudanabaena* βρίσκονται στο πεδίο μελέτης των ερευνητών καθώς παράγουν βιοδραστικούς μεταβολίτες με πιθανή αντινεοπλασματική δράση χωρίς ωστόσο να ανήκουν σε κάποια γνωστή κατηγορία τοξινών. Επιπλέον, τα εκχυλίσματα αυτά φαίνεται να περιέχουν πολλούς παράγοντες που προκαλούν τοξικότητα τόσο σε κύτταρα καρκινικών σειρών όσο και σε πειραματόζωα.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τη λίμνη Παμβώτιδα, ένα αρχαίο οικοσύστημα της Ηπείρου, ως προς την ποικιλότητα Βακτηρίων και Αρχαίων που φιλοξενεί. Ανιχνεύσαμε αλληλουχίες 16S rDNA που αντιπροσωπεύουν νέα είδη/στελέχη αποκαλύπτοντας τη σημαντική βιοποικιλότητα του αρχαίου αυτού οικοσυστήματος.

Πιο συγκεκριμένα:

- Διαπιστώσαμε πως μεγάλα ποσοστά Βακτηρίων και Αρχαίων στα δείγματα ιλύος ανήκουν πιθανόν σε νέα είδη/στελέχη και επιπλέον υπάρχουν αλληλουχίες που αντιπροσωπεύουν “unclassified bacteria” και “unclassified archaea”. Στην περίπτωση των κυανοβακτηρίων ανιχνεύσαμε αλληλουχίες που δημιουργούν μια ξεχωριστή φυλογενετικά ομάδα (Lake Pamvotis cluster). Τα παραπάνω ευρήματα φανερώνουν πως ο πυθμένας της λίμνης κρύβει μια άγνωστη βιοποικιλότητα και ίσως πολλά ενδημικά είδη/στελέχη.
- Μετά από αλληλούχιση επόμενης γενιάς σε δείγματα νερού της λίμνης, επιβεβαιώσαμε την ύπαρξη Βακτηρίων που πιθανόν ανήκουν σε νέα είδη/στελέχη και για πρώτη φορά διαπιστώσαμε πως κυανοβακτήρια του γένους *Synechococcus sp.* δημιουργούν μια άνθιση την άνοιξη, διαφορετική από εκείνη που δημιουργείται το καλοκαίρι από κυανοβακτήρια του γένους *Microcystis sp.*
- Μελετήθηκε το βιοχημικό προφίλ των Βακτηρίων της στήλης του νερού και διαπιστώσαμε πως τα Βακτήρια καταναλώνουν κυρίως υδατάνθρακες και πολυμερή όπως τα Tween 80 και Tween 40.
- Έπειτα από τον προσδιορισμό της αφθονίας των προκαρυωτικών κυττάρων στα δείγματα ιλύος αλλά και νερού της λίμνης Παμβώτιδας, διαπιστώσαμε πως τα Βακτήρια κυριαρχούν συγκριτικά με τα Αρχαία όμως η ποικιλότητα των Αρχαίων στα δείγματα ιλύος είναι μεγαλύτερη. Επιπλέον, διαπιστώσαμε χωρικές και χρονικές διαφορές στον αριθμό των προκαρυωτικών κυττάρων.
- Φυσικοχημικοί παράγοντες όπως Ni,Cr,Ca,pH,TKN,As,TOC βρέθηκε να επηρεάζουν τις αφθονίες Βακτηρίων και Αρχαίων.

- Έπειτα από καλλιέργειες ετερότροφων Βακτηρίων και κυανοβακτηρίων απομονώσαμε Βακτήρια που πιθανόν ανήκουν σε νέα είδη/στελέχη.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας, μελετήσαμε ως προς την κυτταροτοξική/αντινεοπλασματική τους δράση εκχύλισμα ετερότροφων Βακτηρίων και κυανοβακτηρίων τα οποία απομονώσαμε από τη λίμνη Παμβώτιδα. Παρατηρήσαμε ότι ένα μεθανολικό εκχύλισμα (crude extract) από κυανοβακτήριο του γένους *Pseudanabaena sp.* προκαλεί έντονα φαινόμενα απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα μαστού (καρκινική κυτταρική σειρά MCF7), όμως δεν εμφανίζει εκλεκτικότητα διότι προκαλεί επίσης απόπτωση και σε φυσιολογικούς ινοβλάστες (κυτταρική σειρά MRC5). Η τοξίνη που παράγει δεν ανήκει στις γνωστές κυανοτοξίνες μικροκυστίνη, νοντουλαρίνη, κυλινδροσπερμοψίνη. Το παραπάνω εύρημα είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικό καθώς μελέτες εύρεσης βιοδραστικών μορίων και συγκεκριμένα με δράση αντινεοπλασματική, διεξάγονται σε κυανοβακτήρια κυρίως θαλάσσιων οικοσυστημάτων και όχι γλυκών νερών.

6. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

“Μοριακή χαρτογράφηση μικροβιακών κοινοτήτων υδάτινων οικοσυστημάτων της Ηπείρου και μελέτη αξιοποίησής τους ως πηγών πιθανών αντικαρκινικών παραγόντων”

Τα αρχαία οικοσυστήματα προσελκύουν το ενδιαφέρον των ερευνητών καθώς η παρατεταμένη ζωή τους και η γεωγραφική τους απομόνωση τα καθιστούν μοντέλα μελέτης εξέλιξης ειδών και περιβαλλοντικών αλλαγών. Τα Βαλκάνια αποτελούν ένα παγκόσμιο “hot spot” της ενδημικής ποικιλότητας των οικοσυστημάτων γλυκού νερού. Αρχαιότερη λίμνη της Ευρώπης θεωρείται η λίμνη Οχρίδα και όσες μεγάλες λίμνες βρίσκονται σε ακτίνα εντός 300km με κέντρο τη λίμνη Οχρίδα, θεωρούνται επίσης αρχαίες. Παραδείγματα αποτελούν η λίμνη Παμβώτιδα την οποία και μελετήσαμε, καθώς και άλλες λίμνες της Ηπείρου όπως η Ζαραβίνα και η λίμνη Ζηρού. Η λίμνη Παμβώτιδα είναι μια ρηχή λίμνη, η οποία εμφανίζει έντονο ευτροφισμό τις τελευταίες τρεις δεκαετίες. Απ’ όσο γνωρίζουμε δεν έχουν διεξαχθεί σε αυτήν μελέτες προσδιορισμού της ποικιλότητας Βακτηρίων και Αρχαίων. Θέμα επίσης της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η απομόνωση και η καλλιέργεια ετερότροφων Βακτηρίων και κυανοβακτηρίων από το παραπάνω οικοσύστημα και στη συνέχεια η πραγματοποίηση δοκιμών κυτταροτοξικότητας μεθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων αυτών σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. Είναι γνωστό στη βιβλιογραφία πως τα Βακτήρια παράγουν βιοδραστικούς παράγοντες που εμφανίζουν κυτταροτοξική/αντινεοπλασματική δράση. Αξίζει να σημειωθεί πως περισσότερα από 40 αντικαρκινικά βιομόρια έχουν χαρακτηριστεί από κυανοβακτήρια. Οι περισσότερες μελέτες όμως πραγματοποιούνται σε μικροοργανισμούς θαλάσσιων οικοσυστημάτων και όχι γλυκών νερών.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε δείγματα νερού και ιλύος από τη λίμνη Παμβώτιδα από δυο σταθμούς της λίμνης, τις τέσσερις εποχές του έτους. Αρχικά προσδιορίσαμε τις φυσικοχημικές παραμέτρους τόσο της ιλύος όσο και του νερού και στη συνέχεια για να μελετήσουμε την ποικιλότητα Βακτηρίων/Αρχαίων προχωρήσαμε σε εκχύλιση DNA, PCR, πήκτωμα DGGE, κλωνοποίηση, αλληλούχιση, φυλογενετική ανάλυση καθώς και αλληλούχιση επόμενης γενιάς. Για την ποσοτικοποίηση των προκαρυωτικών κυττάρων στα δείγματα της λίμνης Παμβώτιδας χρησιμοποιήσαμε

real-time PCR. Με τη μέθοδο BIOLOG μελετήσαμε το βιοχημικό προφίλ των Βακτηρίων. Εφαρμόσαμε στατιστική ανάλυση θέλοντας να διαπιστώσουμε αν υπάρχει συσχέτιση των φυσικοχημικών παραμέτρων με την αφθονία Βακτηρίων και Αρχαίων.

Στην περίπτωση των βακτηριακών καλλιεργειών, χρησιμοποιήσαμε R2A θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη και απομόνωση ετερότροφων Βακτηρίων και BG11 θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη και απομόνωση κυανοβακτηρίων. Πρωτόκολλα εκχύλισης σε μεθανόλη και νερό χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό την απομόνωση των βακτηριακών εκχυλισμάτων, τα οποία εν συνεχεία χρησιμοποιήθηκαν για δοκιμές τοξικότητας σε καρκινικές κυτταρικές σειρές (A549, HepG2, MCF7) και σε φυσιολογικούς ινοβλάστες (MRC5). Για να διαπιστώσουμε τον τρόπο πρόκλησης τοξικότητας του εκχυλίσματος (απόπτωση ή νέκρωση) στα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιήσαμε κυτταρομετρία ροής.

Στην παρούσα εργασία ανιχνεύσαμε μεγάλο ποσοστό Βακτηρίων (50.88%) και Αρχαίων (20.65%) στα δείγματα ιλύος της λίμνης Παμβώτιδας που πιθανόν ανήκουν σε νέα είδη/στελέχη και ακόμη μεγαλύτερα ποσοστά (84.21%, 95.65% αντίστοιχα) που ανήκουν σε μη καλλιεργούμενα είδη με βάση τις εισαγωγές στη βάση δεδομένων GenBank. Στα ιζήματα της λίμνης κυριαρχούν τα *Proteobacteria*, τα *Cyanobacteria* και τα μεθανογόνα Αρχαία (*Methanomicrobiales*). Επίσης, τα Αρχαία καταλαμβάνουν το 11.13%-23.88% του συνολικού αριθμού των προκαρυωτικών κυττάρων ενώ τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που επηρεάζουν την αφθονία των προκαρυωτικών κυττάρων είναι τα Ni, Cr, Ca, pH, TKN, As, TC. Επιπλέον, ανιχνεύσαμε αλληλουχίες κυανοβακτηρίων οι οποίες διαπιστώσαμε πως σχηματίζουν μια φυλογενετικά ξεχωριστή ομάδα η οποία ονομάστηκε “Lake Pamvotis cluster”.

Στο νερό της λίμνης Παμβώτιδας ανιχνεύσαμε αλληλουχίες Βακτηρίων με χαμηλή ομολογία με αντίστοιχες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων GenBank. Στο νερό επικρατεί το φύλο *Proteobacteria*, εύρημα που συμφωνεί με τη βιβλιογραφία, τα Αρχαία καταλαμβάνουν ένα μικρό ποσοστό της μικροβιακής κοινότητας (0.14%-9.77%) και για πρώτη φορά διαπιστώσαμε πως κυανοβακτήρια του γένους *Synechococcus sp.* πιθανόν δημιουργούν μια άνθιση την άνοιξη, διαφορετική από εκείνη που δημιουργούν κυανοβακτήρια του γένους *Microcystis sp.* το καλοκαίρι.

Στη συνέχεια της εργασίας, απομονώσαμε και καλλιεργήσαμε ετερότροφα Βακτήρια και κυανοβακτήρια, εκχυλίσματα των οποίων χρησιμοποιήσαμε σε δοκιμές τοξικότητας στις καρκινικές κυτταρικές σειρές. Ένα μεθανολικό εκχύλισμα από

κυανοβακτήριο διαπιστώσαμε πως προκαλεί έντονα φαινόμενα απόπτωσης σε κύτταρα καρκίνου μαστού (MCF7) αλλά και στους φυσιολογικούς ινοβλάστες (MRC5). Το κυανοβακτήριο αυτό το οποίο χαρακτηρίσαμε μοριακά, ανήκει στο γένος *Pseudanabaena/Limnothrix sp.* και ο βιοδραστικός παράγοντας που παράγει δεν ανήκει στις γνωστές κυανοτοξίνες μικροκυστίνη/νοντουλαρίνη και κυλινδροσπερμοψίνη.

Η παρούσα διατριβή αποκαλύπτει τη σημαντική βιοποικιλότητα των Αρχαίων οικοσυστημάτων που αξίζουν προστασίας και περαιτέρω μελέτης. Τα ευρήματά μας φανερώνουν πως η λίμνη Παμβώτιδα φιλοξενεί πολλά νέα και ίσως ενδημικά είδη/στελέχη Βακτηρίων, Αρχαίων. Τέλος, η τοξικότητα στα καρκινικά κύτταρα που προκαλεί το μεθανολικό εκχύλισμα από το κυανοβακτήριο του γένους *Pseudanabaena/Limnothrix sp.* είναι ένα ενθαρρυντικό αποτέλεσμα, καθώς μελέτες εύρεσης βιοδραστικών παραγόντων σε υδάτινα οικοσυστήματα γλυκών νερών είναι περιορισμένες και φανερώνει πως αρχαία οικοσυστήματα ίσως αποτελούν πηγές βιοδραστικών μορίων που αξίζουν περαιτέρω μελέτης.

“Molecular mapping of microbial assemblages in aqueous ecosystems of Epirus and study of potential use as antineoplastic factors”

Ancient ecosystems are hotspots of biodiversity and their longevity and geographical isolation make them important agents for evolutionary and climate history research. In the European continent ancient lakes are restricted to the Balkan Region, which has been recognized as a worldwide hotspot of endemic freshwater biodiversity. The most ancient of these lakes is lake Ohrid and the majority of all ancient or putatively ancient European Lakes are thought to be restricted within a radius of 300km around lake Ohrid. This cluster of lakes includes Lake Pamvotis, which we studied, and other lakes of Epirus like Zaravina and Ziros. Lake Pamvotis is a shallow lake and has been suffering from eutrophication over the last three decades. To our knowledge this is the first study to reveal bacterial and archaeal diversity in Lake Pamvotis. The second subject of this study was the isolation and culture of bacterial cells from lake Pamvotis. Methanol and aquatic extracts from those cultures would be evaluated for their potential cytotoxic and antineoplastic effects in cancer cell lines. It is well known that bacteria produce bioactive agents that have cytotoxic/anticancer activity. More than 40 anticancer biomolecules have derived from cyanobacteria but most of the efforts for the discovery of novel bioactive factors are taking place in marine microorganisms than in freshwater.

In our analysis, we used water and sediment samples from lake Pamvotis from two stations and each season. Firstly, we determined the physicochemical parameters and then in order to reveal the diversity of bacteria and archaea we used extraction DNA protocol, PCR protocols, DGGE, cloning, sequencing, phylogenetic analysis tools and next generation sequencing. To quantify bacteria and archaea in lake Pamvotis samples, we used real-time PCR and we used BIOLOG method to study the bacterial biochemical profile. We also performed statistical analysis to investigate possible relationships among bacterial and archaeal abundances and the physicochemical variables.

In case of bacterial and cyanobacterial cultures, we used R2A and BG11 medium, respectively. Methanol and aquatic extracts from isolated bacteria and cyanobacteria were tested in cancer cell lines A549, HepG2, MCF7 and MRC7 (control) for

cytotoxic/antineoplastic activity. To find out how the bioactive compound provokes cytotoxicity effects (apoptosis or necrosis) we performed flow cytometry.

Concerning lake Pamvotis sediments, we identified many bacterial (50.88%) and archaeal (20.65%) sequences corresponding to potentially new species and most of the bacterial (84.21%) and archaeal (95.65%) sequences were found not to have cultivated counterparts (compared to GenBank entries). *Proteobacteria*, *Cyanobacteria* and methanogenic archaea (*Methanomicrobiales*) were in abundance in the sediments of the lake and archaea might represent 11.13%-23.88% of the total prokaryotic cells. Of the determined physicochemical variables, Ni, Cr, Ca, pH, TKN, As, TC were found to affect strongly the prokaryotic abundances. Upon phylogenetic analysis, a new class of *Cyanobacteria* was identified and named "Lake Pamvotis cluster" (LPC).

In the water samples of lake Pamvotis we also identified bacterial sequences displayed low identities to any known sequences in GenBank database. *Proteobacteria* were found to be dominant in water and archaea might represent 0.14%-9.77% of the total prokaryotic cells. We also noticed that cyanobacteria related to *Synechococcus sp.* might be responsible for a bloom in spring, different than *Microcystis sp.* bloom in summer.

Finally, the extracts from bacterial and cyanobacterial cultures which we used for toxicity tests, revealed a potential bioactive compound. The cyanobacterial methanol extract had cytotoxic effects (apoptosis) on MCF7 cells and on control fibroblasts (MRC5 cells). This extract was derived from the cyanobacterium related to *Pseudanabaena/Limnothrix sp.* and the bioactive compound was not microcystin/nodularin or cylindrospermopsin.

