



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**«Μοριακός χαρακτηρισμός δυνητικώς τοξικών στελεχών
βακτηρίων και πρωτίστων από υδάτινα οικοσυστήματα:
το παράδειγμα του Αμβρακικού Κόλπου»**

Μαρία - Χριστίνα Μαυρογιώργου
Βιολόγος, MSc Βιοτεχνολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**«Μοριακός χαρακτηρισμός δυνητικώς τοξικών στελεχών
βακτηρίων και πρωτίστων από υδάτινα οικοσυστήματα:
το παράδειγμα του Αμβρακικού Κόλπου»**

Μαρία - Χριστίνα Μαυρογιώργου
Βιολόγος, MSc Βιοτεχνολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020

«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. Μαυρογιώργου Μαρίας-Χριστίνας: 11-2-2014

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 763^α/10-4-2014

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

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

Μέλη

Μπριασούλης Ευάγγελος, Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καταπόδης Πέτρος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημικής Μηχανικής, του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 8-5-2014

«Μοριακός Χαρακτηρισμός δυνητικώς τοξικών στελεχών βακτηρίων και πρωτίστων από υδάτινα οικοσυστήματα: Το παράδειγμα του Αμβρακικού»

Ημερομηνία ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 820^α/28-9-2017

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

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

Μέλη

Σταμάτης Χαράλαμπος, Καθηγητής Ενζυμικής Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καταπόδης Πέτρος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημικής Μηχανικής, του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 910^α/21-1-2020

Βώκου Δέσποινα	Καθηγήτρια Χερσαίων Οικοσυστημάτων και Βιοτικών Πόρων του Τμήματος Βιολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης
Σταμάτης Χαράλαμπος	Καθηγητής Ενζυμικής Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φριλίγγος Ευστάθιος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κατζηκακού Σωτήριος	Καθηγητής Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χάλλεϋ Τζων	Καθηγητής Οικολογίας, του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καταπόδης Πέτρος	Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημικής Μηχανικής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Σακκάς Ηρακλής

Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Βιοπαθολογίας-Μικροβιολογίας
και Υγιεινής

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 14-2-2020

Ιωάννινα 19-2-2020

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Άννα Μπατιστάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



*«Ωστόσο ρώτησε τα ζώα, θα σε διδάξουν
ρώτησε τα πουλιά και θα σου πουν
μίλα στη γη και θα σου δώσει μάθημα
της θάλασσας τα ψάρια θα σου διηγούνται.»*

Ιωβ 12, 7-8

*Πώς να εξηγήσεις την θάλασσα σε αυτούς
που την κοιτούν και βλέπουν μόνο νερό;*

*Στην Νάνσυ,
στους γονείς μου,
στην ανάμνηση της γιαγιάς Μαρίας*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Διεπιστημονικό Εργαστήριο Μοριακής Ογκολογίας, Κέντρο Βιοτρόπεζας Καρκίνου, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Τα κυανοβακτήρια μπήκαν απροσδόκητα στη ζωή μου το 2004, ξεκινώντας την διπλωματική μου εργασία. Από την πρώτη στιγμή τα αντιμετώπιζα με έμφυτο θαυμασμό με ό,τι νέο προκαλούσαν τη σκέψη μου. Η παρούσα διατριβή ξεκίνησε ως μια προσωπική ανάγκη που απλώς έπρεπε να εκπληρωθεί. Έχω την τύχη να τελειώσω την διατριβή με τα ίδια συναισθήματα, μόνο που τώρα όλα αυτά αποτελούν κομμάτι του «είναι» μου. Εκτός από τα κυανοβακτήρια, ο θαυμασμός μου επεκτάθηκε και στα πρώτιστα, κάνοντάς με να σκέφτομαι «αυτόν τον κόσμο τον μικρό, τον μέγα» Η συγγραφή και ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας, αποτέλεσε για μένα ιδιαίτερα εσωτερική και πολύπλοκη διαδικασία, ένα σημαντικό προσωπικό στοίχημα, με πολλά κέρδη και απώλειες, απότοκο των άλλοτε ευνοϊκών και άλλοτε δύσκολων συνθηκών.

Κατά τη διάρκειά της, πολλοί ήταν αυτοί που με την καθημερινή τους συμπαράσταση, την υπομονή τους και τη θετική τους σκέψη, ιδιαίτερα στις εποχές των μεγάλων διλημμάτων, συνέβαλαν στην εκπλήρωση του στόχου μου. Με την ολοκλήρωση της, νιώθω την ανάγκη, αλλά και την υποχρέωση, να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσοι συνέβαλαν να ξεκινήσει αλλά και να κλείσει ο κύκλος της διαδρομής αυτής.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Ευστάθιο Φριλίγγο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το θέμα της διδακτορικής μου διατριβής. Ιδιαίτερα, θέλω να τον ευχαριστήσω για την καθοδήγηση, τη συμπαράσταση, τις κατευθυντήριες οδηγίες και τις εύστοχες παρατηρήσεις του κατά την επίβλεψη της εργασίας μου.

Επίσης, οφείλω να εκφράσω ένα μεγάλο «ευχαριστώ» στους Δρ κ. Ιωάννη Σαΐνη και στην Δρ. κ. Κατερίνα Βαρέλη, για τις ατελείωτες ώρες που αφιέρωσαν, βοηθώντας με από τη συλλογή των δειγμάτων μέχρι και την συγγραφή της εργασίας. Ήταν πάντα πρόθυμοι να απαντήσουν σε κάθε απορία και να λύσουν κάθε δυσκολία που τυχόν παρουσιαζόταν. Είναι εκείνοι που με μύησαν στον θαυμαστό κόσμο της βιολογίας, πριν από περίπου 20 χρόνια. Ύστερα από τόσα χρόνια καθημερινής επικοινωνίας και συνεργασίας, έχει αναπτυχθεί μια πολύ δυνατή φιλία.

Στον αείμνηστο Καθηγητή Ευάγγελο Μπριασούλη, εμπνευστή και δημιουργό της Βιοτρόπεζας Καρκίνου του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, οφείλω ένα ευχαριστώ γιατί μου έδωσε την ευκαιρία να αποτελέσω μέλος της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου του, θέτοντάς στη διάθεσή μου την υλικοτεχνική υποδομή του εργαστηρίου της Βιοτρόπεζας. Η απουσία του είναι ιδιαίτερα αισθητή, αλλά το έργο του συνεχίζει να μας εμπνέει, δείχνοντας μας τον δρόμο της ουσιαστικής και πραγματικής έρευνας.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: τον κ. Χαράλαμπο Σταμάτη, Καθηγητή, και τον κ. Πέτρο Καταπόδη, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την άφογη συνεργασία όλα αυτά τα χρόνια, τις χρήσιμες συμβουλές τους και την διάθεσή τους να μοιραστούν απλόχερα τις γνώσεις τους σε τομείς που εφάπτονται του αντικειμένου τους.

Για τον χρόνο που διέθεσαν προκειμένου να κρίνουν την παρούσα εργασία, ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς επιτροπής.

Στα χρόνια που διήρκησε η διατριβή, δημιουργήθηκαν πολλές συνεργασίες και φιλίες. Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ, θέλω να εκφράσω στην Δρ. Αναστασία Τούκα, που μοιράστηκε τις γνώσεις της μαζί μου, χωρίς καμμία ιδιοτέλεια. Οι στιγμές που περάσαμε στο εργαστήριο, κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, με τις Δήμητρα Κουμάση, Δέσποινα Βόγγολη και Θεοδώρα (Δώρα) Λόντρα, αποτελούν μια όμορφη ανάμνηση. Μοιραστήκαμε τον ενθουσιασμό, τις προκλήσεις, τις δυσκολίες και τις ευχάριστες στιγμές, δουλεύοντας παρέα σε ένα κλίμα που ήταν πάντα ιδανικό.

Η εργασία αυτή δε θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς την συνεργασία με τους κ. Γιώργο Βαγενά, για τις μετρήσεις των φυσικοχημικών παραμέτρων, και τον Δρ. κ. Σάββα Γενίτσαρη, για την εκπαίδευσή μου στην ανάλυση των αποτελεσμάτων αλληλούχισης επόμενης γενιάς.

Για τις εύστοχες παρατηρήσεις του στη συγγραφή της διατριβής, ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου τον κ. Ζήση Κάκο. Η έντονη συγκίνησή του, όταν είδε ένα από τα πρώτα αντίτυπα θα μείνει για πάντα χαραγμένη στο μυαλό μου.

Θα ήταν παράλειψή μου, να μην ευχαριστήσω τον Νίκο. Εμφανίστηκε στη ζωή μου τα δύο τελευταία χρόνια και από τότε η υποστήριξή του σε όλα τα επίπεδα, η ενθάρρυνσή του και η υπομονή του υπήρξαν αρωγοί στην περάτωση και την συγγραφή της διατριβής.

Ο ακρογωνιαίος λίθος όλων όσα έχω καταφέρει ήταν και θα είναι η οικογένειά μου. Με την γιαγιά Μαρία (Μαρικάκι) ξεκινήσαμε «μαζί» το ταξίδι στον κόσμο της βιολογίας. Ήταν πάντα διαθέσιμη να ξεφυλλίσει τα βιβλία της βιολογίας που διάβαζα όλα αυτά τα χρόνια, κι ας καταλάβαινε ελάχιστα. Ήταν ο πρώτος διορθωτής, στα πρόχειρα κείμενα της πτυχιακής και της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Στο βαθμό που κατανοούσε τις βιολογικές έννοιες, οι παρατηρήσεις της ήταν εύστοχες. Δυστυχώς δεν είναι πλέον πλάι μου, για να δει το τέλος της «κοινής» μας προσπάθειας.

Δεν υπάρχει συνδυασμός λέξεων για να εκφράσω το ευχαριστώ και την ταπεινότητα απέναντι τους και την στήριξη που έλαβα από δύο πολύ σπουδαίους ανθρώπους, τους γονείς μου, τη μητέρα μου Νικολέττα και τον πατέρα μου Δημήτρη. Υπό το ίδιο πρίσμα, η αδελφή μου Νάνσυ, παραμένει ο καλύτερος άνθρωπος που γνωρίζω, η καλύτερη μου φίλη και η πιο αξιόπιστη παρουσία στη ζωή μου.

Η εργασία αυτή δεν είναι απλώς ένα αποτέλεσμα μελέτης έξι χρόνων. Είναι πολύ περισσότερα. Σε «όσους περπάτησαν μαζί μου» λοιπόν, ένα «ευχαριστώ» είναι λίγο, πολλά «ευχαριστώ» είναι και πάλι λίγα!

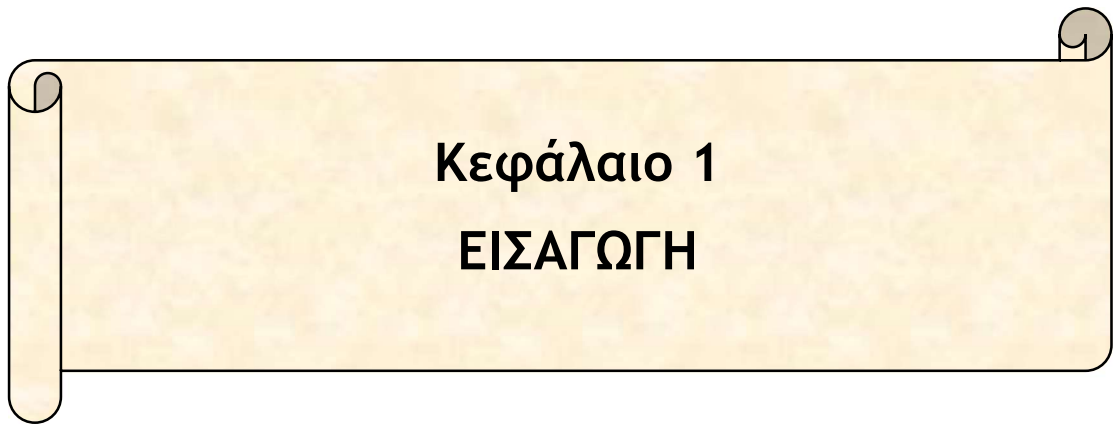
*Μαρία -Χριστίνα Μαυρογιώργου
Ιωάννινα, 2020*