The present study reveals the hidden biodiversity of ancient ecosystems that worth protection and further investigation. Our findings suggest that putatively new or/and endemic species of bacteria and archaea are present in lake Pamvotis. The cytotoxicity in cancer cell lines caused by methanol extract from *Pseudanabaena/Limnothrix sp.* is encouraging though discovery efforts for bioactive compounds are not focused in freshwater ecosystems and probably ancient lakes could be sources for bioactive molecules.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock biology of microorganisms. 10th edition ed: Pearson Education Inc; 2003.
2. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(12):4576-9.
3. Barton NH, Briggs DEG, Eisen JA, et al. *Evolution*: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2007.
4. Rappé MS, Giovannoni SJ. The Uncultured Microbial Majority. *Annual Review of Microbiology*. 2003;57(1):369-94.
5. Erko S, A. RF, L. W-RN. Proposal for a New Hierarchic Classification System, *Actinobacteria classis nov*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 1997;47(2):479-91.
6. Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U. *E. coli* as an All-Rounder: The thin line between commensalism and pathogenicity. In: Dobrindt U, Hacker JH, Svanborg C, editors. *Between Pathogenicity and Commensalism*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 3-32.
7. Online Textbook of Bacteriology [Internet]. 2012. Available from: textbookofbacteriology.net.
8. Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(11):5088-90.
9. DeLong EF. Everything in moderation: Archaea as 'non-extremophiles'. *Current Opinion in Genetics & Development*. 1998;8(6):649-54.
10. Valentine DL. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. *Nature Reviews Microbiology*. 2007;5:316.
11. Barns SM, Delwiche CF, Palmer JD, et al. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(17):9188-93.
12. Huber H, Hohn MJ, Rachel R, et al. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature*. 2002;417:63.
13. Guy L, Ettema TJG. The archaeal TACK superphylum and the origin of eukaryotes. *Trends in Microbiology*. 2011;19(12):580-7.
14. Zillig W, Stetter KO, Wunderl S, et al. The *Sulfolobus*-*Caldariella* group: Taxonomy on the basis of the structure of DNA-dependent RNA polymerases. *Archives of microbiology*. 1980;125(3):259-69.
15. Raven P, Johnson G. *Biology*. Fifth ed: The McGraw-Hill Companies; 1999.
16. Cooper CR, Vanittanakom N. Insights into the pathogenicity of *Penicillium marneffei*. *Future Microbiology*. 2008;3(1):43-55.
17. Leliaert F, Smith DR, Moreau H, et al. Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2012;31(1):1-46.
18. Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, et al. Use of 16S rRNA and *rpoB* Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *Applied and environmental microbiology*. 2007;73(1):278-88.
19. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*. 1991;173(2):697-703.

20. Schmidt TM. Multiplicity of Ribosomal RNA Operons in Prokaryotic Genomes. In: de Bruijn FJ, Lupski JR, Weinstock GM, editors. *Bacterial Genomes: Physical Structure and Analysis*. Boston, MA: Springer US; 1998. p. 221-9.
21. Dahllöf I, Baillie H, Kjelleberg S. rpoB-Based Microbial Community Analysis Avoids Limitations Inherent in 16S rRNA Gene Intraspecies Heterogeneity. *Applied and environmental microbiology*. 2000;66(8):3376-80.
22. Lafontaine DLJ, Tollervey D. The function and synthesis of ribosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(7):514-20.
23. Rogers SO. *Integrated Molecular Evolution*: CRC Press; 2011.
24. illumina. *An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology* 2016:[1-16 pp.].
25. Sanchez A. *Introduction to NGS and NGS Data Analysis*. 2011.
26. Newton RJ, Jones SE, Eiler A, et al. A Guide to the Natural History of Freshwater Lake Bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2011;75(1):14-49.
27. Vareli K, Touka A, Theurillat X, et al. Microcystins in two Low nutrient lakes in the Epirus Region of North-West Greece. *CLEAN – Soil, Air, Water*. 2015;43(9):1307-15.
28. Sainis I, Fokas D, Vareli K, et al. Cyanobacterial Cyclopeptides as Lead Compounds to Novel Targeted Cancer Drugs. *Marine drugs*. 2010;8(3):629-57.
29. Rajaniemi P, Hrouzek P, Kaštovská K, et al. Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2005;55(1):11-26.
30. Lewis LA, McCourt RM. Green algae and the origin of land plants. *American Journal of Botany*. 2004;91(10):1535-56.
31. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*. 2012;75(3):311-35.
32. Khazir J, Mir BA, Mir SA, et al. Natural products as lead compounds in drug discovery. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2013;15(7):764-88.
33. Zhu F, Qin C, Tao L, et al. Clustered patterns of species origins of nature-derived drugs and clues for future bioprospecting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(31):12943-8.
34. Hu G-P, Yuan J, Sun L, et al. Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. *Marine drugs*. 2011;9(4):514-25.
35. Svircev Z, Cetojevic-Simin D, Simeunovic J, et al. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activity of terrestrial cyanobacterial strains from Serbia. *Science in China Series C: Life Sciences*. 2008;51(10):941-7.
36. Fischer WJ, Altheimer S, Cattori V, et al. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicology and applied pharmacology*. 2005;203(3):257-63.
37. König J, Seithel A, Gradhand U, et al. Pharmacogenomics of human OATP transporters. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2006;372(6):432-43.
38. Vareli K, Jaeger W, Touka A, et al. Hepatotoxic Seafood Poisoning (HSP) due to microcystins: A threat from the Ocean? *Marine drugs*. 2013;11(8):2751-68.
39. van Apeldoorn ME, van Egmond HP, Speijers GJA, et al. Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2007;51(1):7-60.
40. Martins J, Vasconcelos V. Microcystin Dynamics in Aquatic Organisms. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 2009;12:65-82.
41. Rastogi RP, Madamwar D, Incharoensakdi A. Bloom Dynamics of Cyanobacteria and Their Toxins: Environmental Health Impacts and Mitigation Strategies. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6(1254):1-22.

42. Krienitz L, Ballot A, Kotut K, et al. Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at Lake Bogoria, Kenya. *FEMS microbiology ecology*. 2003;43(2):141-8.
43. Jochimsen EM, Carmichael WW, An J, et al. Liver Failure and Death after Exposure to Microcystins at a Hemodialysis Center in Brazil. *New England Journal of Medicine*. 1998;338(13):873-8.
44. Hagenbuch B, Meier PJ. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflügers Archiv*. 2004;447(5):653-65.
45. Rantala A, Fewer DP, Hisbergues M, et al. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(2):568-73.
46. Schatz D, Keren Y, Vardi A, et al. Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. *Environmental microbiology*. 2007;9(4):965-70.
47. Kuusisto E, Hyvärinen V. *Hydrology of Lakes. Water Quality Measurements Series: John Wiley & Sons, Ltd.; 2007. p. 1-11.*
48. Wilke T, Schultheiß R, Albrecht C, et al. Native "Dreissena" freshwater mussels in the Balkans: in and out of ancient lakes. *Biogeosciences*. 2010;7(10):3051-65.
49. Albrecht C, Hauffe T, Schreiber K, et al. Mollusc Biodiversity and Endemism in the Potential Ancient Lake Trichonis, Greece. *Malacologia*. 2009;51(2):357-75.
50. Wagner B, Wilke T. Preface "Evolutionary and geological history of the Balkan lakes Ohrid and Prespa". *Biogeosciences*. 2011;8(4):995-8.
51. Albrecht C, Wilke T. Ancient Lake Ohrid: biodiversity and evolution. In: Wilke T, Väinölä R, Riedel F, editors. *Patterns and Processes of Speciation in Ancient Lakes: Proceedings of the Fourth Symposium on Speciation in Ancient Lakes, Berlin, Germany, September 4–8, 2006*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2009. p. 103-40.
52. Vareli K, Briasoulis E, Pilidis G, et al. Molecular confirmation of *Planktothrix rubescens* as the cause of intense, microcystin—Synthesizing cyanobacterial bloom in Lake Ziros, Greece. *Harmful Algae*. 2009;8(3):447-53.
53. Frogley MR, Preece RC. A faunistic review of the modern and fossil molluscan fauna from Lake Pamvotis, Ioannina, an ancient lake in NW Greece: implications for endemism in the Balkans. In: Griffiths HI, Kryštufek B, Reed JM, editors. *Balkan Biodiversity: Pattern and Process in the European Hotspot*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2004. p. 243-60.
54. Frogley MR, Griffiths HI, Heaton THE. Historical biogeography and Late Quaternary environmental change of Lake Pamvotis, Ioannina (north-western Greece): evidence from ostracods. *Journal of Biogeography*. 2001;28(6):745-56.
55. Tzedakis PC. Vegetation change through glacial—interglacial cycles: a long pollen sequence perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*. 1994;345(1314):403.
56. Frogley MR, Preece RC. A review of the aquatic mollusca from Lake Pamvotis, Ioannina, an ancient Lake in NW Greece. *Journal of Conchology*. 2007;39:271-96.
57. Kagalou I, Tsimarakis G, Paschos I. Water chemistry and biology in a shallow lake (Lake Pamvotis- Greece). present state and perspectives. *Global Nest: the Int J*. 2001;3:85-94.
58. Kagalou I, Papastergiadou E, Tsimarakis G, et al. Evaluation of the trophic state of Lake Pamvotis Greece, a shallow urban lake. *Hydrobiologia*. 2003;506(1):745-52.
59. Kagalou I, Papastergiadou E, Leonardos I. Long term changes in the eutrophication process in a shallow Mediterranean lake ecosystem of W. Greece: Response after the reduction of external load. *Journal of Environmental Management*. 2008;87(3):497-506.
60. Vardaka E, Moustaka-Gouni M, Cook CM, et al. Cyanobacterial blooms and water quality in Greek waterbodies. *Journal of Applied Phycology*. 2005;17(5):391-401.

61. Papadimitriou T, Armeni E, Stalikas CD, et al. Detection of microcystins in Pamvotis lake water and assessment of cyanobacterial bloom toxicity. *Environmental monitoring and assessment*. 2012;184(5):3043-52.
62. Vareli K, Pilidis G, Mavrogiorgou MC, et al. Molecular characterization of cyanobacterial diversity and yearly fluctuations of Microcystin loads in a suburban Mediterranean Lake (Lake Pamvotis, Greece). *Journal of environmental monitoring : JEM*. 2009;11(8):1506-12.
63. Hadjisolomou E, Stefanidis K, Papatheodorou G, et al. Assessing the contribution of the environmental parameters to eutrophication with the use of the "PaD" and "PaD2" methods in a hypereutrophic lake. *International journal of environmental research and public health*. 2016;13(8):764.
64. American_Public_Health_Association, Eaton AD. Standard methods for the examination of water and wastewater / prepared and published jointly by American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation. 21st ed. ed: Washington, D. C. : APHA-AWWA-WEF; 2005.
65. Fotyma M, Jadczyzyn T, Jozefaciuk G. Hundredth molar calcium chloride extraction procedure. part II: Calibration with conventional soil testing methods for pH. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 1998;29(11-14):1625-32.
66. Jackson PE, Gokhale S, Streib T, et al. Improved method for the determination of trace perchlorate in ground and drinking waters by ion chromatography. *Journal of chromatography A*. 2000;888(1-2):151-8.
67. Kotti ME, Vlessidis AG, Evmiridis NP. Determination of Phosphorous and Nitrogen in the Sediment of Lake 'pamvotis' (Greece). *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 2000;78(3-4):455-67.
68. Ashley K, Andrews RN, Cavazos L, et al. Ultrasonic extraction as a sample preparation technique for elemental analysis by atomic spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2001;16(10):1147-53.
69. Muyzer G, Teske A, Wirsén CO, et al. Phylogenetic relationships of Thiomicrospira species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Archives of microbiology*. 1995;164(3):165-72.
70. Casamayor EO, Schäfer H, Bañeras L, et al. Identification of and Spatio-Temporal Differences between Microbial Assemblages from Two Neighboring Sulfurous Lakes: Comparison by Microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and environmental microbiology*. 2000;66(2):499-508.
71. Eden PA, Schmidt TM, Blakemore RP, et al. Phylogenetic Analysis of Aquaspirillum magnetotacticum Using Polymerase Chain Reaction-Amplified 16S rRNA-Specific DNA. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 1991;41(2):324-5.
72. Janse I, Meima M, Kardinaal WE, et al. High-resolution differentiation of Cyanobacteria by using rRNA-internal transcribed spacer denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology*. 2003;69(11):6634-43.
73. Moffitt MC, Neilan BA. On the presence of peptide synthetase and polyketide synthase genes in the cyanobacterial genus Nodularia. *FEMS microbiology letters*. 2001;196(2):207-14.
74. Neilan BA, Dittmann E, Rouhiainen L, et al. Nonribosomal Peptide Synthesis and Toxigenicity of Cyanobacteria. *Journal of bacteriology*. 1999;181(13):4089-97.
75. Ercolini D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of microbiological methods*. 2004;56(3):297-314.
76. Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*. 1993;59(3):695-700.

77. Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1998;73(1):127-41.
78. Vokou D, Vareli K, Zarali E, et al. Exploring biodiversity in the bacterial community of the Mediterranean phyllosphere and its relationship with airborne bacteria. *Microbial ecology*. 2012.
79. Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular biology and evolution*. 2011;28(10):2731-9.
80. Montserrat Sala M, Estrada M, Gasol J. Seasonal changes in the functional diversity of bacterioplankton in contrasting coastal environments of the NW Mediterranean 2006. 1-9 p.
81. Tamaki H, Sekiguchi Y, Hanada S, et al. Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques. *Applied and environmental microbiology*. 2005;71(4):2162-9.
82. Berg KA, Lyra C, Sivonen K, et al. High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. *The ISME journal*. 2009;3(3):314-25.
83. Karlsson KM, Spoof LE, Meriluoto JA. Quantitative LC-ESI-MS analyses of microcystins and nodularin-R in animal tissue--matrix effects and method validation. *Environmental toxicology*. 2005;20(3):381-9.
84. Kounnis V, Chondrogiannis G, Mantzaris M, et al. Microcystin LR Shows Cytotoxic Activity Against Pancreatic Cancer Cells Expressing the Membrane OATP1B1 and OATP1B3 Transporters. *Anticancer research*. 2015;35(11):5857-65.
85. Βαρθολομάτος Γ. Κυτταρομετρία Ροής, Αρχές και Κλινικο-Ερευνητικές Εφαρμογές της 2007.
86. MacDonald DD, Ingersoll CG, Berger TA. Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 2000;39(1):20-31.
87. Kim SJ, Koh DC, Park SJ, et al. Molecular analysis of spatial variation of iron-reducing bacteria in riverine alluvial aquifers of the Mankyeong River. *Journal of microbiology*. 2012;50(2):207-17.
88. Chen Y, Wen X, Sun Y, et al. Mulching practices altered soil bacterial community structure and improved orchard productivity and apple quality after five growing seasons. *Scientia Horticulturae*. 2014;172:248-57.
89. Forget NL, Murdock SA, Juniper SK. Bacterial diversity in Fe-rich hydrothermal sediments at two South Tonga Arc submarine volcanoes. *Geobiology*. 2010;8(5):417-32.
90. Yoshida N, Takahashi N, Hiraishi A. Phylogenetic characterization of a polychlorinated-dioxin- dechlorinating microbial community by use of microcosm studies. *Applied and environmental microbiology*. 2005;71(8):4325-34.
91. Hoshino T, Terahara T, Tsuneda S, et al. Molecular analysis of microbial population transition associated with the start of denitrification in a wastewater treatment process. *Journal of applied microbiology*. 2005;99(5):1165-75.
92. Costello EK, Schmidt SK. Microbial diversity in alpine tundra wet meadow soil: novel Chloroflexi from a cold, water-saturated environment. *Environmental microbiology*. 2006;8(8):1471-86.
93. Jiang L, Zheng Y, Peng X, et al. Vertical distribution and diversity of sulfate-reducing prokaryotes in the Pearl River estuarine sediments, Southern China. *FEMS microbiology ecology*. 2009;70(2):93-106.
94. Wang F, Zhou H, Meng J, et al. GeoChip-based analysis of metabolic diversity of microbial communities at the Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(12):4840-5.

95. Losey NA, Stevenson BS, Busse HJ, et al. *Thermoanaerobaculum aquaticum* gen. nov., sp. nov., the first cultivated member of Acidobacteria subdivision 23, isolated from a hot spring. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2013;63(Pt 11):4149-57.
96. Naether A, Foessel BU, Naegele V, et al. Environmental factors affect Acidobacterial communities below the subgroup level in grassland and forest soils. *Applied and environmental microbiology*. 2012;78(20):7398-406.
97. Barns SM, Cain EC, Sommerville L, et al. Acidobacteria phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. *Applied and environmental microbiology*. 2007;73(9):3113-6.
98. Lu S, Gischkat S, Reiche M, et al. Ecophysiology of Fe-cycling bacteria in acidic sediments. *Applied and environmental microbiology*. 2010;76(24):8174-83.
99. Ye W, Liu X, Lin S, et al. The vertical distribution of bacterial and archaeal communities in the water and sediment of Lake Taihu. *FEMS microbiology ecology*. 2009;70(2):107-20.
100. Galand PE, Lovejoy C, Vincent WF. Remarkably diverse and contrasting archaeal communities in a large arctic river and the coastal Arctic Ocean. *Aquat Microb Ecol*. 2006;44:115-26.
101. Lazar CS, L'Haridon S, Pignet P, et al. Archaeal populations in hypersaline sediments underlying orange microbial mats in the Napoli mud volcano. *Applied and environmental microbiology*. 2011;77(9):3120-31.
102. Baker BJ, Comolli LR, Dick GJ, et al. Enigmatic, ultrasmall, uncultivated Archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(19):8806-11.
103. Auguet JC, Casamayor EO. Partitioning of Thaumarchaeota populations along environmental gradients in high mountain lakes. *FEMS microbiology ecology*. 2013;84(1):154-64.
104. Dick GJ, Andersson AF, Baker BJ, et al. Community-wide analysis of microbial genome sequence signatures. *Genome biology*. 2009;10(8):R85.
105. Paul K, Nonoh JO, Mikulski L, et al. "Methanoplasmatales," Thermoplasmatales-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. *Applied and environmental microbiology*. 2012;78(23):8245-53.
106. Borrel G, Lehours AC, Crouzet O, et al. Stratification of Archaea in the deep sediments of a freshwater meromictic lake: vertical shift from methanogenic to uncultured archaeal lineages. *PloS one*. 2012;7(8):e43346.
107. Buckles LK, Villanueva L, Weijers JW, et al. Linking isoprenoidal GDGT membrane lipid distributions with gene abundances of ammonia-oxidizing Thaumarchaeota and uncultured crenarchaeotal groups in the water column of a tropical lake (Lake Challa, East Africa). *Environmental microbiology*. 2013;15(9):2445-62.
108. Klappenbach JA, Dunbar JM, Schmidt TM. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Applied and environmental microbiology*. 2000;66(4):1328-33.
109. Beals EW. Bray-Curtis Ordination: An Effective Strategy for Analysis of Multivariate Ecological Data. In: MacFadyen A, Ford ED, editors. *Advances in Ecological Research*. 14: Academic Press; 1984. p. 1-55.
110. Garland JL, Mills AL. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and environmental microbiology*. 1991;57(8):2351-9.
111. Tzedakis PC, Lawson IT, Frogley MR, et al. Buffered tree population changes in a quaternary refugium: evolutionary implications. *Science*. 2002;297(5589):2044-7.

112. Romero JR, Kagalou I, Imberger J, et al. Seasonal water quality of shallow and eutrophic Lake Pamvotis, Greece: implications for restoration. *Hydrobiologia*. 2002;474(1):91-105.
113. Daskalou V, Vreca P, Muri G, et al. Recent environmental changes in the shallow Lake Pamvotis (NW Greece): evidence from sedimentary organic matter, hydrocarbons, and stable isotopes. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 2009;57(1):21-31.
114. Haller L, Tonolla M, Zopfi J, et al. Composition of bacterial and archaeal communities in freshwater sediments with different contamination levels (Lake Geneva, Switzerland). *Water research*. 2011;45(3):1213-28.
115. Gough HL, Stahl DA. Microbial community structures in anoxic freshwater lake sediment along a metal contamination gradient. *The ISME journal*. 2011;5(3):543-58.
116. Bhattarai S, Ross KA, Schmid M, et al. Local conditions structure unique archaeal communities in the anoxic sediments of meromictic Lake Kivu. *Microbial ecology*. 2012;64(2):291-310.
117. Stalikas C, Pilidis G, karayannis M. Heavy metal contents in sediments of the lake Ioannina and Kalamas river in north-western Greece. *Fresen Environ Bull* 1994;3:575-9.
118. Watzin M, Puka V, Naumoski TB. Lake Ohrid and its watershed, state of the environment report. Lake Ohrid Conservation Project. Tirana, Albania and Ohrid Macedonia. 2002.
119. Skoulikidis NT. Defining chemical status of a temporary Mediterranean River. *Journal of environmental monitoring : JEM*. 2008;10(7):842-52.
120. Ioannides K, Stamoulis K, Papachristodoulou C, et al. Distribution of heavy metals in sediment cores of Lake Pamvotis (Greece): a pollution and potential risk assessment. *Environmental monitoring and assessment*. 2015;187(1):4209.
121. Buck U, Grossart HP, Amann R, et al. Substrate incorporation patterns of bacterioplankton populations in stratified and mixed waters of a humic lake. *Environmental microbiology*. 2009;11(7):1854-65.
122. Glockner FO, Zaichikov E, Belkova N, et al. Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Applied and environmental microbiology*. 2000;66(11):5053-65.
123. Hiorns WD, Methe BA, Nierzwicki-Bauer SA, et al. Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Applied and environmental microbiology*. 1997;63(7):2957-60.
124. Zwisler W, Selje N, Simon M. Seasonal patterns of the bacterioplankton community composition in a large mesotrophic lake. *Aquatic Microbial Ecology*. 2003;31(3):211-25.
125. Biers EJ, Sun S, Howard EC. Prokaryotic genomes and diversity in surface ocean waters: interrogating the global ocean sampling metagenome. *Applied and environmental microbiology*. 2009;75(7):2221-9.
126. Rusch DB, Halpern AL, Sutton G, et al. The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: northwest Atlantic through eastern tropical Pacific. *PLoS biology*. 2007;5(3):e77.
127. Qiu YL, Hanada S, Ohashi A, et al. *Syntrophorhabdus aromaticivorans* gen. nov., sp. nov., the first cultured anaerobe capable of degrading phenol to acetate in obligate syntrophic associations with a hydrogenotrophic methanogen. *Applied and environmental microbiology*. 2008;74(7):2051-8.
128. Dai J, Tang X, Gao G, et al. Effects of salinity and nutrients on sedimentary bacterial communities in oligosaline Lake Bosten, northwestern China. *Aquatic Microbial Ecology*. 2013;69(2):123-34.
129. Song H, Li Z, Du B, et al. Bacterial communities in sediments of the shallow Lake Dongping in China. *Journal of applied microbiology*. 2012;112(1):79-89.

130. Zhang J, Yang Y, Zhao L, et al. Distribution of sediment bacterial and archaeal communities in plateau freshwater lakes. *Applied microbiology and biotechnology*. 2014;99(7):3291-302.
131. Eiler A, Bertilsson S. Flavobacteria blooms in four eutrophic lakes: linking population dynamics of freshwater bacterioplankton to resource availability. *Applied and environmental microbiology*. 2007;73(11):3511-8.
132. Kirchman DL. The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS microbiology ecology*. 2002;39(2):91-100.
133. Rossello-Mora R, Thamdrup B, Schafer H, et al. The response of the microbial community of marine sediments to organic carbon input under anaerobic conditions. *Syst Appl Microbiol*. 1999;22(2):237-48.
134. Rinta-Kanto JM, Saxton MA, DeBruyn JM, et al. The diversity and distribution of toxigenic *Microcystis* spp. in present day and archived pelagic and sediment samples from Lake Erie. *Harmful Algae*. 2009;8(3):385-94.
135. Incagnone G, Marrone F, Barone R, et al. How do freshwater organisms cross the "dry ocean"? A review on passive dispersal and colonization processes with a special focus on temporary ponds. *Hydrobiologia*. 2014;750(1):103-23.
136. Padisák J, Vasas G, Borics G. Phycogeography of freshwater phytoplankton: traditional knowledge and new molecular tools. *Hydrobiologia*. 2015;764(1):3-27.
137. Barberan A, Fernandez-Guerra A, Auguet JC, et al. Phylogenetic ecology of widespread uncultured clades of the Kingdom Euryarchaeota. *Molecular ecology*. 2011;20(9):1988-96.
138. Smith PF, Langworthy TA, Smith MR. Polypeptide nature of growth requirement in yeast extract for *Thermoplasma acidophilum*. *Journal of bacteriology*. 1975;124(2):884-92.
139. Takano Y, Chikaraishi Y, Ogawa NO, et al. Sedimentary membrane lipids recycled by deep-sea benthic archaea. *Nature Geosci*. 2010;3(12):858-61.
140. Grokopf R, Stubner S, Liesack W. Novel euryarchaeotal lineages detected on rice roots and in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. *Applied and environmental microbiology*. 1998;64(12):4983-9.
141. Green TJ, Barnes AC, Bartkow M, et al. Sediment bacteria and archaea community analysis and nutrient fluxes in a sub-tropical polymictic reservoir. *Aquatic Microbial Ecology*. 2012;65(3):287-302.
142. Nam Y-D, Sung Y, Chang H-W, et al. Characterization of the depth-related changes in the microbial communities in Lake Hovsgol sediment by 16S rRNA gene-based approaches. *The Journal of Microbiology*. 2008;46(2):125-36.
143. Pester M, Schleper C, Wagner M. The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Current opinion in microbiology*. 2011;14(3):300-6.
144. Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, et al. Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature reviews Microbiology*. 2008;6(3):245-52.
145. Teske A, Sorensen KB. Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? *The ISME journal*. 2008;2(1):3-18.
146. Biddle JF, Lipp JS, Lever MA, et al. Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(10):3846-51.
147. Schwarz JI, Eckert W, Conrad R. Community structure of Archaea and Bacteria in a profundal lake sediment Lake Kinneret (Israel). *Syst Appl Microbiol*. 2007;30(3):239-54.
148. Lipp JS, Morono Y, Inagaki F, et al. Significant contribution of Archaea to extant biomass in marine subsurface sediments. *Nature*. 2008;454(7207):991-4.
149. Jiang H, Dong H, Yu B, et al. Dominance of putative marine benthic Archaea in Qinghai Lake, north-western China. *Environmental microbiology*. 2008;10(9):2355-67.

150. Yin H, Niu J, Ren Y, et al. An integrated insight into the response of sedimentary microbial communities to heavy metal contamination. *Scientific reports*. 2015;5:14266.
151. Jung J, Yeom J, Han J, et al. Seasonal changes in nitrogen-cycle gene abundances and in bacterial communities in acidic forest soils. *Journal of microbiology*. 2012;50(3):365-73.
152. Jackson CR, Dugas SL. Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal *arsC* gene sequences suggests an ancient, common origin for arsenate reductase. *BMC evolutionary biology*. 2003;3:18.
153. Bini E. Archaeal transformation of metals in the environment. *FEMS microbiology ecology*. 2010;73(1):1-16.
154. Burkhardt E-M, Bischoff S, Akob DM, et al. Heavy Metal Tolerance of Fe(III)-Reducing Microbial Communities in Contaminated Creek Bank Soils. *Applied and environmental microbiology*. 2011;77(9):3132-6.
155. Gupta K, Chatterjee C, Gupta B. Isolation and characterization of heavy metal tolerant Gram-positive bacteria with bioremedial properties from municipal waste rich soil of Kestopur canal (Kolkata), West Bengal, India. *Biologia*. 2012;67(5):827-36.
156. Bengtson P, Sterngren AE, Rousk J. Archaeal abundance across a pH gradient in an arable soil and its relationship to bacterial and fungal growth rates. *Applied and environmental microbiology*. 2012;78(16):5906-11.
157. Kemmitt SJ, Wright D, Goulding KWT, et al. pH regulation of carbon and nitrogen dynamics in two agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 2006;38(5):898-911.
158. Fierer N, Jackson RB. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(3):626-31.
159. Frijlink MJ, Abee T, Laanbroek HJ, et al. The bioenergetics of ammonia and hydroxylamine oxidation in *Nitrosomonas europaea* at acid and alkaline pH. *Archives of microbiology*. 1992;157(2):194-9.
160. Nicol GW, Leininger S, Schleper C, et al. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environmental microbiology*. 2008;10(11):2966-78.
161. Bollmann A, Bullerjahn GS, McKay RM. Abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in sediments of trophic end members of the Laurentian Great Lakes, Erie and Superior. *PLoS one*. 2014;9(5):e97068.
162. Sun W, Xia C, Xu M, et al. Distribution and abundance of archaeal and bacterial ammonia oxidizers in the sediments of the Dongjiang River, a drinking water supply for Hong Kong. *Microbes and environments*. 2013;28(4):457-65.
163. Ban Q, Li J, Zhang L, et al. Phylogenetic diversity of methanogenic Archaea and kinetics of methane production at slightly acidic conditions of an anaerobic sludge. *Int J Agric Biol*. 2013;15: 347-51.
164. Bräuer SL, Cadillo-Quiroz H, Ward RJ, et al. *Methanoregula boonei* gen. nov., sp. nov., an acidiphilic methanogen isolated from an acidic peat bog. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2011;61(1):45-52.
165. Sandaa RA, Enger O, Torsvik V. Abundance and diversity of Archaea in heavy-metal-contaminated soils. *Applied and environmental microbiology*. 1999;65(8):3293-7.
166. Li P, Jiang D, Li B, et al. Comparative survey of bacterial and archaeal communities in high arsenic shallow aquifers using 454 pyrosequencing and traditional methods. *Ecotoxicology*. 2014;23(10):1878-89.
167. Lim J, Woodward J, Tulaczyk S, et al. Analysis of the microbial community and geochemistry of a sediment core from Great Slave Lake, Canada. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2010;99(2):423-30.

168. Lucheta AR, Otero XL, Macías F, et al. Bacterial and archaeal communities in the acid pit lake sediments of a chalcopyrite mine. *Extremophiles : life under extreme conditions*. 2013;17(6):941-51.
169. Zhang J, Zhu C, Guan R, et al. Microbial profiles of a drinking water resource based on different 16S rRNA V regions during a heavy cyanobacterial bloom in Lake Taihu, China. *Environmental Science and Pollution Research International*. 2017;24(14):12796-808.
170. Zeng J, Deng L-J, Lou K, et al. Molecular characterization of the planktonic microorganisms in water of two mountain brackish lakes. *Journal of Basic Microbiology*. 2014;54(6):509-20.
171. Inceoğlu Ö, Llíros M, Crowe SA, et al. Vertical Distribution of Functional Potential and Active Microbial Communities in Meromictic Lake Kivu. *Microbial ecology*. 2015;70(3):596-611.
172. Iliev I, Yahubyan G, Marhova M, et al. Metagenomic profiling of the microbial freshwater communities in two Bulgarian reservoirs. *Journal of Basic Microbiology*. 2017;57(8):669-79.
173. Callieri C, Corno G, Caravati E, et al. Photosynthetic characteristics and diversity of freshwater *Synechococcus* at two depths during different mixing conditions in a deep oligotrophic lake. *Journal of Limnology*. 2007;66(2):81-9.
174. Parulekar NN, Kolekar P, Jenkins A, et al. Characterization of bacterial community associated with phytoplankton bloom in a eutrophic lake in South Norway using 16S rRNA gene amplicon sequence analysis. *PloS one*. 2017;12(3):e0173408.
175. Cai H, Jiang H, R Krumholz L, et al. Bacterial Community Composition of Size-Fractionated Aggregates within the Phycosphere of Cyanobacterial Blooms in a Eutrophic Freshwater Lake. *PloS one*. 2014;9:e102879.
176. Hahn MW, Kasalický V, Jezbera J, et al. *Limnohabitans curvus* gen. nov., sp. nov., a planktonic bacterium isolated from a freshwater lake. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2010;60(6):1358-65.
177. Reitschuler C, Hofmann K, Illmer P. Abundances, diversity and seasonality of (non-extremophilic) Archaea in Alpine freshwaters. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2016;109(6):855-68.
178. Lew S, Koblizek M, Lew M, et al. Seasonal changes of microbial communities in two shallow peat bog lakes. *Folia Microbiol (Praha)*. 2015;60(2):165-75.
179. Wei G, Li M, Li F, et al. Distinct distribution patterns of prokaryotes between sediment and water in the Yellow River estuary. *Applied microbiology and biotechnology*. 2016;100(22):9683-97.
180. Lima-Bittencourt CI, Costa PS, Reis MP, et al. A survey on cultivable heterotrophic bacteria inhabiting a thermally unstratified water column in an Atlantic Rainforest lake. *PeerJ*. 2014;2:e478.
181. Grover J, Chrzanowski TH. Seasonal patterns of substrate utilization by bacterioplankton: case studies in four temperate lakes of different latitudes. *Aquatic Microbial Ecology*. 2000;23(1):41-54.
182. Montserrat Sala M, Estrada M, Gasol J. Seasonal changes in the functional diversity of bacterioplankton in contrasting coastal environments of the NW Mediterranean. *Aquatic Microbial Ecology*. 2006;44:1-9.
183. Cottrell MT, Kirchman DL. Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the Cytophaga-Flavobacter cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Applied and environmental microbiology*. 2000;66(4):1692-7.
184. Rangel M, Martins JCG, Garcia AN, et al. Analysis of the Toxicity and Histopathology Induced by the Oral Administration of *Pseudanabaena galeata* and *Geitlerinema splendidum* (Cyanobacteria) Extracts to Mice. *Marine drugs*. 2014;12(1):508-24.