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Κεφάλαιο 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1. Εισαγωγή.....	11
1.2. Βιοτοξίνες στη θάλασσα	11
1.2.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή βιοτοξινών	13
1.2.2. Επιδράσεις στους ανθρώπους	15
1.2.3. Επιπτώσεις στα ζώα	15
1.2.4. Οικονομικές επιπτώσεις.....	16
1.2.5. Έλεγχος και παρακολούθηση των HAB.....	17
1.2.6. Καθορισμός ρυθμιστικών ορίων.....	18
1.2.7. «Αναδυόμενες» τοξίνες	19
1.2.8. Μέθοδοι ανάλυσης	20
1.2.9. Θαλάσσιες βιοτοξίνες	24
1.2.9.1. Υδροφίλες βιοτοξίνες	24
1.2.9.1.1. Δομοϊκό Οξύ: Τοξίνες Αμνησιακού Συνδρόμου (AST).....	24
1.2.9.1.2. Σαξιτοξίνες: Τοξίνες Παραλυτικού Συνδρόμου (PST).....	26
1.2.9.1.3. Μικροκυστίνες: Τοξίνες Ηπατικού Συνδρόμου (HST)	29
1.2.9.2. Λιπόφιλες Βιοτοξίνες.....	33
1.2.9.2.1. Οκαδαϊκό οξύ: Τοξίνες Διαρροϊκού Συνδρόμου (DST).....	33
1.2.9.2.2. Μπρεβετοξίνες: Τοξίνες Νευροτοξικού Συνδρόμου (NST)	35
1.3. Μύδια.....	39
1.4. Μικροοργανισμοί της θάλασσας	40
1.4.1. Τα πρώτιστα στα θαλάσσια οικοσυστήματα	41
1.4.1.1. Νέα είδη Πρωτίστων	42
1.4.1.2. Τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην ταξινόμηση των πρωτίστων	43
1.4.2. Κυανοβακτήρια	44
1.4.2.1. Ποικιλότητα κυανοβακτηρίων	44
1.4.2.2. Φυλογένεση κυανοβακτηρίων.....	45
1.5. Αμβρακικός κόλπος.....	49
1.6. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	53
Κεφάλαιο 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	54
2.1. Συλλογή, επεξεργασία και αποθήκευση δειγμάτων.....	57
2.1.1. Συλλογή δειγμάτων	57

2.1.2.	Επεξεργασία και αποθήκευση δειγμάτων	58
2.1.2.1.1.	Επεξεργασία και αποθήκευση δειγμάτων νερού	58
2.1.2.1.2.	Επεξεργασία και αποθήκευση δειγμάτων δίθυρων	58
2.2.	Μέτρηση φυσικοχημικών παραμέτρων των δειγμάτων	58
2.3.	Ποσοτικός προσδιορισμός τοξινών στον Αμβρακικό κόλπο.....	58
2.3.1.	Εκχύλιση τοξινών από μυϊκό ιστό δίθυρων	59
2.3.2.	Ενζυμοσυνδεόμενος ανοσοπροσοροφητικός προσδιορισμός (ELISA) τοξινών.....	60
2.4.	Μοριακός χαρακτηρισμός πρωτίστων στον Αμβρακικό Κόλπο.....	62
2.4.1.	Εκχύλιση DNA από τα δείγματα νερού	62
2.4.2.	Αλληλούχιση DNA επόμενης γενιάς (NGS)	63
2.4.2.1.	Επεξεργασία δεδομένων από την NGS	63
2.4.2.2.	Ανάλυση δεδομένων από την NGS	64
2.5.	Μοριακός χαρακτηρισμός κυανοβακτηρίων στον Αμβρακικό Κόλπο.....	65
2.5.1.	PCR για 16S rDNA-ITS-23S.....	65
2.5.2.	Κλωνοποίηση επιθυμητών τμημάτων DNA σε πλασμίδια	67
2.5.3.	Γονιδιακή βιβλιοθήκη για 16S rDNA-ITS-23S κυανοβακτηρίων	68
2.5.4.	Αλληλούχιση κλώνων και ταυτοποίηση κυανοβακτηρίων	69
2.5.5.	Διερεύνηση αλληλουχιών DNA μέσω αναλύσεων στοίχισης (Basic Local Alignment Tool – BLAST)	69
2.5.6.	Κατασκευή φυλογενετικών δένδρων.....	70
2.6.	Εμπλουτισμένη καλλιέργεια επιφανειακού νερού.....	71
2.6.1.	Ανάπτυξη και απομόνωση κυανοβακτηρίων από δείγματα νερού του Αμβρακικού κόλπου	71
2.6.2.	Έλεγχος παραγωγής μικροκυστίνης στις καλλιέργειες.....	71
2.6.3.	Μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας στην καλλιέργεια A10	71
2.6.4.	PCR για γονίδια του οπερονίου της μικροκυστίνης.....	72
Κεφάλαιο 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....		75
3.1.	Δειγματοληψία.....	77
3.2.	Φυσικοχημικές μετρήσεις δειγμάτων νερού	77
3.3.	Ποσοτικός προσδιορισμός θαλάσσιων βιοτοξινών σε δίθυρα.....	77
3.4.	Μοριακός χαρακτηρισμός των πρωτίστων.....	81
3.5.	Μοριακός χαρακτηρισμός των κυανοβακτηρίων	86
3.5.1.	Με γονιδιακή βιβλιοθήκη για την περιοχή 16S – ITS – 23S rDNA και φυλογενετική ανάλυση	86
3.5.2.	Με NGS.....	88

3.6.	Καλλιέργειες κυανοβακτηρίων και τοξικότητα.....	92
3.6.1.	Χαρακτηρισμός κυανοβακτηρίων της καλλιέργειας A10	92
3.6.2.	Έκφραση γονιδίων παραγωγής μικροκυστίνης στην καλλιέργεια A10	93
Κεφάλαιο 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....		97
4.1.	Φυσικοχημικά και ωκεανογραφικά χαρακτηριστικά του Αμβρακικού Κόλπου... ..	99
4.2.	Βιοτοξίνες στον Αμβρακικό Κόλπο.....	99
4.3.	Ποικιλότητα πρωτίστων στα δείγματα νερού.....	104
4.4.	Ποικιλότητα κυανοβακτηρίων στα δείγματα νερού.....	105
4.5.	Εμπλουτισμένη καλλιέργεια κυανοβακτηρίων από δείγματα του Αμβρακικού Κόλπου	109
Κεφάλαιο 5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ		113
Κεφάλαιο 6 ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ.....		119
Κεφάλαιο 7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		127
Κεφάλαιο 8 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ		143



Κεφάλαιο 1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Εισαγωγή

Τα κυανοβακτήρια, τα δεινομαστιγωτά, τα φύκη και τα διάτομα είναι υδρόβιοι μικροοργανισμοί που βρίσκονται σε όλο το πλανήτη, τόσο σε λίμνες όσο και σε ωκεανούς. Οι οργανισμοί αυτοί είναι γνωστοί ως φυτοπλαγκτόν. Από τους θαλάσσιους φυτοπλαγκτονικούς οργανισμούς των ωκεανών, 300 είδη είναι ικανά να πολλαπλασιάζονται ταχέως και σχηματίζουν πυκνή βιομάζα [1], προκαλώντας μαζικούς θανάτους σε ψάρια είτε μέσω εξάντλησης του διαλυμένου στο νερό οξυγόνου, είτε μέσω της φυσικής απόφραξης των βραγχίων τους, είτε παράγοντας τοξικούς δευτερογενείς μεταβολίτες.

1.2. Βιοτοξίνες στη θάλασσα

Ραγδαία αύξηση ή συσσώρευση πληθυσμού φυκών σε υδάτινα οικοσυστήματα είναι ένα φαινόμενο γνωστό ως άνθιση των φυκών (algal bloom) [2]. Όταν, μάλιστα κατά τη διάρκεια μια άνθισης παράγονται δευτερογενείς μεταβολίτες με τοξικές δράσεις σε άλλους οργανισμούς, το φαινόμενο είναι γνωστό ως HAB (Harmful Algal Bloom). Οι βιοτοξίνες αυτές μπορεί να επηρεάσουν την ανθρώπινη υγεία, προσβάλλοντας το ήπαρ (ηπατοτοξίνες), το νευρικό σύστημα (νευροτοξίνες) και το δέρμα (δερματοτοξίνες) [3]. Δεδομένου ότι οι τοξίνες αυτές συσσωρεύονται στα οστρακοειδή, τα HAB αποτελούν σημαντικό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Απειλούν την ποιότητα των υδάτων, την υγεία των έμβιων όντων, την αναψυχή, τον τουρισμό, την υδατοκαλλιέργεια και τα θαλάσσια οικοσυστήματα [4].

Οι θαλάσσιες βιοτοξίνες διακρίνονται σε υδρόφιλες και λιπόφιλες, με βάση τη χημεία και την υδατοδιαλυτότητα τους. Εντός αυτών των δύο κατηγοριών, οι βιοτοξίνες ομαδοποιούνται με βάση το σύνδρομο που προκαλούν (Πίνακας 1.1). Τα σύνδρομα που σχετίζονται με την έκθεση σε βιοτοξίνες συνήθως ονομάζονται με βάση τα αποτελέσματα που προκαλούν ή την ονομασία των οργανισμών που τις παράγουν. Για παράδειγμα, οι τοξίνες του παραλυτικού συνδρόμου (PST) είναι νευροτοξίνες που μπορούν να προκαλέσουν παράλυση, ενώ οι μπρεβετοξίνες ονομάζονται έτσι επειδή παράγονται από το διάτομο *Karenia brevis*. Ορισμένα είδη του διατόμου *Pseudo-nitzschia* είναι ικανά να παράγουν βιοτοξίνη υπεύθυνη για την αμνησιακή δηλητηρίαση από οστρακοειδή (ASP). Στα γλυκά νερά, είναι επίσης γνωστό ότι πολλά είδη κυανοβακτηρίων παράγουν PSTs και ηπατοτοξίνες [5]. Τα καρκινοειδή, τα οστρακόδερμα και τα ψάρια που τρέφονται με αυτό το φυτοπλαγκτόν συσσωρεύουν βιοτοξίνες και τις προωθούν στα ανώτερα επίπεδα της τροφικής αλυσίδας. Ο άνθρωπος και τα ζώα εκτίθενται σε αυτές τις τοξίνες ή μέσω τροφής των άλλων οργανισμών (δίθυρα, καρκινοειδή, οστρακόδερμα, ψάρια) ή μέσω κατάποσης μολυσμένου νερού [6].

Πίνακας 1.1: Σύνδρομα δηλητηρίασης λόγω κατανάλωσης οστρακοειδών από θαλάσσιες βιοτοξίνες, οργανισμοί που τις παράγουν και καταγεγραμμένες επιπτώσεις σε ανθρώπους

Τοξίνες	Τοξικό Σύνδρομο	Είδη που τις παράγουν	Καταγεγραμμένες επιπτώσεις σε ανθρώπους
<u>Υδροφιλες</u>			
Δομοϊκό οξύ και ανάλογες χημικές ενώσεις	Αμνησιακή δηλητηρίαση (ASP) [7]	<i>Pseudo-nitzschia spp.</i> Red algae (<i>Chondria armata</i> , <i>Digenea simplex</i> , <i>Alsidium corallinum</i>)	έμετος, διάρροια, κοιλιακό άλγος, σύγχυση, απώλεια μνήμης, κρίση, κώμα, θάνατος
Σαξιτοξίνες και ανάλογες χημικές ενώσεις	Παραλυτική δηλητηρίαση (PSP) [8]	Πρώτιστα: <i>Alexandrium</i> , <i>Gymnodinium</i> , <i>Pyrodinium bahamense var. compressum</i> , Κυανοβακτήρια: <i>Lyngbya</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Phlanktothrix</i>)	ναυτία, παραισθησία, ταχυκαρδία, μυϊκή παράλυση, αναπνευστική ανεπάρκεια, θάνατος
Μικροκυστίνες	Ηπατική δηλητηρίαση (HSP)[9]	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Oscillatoria</i>	κοιλιακό άλγος, έμετος και ναυτία, διάρροια, κεφαλαλγία, φουσκάλες γύρω από το στόμα <u>μετά από εισπνοή</u> πονόλαιμο, ξηρό βήχα και πνευμονία
<u>Λιπόφιλες</u>			
Οκαδαϊκό οξύ, Δινοφυσιοτοξίνες	Διαρροϊκή δηλητηρίαση (DSP) [10]	<i>Dinophysis spp.</i> , <i>Prorocentrum</i>	ναυτία, έμετος, διάρροια, κοιλιακό άλγος
Μπρεβετοξίνες	Νευροτοξική δηλητηρίαση (NSP) [11]	<i>Karenia brevis spp.</i> <i>Chattonella antiqua</i> , <i>Fibrocapsa japonica</i> , <i>Heterosigma akashiwo</i>	<u>μετά την κατάποση</u> ναυτία, έμετος, διάρροια, ψύχωση, εφίδρωση, υπόταση δυσαισθησία, , παραισθησία των χειλιών, πρόσωπο και άκρα, κράμπες, παράλυση, επιληπτικές κρίσεις και κώμα <u>μετά από εισπνοή</u> Ρινόρροια, Βρογχοσυστολή, Βήχας

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει παρατηρηθεί αύξηση των HAB. Στην Βόρεια Αμερική, κατά μήκος της δυτικής ακτής του Καναδά, των ΗΠΑ και του Μεξικού έχουν καταγραφεί ανθίσεις διατόμων που παράγουν αμνησιακές τοξίνες και δινομαστιγωτών που παράγουν παραλυτικές τοξίνες [12]. Στην Τουρκία, έχουν αναφερθεί συχνές ανθίσεις μικροοργανισμών που παράγουν αμνησιακές τοξίνες [13], ενώ στην Ιρλανδία έκλεισαν περιοχές συγκομιδής οστρακοειδών λόγω των αμνησιακών και παραλυτικών τοξινών που βρίσκονται πάνω από τα επιτρεπόμενα όρια στο σώμα των οστρακοειδών [14, 15]. Τα τελευταία χρόνια, το φυτοπλαγκτόν και οι συναφείς βιοτοξίνες βρίσκονται όλο και περισσότερο σε τόπους που δεν είχαν καταγραφεί HAB: Στην Ισλανδία, η βόρεια ακτή του Eyjafjordur και η δυτική ακτή του Breidafjordur γνώρισαν άνθηση *Alexandrium spp.* τον Ιούνιο του 2009. Η μόλυνση των μπλε μυδιών με παραλυτικές τοξίνες (PST), που οδήγησαν σε εκτεταμένο κλείσιμο των τόπων συλλογής, ήταν η πρώτη απαγόρευση που σχετίζεται με βιοτοξίνες στην Ισλανδία [16]. Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι οι συγκομιδές στρειδιών έκλεισαν για πρώτη φορά στον Κόλπο του Μεξικού, λόγω της επιβεβαιωμένης παρουσίας οκαδαϊκού οξέος [17]. Ομοίως, έχουν δημοσιευθεί πρώτες αναφορές του αμνησιακών τοξινών στα νότια παράλια της Αυστραλίας [18]. Στην Ελλάδα, απαγόρευση συγκομιδής μυδιών από μυδοκαλλιέργειες συμβαίνει σχεδόν σε ετήσια βάση, αλλά για μικρό χρονικό διάστημα [19, 20].

Οι αιτίες της αύξησης των HAB οφείλονται σε φυσικούς και ανθρωπογενείς παράγοντες, όπως η διασπορά των τοξικών ειδών μέσω θαλάσσιων ρευμάτων ή μέσω του έρματος πλοίων, η υδατοκαλλιέργεια αλλά και η παρακολούθηση των υδάτινων οικοσυστημάτων σε τακτά χρονικά διαστήματα και με πιο ευαίσθητες τεχνικές [21-23]. Η αλλαγή του κλίματος έχει επίσης αναφερθεί ως ένας από τους βασικούς παράγοντες αύξησης των HABs [24]. Οι αυξημένες θερμοκρασίες της θάλασσας και η στρωματοποίηση του νερού αυξάνουν τον ρυθμό ανάπτυξης των δινομαστιγωτών [25]. Ταυτόχρονα, η μείωση της θρεπτικής αξίας του επιφανειακού νερού ευνοεί την ανάπτυξή τους [26]. Τα κλιματικά μοντέλα προβλέπουν όλο και πιο συχνή εμφάνιση HAB στο μέλλον [27].

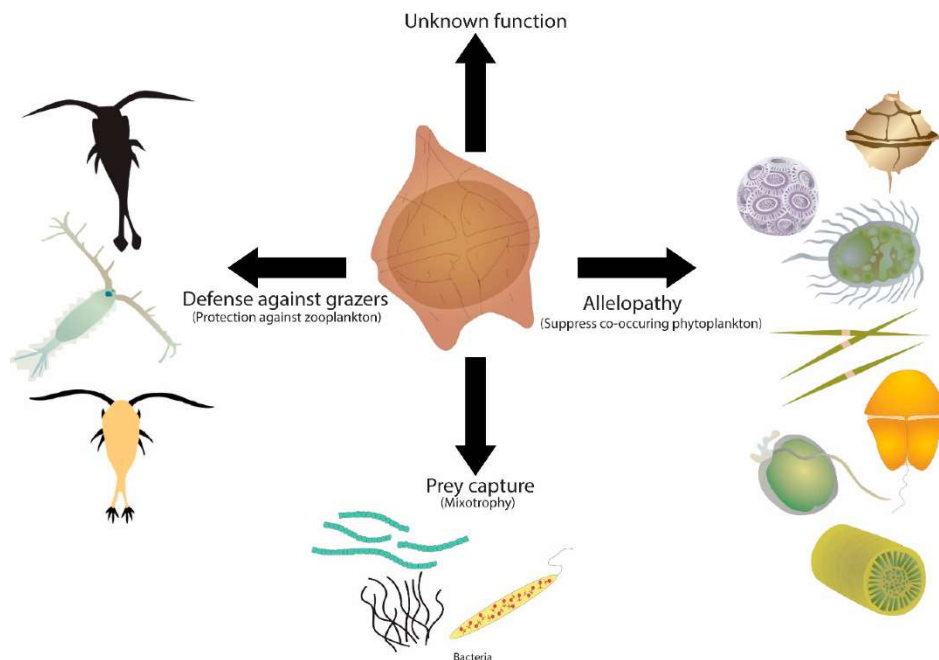
1.2.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή βιοτοξινών

Η παραγωγή βιοτοξινών από το φυτοπλαγκτόν επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες. Η διαθεσιμότητα των θρεπτικών ουσιών, όπως ο διαλυμένος στο νερό σίδηρος, αλλά και περιβαλλοντικές παράμετροι (ακτινοβολία, θερμοκρασία, αλατότητα, ανόργανα θρεπτικά συστατικά) έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν της περιεκτικότητα και τη σύνθεση βιοτοξινών για πολλά διαφορετικά στελέχη του

Alexandrium [28, 29], ενώ δεν έχει βρεθεί κάποια συσχέτιση μεταξύ της φωτοσύνθεσης ή του ρυθμού ανάπτυξης και της ολικής τοξικότητας.

Τα δινωμαστιγωτά, όπως το *Alexandrium*, είναι πιο ανταγωνιστικά σε συνθήκες με περιορισμένα θρεπτικά συστατικά [30]. Σε ένα στέλεχος του *A. fundyense* παρατηρήθηκαν δραματικές αλλαγές στη σύνθεση βιοτοξινών, όταν αναπτύχθηκε σε ημισυνεχείς καλλιέργειες με περιορισμένη πηγή αζώτου και φωσφόρου [28]. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί σημαντικές αλλαγές στη σύνθεση βιοτοξινών σε μικροοργανισμούς που εκτίθενται σε διαφορετικές καταπονήσεις [25, 31]. Παρ' όλα αυτά, διάφορα προφίλ βιοτοξινών έχουν παρατηρηθεί σε διαφορετικούς πληθυσμούς φυτοπλαγκτού παγκοσμίως [32].

Η παραγωγή βιοτοξινών μπορεί επίσης να είναι ένας αμυντικός μηχανισμός κατά των οργανισμών που τρέφονται από τους τοξικούς μικροοργανισμούς ή ακόμη και να χρησιμεύουν ως ενδιάμεσες ενώσεις σε οδούς απορρόφησης θρεπτικών ουσιών (Εικόνα 1.1) [33].



Εικόνα 1.1: Η παραγωγή τοξινών από τα δινωμαστιγωτά, έχει διάφορους οικολογικούς ρόλους [34].

Υπάρχει χρόνος υστέρησης μεταξύ του μέγιστου της ανθοφορίας και της μέγιστης τοξικότητας. Για παράδειγμα, η μέγιστη τοξικότητα των μυδιών μετρήθηκε 13 ημέρες μετά την καταμέτρηση του μέγιστου αριθμού κυττάρων μιας ανθοφορίας του *Gymnodinium catenatum* [35]. Παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση της συγκέντρωσης C3, C4 και GTX6 (ανάλογες χημικές ενώσεις σαξιτοξινών), υποδηλώνοντας μια διαδικασία απομάκρυνσης στα μύδια. Η ποσοτικοποίηση γίνεται ιδιαίτερα σημαντική κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, καθώς ο υψηλότερος κίνδυνος δηλητηρίασης για τον άνθρωπο συμβαίνει σε αυτό το στάδιο.

1.2.2. Επιδράσεις στους ανθρώπους

Η κύρια οδός έκθεσης του ανθρώπου σε θαλάσσιες βιοτοξίνες είναι μέσω της κατανάλωσης τοξικών θαλασσινών [36]. Οι άνθρωποι όμως, μπορούν να εκτεθούν σε θαλάσσιες βιοτοξίνες μέσω σωματικής επαφής με το νερό κατά τη διάρκεια ενός HAB [37] ή μέσω εισπνοής αερολυμάτων βιοτοξινών, όταν η δράση των κυμάτων κοντά στις παραλίες διαλύει τα κύτταρα των διατομών που παράγουν τοξίνες [38-40]. Η έκθεση σε αερολύματα που περιέχουν μπρεβετοξίνες έχει συνδεθεί με επιδεινούμενα συμπτώματα άσθματος [41, 42].

Τα χαρακτηριστικά αυτών των τοξινών δεν αλλάζουν με το μαγείρεμα ή την ψύξη και δεν τροποποιούν τη γεύση των μολυσμένων οργανισμών, για αυτό είναι πολύ δύσκολο να εντοπιστούν [43].

1.2.3. Επιπτώσεις στα ζώα

Η συσσώρευση βιοτοξινών με κατανάλωση οστρακοειδών, οστρακόδερμων και μαλάκιων μπορεί να επηρεάσει πολλαπλά τροφικά επίπεδα σε θαλάσσια περιβάλλοντα και τροφικές αλυσίδες, επηρεάζοντας θαλάσσια ζώα που ζουν ελεύθερα και ζώα υδατοκαλλιέργειας όπως μύδια, αστακούς και σολομό [44]. Επίσης, έχει καταγραφεί θνησιμότητα μεγάλων ζώων όπως δελφίνια [45], φώκιες [46], θαλάσσια λιοντάρια [47] και θαλάσσια πτηνά [48]. «Ένοχοι» στην πρόωξη των βιοτοξινών κατά μήκος των τροφικών αλυσίδων έχουν βρεθεί και μη παραδοσιακοί φορείς των τοξινών, όπως τα γαστερόποδα και τα ψάρια που τρώνε πλαγκτόν [49]. Στα οστρακοειδή, μέσω διήθησης, τα δινομαστιγωτά αντλούνται από το νερό και χωνεύονται στο έντερο απελευθερώνοντας βιοτοξίνες, που απορροφώνται και μεταφέρονται σε άλλα όργανα των οστρακοειδών χωρίς να προκαλούν θνησιμότητα στα ίδια [43].

Οι μεγάλες θνησιμότητες του σολομού του Ατλαντικού σε δύο τοποθεσίες στον κόλπο του Fundy (New Brunswick, Καναδάς) τον Σεπτέμβριο του 2003 συνδέθηκαν με την άνθηση του *Alexandrium fundyense*, ενός δινομαστιγωτού που παράγει παραλυτικές τοξίνες. Το ζωπλαγκτόν βρέθηκε να περιέχει παραλυτικές τοξίνες που ταιριάζουν με το προφίλ των *A. fundyense* στην εκθετική φάση καλλιέργειας ή σε άνθιση του πληθυσμού του στο περιβάλλον [44].

Οι ενδοκυτταρικές βιοτοξίνες μπορούν να απελευθερωθούν στο περιβάλλον μέσω της απέκκρισης ή της λύσης των φυτοπλαγκτονικών κυττάρων, δημιουργώντας μια άλλη οδό έκθεσης μέσω άμεσης απορρόφησης από το νερό από υδρόβια ζώα. Μελέτες που διεξήχθησαν από τους Lefebvre et al [50] επιβεβαίωσαν ότι η κατάποση παραλυτικών τοξινών μέσω φορέων φυκών ή ζωπλαγκτόν είναι μια οδός έκθεσης σε παραλυτικές τοξίνες που προκαλούν

οξεία τοξικότητα σε ψάρια (ενήλικα ή προνύμφες) κατά τη διάρκεια τοξικών ανθίσεων.

Η εξωκυττάρια ύπαρξη σαξιτοξινών έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τη συμπεριφορά των αναπτυσσόμενων προνυμφών ψαριών, προκαλώντας πλήρη απώλεια της αισθητικοκινητικής λειτουργίας, καθυστερημένη εκκόλαψη, δυσπλασίες και θνησιμότητα σε προνύμφες ψαριού ζέβρα (zebrafish, *Danio rerio*). Ωστόσο, οι τοξίνες αυτές δεν παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στο pH του θαλασσινού νερού, εκτός αν υπάρξει συμπλοκοποίησή τους με άλλες ουσίες [51].

1.2.4. Οικονομικές επιπτώσεις

Η απειλή εξαιτίας των θαλάσσιων βιοτοξινών δεν είναι μόνο ζήτημα δημόσιας υγείας, αλλά αποτελεί επίσης απειλή και για την παγκόσμια οικονομία. Η εμφάνιση HAB σε μια περιοχή, συχνά καταλήγει σε μαζικούς θανάτους θαλάσσιων οργανισμών και στην απαγόρευση της αλιείας. Παράλληλα, οι συνεχείς δαπάνες που απαιτούνται για τη συντήρηση και τη λειτουργία προγραμμάτων παρακολούθησης παρουσιάζουν σημαντικό κόστος για τις παγκόσμιες οικονομίες. Μπορούν να αποτελέσουν εμπόδια στο διεθνές εμπόριο: Στην Ταϊλάνδη, ο κίνδυνος μόλυνσης από βιοτοξίνες από τις παραδοσιακές πρακτικές υδατοκαλλιέργειας οστρακοειδών προκάλεσε την εφαρμογή εθελοντικής απαγόρευσης των εξαγωγών μέχρις ότου θεσπιστούν διεθνώς αναγνωρισμένα προγράμματα υγιεινής για οστρακοειδή [52].