185. Cartuche L, Cruz D, Ramírez MI, et al. Antibacterial and cytotoxic activity from the extract and fractions of a marine derived bacterium from the *Streptomyces* genus. *Pharmaceutical Biology*. 2015;53(12):1826-30.
186. Aboul-Ela HM, Shreadah MA, Abdel-Monem NM, et al. Isolation, cytotoxic activity and phylogenetic analysis of *Bacillus* sp. bacteria associated with the red sea sponge *Amphimedon ochracea*. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2012;3:815-23.
187. Felczykowska A, Pawlik A, Mazur-Marzec H, et al. Selective inhibition of cancer cells' proliferation by compounds included in extracts from Baltic Sea cyanobacteria. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2015;108:1-10.
188. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products*. 2007;70(3):461-77.
189. Singh RK, Tiwari SP, Rai AK, et al. Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery. *The Journal of antibiotics*. 2011;64(6):401-12.
190. Costa M, Costa-Rodrigues J, Fernandes MH, et al. Marine cyanobacteria compounds with anticancer properties: a review on the implication of apoptosis. *Marine drugs*. 2012;10(10):2181-207.
191. Costa M, Garcia M, Costa-Rodrigues J, et al. Exploring bioactive properties of marine cyanobacteria isolated from the Portuguese Coast: high potential as a source of anticancer compounds. *Marine drugs*. 2014;12(1):98-114.
192. Teneva I, Asparuhova D, Dzhambazov B, et al. The freshwater cyanobacterium *Lyngbya aerugineo-coerulea* produces compounds toxic to mice and to mammalian and fish cells. *Environmental toxicology*. 2003;18(1):9-20.
193. Acinas SG, Haverkamp THA, Huisman J, et al. Phenotypic and genetic diversification of *Pseudanabaena* spp. (cyanobacteria). *The ISME journal*. 2008;3(1):31-46.
194. Martins R, Pereira P, Welker M, et al. Toxicity of culturable cyanobacteria strains isolated from the Portuguese coast. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2005;46(4):454-64.
195. Bernard C, Froscio S, Campbell R, et al. Novel toxic effects associated with a tropical *Limnothrix/Geitlerinema*-like cyanobacterium. *Environmental toxicology*. 2011;26(3):260-70.

8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 8.1: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων ιλύος της λίμνης Παμβώτιδας

	Depth (m)		T °C		pH		TC (mg g ⁻¹)		TOC (mg g ⁻¹)		TP (mg g ⁻¹)		TKN (mg g ⁻¹)	
	SS1	SS2	SS1	SS2	SS1	SS2	SS1	SS2	SS1	SS2	SS1	SS2	SS1	SS2
Άνοιξη	8.40±0.20	9.30±0.30	20±0.50	19±0.40	6.96±0.02	6.30±0.01	67.54±7.26	99.79±3.53	60.69±3.13	87.31±3.99	3.02±0.02	4.05±0.02	2.94±0.01	5.03±0.11
Καλοκαίρι	7.30±0.15	8.20±0.18	26±0.70	24±0.50	7.07±0.01	6.31±0.01	68.58±2.31	99.53±2.07	65.00±2.01	93.70±4.09	4.83±0.05	4.13±0.02	3.91±0.03	3.33±0.02
Φθινόπωρο	8.10±0.25	9.00±0.20	11±0.50	12±0.50	7.08±0.01	6.23±0.02	67.39±2.42	65.60±1.01	63.54±2.56	61.30±1.96	10.01±0.09	9.69±0.08	3.99±0.03	5.01±0.05
Χειμώνας	8.40±0.10	9.30±0.40	6±0.10	6±0.20	7.18±0.20	6.45±0.02	59.73±3.60	79.80±11.14	58.19±2.12	79.60±1.02	10.75±0.42	8.78±0.05	3.94±0.03	5.80±0.01

	Na ⁺ (mg kg ⁻¹)		K ⁺ (mg kg ⁻¹)		Ca ²⁺ (mg kg ⁻¹)		Mg ²⁺ (mg kg ⁻¹)		Cl ⁻ (mg kg ⁻¹)		SO ₄ ⁻ (mg kg ⁻¹)	
	SS1	SS2	SS1	SS2	SS1	SS2	SS1	SS2	SS1	SS2	SS1	SS2
Άνοιξη	4.96±0.01	6.09±0.01	4.17±0.01	5.41±0.01	37.69±0.02	72.15±0.26	13.06±0.04	17.83±0.01	64.34±0.02	117.82±0.70	296.62±0.04	537.42±0.10
Καλοκαίρι	4.87±0.01	5.54±0.00	4.34±0.01	5.98±0.00	50.04±0.02	76.34±0.79	14.48±0.03	19.41±0.04	64.66±0.02	103.95±0.18	554.17±0.03	386.02±0.12
Φθινόπωρο	4.91±0.01	6.33±0.01	5.57±0.03	5.86±0.01	49.19±0.12	70.98±0.02	18.73±0.02	18.95±0.03	70.17±0.01	109.87±0.09	431.68±0.02	589.16±0.03
Χειμώνας	3.39±0.00	3.62±0.02	5.56±0.01	5.02±0.02	57.28±0.02	51.26±0.73	16.33±0.02	16.32±0.02	35.35±0.02	51.16±0.04	450.01±0.03	428.55±0.07

Πίνακας 8.1 συνέχεια

	Sb (mg kg ⁻¹)		Ni (mg kg ⁻¹)		Hg (mg kg ⁻¹)		Se (mg kg ⁻¹)		Cd (mg kg ⁻¹)		Mn (mg kg ⁻¹)	
	SS1	SS2	SS1	SS2	SS1	SS2	SS1	SS2	SS1	SS2	SS1	SS2
Άνοιξη	5.10±0.08	2.43±0.02	132.00±0.25	98.00±1.75	1.13±0.01	1.59±0.01	<6.00	<6.00	<4.00	<4.00	1090.00±22.00	959.00±10.00
Καλοκαίρι	2.85±0.02	2.78±0.01	126.00±0.20	97.10±1.53	0.16±0.00	0.84±0.02	<6.00	<6.00	<4.00	<4.00	1130.00±35.00	843.00±21.00
Φθινόπωρο	2.89±0.01	2.72±0.02	123.00±0.17	96.50±1.20	0.44±0.01	0.95±0.01	<6.00	<6.00	<4.00	<4.00	1330.00±76.00	923.00±15.00
Χειμώνας	3.32±0.02	3.52±0.02	135.00±0.22	88.50±2.70	0.18±0.01	<0.10	<6.00	<6.00	<4.00	<4.00	950.00±15.00	999.00±32.00

	Pb (mg kg ⁻¹)		Fe (mg kg ⁻¹)		Cu (mg kg ⁻¹)		Cr (mg kg ⁻¹)		Zn (mg kg ⁻¹)		As (mg kg ⁻¹)	
	SS1	SS2	SS1	SS2	SS1	SS2	SS1	SS2	SS1	SS2	SS1	SS2
Άνοιξη	<30.0	<30.0	25200.00±58.00	25500.00±61.00	31.40±1.10	31.80±0.90	83.10±2.87	59.40±2.12	81.30±1.99	89.90±3.22	2.76±0.01	4.58±0.02
Καλοκαίρι	<30.0	<30.0	27600.00±32.00	26400.00±59.00	32.10±0.70	32.10±1.20	83.60±2.66	66.00±1.89	93.00±1.42	91.50±2.89	1.88±0.01	4.44±0.03
Φθινόπωρο	<30.0	<30.0	28100.00±45.00	23600.00±52.00	30.60±0.50	31.00±0.20	81.70±1.57	63.60±1.75	90.10±1.08	97.00±3.55	2.40±0.02	4.37±0.01
Χειμώνας	<30.0	<30.0	28200.00±42.00	21000.00±20.00	34.00±0.90	37.00±0.40	79.20±1.28	58.40±1.97	97.00±2.80	78.70±1.43	2.14±0.01	4.80±0.02

Οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων που φαίνεται να υπερβαίνουν είτε το PEC είτε TEC επισημαίνονται με έντονα γράμματα. SS1: Σταθμός δειγματοληψίας 1 (Sample Station 1), SS2: Σταθμός δειγματοληψίας 2 (Sample Station 2)

Πίνακας 8.2: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού της λίμνης Παμβώτιδας. Μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στους δυο σταθμούς δειγματοληψίας (SS1, SS2), κατά τις τέσσερις εποχές του έτους, από την επιφάνεια και τον πυθμένα της λίμνης

		T (°C)	Διαλυμένο O ₂ (mg L ⁻¹)	NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	P ₂ O ₅ (mg L ⁻¹)	TP (mg L ⁻¹)
Άνοιξη	SS1 _{επιφάνεια}	19±0.70	10.2±0.1	0.12±0.08	0.06±0.05	0.80±0.22	0.13±0.01	0.27±0.02
	SS1 _{πυθμένας}	20±0.50	6.5±0.3	0.30±0.02	0.09±0.02	1.80±0.09	0.21±0.01	0.37±0.01
	SS2 _{επιφάνεια}	19±0.50	9.8±0.2	0.10±0.04	0.05±0.02	3.80±0.02	0.07±0.01	0.29±0.04
	SS2 _{πυθμένας}	19±0.30	6.7±0.2	0.47±0.01	0.13±0.01	3.90±0.02	0.27±0.03	0.32±0.03
Καλοκαίρι	SS1 _{επιφάνεια}	25±0.20	8.3±0.3	0.30±0.02	Bdl	11.1±0.01	1.04±0.02	1.08±0.02
	SS1 _{πυθμένας}	23±0.10	2.6±0.3	0.30±0.02	0.08±0.02	7.70±0.02	0.62±0.01	0.77±0.03
	SS2 _{επιφάνεια}	25±0.30	5.6±0.1	0.24±0.03	0.08±0.03	8.30±0.02	0.57±0.03	1.22±0.02
	SS2 _{πυθμένας}	24±0.10	1.3±0.2	0.54±0.01	0.08±0.03	9.60±0.01	0.61±0.02	0.75±0.02
Φθινόπωρο	SS1 _{επιφάνεια}	8±0.20	7.2±0.2	0.44±0.10	0.10±0.02	5.20±0.01	0.23±0.02	0.62±0.04
	SS1 _{πυθμένας}	11±0.40	6.5±0.1	0.49±0.09	0.16±0.02	5.20±0.00	0.53±0.01	0.64±0.04
	SS2 _{επιφάνεια}	8±0.20	7.5±0.2	0.65±0.04	0.11±0.01	6.00±0.02	0.25±0.02	0.50±0.01
	SS2 _{πυθμένας}	12±0.30	6.3±0.3	0.36±0.02	0.11±0.01	4.90±0.05	0.14±0.04	0.25±0.04
Χειμώνας	SS1 _{επιφάνεια}	5±0.30	12.2±0.1	0.11±0.03	0.05±0.01	6.20±0.02	0.09±0.00	0.15±0.02
	SS1 _{πυθμένας}	6±0.20	11.5±0.1	0.19±0.03	0.06±0.03	4.90±0.07	0.10±0.04	0.21±0.02
	SS2 _{επιφάνεια}	5±0.50	12.2±0.1	0.12±0.01	0.06±0.01	4.10±0.05	0.07±0.01	0.14±0.01
	SS2 _{πυθμένας}	6±0.10	10.8±0.2	0.39±0.02	0.07±0.02	4.40±0.05	0.15±0.02	0.24±0.01

Bdl: below detection level,
 SS1: Σταθμός δειγματοληψίας 1 (Sample Station 1), SS2: Σταθμός δειγματοληψίας 2 (Sample Station 2)

Εικόνα 8.1: 16S rDNA αλληλουχίες Βακτηρίων από τα δείγματα ιλύος της λίμνης Παμβώτιδας που κατατέθηκαν στην GenBank (KP244158-KP244214)

uncultured bacterium 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

PopSet: 806818032

[GenBank](#) [FASTA](#)

[Go to:](#)

Study Details

Diversity of bacteria in the sediments of an ancient European lake (Lake Pamvotis-Greece)

Touka,A., Vareli,K. and Sainis,I.

[Go to:](#)

Sequences in this data set

KP244214.1	Uncultured bacterium clone BacPamv51 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KP244213.1	Uncultured bacterium clone BacPamv50 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KP244212.1	Uncultured bacterium clone BacPamv49 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KP244211.1	Uncultured bacterium clone BacPamv48 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KP244210.1	Uncultured bacterium clone BacPamv47 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KP244209.1	Uncultured bacterium clone BacPamv46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KP244208.1	Uncultured bacterium clone BacPamv45 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KP244207.1	Uncultured bacterium clone BacPamv44 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KP244206.1	Uncultured bacterium clone BacPamv43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KP244205.1	Uncultured bacterium clone BacPamv42 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KP244204.1	Uncultured bacterium clone BacPamv41 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KP244203.1	Uncultured bacterium clone BacPamv40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KP244202.1	Uncultured bacterium clone BacPamv39 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KP244201.1	Uncultured bacterium clone BacPamv38 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KP244200.1	Uncultured bacterium clone BacPamv37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KP244199.1	Uncultured bacterium clone BacPamv36 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Εικόνα 8.2: 16S rDNA αλληλουχίες Αρχαίων από τα δείγματα ιλύος της λίμνης Παμβώτιδας που κατατέθηκαν στην GenBank (GenBank KC510289-KC510380)

Uncultured archaeon 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

PopSet: 459648989

[GenBank](#) [FASTA](#)

[Go to:](#)

Study Details

Diversity of Archaea in the sediments of an ancient European lake (Lake Pamvotis-Greece)

Touka,A., Vareli,K. and Sainis,I.

[Go to:](#)

Sequences in this data set

KC510380.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv115 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510379.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv114 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510378.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv112 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510377.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv109 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510376.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv108B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510375.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv108A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510374.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv96 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510373.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv92 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510372.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv90 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510371.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv89 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510370.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv88 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510369.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv86B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510368.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv86A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510367.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv84B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510366.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv84A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510365.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv83B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510364.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv83A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510363.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv82 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510362.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv79D 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510361.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv79C 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510360.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv79B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510359.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv79A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510358.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv77B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510357.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv77A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510356.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv76 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510355.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv75 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510354.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv72B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510353.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv72A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510352.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv71 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510351.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv70 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510350.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv69 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

KC510298.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510297.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510296.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510295.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv4C 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510294.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv4B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510293.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv4A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510292.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv3B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510291.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv3A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510290.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KC510289.1	Uncultured archaeon clone ArcPamv1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Εικόνα 8.3: 16S rDNA αλληλουχίες από Βακτήρια, που απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν από τα δείγματα ιλύος της λίμνης Παμβώτιδας (GenBank KU8626661-KU862683)

Bacteria 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

PopSet: 1070059189

[GenBank](#) [FASTA](#)

[Go to:](#)

Study Details

Prokaryotic diversity and abundance in the sediments of an ancient European Lake (Lake Pamvotis-Greece)
Touka,A., Vareli,K. and Sainis,I.