Η αυξανόμενη απειλή HAB επηρεάζει τις χώρες με μεγάλες βιομηχανίες υδατοκαλλιέργειας, όπως η Ισλανδία, όπου τα προϊόντα της θάλασσας αντιπροσώπευαν το 2009, το 42% της συνολικής αξίας των εξαγωγών [16]. Η Νέα Ζηλανδία διαθέτει επίσης μεγάλη βιομηχανία υδατοκαλλιέργειας αξίας 1,5 δισεκατομμυρίων δολαρίων το 2010 [53]. Οι οικονομικές απώλειες σε τοπικές επιχειρήσεις, όπως οι οστρακοκαλλιέργειες, οι παραλιακές επιχειρήσεις και άλλες βιομηχανίες που σχετίζονται με τα θαλασσινά, από ένα HAB παραλυτικών τοξινών στο Maine των ΗΠΑ, εκτιμήθηκαν σε 6 εκατομμύρια δολάρια ΗΠΑ ετησίως [52]. Στη Μαλαισία, οι απώλειες ψαριών που οφείλονται σε HAB εκτιμήθηκε ότι προκαλούν απώλεια 20 εκατομμυρίων Μαλαισιανών δολαρίων για κάθε ένα περιστατικό [54]. Στην Αυστραλία, μια μόλυνση των οστρακοειδών με παραλυτικές τοξίνες κατά τη διάρκεια μιας απροσδόκητης εκδήλωσης HAB εκτιμάται ότι έχει συνολικό οικονομικό αντίκτυπο 23 εκατομμυρίων δολαρίων ΗΠΑ σε ολόκληρο τον κλάδο της εμπορικής αλιείας και της θαλάσσιας γεωργίας [55].

Επιπλέον, το κόστος λειτουργίας ενός προγράμματος παρακολούθησης είναι επίσης σημαντικό: Στην Αμερική, τα περισσότερα κράτη εφαρμόζουν το δικό τους πρόγραμμα παρακολούθησης, το οποίο κοστίζει έως και 200.000 δολάρια ΗΠΑ ετησίως. Στην Αυστραλία, η παρακολούθηση της ασφάλειας των

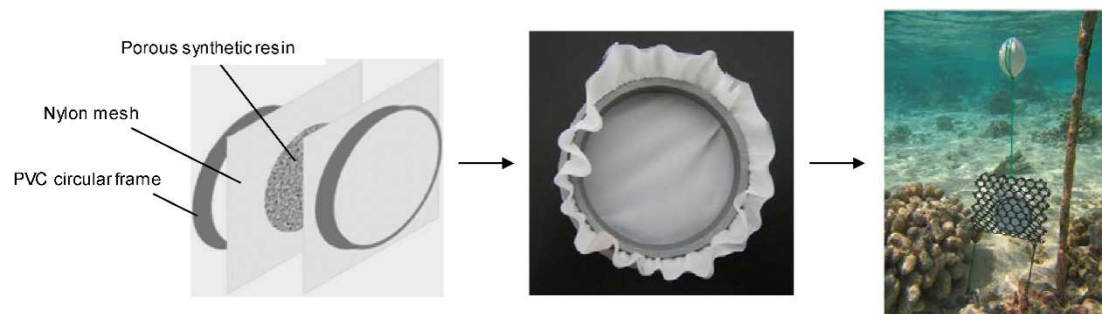
οστρακοειδών γίνεται από το κράτος και καθοδηγείται από ένα ομοσπονδιακό πλαίσιο. Τα κράτη που έχουν μεγάλη βιομηχανία οστρακοειδών και υδατοκαλλιέργειας, όπως η Νέα Νότια Ουαλία, η Νότια Αυστραλία, η Τασμάνια και η Βικτώρια, έχουν υψηλότερο λειτουργικό κόστος. Το συνολικό κόστος διαχείρισης των επικινδύνων κυανοβακτηρίων εκτιμάται ότι κοστίζει 180-240 εκατομμύρια δολάρια ετησίως [56].

Τα περισσότερα είδη οστρακοειδών μπορούν να συσσωρεύσουν και να ανεχθούν υψηλές συγκεντρώσεις βιοτοξινών. Τα οστρακοειδή, όπως τα μύδια και τα στρείδια συλλέγονται συνήθως ζωντανά. Κατά την συλλογή τους δεν μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ μολυσμένων και μη μολυσμένων οστρακοειδών.

1.2.5. Έλεγχος και παρακολούθηση των HAB

Πολλές από τις βιοτοξίνες που έγιναν γνωστές τα τελευταία 50 χρόνια. Οι συγκεντρώσεις αυτών των τοξινών στο νερό και στα οστρακοειδή, παρακολουθούνται τώρα με διάφορες χημικές, βιοχημικές ή μοριακές μεθόδους [57]. Λόγω των προγραμμάτων παρακολούθησης που εφαρμόζονται από κυβερνήσεις σε όλο τον κόσμο, έχει παρατηρηθεί μείωση του αριθμού των περιπτώσεων δηλητηρίασης [58].

Έχουν αναπτυχθεί νέα εργαλεία και μέθοδοι που βοηθούν στην παρακολούθηση των συνθηκών ύδατος και της πιθανότητας τοξικών HABs. Ένας από αυτούς είναι η στερεά φάσης προσρόφηση και παρακολούθηση τοξινών (SPATTs). Πρόκειται για παθητικούς σάκους προσροφητικού υλικού που αφήνονται ανοικτοί στο νερό, για κάποιο χρονικό διάστημα με σκοπό να απορροφήσουν τοξίνες οι οποίες μετά μπορούν να αναλυθούν με χημικές μεθόδους [59, 60].



Εικόνα 1.2 : Αρχή λειτουργίας των SPATT [60].

Επιπλέον, μπορούν να εφαρμοστούν μέτρα για την ελαχιστοποίηση της έκθεσης του ανθρώπου σε αυτές τις χημικές ουσίες. Μια τεχνική περιλαμβάνει την απομάκρυνση των HAB ή των τοξινών από τα υδάτινα σώματα όταν εμφανίζονται. Αυτό μπορεί να γίνει με την προσθήκη τροποποιημένου πηλού σε HAB για την κροκύδωση των φυκών στο νερό [61]. Η διαδικασία αυτή, βρέθηκε να μειώνει κατά 82% μία ομάδα παραλυτικών τοξινών και την

συγκέντρωση φωσφορικών και νιτρικών (μακροθρεπτικά συστατικά που χρειάζονται για την ανάπτυξη του φυτοπλαγκτού). Αυτή η μέθοδος έχει αναφερθεί ότι έχει κάποια επιτυχία στην Κίνα [62]. Πιο πρόσφατα, οι Vasama et al [63] αναφέρουν απομάκρυνση των παραλυτικών τοξινών με χρήση προβιοτικών βακτηρίων γαλακτικού οξέος (*Lactobacillus rhamnosus* GG και LC-705). Ο μηχανισμός αυτής της μείωσης πιστεύεται ότι οφείλεται σε δέσμευση των βιοτοξινών σε συστατικά των βακτηρίων. Πρόκειται για ένα θετικό αρχικό αποτέλεσμα στη διαχείριση των επιπέδων βιοτοξίνης στα υδάτινα σώματα.

Η κινητήρια δύναμη για την πρόοδο στον τομέα της παρακολούθησης και του ελέγχου των θαλάσσιων βιοτοξινών είναι το γεγονός ότι δεν υπάρχουν σήμερα γνωστά αντίδοτα σε καμία δηλητηρίαση από θαλάσσιες βιοτοξίνες [64]. Ως εκ τούτου, η παρακολούθηση αποτελεί σημαντικό μέρος της διασφάλισης της ασφάλειας. Τα προγράμματα παρακολούθησης εστιάζουν στον προσδιορισμό του κινδύνου και της τοξικότητας. Η παρακολούθηση του αριθμού των κυττάρων των φυκών στο νερό αποτελεί έμμεση μέτρηση του κινδύνου τοξικότητας, καθώς ο υψηλός αριθμός κυττάρων των φυκών δεν σημαίνει απαραίτητα ότι τα οστρακοειδή είναι τοξικά. Η άμεση μέτρηση τοξινών στον ιστό των οστρακοειδών παραμένει ένα κρίσιμο εργαλείο για την εξασφάλιση της βρώσιμης ασφάλειας των οστρακοειδών.

1.2.6. Καθορισμός ρυθμιστικών ορίων

Η μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση βιοτοξινών καθορίζεται με βάση δεδομένα που προέρχονται από περιστατικά δηλητηριάσεων και από τοξικολογικές δοκιμές σε ζώα. Οι εκτιμήσεις κινδύνου λαμβάνουν υπόψη επιδημιολογικά στοιχεία, όπως οι συχνότητες κατανάλωσης, οι μεταβολές του μεγέθους των μερίδων μεταξύ των πληθυσμών και οι τοξικολογικές πληροφορίες. Χρησιμοποιώντας αυτά τα δεδομένα, καθορίζονται όρια σχεδιασμένα να παρέχουν κάλυψη μέχρι το 97,5% του παγκόσμιου πληθυσμού [65].

Στην Αυστραλία, το Πρόγραμμα Επιθεώρησης Εισαγωγών Τροφίμων (IFIS) είναι ένα πρόγραμμα επιθεώρησης τροφίμων εποπτευόμενο από το Υπουργείο Γεωργίας. Σκοπός του είναι να παρακολουθεί τα εισαγόμενα τρόφιμα για τη συμμόρφωση με τα αυστραλιανά πρότυπα αναφοράς τροφίμων. Τα δίθυρα μαλάκια, όπως τα μύδια και τα στρείδια, ταξινομούνται ως τρόφιμα με υψηλό κίνδυνο για την υγεία των καταναλωτών [66].

Η Ευρωπαϊκή Ένωση με την οδηγία EK853/2004 [67] καθορίζει τις θαλάσσιες βιοτοξίνες που μπορεί να υπάρχουν σε δίθυρα μαλάκια καθώς και τα επιτρεπόμενα όρια αυτών. Στην Ελλάδα, το πρόγραμμα παρακολούθησης της συγκέντρωσης θαλάσσιων βιοτοξινών σε δίθυρα μαλάκια, περιλαμβάνει εβδομαδιαίες δειγματοληψίες και έλεγχο για την ύπαρξη βιοτοξινών μέσω

βιοδοκιμασίας με χρήση επίμυων. Ακολουθώντας τις οδηγίες της ΕΕ, η συγκέντρωση των βιοτοξινών σε δίθυρα στην αγορά δεν υπερβαίνει τα ασφαλή όρια που έχουν θεσπιστεί.

Τα ισχύοντα ρυθμιστικά όρια για κάθε κατηγορία θαλασσίων βιοτοξινών φαίνονται στον Πίνακα 1.2. Οι τιμές που δίνονται εκφράζονται ως mg τοξίνης ανά κιλό νωπού ιστού δίθυρου (μύδια, κυδώνια, στρείδια κ.ά.). Στην ευρωπαϊκή νομοθεσία δεν έχει ρυθμιστεί κάποιο όριο για την συγκέντρωση μπρεβετοξινών, καθώς αυτή η κατηγορία τοξινών δεν έχει καταγραφεί στον ευρωπαϊκό χώρο. Επίσης δεν έχει ρυθμιστεί όριο για τη συγκέντρωση των μικροκυστινών σε ιστούς διθύρων, καθώς μόλις τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να εντοπίζεται σε θαλάσσιους οργανισμούς. Υπάρχει όμως, μια κατευθυντήρια οδηγία που ορίζει την συνιστώμενη ημερήσια δόση (T.D.I.).

Πίνακας 1.2: Όρια βιοτοξινών σε δίθυρα μαλάκια, όπως έχουν καθοριστεί από την Ευρωπαϊκή ένωση, τον FDA και την Αυστραλιανή νομοθεσία

Τοξίνη	Κατηγορίες τοξινών	Όρια	
		Ευρώπη	FDA
Δομοϊκό οξύ (DA)	DA και ανάλογες χημικές ενώσεις	20mg DA/kg	20mg DA/kg
Σαξιτοξίνη (SXT)	SXT και ανάλογες χημικές ενώσεις	0,8mg STX eq/kg	0,8mg STX eq/kg
Οκαδαϊκό οξύ (OA)	OA, DTX1, 2, 3	0,16mg OA eq/kg	0,16mg OA eq/kg
Μπρεβετοξίνη (BTX)	BTX 1, 2 και παράγωγες χημικές ενώσεις	Δεν έχει ρυθμιστεί	0,8mg BTX2 eq/kg
Μικροκυστίνη (MC)	Ισοδύναμα MC-LR		T.D.I. : 0.04μg MC-LR/ kg* d

1.2.7. «Αναδυόμενες» τοξίνες

Παρά την επιτυχία του σημερινού συστήματος παρακολούθησης, οι «αναδυόμενες» τοξίνες και τα νέα ανάλογα των γνωστών τοξινών εξακολουθούν να αποτελούν ανησυχία. Υπάρχει ένα μεγάλο χάσμα στις γνώσεις σχετικά με την επιδημιολογία και τις τοξικολογικές επιδράσεις της χρόνιας έκθεσης σε αυτές τις τοξίνες [65-67]. Οι αξιολογήσεις κινδύνου δεν έχουν ακόμη διεξαχθεί σε πολλές ομάδες τοξινών, οι οποίες περιλαμβάνουν την παρακολούθηση του κινδύνου των HAB και την εκτίμηση κινδύνου κατά την διαχείριση των βιοτοξινών σε τρόφιμα και μη τρόφιμα (αερολύματα, νερό)

[68]. Εκτός από τις κύριες ομάδες επιτηρούμενων θαλάσσιων βιοτοξινών που αναφέρθηκαν παραπάνω, υπάρχουν επίσης ενώσεις που έχουν πρόσφατα εντοπιστεί αλλά δεν έχουν θεσπιστεί ποσοτικά όρια, λόγω έλλειψης τοξικολογικών δεδομένων ή καθόλου αποδεδειγμένης σχέσης μεταξύ ασθένειας και την έκθεση σε αυτές τις νέες τοξίνες, π.χ. κυκλικές αμίνες [62, 65], ισεδοτοξίνες και πεκτενοτοξίνες [52, 69], παλυτοξίνες [70] και τετροδοτοξίνη [71].

1.2.8. Μέθοδοι ανάλυσης

Οι δοκιμές ασφάλειας των θαλασσινών για τις θαλάσσιες βιοτοξίνες άρχισαν μετά την αρχική αναφορά ασθενειών που τελικά συνδέθηκε με τα θαλασσινά και τα προϊόντα θαλασσινών που καταναλώθηκαν σε συγκεκριμένες εποχές και τοποθεσίες [55].

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σήμερα για την ανίχνευση θαλάσσιων τοξινών χωρίζονται σε αναλυτικές και βιολογικές [68]. Οι αναλυτικές μέθοδοι επιτρέπουν την ταυτοποίηση των τοξινών που μετρούνται με βάση τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, παρέχοντας ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες για το τοξικολογικό προφίλ των οστρακοειδών. Οι βιολογικές μέθοδοι δίνουν μια συνολική εκτίμηση της περιεκτικότητας σε τοξίνες. Στο πλαίσιο των βιολογικών μεθόδων χρησιμοποιούνται τεχνικές βασισμένες σε ανοσολογικές μεθόδους [69, 70], τεχνικές βασισμένες στον υποδοχέα εισαγωγής των τοξινών στα κύτταρα και τεχνικές που βασίζονται σε κυτταροκαλλιέργειες [71].

Τα τελευταία χρόνια, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) έχει αναγνωρίσει τη σημασία της τυποποίησης των μεθόδων δοκιμής για τις θαλάσσιες βιοτοξίνες και έχουν αρχίσει οι συζητήσεις σχετικά με τα κριτήρια επιδόσεων κάθε μεθόδου. Είναι αναγκαίο για τους διεθνείς οργανισμούς, να συμφωνήσουν για τα πρότυπα που σχετίζονται με τον έλεγχο και την αναφορά των αναλύσεων θαλάσσιων βιοτοξινών. Στο παρόν στάδιο, τα κριτήρια επιδόσεων των μεθόδων έχουν συζητηθεί σε διεθνές επίπεδο, αλλά δεν έχουν ακόμη ολοκληρωθεί. Ωστόσο, αυτά τα κριτήρια αποτελούν ένα χρήσιμο σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη των μεθόδων ανίχνευσης των θαλάσσιων βιοτοξινών.

Η βιολογική δοκιμασία σε ποντίκια (mouse bioassay - MBA) χρησιμοποιείται παραδοσιακά για την ανίχνευση θαλάσσιων βιοτοξινών σε οστρακοειδή [72]. Ωστόσο, για λόγους καλής διαβίωσης των ζώων, υπάρχει αυξανόμενη ανησυχία όσον αφορά τη χρήση τους. Η MBA έχει δείξει κακή εξειδίκευση και ορισμένες από τις τοξίνες της ομάδας ΒΤΧ δεν εκκυλίζονται αποτελεσματικά με την πρότυπη μέθοδο. Επομένως δεν θεωρείται κατάλληλη μέθοδος ανίχνευσης για τις ΒΤΧ. Εναλλακτικοί τρόποι προσδιορισμού τοξινών, όπως ανοσοδοκιμασίες *in vitro* έχουν δείξει ότι είναι σε θέση να ανιχνεύουν τοξίνες

σε εκχυλίσματα οστρακοειδών και ψαριών. Καθώς ούτε αυτές οι μέθοδοι παρέχουν πληροφορίες για το προφίλ των τοξινών και των μεταβολιτών τους, χρειάζεται να αναπτυχθούν περαιτέρω [73]. Οι μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας - διαδοχικής φασματομετρίας μάζας (LC-MS/MS) επιτρέπουν την ειδική ανίχνευση μεμονωμένων τοξινών της ομάδας ΒΤΧ και θα είχαν αξία για την ποσοτικοποίησή τους σε οστρακοειδή και ψάρια. Το μειονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι δεν υπάρχουν πρότυπα για όλους τους μεταβολίτες όλων των θαλάσσιων βιοτοξινών.

Εκτός από αυτές τις μεθόδους, για τον προσδιορισμό των τοξινών σε δείγματα νερού ή σε εκχυλίσματα οστρακοειδών ή ψαριών, έχουν χρησιμοποιηθεί: μικροσκοπική παρατήρηση για την ύπαρξη οργανισμών που παράγουν τις τοξίνες [74], μέθοδοι μέτρησης σωματιδίων στην υδάτινη στήλη [58], τεχνικές μοριακής βιολογίας (ενίσχυση με βάση την αλληλουχία νουκλεϊκών οξέων (NASBA) [75], in situ φθορίζουσα υβριδοποίηση (FISH) [43], δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας [76], δοκιμασίες πρόσδεσης σε υποδοχέα (AOAC), χρωματογραφία [77, 78] και προσδιορισμός της συγκέντρωσης των τοξινών με χρήση βιοαισθητήρων [79]. Κάθε μια από αυτές τις μεθόδους παρουσιάζει διαφορετικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα (

Πίνακας 1.3). Για το λόγο αυτό, στις μελέτες συνδυασμός μεθόδων.

Πίνακας 1.3: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα μεθόδων ανίχνευσης θαλασσιών βιοτοξινών

Μέθοδος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Συμβατική χρωματογραφία	<ul style="list-style-type: none"> Χρήση των ΜΕΚC-LIF, LC-UV και LC-FLD Κάποιος βαθμός εξειδίκευσης 	<ul style="list-style-type: none"> Πολύ περιορισμένα διαθέσιμα δεδομένα για τον προσδιορισμό τοξινών σε χαμηλή συγκέντρωση Έλλειψη προτύπων και εξοπλισμού
LC-MS (MS)	<ul style="list-style-type: none"> Εξαιρετικά συγκεκριμένο Ευαίσθητος Διεξήχθη ενιαία εργαστηριακή επικύρωση 	<ul style="list-style-type: none"> Ακριβά όργανα Έλλειψη όλων των κατάλληλων προτύπων
Χρήση βιοαισθητήρα	<ul style="list-style-type: none"> Χρήσιμα εργαλεία εξέτασης έρευνας Υψηλή ευαισθησία 	<ul style="list-style-type: none"> Έλλειψη εξειδίκευσης Ακριβά όργανα για βιοαισθητήρες

	<ul style="list-style-type: none"> • Οι αλληλεπιδράσεις με το υπόστρωμα μπορούν να περιοριστούν 	
Μέθοδος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Μικροσκοπική παρατήρηση	<ul style="list-style-type: none"> • Ανίχνευση δυνητικά τοξικών κυανοβακτηρίων και φυκών σε επίπεδο γένους • Μέθοδος απαραίτητη από την νομοθεσία 	<ul style="list-style-type: none"> • Μη ειδική ανίχνευση • Δεν υπάρχουν στοιχεία για την τοξικότητα των οστρακοειδών
Μέθοδοι μέτρησης σωματιδίων	<ul style="list-style-type: none"> • Ταχύτερη απαρίθμηση κυττάρων • Δυνατότητα για <i>in situ</i> ανάλυση 	<ul style="list-style-type: none"> • Η ανίχνευση μπορεί να διακυβευτεί όταν αναλύονται πυκνά δείγματα (δείγματα από bloom) • Μικρά αποδεικτικά στοιχεία για καταλληλότητα για <i>in situ</i> παρακολούθηση • Η συντήρηση δείγματος περιορίζει την ανίχνευση • Μη ειδική ανίχνευση σε επίπεδο είδους
Τεχνικές μοριακής βιολογίας	<ul style="list-style-type: none"> • Επιτρέπει την ταυτοποίηση διαφορετικών ειδών κυανοβακτηρίων και πρωτίστων • Χρησιμοποιείται για επαλήθευση των τοξικών στελεχών 	<ul style="list-style-type: none"> • Μέθοδοι που βρίσκονται ακόμη σε εξέλιξη, χωρίς επίσημη πιστοποίηση, μέχρι σήμερα • Απαιτεί ακριβά όργανα και πολύ καλά εκπαιδευμένους χρήστες
Βιολογική δοκιμή σε ποντίκια	<ul style="list-style-type: none"> • Παραδοσιακή μέθοδος αξιολόγησης τοξικότητας • Ιστορικό χρήσης και πρόληψη της ασθένειας • Σχετικά απλή τεχνολογία 	<ul style="list-style-type: none"> • Αδυναμία ανίχνευσης όλων των τοξινών • Ηθικά ζητήματα για την χρήση πειραματόζωων • Μεταβλητή απόδοση • Δεν έχει επικυρωθεί

Μέθοδος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας	<ul style="list-style-type: none"> • Ευαίσθητη λειτουργική δοκιμασία • Χρήση κυτταροκαλλιεργειών • Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση όλων των μεταβολικών των τοξινών 	<ul style="list-style-type: none"> • Χρονοβόρος • Κακή συσχέτιση με το MBA • Περιορισμένα δεδομένα σχετικά με τα χαρακτηριστικά απόδοσης της μεθόδου • Υψηλή μεταβλητότητα • Αλληλεπιδράσεις με το υπόστρωμα
Δοκιμασία πρόσδεσης σε υποκινητή (RBA)	<ul style="list-style-type: none"> • Απλή, ευαίσθητη, γρήγορη • Καλές επιδόσεις σε μελέτη μεταξύ εργαστηρίων • Πιθανή δοκιμασία σύνδεσης με βάση φθορισμό 	<ul style="list-style-type: none"> • Αλληλεπιδράσεις με το υπόστρωμα • Μεταβλητή συγγένεια για διαφορετικά ανάλογα τοξινών • Απαιτήσεις για ζωικούς ιστούς και ραδιοσήμανση • Περιορισμένη ανάπτυξη μέχρι σήμερα με δοκιμασία σύνδεσης με βάση φθορισμό
Ανοσοδοκιμασία	<ul style="list-style-type: none"> • Ειδική και ευαίσθητη • Μπορεί να εφαρμοστεί "στο πεδίο" • Μικρή αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα • Καλή συσχέτιση με τα MBA και LC-MS 	<ul style="list-style-type: none"> • Χαμηλή ανίχνευση για τα ανάλογα των τοξινών • Μόνο εργαλείο διαλογής - δεν παρέχονται δεδομένα τοξικότητας ή προφίλ • Απαιτείται αρκετή ποσότητα τοξίνης για την παραγωγή αντισωμάτων • Πιθανά προβλήματα με τα εμπορικά κιτ, με την αλλαγή των κατασκευαστών (ιδιότητες ή χαρακτηριστικά απόδοσης)

	<ul style="list-style-type: none"> • Επικύρωση μεμονωμένου εργαστηρίου και επανάληψη αποτελεσμάτων από άλλα εργαστήρια 	
--	---	--

1.2.9. Θαλάσσιες βιοτοξίνες

Όπως ήδη αναφέρθηκε οι θαλάσσιες βιοτοξίνες διακρίνονται σε υδρόφιλες και λιπόφιλες, με βάση τη χημεία και την υδατοδιαλυτότητα τους.