[Go to:](#)

Sequences in this data set

KU862683.1	Micrococcus sp. strain 23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU862682.1	Porphyr bacter sp. strain 22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU862681.1	Flavobacterium sp. strain 21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU862680.1	Hydrogenophaga sp. strain 20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU862679.1	Pseudomonas sp. strain 19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU862678.1	Hydrogenophaga sp. strain 18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU862677.1	Paucibacter sp. strain 17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU862676.1	Chryseobacterium sp. strain 16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU862675.1	Flavobacterium sp. strain 15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU862674.1	Pseudomonas sp. strain 14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU862673.1	Flavobacterium sp. strain 13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU862672.1	Pseudomonas sp. strain 12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU862671.1	Rheinheimera sp. strain 11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU862670.1	Flavobacterium sp. strain 10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU862669.1	Acinetobacter sp. strain 9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU862668.1	Flavobacterium sp. strain 8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU862667.1	Flavobacterium sp. strain 7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU862666.1	Aeromonas sp. strain 6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU862665.1	Rhodoferrax sp. strain 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU862664.1	Vogesella sp. strain 4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU862663.1	Chryseobacterium sp. strain 3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU862662.1	Rheinheimera sp. strain 2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU862661.1	Massilia sp. strain 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Πίνακας 8.3: Σύγκριση των βακτηριακών 16S rDNA αλληλουχιών που ανακτήθηκαν από τα δείγματα ιλύος της λίμνης Παμβώτιδας, με αντίστοιχες γνωστές 16S rDNA αλληλουχίες που βρίσκονται σε βάσεις δεδομένων

Clone name	Accession number	% query,%identity culture collection*	% query, % identity cultured species**	References
BacPamv1	KP244158	100% 99% HM153665.1	100% 99% NR029024.1 <i>Hydrogenophaga defluvii</i> BSB 9.5	*[1] **[2]
BacPamv2	KP244159	99% 98% FQ659268.1	99% 88% NR074757.1 <i>Treponema caldaria</i> DSM 7334	* unpublished ** unpublished
BacPamv3	KP244160	100% 93% GQ472421.1	100% 83% NR075001.1 <i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073	*[3] ** unpublished
BacPamv4	KP244161	100% 99% HM243914.1	100% 86% NR074330.1 <i>Nitrosococcus oceani</i> ATCC 19707	* unpublished ** unpublished
BacPamv5	KP244162	100% 96% JN805711.1	100% 92% NR075002.1 <i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> MPOB	*[4] ** unpublished
BacPamv6	KP244163	100% 87% JQ516335.1	100% 78% NR075009.1 <i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA	*[5] **[6]
BacPamv7	KP244164	100% 95% HQ910926.1	100% 85% NR028695.1 <i>Lewinella nigricans</i> SS-2	* unpublished **[7]

BacPamv8	KP244165	100% 99% KC432448.1	100% 86% NR104911.1 <i>Vampirovibrio chlorellavorus</i> ICPB 3707	* unpublished ** unpublished
BacPamv9A	KP244166	100% 99% KC432448.1	100% 85% NR043559.1 <i>Gracilibacter thermotolerans</i> JW/YJL-S1	* unpublished ** [8]
BacPamv9B	KP244167	100% 100% JF265807.1	100% 96% NR029287.1 <i>Nitrospira moscoviensis</i> NSP M-1	* unpublished ** [9]
BacPamv10	KP244168	100% 99% HM346679.1	100% 94% NR042824.1 <i>Collimonas arenae</i> NCCB 100031	*[10] **[11]
BacPamv11	KP244169	100% 92% EF203209.1	100% 85% NR036977.1 <i>Thiococcus pfennigii</i> 4250	* [12] **[13]
BacPamv12	KP244170	100% 99% AB661525.1	100% 84% NR109681.1 <i>Thermoanaerobaculum aquaticum</i> MP-01	*[14] **[15]
BacPamv13A	KP244171	100% 99% AB196055.1	100% 92% NR044309.1 <i>Steroidobacter denitrificans</i> F5	*[16] **[17]
BacPamv13B	KP244172	99% 93% HF677528.1	98% 85% NR075001.1 <i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073	* unpublished ** unpublished
BacPamv13C	KP244173	100% 99% KC989704.1	100% 99% NR074314.1 <i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843	*[18] **[19]
BacPamv14	KP244174	100% 90% JN473052.1	100% 78% NR075001.1 <i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073	*[20] ** unpublished

BacPamv15	KP244175	100% 99% HM346679.1	100% 93% NR042824.1 <i>Collimonas arenae</i> NCCB 100031	*[10] **[11]
BacPamv16	KP244176	100% 99% JN868188.1	100% 92% NR043249.1 <i>Denitratisoma</i> <i>oestradiolicum</i> AcBE2-1	*[21] **[22]
BacPamv17A	KP244177	98% 96% JQ583178.1	97% 94% NR074351.1 <i>Candidatus solibacter</i> Ellin 6076	* unpublished ** unpublished
BacPamv17B	KP244178	100% 96% HQ904418.1	100% 85% NR102459.1 <i>Chamaesiphon minutes</i> PCC 6605	* unpublished ** unpublished
BacPamv18	KP244179	100% 99% KF287757.1	100% 99% NR025816.1 <i>Porphyrobacter</i> <i>donghaensis</i> SW-132	*unpublished **[23]
BacPamv19	KP244180	100% 99% KC248046.1	100% 98% NR042941.1 <i>Paucibacter</i> <i>toxinivorans</i> 2C20	* unpublished **[24]
BacPamv20A	KP244181	100% 97% HQ661184.1	100% 84% NR102468.1 <i>Stanieria cyanospaera</i> PCC 7437	* unpublished ** unpublished
BacPamv20B	KP244182	100% 89% EU376186.1	100% 79% NR102456.1 <i>Leptolyngbya</i> PCC 7376	*[12] ** unpublished
BacPamv21	KP244183	100% 99% EU104276.1	100% 89% NR040990.1 <i>Owenweeksia</i> <i>hongkongensis</i> UST 20020801	* unpublished **[25]
BacPamv22	KP244184	100% 96% HQ661184.1	100% 84% NR102456.1 <i>Leptolyngbya</i> PCC 7376	* unpublished ** unpublished

BacPamv23	KP244185	100% 96% KF939466.1	100% 94% NR102987.1 <i>Clostridium clariflavum</i> DSM 19732	* unpublished **[26]
BacPamv24A	KP244186	100% 99% KC541335.1	100% 93% NR044309.1 <i>Steroidobacter denitrificans</i> FS	* unpublished **[17]
BacPamv24B	KP244187	99% 97% AY693835.1	99% 83% NR025079.1 <i>Desulfomonile limimaris</i> DSB-M	* unpublished **[27]
BacPamv25	KP244188	100% 99% HM243891.1	100% 88% NR074345.1 <i>Thermodesulfovibrio yellowstonii</i> DSM 11347	* unpublished ** unpublished
BacPamv26	KP244189	100% 99% KC666549.1	100% 97% NR043993.1 <i>Rheinheimera tangshanensis</i> JA3-B52	* unpublished **[28]
BacPamv27	KP244190	100% 93% HQ246251.1	100% 93% NR029024.1 <i>Hydrogenophaga defluvii</i> BSB 9.5	* unpublished **[2]
BacPamv28	KP244191	100% 91% AB722172.1	100% 84% NR037137.1 <i>Treponema medium</i> G7201	* unpublished **[29]
BacPamv29	KP244192	99% 91% AB661540.1	99% 86% NR074757.1 <i>Treponema caldaria</i> DSM 7334	*[30] ** unpublished
BacPamv30	KP244193	100% 99% JN257048.1	100% 95% NR074317.1 <i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	* unpublished ** unpublished
BacPamv31	KP244194	100% 91% GQ356966.1	100% 84% NR025150.1 <i>Desulfobulbus mediterraneus</i> 86FS1	* unpublished **[31]
BacPamv32	KP244195	100% 99%	100% 98%	* unpublished

		KF556697.1	NR074760.1 <i>Albidiferax ferrireducens</i> T118	** unpublished
BacPamv33	KP244196	100% 99% AB793710.1	100% 97% NR026102.1 <i>Clostridium papyrosolvens</i> DSM 2792	* [32] **[33]
BacPamv34	KP244197	100% 92% GU208417.1	100% 85% NR028745.1 <i>Thioalkalivibrio denitrificans</i> ALJD	*[3] **[34]
BacPamv35	KP244198	100% 89% AM181924.1	100% 84% NR043929.1 <i>Skermanella aerolata</i> 5416T-32	*[35] **[36]
BacPamv36	KP244199	100% 99% HG792168.1	100% 99% NR036911.2 <i>Aeromonas media</i> RM	* unpublished **[37]
BacPamv37	KP244200	100% 99% KC815481.1	100% 99% NR102447.1 <i>Cyanobium gracile</i> PCC 6307	* unpublished ** unpublished
BacPamv38	KP244201	100% 99% LK054500.1	100% 99% NR075062.2 <i>Micrococcus luteus</i> NCTC 2665	* unpublished ** unpublished
BacPamv39	KP244202	100% 92% KF384384.1	100% 87% NR104682.1 <i>Marinilabilia salmonicolor</i> JCM 21150 NBRC 15946	* unpublished ** unpublished
BacPamv40	KP244203	100% 98% EU376186.1	100% 83% NR102456.1 <i>Leptolyngbya</i> PCC 7376	*[12] ** unpublished
BacPamv41	KP244204	100% 93% DQ642331.1	100% 90% NR041306.1 <i>Syntrophorhabdus aromaticivorans</i> U1	* unpublished **[38]
BacPamv42	KP244205	100% 96% GU197631.1	100% 92% NR074317.1 <i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	* unpublished ** unpublished

BacPamv43	KP244206	100% 88% AB186797.1	100% 81% NR043385.1 <i>Dictyoglomus turgidum</i> DSM 6724	*[39] ** unpublished
BacPamv44	KP244207	100% 95% AB486150.1	100% 89% NR075011.1 <i>Geobacter metallireducens</i> GS-15	*[40] **[41]
BacPamv45	KP244208	100% 99% KC432448.1	100% 85% NR043559.1 <i>Gracilibacter thermotolerans</i> JW/YJL-S1	* unpublished **[8]
BacPamv46	KP244209	100% 96% GU454906.1	100% 87% NR074757.1 <i>Treponema caldaria</i> DSM 7334	*[42] ** unpublished
BacPamv47	KP244210	100% 99% KC432448.1	100% 84% NR043559.1 <i>Gracilibacter thermotolerans</i> JW/YJL-S1	* unpublished **[8]
BacPamv48	KP244211	99% 92% AB240355.1	99% 84% NR044075.1 <i>Thermodesulfovibrio hydrogeniphiles</i> HbrS	* unpublished **[43]
BacPamv49	KP244212	100% 93% JN397726.1	100% 91% NR028715.1 <i>Acidovorax temperans</i> PHL	* unpublished ** [44]
BacPamv50	KP244213	100% 99% JX223096.1	100% 99% NR040800.1 <i>Vogesella indigofera</i> ATCC 19706	* unpublished **[45]
BacPamv51	KP244214	100% 96% JQ624950.1	100% 92% NR026102.1 <i>Clostridium papyrosolvens</i> DSM 2792	*[46] **[33]

References

1. Li H, Xing P, Chen M, Bian Y, Wu QL. Short-term bacterial community composition dynamics in response to accumulation and breakdown of *Microcystis* blooms. *Water Res* 2011;45:1702-1710.
2. Kampfer P, Schulze R, Jackel U, Malik KA, Amann R et al. *Hydrogenophaga defluvii* sp. nov. and *Hydrogenophaga atypica* sp. nov., isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005;55:341-344.
3. Song H, Li Z, Du B, Wang G, Ding Y. Bacterial communities in sediments of the shallow Lake Dongping in China. *J Appl Microbiol* 2012;112:79-89.
4. Yan Z, Song N, Cai H, Tay J-H, Jiang H. Enhanced degradation of phenanthrene and pyrene in freshwater sediments by combined employment of sediment microbial fuel cell and amorphous ferric hydroxide. *J Hazard Mater* 2012;199-200:217-225.
5. Kimes NE, Johnson WR, Torralba M, Nelson KE, Weil E et al. The *Montastraea faveolata* microbiome: ecological and temporal influences on a Caribbean reef-building coral in decline. *Environ Microbiol* 2013;15:2082-2094.
6. Butler JE, Young ND, Aklujkar M, Lovley DR. Comparative genomic analysis of *Geobacter sulfurreducens* KN400, a strain with enhanced capacity for extracellular electron transfer and electricity production. *BMC Genomics* 2012;13:1-13.
7. Sly LI, Taghavit M, Fegan M. Phylogenetic heterogeneity within the genus *Herpetosiphon*: transfer of the marine species *Herpetosiphon cohaerens*, *Herpetosiphon nigricans* and *Herpetosiphon persicus* to the genus *Leiwinella* gen. nov. in the Flexibacter-Bacteroides-Cytophaga phylum. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:731-737.
8. Lee YJ, Romanek CS, Mills GL, Davis RC, Whitman WB et al. *Gracilibacter thermotolerans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermotolerant bacterium from a constructed wetland receiving acid sulfate water. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006;56:2089-2093.
9. Ehrich S, Behrens D, Lebedeva E, Ludwig W, Bock E. A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship. *Arch Microbiol* 1995;164:16-23.
10. Xing W, Zhao Y, Zuo JE. Microbial activity and community structure in a lake sediment used for psychrophilic anaerobic wastewater treatment. *J Appl Microbiol* 2010;109:1829-1837.
11. Hoppener-Ogawa S, de Boer W, Leveau JH, van Veen JA, de Brandt E et al. *Collimonas arenae* sp. nov. and *Collimonas pratensis* sp. nov., isolated from (semi-)natural grassland soils. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;58:414-419.
12. Kormas KA, Vardaka E, Moustaka-Gouni M, Kontoyanni V, Petridou E et al. Molecular detection of potentially toxic cyanobacteria and their associated bacteria in lake water column and sediment. *World J Microbiol Biotechnol* 2010;26:1473-1482.
13. Imhoff JF, Suling J, Petri R. Phylogenetic relationships among the Chromatiaceae, their taxonomic reclassification and description of the new genera *Allochromatium*, *Halochromatium*, *Isochromatium*, *Marichromatium*, *Thiococcus*, *Thiohalocapsa* and *Thermochromatium*. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:1129-1143.
14. Kojima H, Tsutsumi M, Ishikawa K, Iwata T, Mußmann M et al. Distribution of putative denitrifying methane oxidizing bacteria in sediment of a freshwater lake, Lake Biwa. *Syst Appl Microbiol* 2012;35:233-238.
15. Losey NA, Stevenson BS, Busse HJ, Sinnighe Damste JS, Rijpstra WI et al. *Thermoanaerobaculum aquaticum* gen. nov., sp. nov., the first cultivated member of Acidobacteria subdivision 23, isolated from a hot spring. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013;63:4149-4157.

16. Hoshino T, Terahara T, Yamada K, Okuda H, Suzuki I et al. Long-term monitoring of the succession of a microbial community in activated sludge from a circulation flush toilet as a closed system. *FEMS Microbiol Ecol* 2006;55:459-470.
17. Fahrbach M, Kuever J, Remesch M, Huber BE, Kampfer P et al. *Steroidobacter denitrificans* gen. nov., sp. nov., a steroidal hormone-degrading gammaproteobacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;58:2215-2223.
18. Martins J, Leao PN, Ramos V, Vasconcelos V. N-terminal protease gene phylogeny reveals the potential for novel cyanobactin diversity in cyanobacteria. *Mar Drugs* 2013;11:4902-4916.
19. Kaneko T, Nakajima N, Okamoto S, Suzuki I, Tanabe Y et al. Complete genomic structure of the bloom-forming toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-843. *DNA Res* 2007;14:247-256.
20. Harris JK, Caporaso JG, Walker JJ, Spear JR, Gold NJ et al. Phylogenetic stratigraphy in the Guerrero Negro hypersaline microbial mat. *ISME J* 2013;7:50-60.
21. Zhao D, Huang R, Zeng J, Yan W, Wang J et al. Diversity analysis of bacterial community compositions in sediments of urban lakes by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). *World J Microbiol Biotechnol* 2012;28:3159-3170.
22. Fahrbach M, Kuever J, Meinke R, Kampfer P, Hollender J. *Denitratissoma oestradiolicum* gen. nov., sp. nov., a 17beta-oestradiol-degrading, denitrifying betaproteobacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006;56:1547-1552.
23. Yoon JH, Lee MH, Oh TK. *Porphyrobacter donghaensis* sp. nov., isolated from sea water of the East Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:2231-2235.
24. Rapala J, Berg KA, Lyra C, Niemi RM, Manz W et al. *Paucibacter toxinivorans* gen. nov., sp. nov., a bacterium that degrades cyclic cyanobacterial hepatotoxins microcystins and nodularin. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005;55:1563-1568.
25. Lau KW, Ng CY, Ren J, Lau SC, Qian PY et al. *Owenweeksia hongkongensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium of the phylum 'Bacteroidetes'. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005;55:1051-1057.
26. Izquierdo JA, Goodwin L, Davenport KW, Teshima H, Bruce D et al. Complete Genome Sequence of *Clostridium clariflavum* DSM 19732. *Standards in Genomic Sciences* 2012;6:104-115.
27. Sun B, Cole JR, Tiedje JM. *Desulfomonile limimaris* sp. nov., an anaerobic dehalogenating bacterium from marine sediments. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:365-371.
28. Zhang X, Sun L, Qiu F, McLean RJC, Jiang R et al. *Rheinheimera tangshanensis* sp. nov., a rice root-associated bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;58:2420-2424.
29. Umemoto T, Nakazawa F, Hoshino E, Okada K, Fukunaga M et al. *Treponema medium* sp. nov., isolated from human subgingival dental plaque. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:67-72.
30. Kojima H, Tsutsumi M, Ishikawa K, Iwata T, Mussmann M et al. Distribution of putative denitrifying methane oxidizing bacteria in sediment of a freshwater lake, Lake Biwa. *Syst Appl Microbiol* 2012;35:233-238.
31. Sass A, Rutters H, Cypionka H, Sass H. *Desulfobulbus mediterraneus* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium growing on mono- and disaccharides. *Arch Microbiol* 2002;177:468-474.
32. Horino H, Fujita T, Tonouchi A. Description of *Anaerobacterium chartisolvens* gen. nov., sp. nov., an obligately anaerobic bacterium from *Clostridium* rRNA cluster III isolated from soil of a Japanese rice field, and reclassification of *Bacteroides cellulosolvens* Murray et al. 1984 as *Pseudobacteroides cellulosolvens* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014;64:1296-1303.
33. Rainey FA, Stackebrandt E. 16S rDNA analysis reveals phylogenetic diversity among the polysaccharolytic clostridia. *FEMS Microbiol Let* 1993;113:125-128.
34. Sorokin DY, Lysenko AM, Mityushina LL, Tourova TP, Jones BE et al. *Thioalkalimicrobium aerophilum* gen. nov., sp. nov. and *Thioalkalimicrobium sibericum* sp.