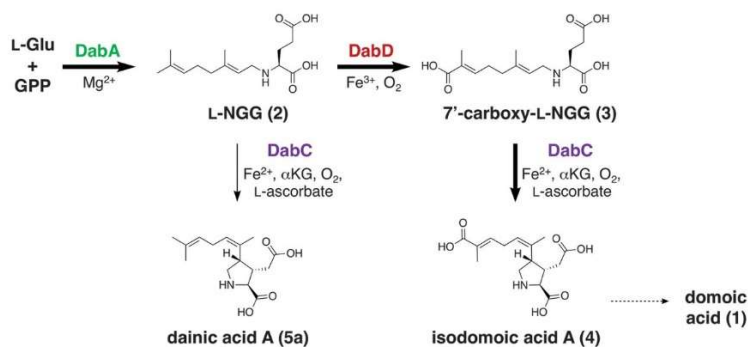
1.2.9.1. Υδρόφιλες βιοτοξίνες

Στις υδρόφιλες βιοτοξίνες ανήκουν το δομοϊκό οξύ, υπεύθυνο για την αμνησιακή δηλητηρίαση και οι σαξιτοξίνες, υπεύθυνες για την παραλυτική δηλητηρίαση. Στην ίδια κατηγορία κατατάσσονται και οι μικροκυστίνες, ηπατοτοξίνες που απαντώνται συνήθως στα γλυκά νερά [80-82] αλλά πρόσφατα εμφανίζονται και στα θαλάσσια οικοσυστήματα [9, 83].

1.2.9.1.1. Δομοϊκό Οξύ: Τοξίνες Αμνησιακού Συνδρόμου (AST)

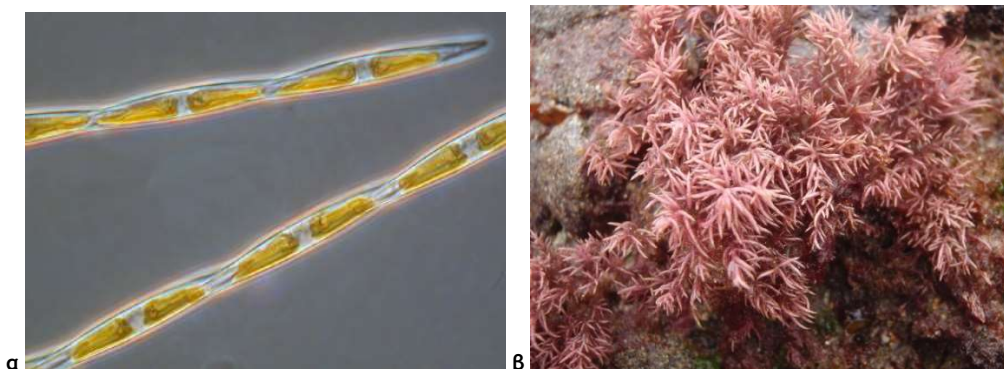
Η πρώτη αναφερθείσα περίπτωση δηλητηρίασης από αμνησιακές τοξίνες ήταν το 1987, στο νησί Prince Edward του Καναδά, όταν η κατανάλωση μολυσμένων μυδιών προκάλεσε τρεις θανάτους και περισσότερες από 100 διακομιδές σε νοσοκομεία, με γαστρεντερικά και νευρολογικά συμπτώματα [84]. Για την ταυτοποίηση αυτής της τοξίνης έγιναν βιοδοκιμές σε επίμυες. Έτσι συνδέθηκαν οι δηλητηριάσεις αυτές με μια μεγάλη άνθιση των δινομαστιγωτών *Nitzschia pungens*. Το δομοϊκό οξύ (DA) στη συνέχεια συνδέθηκε με το γεγονός ως υπεύθυνη χημική ένωση. Παρά το γεγονός ότι η χημική δομή του καθορίστηκε το 1982, δεν είχε συσχετιστεί με ασθένειες μέχρι το συγκεκριμένο περιστατικό το 1987.

Το δομοϊκό οξύ είναι ένα υδατοδιαλυτό ετεροκυκλικό αμινοξύ που πήρε το όνομα του από ένα κόκκινο φύκος που είναι γνωστό με την ιαπωνική του ονομασία, "domoï". Ανήκει στην κατηγορία των καϊνοειδών ενώσεων και έχει απομονωθεί από διάφορα είδη κόκκινων φυκών και διατόμων [85]. Παράγεται κυρίως από πρώτιστα του γένους *Pseudonitzschia*, με τη βοήθεια τεσσάρων ενζύμων (Εικόνα 1.3 Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3: Βιοσύνθεση του δομοϊκού οξέος.

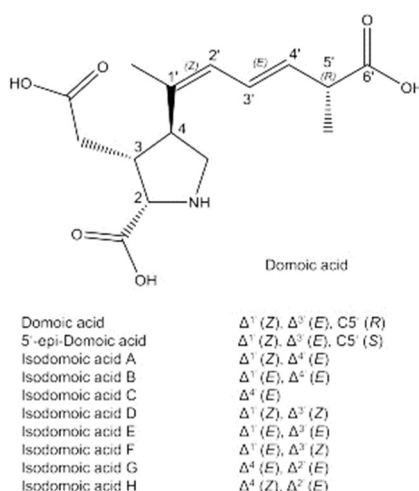
Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί αρκετά ισομερή της τοξίνης [86]. Τα ισοδομοϊκό οξύ A, B και C ταυτοποιήθηκαν ως δευτερεύοντα συστατικά στο φύκος *Chondria armata*. Άλλα γνωστά ισομερή του δομοϊκού οξέος είναι το ισο-δομοϊκό οξύ A-H και το 5'-επι-δομοϊκό οξύ. Για αρκετά χρόνια θεωρούσαν ότι το ισοδομοϊκό οξύ B θα ήταν σε υψηλότερη συγκέντρωση σε χαμηλότερα γεωγραφικά πλάτη. Όμως, οι Romero et al. [87] έδειξαν ότι η σύνθεση αμνησιακών τοξινών δεν εξαρτάται από το γεωγραφικό πλάτος, αλλά αποτελεί χαρακτηριστικό του στελέχους και του υποστελέχους του διατόμου. Παραδείγματος χάριν, τα στελέχη του διατόμου *Nitzschia navis-varingica* που συλλέχθηκαν στις Φιλιππίνες βρέθηκαν να περιέχουν κυρίως ισοδομοϊκό οξύ B ενώ αυτά που συλλέχθηκαν από την Ινδονησία και την Ιαπωνία περιείχαν κυρίως δομοϊκό οξύ.



Εικόνα 1.4: Παραγωγοί δομοϊκού οξέος. α. *Pseudonitzschia* sp. και β. *Chondria armata* [88]

Η αμνησιακή δηλητηρίαση από οστρακοειδή εκδηλώνεται μέσω γαστρεντερικών (έμετος, διάρροια και κοιλιακές κράμπες) και νευρολογικών (πονοκέφαλοι και απώλεια βραχυπρόθεσμης μνήμης) συμπτωμάτων. Το δομοϊκό οξύ είναι ένας ενεργοποιητής του υποδοχέα του γλουταμικού οξέος, στοχεύοντας τους ιοντοτροπικούς υποδοχείς. Αυτοί οι υποδοχείς σχηματίζουν ειδικούς διαύλους κατιόντων και ρυθμίζουν γρήγορα την διεγερτική μετάδοση στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Έκθεση του ιππόκαμπου (περιοχή του εγκεφάλου που σχετίζεται με τη μνήμη) σε δομοϊκό οξύ, μπορεί να οδηγήσει σε προβλήματα αμνησίας και απώλειας μνήμης [89]. Η τοξικότητα του ισοδομοϊκού οξέος A (IA), του ισοδομοϊκού οξέος B (IB) και του ισοδομοϊκού

οξέος C (IC) αναφέρεται ότι είναι σημαντικά χαμηλότερη από αυτή του δομοϊκού οξέος (DA). Σε μελέτες επίμυων που διεξήχθησαν από τους Munday κ.ά. [90], με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση των τοξινών βρέθηκε η LD₅₀ του DA στα 6,0 mg/kg, ενώ δεν σημειώθηκαν θάνατοι. Επειδή η συγκέντρωση αυτών των ισομερών, συνήθως είναι χαμηλή, τα ισομερή αυτά, δεν περιλαμβάνονται στις δοκιμές τοξικότητας δειγμάτων προς ανάλυση. Θεωρητικά, υπάρχει πιθανότητα τα IB να μετατραπούν σε IA και τέλος σε DA, στον μυϊκό ιστό θαλάσσιων ζώων, που μπορούν να δράσουν ως φορείς των ισομερών δομοϊκού οξέος [89].



Εικόνα 1.5: Χημική δομή του δομοϊκού οξέος και των ισομερών του [91]

Πρόσφατα, πειράματα που έγιναν από τους Funk et al (2014) έδειξαν ότι παρουσιάστηκε νεφρική βλάβη σε ένα στέλεχος Μαύρων Ελβετικών (Black Swiss) επίμυων που τράφηκαν με οστρακοειδή που έχουν μολυνθεί με DA στα 5 μg/kg, σημαντικά χαμηλότερα από τα όρια που ισχύουν σήμερα (20 mg/kg). Το DA συσσωρεύθηκε κυρίως στα νεφρά. Ως αποτέλεσμα, ενδέχεται να υπάρχει ανάγκη αναθεώρησης του ρυθμιζόμενου ορίου ώστε να λαμβάνονται υπόψη οι κίνδυνοι μακροχρόνιας έκθεσης σε αυτή την τοξίνη. Οι μέθοδοι ανίχνευσης ενδέχεται να χρειαστεί να είναι σε θέση να ανιχνεύουν μέχρι 0,5-500 μg/kg δομοϊκού οξέος, που είναι 40-40000 φορές χαμηλότερο από το όριο που ισχύει σήμερα [92]. Επί του παρόντος, δεν έχουν οριστεί επίπεδα για τα ισομερή της τοξίνης.

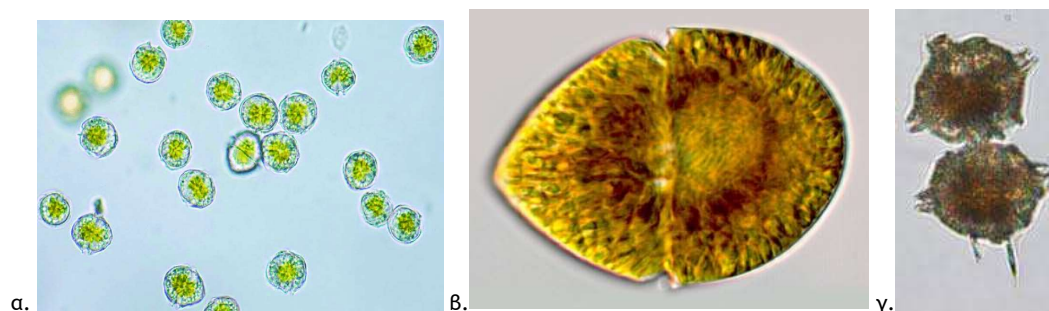
1.2.9.1.2. Σαξιτοξίνες: Τοξίνες Παραλυτικού Συνδρόμου (PST)

Πρόκειται για μια κατηγορία βιοτοξινών που συσσωρεύονται στα οστρακοειδή και προκαλούν παραλυτική δηλητηρίαση. Συνδέονται με τις αντλίες νατρίου των κυττάρων, διακόπτοντας τις φυσιολογικές οδούς κυτταρικής σηματοδότησης. Η διαταραχή αυτή μπορεί να οδηγήσει σε ναυτία,

σε μυρμηκίαση γύρω από τα χείλη και τα δάκτυλα, σε παράλυση και ενδεχομένως θάνατο. Αυτές οι τοξίνες παράγονται τόσο από τους προκαρυωτικούς όσο και από ευκαρυωτικούς οργανισμούς [93]. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι παράγονται μόνο από κυανοβακτήρια στα γλυκά νερά και μόνο από πρώτιστα στα αλμυρά και υφάλμυρα ύδατα [93, 94].

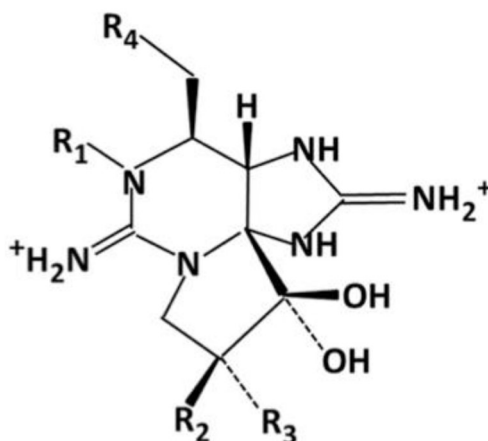
Οι PST εντοπίστηκαν αρχικά στην ακτή του Ειρηνικού των ΗΠΑ, το 1937 και περιγράφηκαν από τους Schantz και Magnussen (1961). Από τότε, παραλυτικές τοξίνες έχουν βρεθεί σε πολλές άλλες τοποθεσίες. Αυτό οφείλεται εν μέρει στην όλο και πιο συχνή εφαρμογή προγραμματών παρακολούθησης, τα οποία αναπτύχθηκαν παράλληλα με την ανάπτυξη της υδατοκαλλιέργειας των οστρακοειδών, αλλά και λόγω της πραγματικής αύξησης της συχνότητας των τοξικών κρουσμάτων [95].

Τα γένη *Alexandrium*, *Gymnodinium* και *Pyrodinium* έχουν στελέχη που παράγουν παραλυτικές τοξίνες, γνωστές ως σαξιτοξίνες [48]. Πολλά γένη κυανοβακτηρίων είναι επίσης γνωστό ότι παράγουν τέτοιες τοξίνες (*Lyngbya*, *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon* και *Phlanktothrix*) [96].



Εικόνα 1.6: Παραγωγοί σαξιτοξινών: *Alexandrium minutum*, *Gymnodinium sp.*, *Pyrodinium sp.* [91]

Πενήντα επτά ανάλογα παραλυτικών τοξινών έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα. Αυτές οι βιοτοξίνες έχουν μια κοινή δομή 3,4,6-τριακυλοτετραϊδροπουρίνης και οι ακόλουθες υποομάδες σχηματίζονται από τροποποιήσεις των τεσσάρων πλευρικών αλυσίδων της ομάδας R. Τα πρόσφατα ταυτοποιημένα βενζοϊκά ανάλογα έχουν βρεθεί ότι είναι ελαφρά λιπόφιλα [8].



Εικόνα 1.7: Γενική δομή σαξιτοξινών [97]

Οι παραλυτικές τοξίνες είναι νευροτοξίνες, που δεσμεύονται μη αναστρέψιμα με τη θέση IV της αντλίας νατρίου στα κύτταρα εμποδίζοντας τα δυναμικά δράσης να διαδίδονται κατά μήκος των νεύρων και τελικά οδηγούν σε παράλυση [98]. Είναι επίσης γνωστό ότι αλληλεπιδρούν με τις αντλίες ασβεστίου και καλίου [99]. Μία από τις πιο ισχυρές φυσικές τοξίνες που είναι γνωστές είναι η σαξιτοξίνη, με θανατηφόρο δόση 1mg για έναν άνθρωπο 70kg [8]. Ωστόσο, άλλα ανάλογα της σαξιτοξίνης έχουν διαφορετικές τοξικότητες λόγω δομικών διαφορών, οι οποίες επηρεάζουν άμεσα την ικανότητα δέσμευσης τους σε υποδοχείς αντλίας νατρίου. Επιπλέον, η έκθεση σε PST ενεργοποιεί τους μηχανισμούς απόκρισης σε οξειδωτικό στρες, επιδεινώνοντας το τοξικό της αποτέλεσμα. Οι μελέτες έκθεσης γατών σε PST έχουν δείξει ότι αυτές οι τοξίνες κινούνται ελεύθερα μεταξύ του εξωκυττάρου και του ενδοκυτταρικού χώρου και του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, το οποίο μπορεί να εξηγήσει γιατί η δηλητηρίαση από παραλυτικές τοξίνες μπορεί να είναι τόσο γρήγορη [100].

Η ρύθμιση της παραγωγής σαξιτοξίνης σε οργανισμούς που την παράγουν και ο μεταβολικός της ρόλος είναι ελάχιστα κατανοητά. Η ευρεία παραγωγή PST από προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά υποδηλώνει την εξελικτικά την παράλληλη απόκτηση βιοσυνθετικών γονιδίων PST, τα οποία μπορεί να βοηθούν τα κυανοβακτήρια υπό συνθήκες υψηλού pH ή νατρίου [101]. Ωστόσο, άλλες μελέτες δεν έδειξαν επιπτώσεις του pH στην περιεκτικότητα σε τοξίνες [33].

Το ισχύον ρυθμιστικό όριο για τις παραλυτικές τοξίνες στα οστρακοειδή είναι 800 µg ισοδύναμα STX.diHCl /kg. Το "DiHCl" αναφέρεται στην μορφή άλατος διχλωριδίου της σαξιτοξίνης, η οποία περιλαμβάνει δύο ιόντα χλωρίου.

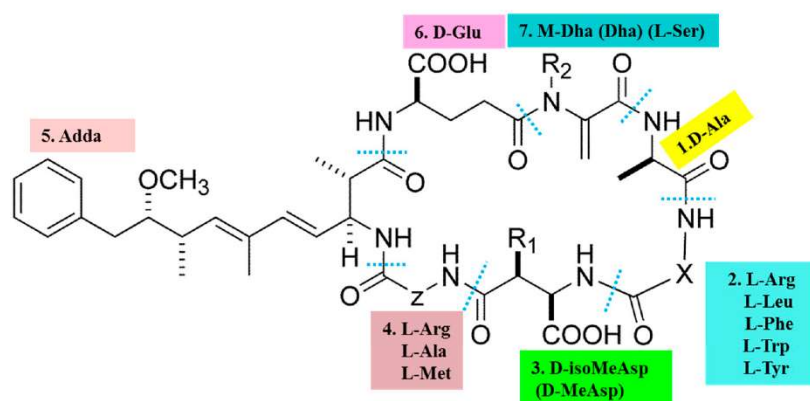
1.2.9.1.3. Μικροκυστίνες: Τοξίνες Ηπατικού Συνδρόμου (HST)

Μια άλλη κατηγορία νευροτοξινών με κυρίως ηπατική δράση είναι οι μικροκυστίνες. Πρόκειται για τοξίνες που παράγονται από οργανισμούς κυρίως των γενών *Microcystis*, *Anabaena/Dolichospermum*, *Planktothrix*, *Oscillatoria*, και σπανιότερα των *Nostoc*, *Anabaenopsis*, και *Hapalosiphon* [80, 102].



Εικόνα 1.8: Παραγωγοί μικροκυστινών: *Microcystis* sp. *Anabaena / Dolichospermum* sp., *Oscillatoria* sp. [103]

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 1.9. 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 μικροκυστινών και παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργότητα της τοξίνης [9, 104].



MC variant	X	Z
MC-LR	Leu	Arg
MC-RR	Arg	Arg
MC-YR	Try	Arg

Εικόνα 1.9: Κυκλική δομή της μικροκυστίνης. Τα ανάλογά της δημιουργούνται από τον διαφορετικό συνδυασμό των αμινοξέων στις θέσεις X,Z [81].

Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί περισσότερα από 90 ανάλογα μικροκυστίνης. Η μικροκυστίνη-LR (MC-LR) είναι η πιο συχνή παραλλαγή της τοξίνης. Άλλες συχνά εντοπισμένες παραλλαγές είναι οι MC-RR, MC-YR και MC-LA [105]. Κάθε παραλλαγή μικροκυστίνης έχει διαφορετικούς βαθμούς τοξικότητας. Οι τοξικοί και μη τοξικοί κυανοβακτηριακοί πληθυσμοί μπορούν να συνυπάρχουν σε ένα ενιαίο οικοσύστημα, και δεν διακρίνονται μικροσκοπικά [106]. Επίσης, ορισμένα είδη εμφανίζουν υψηλή ή χαμηλή τοξικότητα κάτω από διαφορετικές εργαστηριακές συνθήκες (όπως θερμοκρασία, ένταση φωτός, θρεπτικά συστατικά και ιχνοστοιχεία) [107]. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο η τοξικότητα ή μη τοξικότητα των HAB στο ίδιο σώμα του νερού μπορεί να διαφέρει από έτος σε έτος.

Είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια καθώς παραμένουν αμετάβλητα ακόμη και μετά από βρασμό ή χημική υδρόλυση. Επειδή τα φάσματα απορρόφησης των μικροκυστινών δεν αλληλεπικαλύπτονται με το ηλιακό φάσμα [108], η άμεση φωτοαποικοδόμηση των μικροκυστινών από το φως του ήλιου είναι ασήμαντη [109], αλλά η έμμεση οξειδωση τους μπορεί να λάβει χώρα μέσω ουσιών που απορροφούν το ηλιακό φως [81].

Διεξοδική μελέτη της επίδρασης της μικροκυστίνης στα ηπατοκύτταρα [9, 81, 83, 103, 104] έχει δείξει ότι ο θάνατος των περισσότερων θηλαστικών προέρχεται από σοβαρές ηπατικές βλάβες. Χρόνιες εκθέσεις σε χαμηλή συγκέντρωση μικροκυστινών (1μg/l) μπορούν να προκαλέσουν αρνητικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία [110]. Αντιθέτως, δεν είναι ακόμη γνωστός ο οικολογικός ρόλος που μπορεί να έχουν οι μικροκυστίνες. Αρχικά υπήρχε η άποψη ότι λειτουργούσαν σαν αμυντικοί μηχανισμοί των κυανοβακτηρίων έναντι της θήρευσης από το ζωοπλαγκτόν. Μία αλληλοπαθητική λειτουργία των μικροκυστινών έχει επίσης προταθεί, καθώς αναστέλλει την ανάπτυξη διαφορετικών ειδών φυκών [103]. Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι τα κυανοβακτήρια που παράγουν μικροκυστίνες έχουν εμφανιστεί αρκετά νωρίς κατά την εξέλιξη και προϋπήρχαν των μεταζώων. Δεδομένου αυτού, αναζητείται κάποιος άλλος πιθανός οικολογικός ρόλος [9, 111]. Έχουν γίνει διάφορες υποθέσεις όπως ότι χρησιμεύουν σε λειτουργίες όπως: αντίδραση στις ουσίες που απελευθερώνονται από το ζωοπλαγκτόν, απομάκρυνση ιχνοστοιχείων, σηματοδότηση ή/και γονιδιακή ρύθμιση ή ακόμα και να έχουν ρόλο μεταβολίτη, ο οποίος ρυθμίζει πρωτεΐνες και προστατεύει από το οξειδωτικό στρες [9, 112].

Έχουν καταγραφεί περιστατικά δηλητηρίασης από μικροκυστίνες τόσο σε ζώα όσο και σε ανθρώπους. Μαζικοί θάνατοι πτηνών φλαμίνγκο στη λίμνη Bogoria (Κένυα) το 2001 [113] 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 [114]. Για την MC-LR, 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) [9]. Τον Ιούνιο του 2015, η ΕΡΑ ανέπτυξε δύο συμβουλευτικά όρια για την προστασία των ανθρώπων από μικροκυστινες. Τα όρια αυτά αφορούν μια περίοδο 10 ημερών με καθημερινή κατανάλωση μικροκυστινών. Με βάση της έκθεση αυτή, το όριο για βρέφη μέχρι 1 έτους είναι 0,3 μg/L ενώ για ενήλικες άνω των 21 ετών είναι 1,6 μg/L. Είναι επομένως προφανές ότι η έκθεση σε ΜC συνιστά έναν υψηλό κίνδυνο για την υγεία τόσο για τα ζώα όσο και για τον άνθρωπο, λαμβάνοντας επίσης υπόψη την κατανάλωση μολυσμένων ζώων και θαλασσινών που μπορούν να συσσωρεύσουν ΜC-LR και που αποτελούν σημαντικές πηγές τροφής [105, 115].

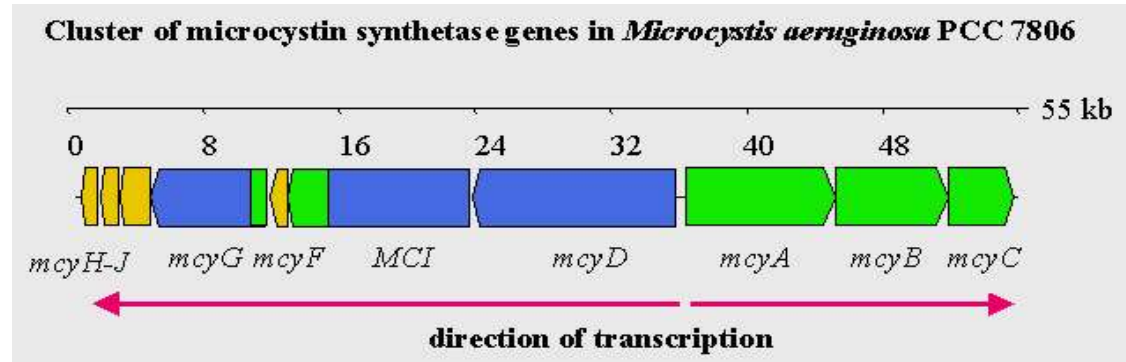
Παρ' όλο που οι μικροκυστινες έχουν μελετηθεί ευρέως σε γλυκά και υφάλμυρα νερά, η βιβλιογραφία είναι περιορισμένη όσον αφορά τις μικροκυστινες στα θαλάσσια ύδατα [9]. Η παρουσία μικροκυστινών στο θαλάσσιο περιβάλλον έχει αναφερθεί στον Ατλαντικό Ωκεανό, την Καραϊβική, τον Ειρηνικό, τον Ινδικό Ωκεανό, την Αραβική Θάλασσα, στη Θάλασσα του Μαρμαρά και τη Μεσόγειο Θάλασσα [116, 117]. Στην Ελλάδα υπάρχουν μόνο δυο εκθέσεις που επιβεβαιώνουν την παρουσία μικροκυστινών σε θαλάσσια ύδατα. Η μια έκθεση από τον Αμβρακικό Κόλπο, η οποία αναφέρει επίπεδα μικροκυστινών που κυμαίνονται από 0.003 έως 19.8 ng/l [77]. Η άλλη μελέτη έλαβε χώρα στον Θερμαϊκό Κόλπο. Αναφέρεται η παρουσία των μικροκυστινών σε συγκεντρώσεις από 0.15 έως 5ppm και αύξηση του πληθυσμού των κυανοβακτηρίων που τις παράγουν, κατά της άνοιξη και τις αρχές του χειμώνα [82].