- nov., and *Thioalkalivibrio versutus* gen. nov., sp. nov., *Thioalkalivibrio nitratis* sp. nov., novel and *Thioalkalivibrio denitrificans* sp. nov., novel obligately alkaliphilic and obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria from soda lakes. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:565-580.
35. Schwarz JI, Lueders T, Eckert W, Conrad R. Identification of acetate-utilizing Bacteria and Archaea in methanogenic profundal sediments of Lake Kinneret (Israel) by stable isotope probing of rRNA. *Environ Microbiol* 2007;9:223-237.
36. Weon HY, Kim BY, Hong SB, Joa JH, Nam SS et al. *Skermanella aerolata* sp. nov., isolated from air, and emended description of the genus *Skermanella*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;57:1539-1542.
37. Martinez-Murcia AJ, Benlloch S, Collins MD. Phylogenetic Interrelationships of Members of the Genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as Determined by 16S Ribosomal DNA Sequencing: Lack of Congruence with Results of DNA-DNA Hybridizations. *Int J Syst Bacteriol* 1992;42:412-421.
38. Qiu YL, Hanada S, Ohashi A, Harada H, Kamagata Y et al. *Syntrophorhabdus aromaticivorans* gen. nov., sp. nov., the first cultured anaerobe capable of degrading phenol to acetate in obligate syntrophic associations with a hydrogenotrophic methanogen. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:2051-2058.
39. Yoshida N, Takahashi N, Hiraishi A. Phylogenetic characterization of a polychlorinated-dioxin- dechlorinating microbial community by use of microcosm studies. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:4325-4334.
40. Ishii S, Yamamoto M, Kikuchi M, Oshima K, Hattori M et al. Microbial populations responsive to denitrification-inducing conditions in rice paddy soil, as revealed by comparative 16S rRNA gene analysis. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:7070-7078.
41. Aklujkar M, Krushkal J, DiBartolo G, Lapidus A, Land ML et al. The genome sequence of *Geobacter metallireducens*: features of metabolism, physiology and regulation common and dissimilar to *Geobacter sulfurreducens*. *BMC Microbiol* 2009;9:109.
42. Zhang P, Chen Y, Zhou Q, Zheng X, Zhu X et al. Understanding short-chain fatty acids accumulation enhanced in waste activated sludge alkaline fermentation: kinetics and microbiology. *Environ Sci Technol* 2010;44:9343-9348.
43. Haouari O, Fardeau ML, Cayol JL, Fauque G, Casiot C et al. *Thermodesulfovibrio hydrogeniphilus* sp. nov., a new thermophilic sulphate-reducing bacterium isolated from a Tunisian hot spring. *Syst Appl Microbiol* 2008;31:38-42.
44. Wen A, Fegan M, Hayward C, Chakraborty S, Sly LI. Phylogenetic relationships among members of the Comamonadaceae, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka et al. 1987) gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:567-576.
45. Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, Oyaizu H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:1563-1589.
46. van der Lelie D, Taghavi S, McCorkle SM, Li L-L, Malfatti SA et al. The Metagenome of an Anaerobic Microbial Community Decomposing Poplar Wood Chips. *PLoS One* 2012;7:e36740.

Πίνακας 8.4: Σύγκριση των βακτηριακών 16S rDNA αλληλουχιών που ανακτήθηκαν από καλλιέργειες Βακτηρίων από τα δείγματα ιλύος της λίμνης Παμβώτιδας, με αντίστοιχες γνωστές 16S rDNA αλληλουχίες που βρίσκονται σε βάσεις δεδομένων

Clone name	Accession number	% query, % identity culture collection*	% query, % identity cultured species**	References
PamvBac iso.1	KU862661	100% 100% KF481602.1	100% 99% NR042502.1 <i>Massilia aurea</i> AP13	* unpublished **[1]
PamvBac iso.2	KU862662	100% 99% KF556686.1	100% 97% NR043699.1 <i>Rheinheimera chironomi</i> K19414	* unpublished **[2]
PamvBac iso.3	KU862663	100% 99% EF471218.1	100% 99% NR042596.1 <i>Cryseobacterium luteum</i> P456/04	* unpublished **[3]
PamvBac iso.4	KU862664	100% 99% JX223096.1	100% 99% NR040800.1 <i>Vogesella indigofera</i> ATCC 19706	* unpublished **[4]
PamvBac iso.5	KU862665	100% 99% KF556697.1	100% 98% NR114646.1 <i>Rhodoferrax ferrireducens</i> T118	* unpublished ** [5]
PamvBac iso.6	KU862666	100% 99% HG792168.1	100% 99% NR036911.2 <i>Aeromonas media</i> RM	* unpublished **[6]
PamvBac iso.7	KU862667	100% 99% KF555636.1	100% 99% NR041057.1 <i>Flavobacterium frigidimaris</i> KUC-1	* unpublished **[7]
PamvBac iso.8	KU862668	100% 99% JF145482.1	100% 99% NR044292.1 <i>Flavobacterium resistens</i> BD-b365	*[8] **[9]

PamvBac iso.9	KU862669	100% 99%	100% 99%	NR025425.1 <i>Acinetobacteria parvus</i> LUH 4616	* unpublished **[10]
PamvBac iso.10	KU862670	100% 100%	100% 98%	NR108576.1 <i>Flavobacterium compostarboris</i> 15C3	* unpublished **[11]
PamvBac iso.11	KU862671	100% 99%	100% 97%	NR043993.1 <i>Rheinheimera tangshanensis</i> JA3-B52	* unpublished **[12]
PamvBac iso.12	KU862672	100% 99%	100% 99%	NR029319.1 <i>Pseudomonas anguilliseptica</i> S1	* [13] **[14]
PamvBac iso.13	KU862673	100% 99%	100% 98%	NR109728.1 <i>Flavobacterium cutihirudinis</i> E89	* unpublished **[15]
PamvBac iso.14	KU862674	97% 99%	97% 98%	NR029319.1 <i>Pseudomonas anguilliseptica</i> S1	*[16] ** [14]
PamvBac iso.15	KU862675	100% 99%	100% 99%	NR044581.1 <i>Flavobacterium chungangense</i> CJ7	* unpublished **[17]
PamvBac iso.16	KU862676	99% 99%	99% 98%	NR115957.1 <i>Chryseobacterium flavum</i> strain CW-E2	* unpublished **[18]

PamvBac iso.17	KU862677	100% 99%	100% 98%	* unpublished **[19]
		KC248046.1	NR042941.1 <i>Paucibacter toxinivorans</i> 2C20	
PamvBac iso.18	KU862678	100% 93%	100% 93%	* unpublished **[20]
		HQ246251.1	NR029024.1 <i>Hydrogenophaga defluvii</i> BSB 9.5	
PamvBac iso.19	KU862679	100% 100%	100% 100%	* [13] ** [14]
		KC294042.1	NR029319.1 <i>Pseudomonas anguilliseptica</i> S1	
PamvBac iso.20	KU862680	100% 99%	100% 99%	*[21] **[20]
		HM153665.1	NR029024.1 <i>Hydrogenophaga defluvii</i> BSB 9.5	
PamvBac iso.21	KU862681	100% 99%	100% 99%	*[22] **[22]
		NR109522.1	NR109522.1 <i>Flavobacterium fontis</i> MIC 3010	
PamvBac iso.22	KU862682	100% 99%	100% 99%	*unpublished **[23]
		KF287757.1	NR025816.1 <i>Porphyrobacter donghaensis</i> SW-132	
PamvBac iso.23	KU862683	100% 99%	100% 99%	*unpublished **[24]
		LK054500.1	NR075062.2 <i>Micrococcus luteus</i> NCTC 2665	

References

- Gallego V, Sanchez-Porro C, Garcia MT, Ventosa A. *Massilia aurea* sp. nov., isolated from drinking water. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006;56:2449-2453.
- Halpern M, Senderovich Y, Snir S. *Rheinheimera chironomi* sp. nov., isolated from a chironomid (Diptera; Chironomidae) egg mass. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;57:1872-1875.
- Behrendt U, Ulrich A, Sproer C, Schumann P. *Chryseobacterium luteum* sp. nov., associated with the phyllosphere of grasses. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;57:1881-1885.

4. Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, Oyaizu H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:1563-1589.
5. Finneran KT, Johnsen CV, Lovley DR. *Rhodoferax ferrireducens* sp. nov., a psychrotolerant, facultatively anaerobic bacterium that oxidizes acetate with the reduction of Fe(III). *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:669-673.
6. Martinez-Murcia AJ, Benlloch S, Collins MD. Phylogenetic Interrelationships of Members of the Genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as Determined by 16S Ribosomal DNA Sequencing: Lack of Congruence with Results of DNA-DNA Hybridizations. *Int J Syst Bacteriol* 1992;42:412-421.
7. Nogi Y, Soda K, Oikawa T. *Flavobacterium frigidimaris* sp. nov., isolated from Antarctic seawater. *Syst Appl Microbiol* 2005;28:310-315.
8. Kong HH, Oh J, Deming C, Conlan S, Grice EA et al. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Res* 2012;22:850-859.
9. Ryu SH, Park JH, Moon JC, Sung Y, Lee SS et al. *Flavobacterium resistens* sp. nov., isolated from stream sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;58:2266-2270.
10. Nemeč A. *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1563-1567.
11. Kim J-J, Kanaya E, Weon H-Y, Koga Y, Takano K et al. *Flavobacterium compostarboris* sp. nov., isolated from leaf-and-branch compost, and emended descriptions of *Flavobacterium hercynium*, *Flavobacterium resistens* and *Flavobacterium johnsoniae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2012;62:2018-2024.
12. Zhang X, Sun L, Qiu F, McLean RJC, Jiang R et al. *Rheinheimera tangshanensis* sp. nov., a rice root-associated bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;58:2420-2424.
13. Shi Z, Cao Z, Qin D, Zhu W, Wang Q et al. Correlation Models between Environmental Factors and Bacterial Resistance to Antimony and Copper. *PLoS One* 2013;8:e78533.
14. Doménech A, Fernández-Garayzábal JF, Lawson P, García JA, Cutuli MT et al. Winter disease outbreak in sea-bream (*Sparus aurata*) associated with *Pseudomonas anguilliseptica* infection. *Aquaculture* 1997;156:317-326.
15. Glaeser SP, Galatis H, Martin K, Kämpfer P. *Flavobacterium cutihirudinis* sp. nov., isolated from *Hirudo verbana*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013;63:2841-2847.
16. Vaz-Moreira I, Nunes OC, Manaia CM. Diversity and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from drinking water. *Sci Total Environ* 2012;426:366-374.
17. Kim JH, Kim KY, Cha CJ. *Flavobacterium chungangense* sp. nov., isolated from a freshwater lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;59:1754-1758.
18. Zhou Y, Dong J, Wang X, Huang X, Zhang K-Y et al. *Chryseobacterium flavum* sp. nov., isolated from polluted soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;57:1765-1769.
19. Rapala J, Berg KA, Lyra C, Niemi RM, Manz W et al. *Paucibacter toxinivorans* gen. nov., sp. nov., a bacterium that degrades cyclic cyanobacterial hepatotoxins microcystins and nodularin. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005;55:1563-1568.
20. Kämpfer P, Schulze R, Jackel U, Malik KA, Amann R et al. *Hydrogenophaga defluvii* sp. nov. and *Hydrogenophaga atypica* sp. nov., isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005;55:341-344.
21. Li H, Xing P, Chen M, Bian Y, Wu QL. Short-term bacterial community composition dynamics in response to accumulation and breakdown of *Microcystis* blooms. *Water Res* 2011;45:1702-1710.
22. Chun J, Kang JY, Jahng KY. *Flavobacterium fontis* sp. nov., isolated from freshwater. *Int J Syst Evol Microbiol* 2012;63:1653-1657.
23. Yoon JH, Lee MH, Oh TK. *Porphyrobacter donghaensis* sp. nov., isolated from sea water of the East Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:2231-2235.

24. Qin S, Li J, Chen H-H, Zhao G-Z, Zhu W-Y et al. Isolation, Diversity, and Antimicrobial Activity of Rare Actinobacteria from Medicinal Plants of Tropical Rain Forests in Xishuangbanna, China. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:6176-6186.

Πίνακας 8.5: Κατανομή των βακτηριακών 16S rDNA κλώνων στους σταθμούς δειγματοληψίας της λίμνης Παμβώτιδας											
	Όνομα κλώνου	SS1	SS2	Άνοιξη		Καλοκαίρι		Φθινόπωρο		Χειμώνας	
				SS1	SS2	SS1	SS2	SS1	SS2	SS1	SS2
<i>γ-Proteobacteria</i>	BacPamv26	√	√	—	√	—	—	√	—	—	—
	BacPamv36	√	—	—	—	—	—	—	—	√	—
	BacPamv13A	√	—	√	—	—	—	—	—	—	—
	BacPamv24A	√	√	—	—	√	√	√	—	—	—
	BacPamv4	√	√	√	√	—	—	√	√	√	√
	BacPamv35	√	—	—	—	—	—	—	—	√	—
	BacPamv11	√	—	√	—	—	—	—	—	—	—
	<u>ΣΥΝΟΛΟ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ</u>	7	3	3	2	1	1	3	1	3	1
<i>β-Proteobacteria</i>	BacPamv10	√	—	√	—	√	—	—	—	—	—
	BacPamv15	√	√	√	—	—	√	—	√	—	√
	BacPamv50	—	√	—	—	—	√	—	—	—	—
	BacPamv16	√	√	√	√	—	—	√	—	—	—
	BacPamv27	√	√	—	—	—	√	√	—	—	—
	BacPamv49	—	√	—	—	—	√	—	√	—	—
	BacPamv19	√	√	—	—	√	√	—	√	√	√
	BacPamv1	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
	BacPamv32	√	—	—	—	—	—	—	—	√	—
	<u>ΣΥΝΟΛΟ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ</u>	7	7	4	2	3	6	3	4	3	3
<i>α-Proteobacteria</i>	BacPamv18	√	—	—	—	√	—	—	—	—	—

<u>ΣΥΝΟΛΟ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ</u>		1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Bacteroidetes</i>	BacPamv7	√	√	√	—	√	√	√	√	√	√
	BacPamv21	√	—	—	—	√	—	√	—	—	—
	BacPamv39	—	√	—	√	—	—	—	—	—	√
<u>ΣΥΝΟΛΟ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ</u>		2	2	1	1	2	1	2	1	1	2
<i>δ-Proteobacteria</i>	BacPamv24B	√	√	—	√	√	√	—	√	—	√
	BacPamv44	—	√	—	√	—	√	—	√	—	√
	BacPamv41	—	√	—	√	—	—	—	—	—	√
<u>ΣΥΝΟΛΟ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ</u>		1	3	0	3	1	2	0	2	0	3
<i>Actinobacteria</i>	BacPamv38	—	√	—	√	—	—	—	—	—	—
<u>ΣΥΝΟΛΟ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ</u>		0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Gemmatimonadetes</i>	BacPamv34	√	√	—	—	—	√	—	—	√	—
<u>ΣΥΝΟΛΟ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ</u>		1	1	0	0	0	1	0	0	1	0
<i>Spirochaetes</i>	BacPamv2	√	√	√	—	—	—	—	√	—	—
	BacPamv29	√	—	—	—	—	—	√	—	—	—
	BacPamv28	√	√	—	√	—	—	√	—	—	—
<u>ΣΥΝΟΛΟ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ</u>		3	2	1	1	0	0	2	1	0	0

<i>Planctomycetes</i>	BacPamv14	√	√	√	—	—	√	—	—	√	√
	BacPamv6	√	√	√	√	—	√	√	—	√	—
<u>ΣΥΝΟΛΟ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ</u>		2	2	2	1	0	2	1	0	2	1
<i>Cyanobacteria</i>	BacPamv20A	√	√	—	√	√	—	√	—	—	—
	BacPamv40	—	√	—	√	—	√	—	—	—	√
	BacPamv22	√	√	—	√	√	√	—	—	√	—
	BacPamv20B	—	√	—	√	—	√	—	√	—	√
	BacPamv17B	—	√	—	√	—	—	—	√	—	√
	BacPamv30	√	—	—	—	—	—	√	—	√	—
	BacPamv42	—	√	—	√	—	—	—	—	—	—
	BacPamv37	√	—	—	—	—	—	—	—	√	—
	BacPamv13C	√	√	—	√	—	√	√	√	√	√
<u>ΣΥΝΟΛΟ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ</u>		5	7	0	7	2	4	3	3	4	4
<i>Firmicutes</i>	BacPamv33	√	√	—	—	—	√	—	—	√	—
	BacPamv51	—	√	—	—	—	—	—	—	—	√
	BacPamv23	√	—	—	—	√	—	—	—	—	—
<u>ΣΥΝΟΛΟ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ</u>		2	2	0	0	1	1	0	0	1	1
<i>Nitrospirae</i>	BacPamv25	√	√	—	√	√	√	√	√	—	√
	BacPamv31	√	—	—	—	—	—	√	—	—	—
	BacPamv48	—	√	—	—	—	√	—	√	—	√
	BacPamv12	√	—	√	—	—	—	—	—	—	—
	BacPamv9B	√	—	√	—	√	—	—	—	—	—

Πίνακας 8.6: Σύγκριση των 16S rDNA αλληλουχιών των Αρχαίων που ανακτήθηκαν από τα δείγματα ιλύος της λίμνης Παμβώτιδας, με αντίστοιχες γνωστές 16S rDNA αλληλουχίες που βρίσκονται σε βάσεις δεδομένων

Clone name	Accession number	% query, % identity culture collection*	% query, % identity cultured species**	References
ArcPamv1	KC510289	100% 96% JN617408	100% 95% NR028163 <i>Methanolinea tarda</i> NOBI-1	*unpublished ** [1]
ArcPamv2	KC510290	100% 99% JN617359	100% 95% NR 044422 <i>Methanosphaerula palustris</i> strain E1-9c	*unpublished **[2]
ArcPamv3A	KC510291	100% 94% JX196214	100% 79% NR028646 <i>Methanotorris formicicus</i> strain Mc-S-70	*unpublished **[3]
ArcPamv3B	KC510292	99% 89% JN853647	100% 72% NR029140 <i>Methanococcus aeolicus</i> Nankai-3	*unpublished **[4]
ArcPamv4A	KC510293	100% 99% HM244131	100% 95% NR044422 <i>Methanosphaerula palustris</i> strain E1-9c	*unpublished **[2]
ArcPamv4B	KC510294	100% 99% JQ795001	100% 80% NR042784 <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> strain M1	*unpublished **[5]
ArcPamv4C	KC510295	100% 99% JX426833	100% 96% NR044422 <i>Methanosphaerula palustris</i> strain E1-9c	*unpublished **[2]
ArcPamv5	KC510296	100% 99% JN 617444	100% 97% NR028242 <i>Methanosaeta concilii</i> strain Opfikon	*unpublished **[6]
ArcPamv6	KC510297	100% 98% DQ301909	100% 95% NRO44422 <i>Methanosphaerula palustris</i> strain E1-9c	*[7] **[2]
ArcPamv7	KC510298	99% 99% JQ794950	99% 97% NR028163	*unpublished **[1]

			<i>Methanolinea tarda</i> NOBI-1	
ArcPamv8A	KC510299	100% 99% JF431625	100% 78% NR029059 <i>Palaeococcus</i> <i>helgesonii</i> strain PI1	*unpublished **[8]
ArcPamv8B	KC510300	100% 99% FJ755715	88% 95% NR028179 <i>Thermococcus</i> <i>thioreducens</i> OGL-20P	*[9] **[10]
ArcPamv9	KC510301	100% 99% JQ245676	100% 94% NR028163 <i>Methanolinea tarda</i> NOBI-1	*[11] **[1]
ArcPamv10	KC510302	100% 99% EF639431	100% 96% NR028163 <i>Methanolinea tarda</i> NOBI-1	*unpublished **[1]
ArcPamv11	KC510303	100% 99% JX426833	100% 96% NR044422 <i>Methanosphaerula</i> <i>palustris</i> strain E1-9c	*unpublished **[2]
ArcPamv12	KC510304	99% 99% AY125724	99% 96% NR028163 <i>Methanolinea tarda</i> NOBI-1	*unpublished **[1]
ArcPamv13	KC510305	99% 99% DQ785302	99% 95% NR044422 <i>Methanosphaerula</i> <i>palustris</i> strain E1-9c	*[12] **[2]
ArcPamv14	KC510306	100% 99% HQ330724	100% 95% NR044422 <i>Methanosphaerula</i> <i>palustris</i> strain E1-9c	*unpublished **[2]
ArcPamv15	KC510307	100% 98% HQ330702	100% 91% NR044422 <i>Methanosphaerula</i> <i>palustris</i> strain E1-9c	*unpublished **[2]
ArcPamv16	KC510308	100% 99% JQ794997	100% 96% NR044422 <i>Methanosphaerula</i> <i>palustris</i> strain E1-9c	*unpublished **[2]
ArcPamv17	KC510309	100% 99% AM503280	100% 95% NR044422 <i>Methanosphaerula</i> <i>palustris</i> strain E1-9c	*[13] **[2]

ArcPamv18A	KC510310	100% 98% EF639431	100% 96% NR028163 <i>Methanolinea tarda</i> NOBI-1	*unpublished **[1]
ArcPamv18B	KC510311	100% 99% JX426828	100% 80% NR042784 <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1 strain M1	*unpublished **[5]
ArcPamv20	KC510312	100% 99% FM165672	100% 96% NR044422 <i>Methanosphaerula palustris</i> strain E1-9c	*[14] **[2]
ArcPamv21A	KC510313	100% 99% JQ795001	100% 80% NR042784 <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1 strain M1	*unpublished **[5]
ArcPamv21B	KC510314	100% 99% JQ794995	100% 80% NR042784 <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1 strain M1	*unpublished **[5]
ArvPamv21C	KC510315	100% 99% JF431702	100% 78% NR029055 <i>Thermococcus aegaeus</i>	*unpublished **[15]
ArcPamv22	KC510316	100% 99% FJ755715	85% 80% NR028179 <i>Thermococcus thioeducens</i> OGL-20P	*[9] **[10]
ArcPamv23	KC510317	100% 99% HM244131	100% 95% NR044422 <i>Methanosphaerula palustris</i> strain E1-9c	*unpublished **[2]
ArcPamv24	KC510318	100% 99% HQ330702	100% 93% NR044422 <i>Methanosphaerula palustris</i> strain E1-9c	*unpublished **[2]
ArcPamv25	KC510319	100% 99% JQ245676	100% 94% NR044422 <i>Methanosphaerula palustris</i> strain E1-9c	*[11] **[2]
ArcPamv28	KC510320	100% 99% DQ676243	100% 95% NR044422 <i>Methanosphaerula palustris</i> strain E1-9c	*[16] **[2]

ArcPamv29	KC510321	100% 99% HQ330690	90% 92% NR042740 <i>Thermococcus hydrothermalis</i> strain AL662	*unpublished **[15]
ArcPamv30	KC510322	100% 99% HQ330690	85% 81% NR028179 <i>Thermococcus thioreducens</i> OGL-20P	*unpublished **[10]
ArcPamv31	KC510323	100% 99% DQ785302	100% 94% NR028163 <i>Methanolinea tarda</i> NOBI-1	*[12] **[1]
ArcPamv33	KC510324	100% 98% JF262336	100% 96% NR028163 <i>Methanolinea tarda</i> NOBI-1	*[17] **[1]
ArcPamv35	KC510325	100% 97% JQ792848	100% 78% NR028248 <i>Methanothermobacter defluvii</i>	*unpublished **[18]
ArcPamv36	KC510326	100% 92% JF853612	100% 78% NR043089 <i>Methanomethylovorans thermophila</i>	*unpublished **[19]
ArcPamv37	KC510327	100% 99% FJ755715	90% 92% NR028179 <i>Thermococcus thioreducens</i> OGL-20P	*[9] **[10]
ArcPamv38	KC510328	100% 100% FJ755715	90% 92% NR028179 <i>Thermococcus thioreducens</i> OGL-20P	*[9] **[10]
ArcPamv39	KC510329	100% 99% JQ079951	100% 98% NR028242 <i>Methanosaeta concilii</i> strain Opfikon	* unpublished **[6]
ArcPamv42	KC510330	99% 99% JQ794950	99% 97% NR028163 <i>Methanolinea tarda</i> NOBI-1	* unpublished **[1]
ArcPamv43	KC510331	99% 99% JX426879	99% 96% NR044422 <i>Methanosphaerula palustris</i> strain E1-9c	* unpublished **[2]
ArcPamv44	KC510332	99% 98% LN896671	99% 76% NR029140	* unpublished **[4]

			<i>Methanococcus aeolicus</i> NanKai-3	
ArcPamv45	KC510333	94% 98% AJ240005 97% 96% AF005766	94% 100% NR029214 <i>Thermofilum pendens</i> strain Hvv3, DSM 2474 94% 100% NR028877 <i>Staphylothermus hellenicus</i> DSM 12710 strain P8	*[20] **[21] **[22] **[23]
ArcPamv49	KC510334	100% 98% JF980361	100% 95% NR044422 <i>Methanosphaerula palustris</i> strain E1-9c	* unpublished **[2]
ArcPamv51A	KC510335	100% 99% JF431901	100% 80% NR042784 <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1 strain M1	* unpublished **[5]
ArcPamv51B	KC510336	99% 98% JQ794997	99% 94% NR044422 <i>Methanosphaerula palustris</i> strain E1-9c	* unpublished **[2]
ArcPamv52	KC510337	100% 99% HM244091	100% 80% NR042784 <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1 strain M1	* unpublished **[5]
ArcPamv54	KC510338	100% 99% JF431775	99% 83% NR043512 <i>Ignisphaera aggregans</i> DSM 17230 strain AQ1.S1	* unpublished **[24]
ArcPamv55	KC510339	100% 99% FM165672	100% 96% NR044422 <i>Methanosphaerula palustris</i> strain E1-9c	*[14] **[2]
ArcPamv57	KC510340	99% 99% JQ794950	99% 96% NR028163 <i>Methanolinea tarda</i> NOBI-1	* unpublished **[1]
ArcPamv58A	KC510341	99% 99% JN649164	99% 95% NR044422 <i>Methanosphaerula palustris</i> strain E1-9c	*[25] **[2]
ArcPamv58B	KC510342	99% 96% FN432722	99% 78% NR042734	*unpublished **[15]

			<i>Thermococcus barophilus</i> MP strain DSM 11836	
ArcPamv59	KC510343	99% 97% HQ330736	100% 78% NR025718 <i>Methanococcus vannielii</i> strain 5B	* unpublished **[5]
ArcPamv60	KC510344	100% 99% DQ310455	100% 77% NR028210 <i>Ferroplasma cupricumulans</i> BH2	*[26] **[27]
ArcPamv65A	KC510345	100% 90% HM004825	100% 78% NR029140 <i>Methanococcus aeolicus</i> NanKai-3	*[28] **[4]
ArcPamv65B	KC510346	100% 97% FJ755715	100% 78% NR042781 <i>Methanobacterium bryantii</i> strain MOH	*[9] **[5]
ArcPamv66	KC510347	98% 93% AB653407	100% 78% NR041513 <i>Thermogymnomonas acidicola</i> strain JCM 13583	* unpublished **[29]
ArcPamv67A	KC510348	100% 99% HE796161	100% 78% NR028701 <i>Methanocaldococcus vulcanius</i> M7	* unpublished **[30]
ArcPamv67B	KC510349	100% 99% HQ404340	100% 77% NR028646 <i>Methanotorriss formicicus</i> strain Mc-S-70	*unpublished **[3]
ArcPamv69	KC510350	100% 99% JN853654	100% 80% NR042784 <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1	*unpublished **[5]
ArcPamv70	KC510351	99% 100% AB652545	100% 93% NR028164 <i>Methanocella paludicola</i> SANAE	*unpublished **[31]
ArcPamv71	KC510352	100% 90% EF639526	100% 80% NR044786 <i>Methanobrevibacter smithii</i> ATCC 35061	* unpublished **[32]
ArcPamv72A	KC510353	100% 98% JQ595987	100% 95% NR042789	* unpublished **[5]

			<i>Methanospirillum hungatei</i> JF-1, strain JF1	
ArcPamv72B	KC510354	100% 99% DQ785302	100% 94% NR044422 <i>Methanosphaerula palustris</i> strain E1-9c	*[12] **[2]
ArcPamv75	KC510355	100% 96% JN649130	100% 94% NR043961 <i>Methanoculleus receptaculi</i>	*[25] **[33]
ArcPamv76	KC510356	100% 99% AB775723	100% 97% NR028163 <i>Methanolinea tarda</i> NOBI-1	*unpublished **[1]
ArcPamv77A	KC510357	100% 99% JQ794950	100% 96% NR028163 <i>Methanolinea tarda</i> NOBI-1	*unpublished **[1]
ArcPamv77B	KC510358	99% 97% FN646492	99% 92% NR044422 <i>Methanosphaerula palustris</i> E1-9c	* unpublished **[2]
ArcPamv79A	KC510359	100% 96% JN853749	100% 78% NR029059 <i>Palaeococcus helgesonii</i>	* unpublished **[8]
ArcPamv79B	KC510360	100% 99% JX426833	100% 96% NR044422 <i>Methanosphaerula palustris</i> E1-9c	* unpublished **[2]
ArcPamv79C	KC510361	100% 99% JQ792430	100% 96% NR044422 <i>Methanosphaerula palustris</i> E1-9c	* unpublished **[2]
ArcPamv79D	KC510362	97% 99% HQ330660	97% 95% NR044422 <i>Methanosphaerula palustris</i> E1-9c	* unpublished **[2]
ArcPamv82	KC510363	100% 99% JX426833	100% 96% NR044422 <i>Methanosphaerula palustris</i> E1-9c	* unpublished **[2]
ArcPamv83A	KC510364	99% 98% EF639443	99% 93% NR044422 <i>Methanosphaerula palustris</i> E1-9c	* unpublished **[2]

ArcPamv83B	KC510365	100% 99% JQ245676	100% 94% NR028163 <i>Methanolinea tarda</i> NOBI-1	*[11] **[1]
ArcPamv84A	KC510366	100% 99% JQ245676	100% 94% NR0128163 <i>Methanolinea tarda</i> NOBI-1	*[11] **[1]
ArcPamv84B	KC510367	87% 87% HQ330736 97% 76% EU983178	82% 76% NR102915 <i>Methanothermococcus</i> <i>okinawensis</i> IH 1	* unpublished *[34] **[35]
ArcPamv86A	KC510368	100% 99% JN617381	100% 80% NR074217 <i>Aciduliprofundum</i> <i>boonei</i> T469 strain T469	* unpublished ** unpublished
ArcPamv86B	KC510369	99% 97% EU519275	99% 95% NR044422 <i>Methanosphaerula</i> <i>palustris</i> E1-9c	* unpublished **[2]
ArcPamv88	KC510370	98% 99% JF431886	98% 98% NR028242 <i>Methanosaeta concilii</i> strain Opfikon	* unpublished **[6]
ArcPamv89	KC510371	100% 96% JQ792848	100% 78% NR116289 <i>Methanobacterium</i> <i>movens</i> strain TS-2	* unpublished **[36]
ArcPamv90	KC510372	100% 97% FN646483	100% 93% NR028242 <i>Methanosaeta concilii</i> Opfikon	* unpublished **[6]
ArcPamv92	KC510373	100% 99% JQ079951	100% 98% NR028242 <i>Methanosaeta concilii</i> Opfikon	* unpublished **[6]
ArcPamv96	KC510374	100% 99% HE964957	100% 94% NR028242 <i>Methanosaeta concilii</i> Opfikon	* unpublished **[6]
ArcPamv108A	KC510375	100% 99% HQ330667	100% 94% NR044422 <i>Methanosphaerula</i> <i>palustris</i> E1-9c	* unpublished **[2]
ArcPamv108B	KC510376	99% 99% JX426828	99% 80% NR042784 <i>Methanobrevibacter</i> <i>ruminantium</i> M1	* unpublished **[5]

ArcPamv109	KC510377	100% 99% HQ330667	100% 95% NR044422 <i>Methanosphaerula palustris</i> E1-9c	* unpublished **[2]
ArcPamv112	KC510378	100% 99% HQ330702	100% 93% NR044422 <i>Methanosphaerula palustris</i> E1-9c	* unpublished **[2]
ArcPamv114	KC510379	100% 99% HM244128	100% 84% NR028877 Staphylothermus hellenicus DSM 12710 strain P8	* unpublished **[23]
ArcPamv115	KC510380	99% 98% FN646492	99% 92% NR04442 <i>Methanosphaerula palustris</i> E1-9c	* unpublished **[2]

References

1. Imachi H, Sakai S, Sekiguchi Y, Hanada S, Kamagata Y et al. *Methanolinea tarda* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from a methanogenic digester sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;58:294-301.
2. Cadillo-Quiroz H, Yavitt JB, Zinder SH. *Methanosphaerula palustris* gen. nov., sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from a minerotrophic fen peatland. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;59:928-935.
3. Takai K, Nealson KH, Horikoshi K. *Methanotorris formicicus* sp. nov., a novel extremely thermophilic, methane-producing archaeon isolated from a black smoker chimney in the Central Indian Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:1095-1100.
4. Kendall MM, Liu Y, Sieprawska-Lupa M, Stetter KO, Whitman WB et al. *Methanococcus aeolicus* sp. nov., a mesophilic, methanogenic archaeon from shallow and deep marine sediments. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006;56:1525-1529.
5. Wright AD, Pimm C. Improved strategy for presumptive identification of methanogens using 16S riboprinting. *J Microbiol Methods* 2003;55:337-349.
6. Eggen R, Harmsen H, de Vos WM. Organization of a ribosomal RNA gene cluster from the archaeobacterium *Methanotheroxobacterium soehngenii*. *Nucleic Acids Res* 1990;18:1306.
7. Cadillo-Quiroz H, Brauer S, Yashiro E, Sun C, Yavitt J et al. Vertical profiles of methanogenesis and methanogens in two contrasting acidic peatlands in central New York State, USA. *Environ Microbiol* 2006;8:1428-1440.
8. Amend JP, Meyer-Dombard DR, Sheth SN, Zolotova N, Amend AC. *Palaeococcus helgesonii* sp. nov., a facultatively anaerobic, hyperthermophilic archaeon from a geothermal well on Vulcano Island, Italy. *Arch Microbiol* 2003;179:394-401.
9. Ye W, Liu X, Lin S, Tan J, Pan J et al. The vertical distribution of bacterial and archaeal communities in the water and sediment of Lake Taihu. *FEMS Microbiol Ecol* 2009;70:107-120.
10. Pikuta EV, Marsic D, Itoh T, Bej AK, Tang J et al. *Thermococcus thio-reducens* sp. nov., a novel hyperthermophilic, obligately sulfur-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;57:1612-1618.

11. Cheng TW, Chang YH, Tang SL, Tseng CH, Chiang PW et al. Metabolic stratification driven by surface and subsurface interactions in a terrestrial mud volcano. *ISME J* 2012;6:2280-2290.
12. Lehours AC, Evans P, Bardot C, Joblin K, Gerard F. Phylogenetic diversity of archaea and bacteria in the anoxic zone of a meromictic lake (Lake Pavin, France). *Appl Environ Microbiol* 2007;73:2016-2019.
13. Conrad R, Klose M, Noll M, Kemnitz D, Bodelier PLE. Soil type links microbial colonization of rice roots to methane emission. *Global Change Biol* 2008;14:657-669.
14. Wu L, Ma K, Li Q, Ke X, Lu Y. Composition of archaeal community in a paddy field as affected by rice cultivar and N fertilizer. *Microb Ecol* 2009;58:819-826.
15. Lepage E, Marguet E, Geslin C, Matte-Tailliez O, Zillig W et al. Molecular diversity of new Thermococcales isolates from a single area of hydrothermal deep-sea vents as revealed by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting and 16S rRNA gene sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:1277-1286.
16. Briece C, Moreira D, Lopez-Garcia P. Archaeal and bacterial community composition of sediment and plankton from a suboxic freshwater pond. *Res Microbiol* 2007;158:213-227.
17. Kan J, Clingenpeel S, Macur RE, Inskeep WP, Lovalvo D et al. Archaea in Yellowstone Lake. *ISME J* 2011;5:1784-1795.
18. Kotelnikova SV, Obratsova AY, Blotevogel K-H, Popov IN. Taxonomic Analysis of Thermophilic Strains of the Genus *Methanobacterium*: Reclassification of *Methanobacterium thermoalcaliphilum* as a Synonym of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43:591-596.
19. Jiang B, Parshina SN, van Doesburg W, Lomans BP, Stams AJ. *Methanomethylivorans thermophila* sp. nov., a thermophilic, methylotrophic methanogen from an anaerobic reactor fed with methanol. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005;55:2465-2470.
20. Casamayor EO, Schafer H, Baneras L, Pedros-Alio C, Muyzer G. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:499-508.
21. Chandler DP, Brockman FJ, Bailey TJ, Fredrickson JK. Phylogenetic Diversity of Archaea and Bacteria in a Deep Subsurface Paleosol. *Microb Ecol* 1998;36:37-50.
22. Kjems J, Leffers H, Olesen T, Holz I, Garrett RA. Sequence, Organization and Transcription of the Ribosomal RNA Operon and the Downstream tRNA and Protein Genes in the Archaeobacterium *Thermofilum pendens*. *Syst Appl Microbiol* 1990;13:117-127.
23. Arab H, Volker H, Thomm M. *Thermococcus aegaeicus* sp. nov. and *Staphylothermus hellenicus* sp. nov., two novel hyperthermophilic archaea isolated from geothermally heated vents off Palaeochori Bay, Milos, Greece. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:2101-2108.
24. Niederberger TD, Gotz DK, McDonald IR, Ronimus RS, Morgan HW. *Ignisphaera aggregans* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic crenarchaeote isolated from hot springs in Rotorua and Tokaanu, New Zealand. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006;56:965-971.
25. Yavitt JB, Yashiro E, Cadillo-Quiroz H, Zinder SH. Methanogen diversity and community composition in peatlands of the central to northern Appalachian Mountain region, North America. *Biogeochemistry* 2011;109:117-131.
26. Pierre EG, Connie L, Warwick FV. Remarkably diverse and contrasting archaeal communities in a large arctic river and the coastal Arctic Ocean. *Aquat Microb Ecol* 2006;44:115-126.
27. Hawkes RB, Franzmann PD, O'Hara G, Plumb JJ. *Ferroplasma cupricumulans* sp. nov., a novel moderately thermophilic, acidophilic archaeon isolated from an industrial-scale chalcocite bioleach heap. *Extremophiles: life under extreme conditions* 2006;10:525-530.

28. Lazar CS, L'Haridon S, Pignet P, Toffin L. Archaeal populations in hypersaline sediments underlying orange microbial mats in the Napoli mud volcano. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:3120-3131.
29. Itoh T, Yoshikawa N, Takashina T. *Thermogymnomonas acidicola* gen. nov., sp. nov., a novel thermoacidophilic, cell wall-less archaeon in the order Thermoplasmatales, isolated from a solfataric soil in Hakone, Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;57:2557-2561.
30. Jeanthon C, L'Haridon S, Reysenbach AL, Corre E, Vernet M et al. *Methanococcus vulcanius* sp. nov., a novel hyperthermophilic methanogen isolated from East Pacific Rise, and identification of *Methanococcus* sp. DSM 4213T as *Methanococcus fervens* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:583-589.
31. Sakai S, Imachi H, Hanada S, Ohashi A, Harada H et al. *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage 'Rice Cluster I', and proposal of the new archaeal order Methanocellales ord. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;58:929-936.
32. Lin C, Miller TL. Phylogenetic analysis of *Methanobrevibacter* isolated from feces of humans and other animals. *Arch Microbiol* 1998;169:397-403.
33. Cheng L, Qiu TL, Li X, Wang WD, Deng Y et al. Isolation and characterization of *Methanoculleus receptaculi* sp. nov. from Shengli oil field, China. *FEMS Microbiol Lett* 2008;285:65-71.
34. Handley KM, Boothman C, Mills RA, Pancost RD, Lloyd JR. Functional diversity of bacteria in a ferruginous hydrothermal sediment. *ISME J* 2010;4:1193-1205.
35. Takai K, Inoue A, Horikoshi K. *Methanothermococcus okinawensis* sp. nov., a thermophilic, methane-producing archaeon isolated from a Western Pacific deep-sea hydrothermal vent system. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:1089-1095.
36. Zhu J, Liu X, Dong X. *Methanobacterium movens* sp. nov. and *Methanobacterium flexile* sp. nov., isolated from lake sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 2011;61:2974-2978.

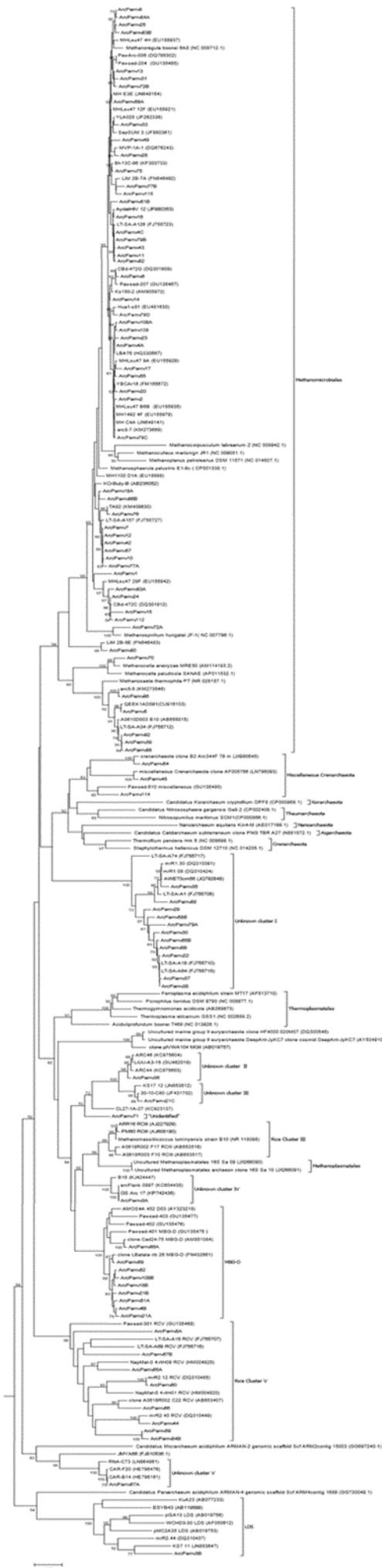
Πίνακας 8.7: Κατανομή των 16S rDNA κλώνων των Αρχαίων στους σταθμούς δειγματοληψίας της λίμνης Παμβώτιδας											
	Όνομα κλώνου	SS1	SS2	Άνοιξη		Καλοκαίρι		Φθινόπωρο		Χειμώνας	
				SS1	SS2	SS1	SS2	SS1	SS2	SS1	SS2
<i>Methanomicrobiales</i>	ArcPamv9	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
	ArcPamv84A	—	√	—	—	—	√	—	—	—	—
	ArcPamv25	√	√	—	—	√	√	—	—	—	—
	ArcPamv83B	—	√	—	—	—	√	—	√	—	—
	ArcPamv13	√	√	—	√	√	√	√	√	—	—
	ArcPamv31	√	√	—	—	—	—	√	√	√	—
	ArcPamv72B	—	√	—	√	—	—	—	—	—	—
	ArcPamv58A	—	√	—	√	—	√	—	√	—	√
	ArcPamv33	√	√	—	√	—	—	√	—	√	—
	ArcPamv49	√	—	—	—	—	—	—	—	√	—
	ArcPamv28	√	—	—	—	—	—	√	—	—	—
	ArcPamv75	—	√	—	√	—	√	—	√	—	√
	ArcPamv77B	—	√	—	√	—	—	—	—	—	—
	ArcPamv115	—	√	—	—	—	—	—	√	—	—
	ArcPamv51B	√	—	—	—	—	—	—	—	√	—
	ArcPamv16	√	√	—	√	√	√	√	√	√	√
	ArcPamv4C	√	√	√	√	—	√	—	√	√	—
	ArcPamv79B	—	√	—	—	—	√	—	—	—	—
	ArcPamv43	√	√	—	—	—	—	√	√	—	—
	ArcPamv11	√	√	√	√	√	√	√	√	—	√
	ArcPamv82	—	√	—	—	—	√	—	—	—	—
	ArcPamv6	√	—	√	—	—	—	—	—	—	—
	ArcPamv14	√	√	—	—	√	√	—	—	—	—

	ArcPamv79D	—	√	—	—	—	√	—	—	—	—
	ArcPamv108A	—	√	—	—	—	—	—	√	—	—
	ArcPamv109	—	√	—	—	—	—	—	√	—	—
	ArcPamv23	√	√	—	√	√	√	√	√	—	√
	ArcPamv4A	√	√	√	√	√	√	√	√	√	—
	ArcPamv17	√	√	—	√	√	√	√	√	√	—
	ArcPamv55	√	—	—	—	—	—	—	—	√	—
	ArcPamv20	√	√	—	√	√	√	√	—	—	—
	ArcPamv2	√	—	√	—	—	—	—	—	—	—
	ArcPamv79C	—	√	—	—	—	√	—	—	—	—
	ArcPamv18A	√	—	—	—	√	—	√	—	—	—
	ArcPamv86B	—	√	—	—	—	√	—	—	—	—
	ArcPamv76	—	√	—	√	—	—	—	—	—	—
	ArcPamv7	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
	ArcPamv12	√	—	—	—	√	—	—	—	—	—
	ArcPamv42	√	—	—	—	—	—	√	—	—	—
	ArcPamv57	√	—	—	—	—	—	—	—	√	—
	ArcPamv10	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
	ArcPamv77A	—	√	—	√	—	—	—	—	—	—
	ArcPamv1	√	—	√	—	—	—	—	—	—	—
	ArcPamv83A	—	√	—	—	—	√	—	—	—	—
	ArcPamv24	√	√	—	√	√	√	√	√	√	√
	ArcPamv15	√	√	—	√	√	√	√	√	√	√
	ArcPamv12	√	—	—	—	√	—	—	—	—	—
	ArcPamv72A	—	√	—	√	—	—	—	—	—	—
	ArcPamv90	—	√	—	—	—	√	—	—	—	—
	ArcPamv70	—	√	—	√	—	—	—	√	—	—
	ArcPamv96	—	√	—	—	—	√	—	—	—	—

Unknown cluster III	ArcPamv21C	√	—	—	—	√	—	√	—	—	—
<u>ΣΥΝΟΛΟ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ</u>		1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Unidentified	ArcPamv71	—	√	—	√	—	—	—	—	—	—
<u>ΣΥΝΟΛΟ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ</u>		0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Unknown cluster IV	ArcPamv3A	√	—	√	—	—	—	—	—	—	—
<u>ΣΥΝΟΛΟ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ</u>		1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
MBG-D	ArcPamv86A	—	√	—	—	—	√	—	√	—	√
	ArcPamv69	—	√	—	√	—	—	—	—	—	—
	ArcPamv52	√	—	—	—	—	—	—	—	√	—
	ArcPamv108B	—	√	—	—	—	—	—	√	—	—
	ArcPamv18B	√	—	—	—	√	—	—	—	—	—
	ArcPamv21B	√	√	—	√	√	—	√	—	—	—
	ArcPamv51A	√	—	—	—	—	—	—	—	√	—
	ArcPamv4B	√	—	√	—	√	—	√	—	—	—
	ArcPamv21A	√	√	—	√	√	—	√	—	—	—
<u>ΣΥΝΟΛΟ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ</u>		6	5	1	3	4	1	3	2	2	1
Rice cluster V	ArcPamv8A	√	—	√	—	—	—	—	—	—	—
	ArcPamv67B	—	√	—	√	—	—	—	√	—	—
	ArcPamv65A	—	√	—	√	—	—	—	√	—	—
	ArcPamv60	—	√	—	√	—	—	—	—	—	—
	ArcPamv66	—	√	—	√	—	—	—	—	—	—
	ArcPamv44	√	√	—	—	—	√	—	√	√	√
	ArcPamv59	—	√	—	√	—	—	—	—	—	—
	ArcPamv84B	—	√	—	—	—	√	—	—	—	—



Εικόνα 8.4: Φυλογενετικό δέντρο (Neighbor-Joining tree) με βάση την αντιστοίχιση των βακτηριακών 16S rDNA αλληλουχιών από τα δείγματα ιλύος της λίμνης Παμβώτιδας, με αλληλουχίες γνωστών ειδών που ανακτήθηκαν από τις βάσεις δεδομένων GenBank/EMBL/DBJ. Αναφέρονται τιμές ομαδοποίησης >50% (Bootstrap values >50%)



Εικόνα 8.5: Φυλογενετικό δέντρο (Neighbor-Joining tree) με βάση την αντιστοίχιση των 16S rDNA αλληλουχιών των Αρχαίων από τα δείγματα ιλύος της λίμνης Παμβώτιδας, με αλληλουχίες γνωστών ειδών που ανακτήθηκαν από τις βάσεις δεδομένων GenBank/EMBL/DBJ. Αναφέρονται τιμές ομαδοποίησης >50% (Bootstrap values >50%)