Σύνθεση μικροκυστινών

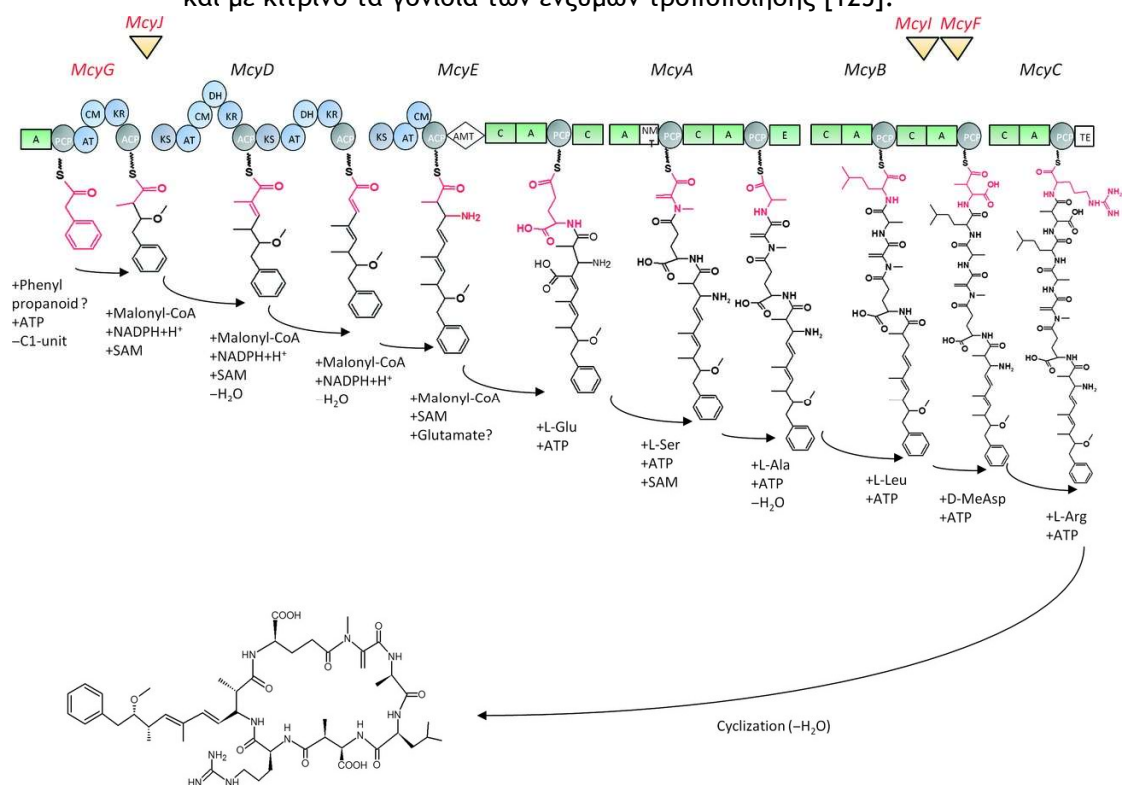
Οι μικροκυστινες συντίθενται μη ριβοσωμικά από ένα πολυλειτουργικό σύμπλεγμα ενζύμων και η σύνθεση τους είναι μια ATP-εξαρτώμενη διαδικασία. Αυτό το σύμπλοκο ενζύμων αποτελείται από πεπτιδικές συνθετάσες (PS), πολυκετιδικές συνθετάσες (PKS) και κάποια άλλα τροποποιητικά ένζυμα. Τόσο οι προκαρυωτικοί όσο και οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί, έχουν μη συνθετικές πεπτιδικές συνθετάσες (NRPS), οι οποίες λειτουργούν ως καταλύτες σχηματισμού πεπτιδίων [118, 119].

Η σύνθεση του συμπλέγματος ενζύμων που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση μικροκυστινών, κωδικοποιείται από τη συστάδα γονιδίων *mcy* (Εικόνα 1.10) οργανωμένα σε δύο οπερόνια (*mcyA-C* και *mcyD-J*) [120]. Τα στελέχη των κυανοβακτηρίων που μπορούν να παράγουν μικροκυστίνη δεν ξεχωρίζουν μορφολογικά από τα μη τοξικά. Δεδομένου ότι όλα τα τοξικά στελέχη των γενών *Microcystis*, *Anabaena* / *Dolichospermum*, *Nostoc* και *Planktothrix* φέρουν συστάδα γονιδίων συνθετάσης των μικροκυστινών (*mcy*), αναπτύχθηκαν μέθοδοι αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για την άμεση ανίχνευση των γονιδίων αυτών σε περιβαλλοντικά δείγματα [121, 122]. Τα γονίδια αυτά απουσιάζουν από τα μη τοξικά στελέχη.

Η πρώτη αλληλούχιση του συμπλέγματος ενζύμων παραγωγής μικροκυστίνης (*mcyS*) έγινε στο κυανοβακτήριο *M. aeruginosa* PCC7806 [119]. Η περιοχή *mcyS* έχει μήκος 55 kb και αποτελείται από 10 γονίδια που οργανώνονται σε δύο αποκλίνοντα μεταγραφόμενα οπερόνια (*mcyA-C* και *mcyD-J*). Κάθε γονίδιο κωδικοποιεί ένα συγκεκριμένο ένζυμο που εμπλέκεται στη σύνθεση, στην προσαρμογή και τη μεταφορά της τοξίνης [119, 123]. Επίσης, τα ORF στο *mcyS* είναι διαφορετικά οργανωμένα σε *Microcystis*, *Anabaena* και *Planktothrix* [124].



Εικόνα 1.10: Οργάνωση της συστάδας (cluster) σύνθεσης μικροκυστίνης (*mcyS*) στο *Microcystis aeruginosa* PCC7806. Με μπλε είναι τα γονίδια που κωδικοποιούν πολυκετιδικές συνθετάσες, με πράσινο τα γονίδια των πεπτιδικών συνθετασών και με κίτρινο τα γονίδια των ενζύμων τροποποίησης [125].



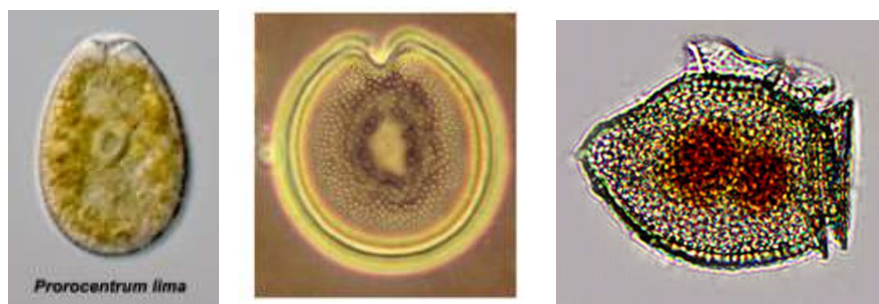
Εικόνα 1.11: Βιοσύνθεση μικροκυστίνης LR, σε κυανοβακτήρια του είδους *Microcystis aeruginosa* PCC7806

1.2.9.2. Λιπόφιλες Βιοτοξίνες

Στις λιπόφιλες ανήκουν το οκαδαϊκό οξύ και οι δινοφυσιτοξίνες, υπεύθυνα για διαρροϊκή δηλητηρίαση και οι μπρεβετοξίνες που είναι νευροτοξίνες.

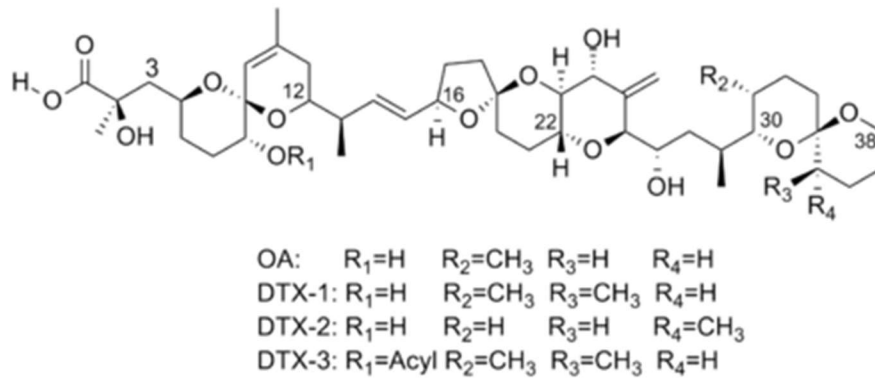
1.2.9.2.1. Οκαδαϊκό οξύ: Τοξίνες Διαρροϊκού Συνδρόμου (DST)

Η ομάδα διαρροϊκών τοξινών (DST) αποτελείται από το οκαδαϊκό οξύ (OA) και τις δινοφυσιτοξίνες (DTXs). Το OA, η πιο αντιπροσωπευτική τοξίνη της ομάδας αυτής, παράγεται κυρίως από δινομαστιγωτά του γένους *Prorocentrum* (κυρίως *P. lima*, αλλά και *P. concanum*) και *Dinophysis* (κυρίως *D. acuta*, *D. acuminata* και *D. fortii*). Τόσο το OA, όσο και οι DTXs, είναι ευρέως διαδεδομένες σε όλο τον κόσμο, αλλά ιδιαίτερα άφθονες στην Ευρώπη, την Ιαπωνία και τη Νότια Αμερική, αν και συνεχώς εμφανίζονται νέα επεισόδια DSP (Καναδάς, Μεξικό, Ινδία, Ταϊλάνδη, Κίνα, Αυστραλία) [126].



Εικόνα 1.12: Οι κυριότεροι οργανισμοί που παράγουν οκαδαϊκό οξύ. με την σειρά που είναι στην φωτογραφία, είναι οι : *Prorocentrum lima*, *Prorocentrum concanum*, *Dinophysis sp* [91].

Πρόκειται για μια ομάδα λιπόφιλων πολυαιθέρων. Το DTX1 είναι το μεθυλιωμένο παράγωγο του OA, ενώ το DTX2 είναι ένα ισομερές του OA. Το DTX3 περιγράφει μια ομάδα τοξινών με δομή ίδια με του OA τροποποιημένη στην ομάδα R1 με λιπαρά οξέα μακρίας αλυσίδας. Όντας πολυκετίδιο, το οκαδαϊκό οξύ παράγεται με την βοήθεια πολυκετιδικών συνθετασών, με μια βιοχημική πορεία που είναι γνωστή [127]



Εικόνα 1.13: Χημική δομή του οκαδαϊκού οξέος και των δινοφουσιτοξινών 1, 2 και 3 [128]

Η συσχέτιση των ΟΑ και DTX με τα γαστρεντερικά συμπτώματα έγινε πριν από μερικές δεκαετίες. Το ΟΑ εντοπίστηκε αρχικά σε μαύρα σφουγγάρια (*Halichondria okadaei* και *H. melanodocia*) [129], αλλά αργότερα εντοπίστηκε σε μικρές ποσότητες στα δινομαστιγωτά των γενών *Prorocentrum* και *Dinophysis*. Το πρώτο επεισόδιο διαρροϊκής δηλητηρίασης λόγω κατανάλωσης οστρακοειδών (Diarrheic Shellfish Poisoning -DSP) σημειώθηκε το 1961 στις Κάτω Χώρες, όμως δεν συσχετίστηκε με τις φυκοτοξίνες εκείνη τη στιγμή. Ήταν το 1976, όταν αποδείχθηκε για πρώτη φορά η συχνή εμφάνιση γαστρεντερίτιδας και η κατανάλωση μολυσμένων με φυκοτοξίνη οστρακοειδών [130]. Έκτοτε, ένας μεγάλος αριθμός επεισοδίων DSP έχει καταγραφεί παγκοσμίως. Ωστόσο, αυτός ο αριθμός πιστεύεται ότι είναι αρκετά μεγαλύτερος, καθώς αυτά τα επεισόδια σπάνια καταχωρούνται, δεδομένου ότι τα συμπτώματα δεν είναι πάντα σοβαρά και οι άνθρωποι δεν χρειάζονται ιατρική βοήθεια.

Το ΟΑ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα πολύτιμο εργαλείο στη μελέτη κυτταρικής σηματοδότησης, λόγω της ικανότητάς του να αναστέλλει επιλεκτικά τη δραστηριότητα των πρωτεϊνικών φωσφατάσων (PP1, PP2A, PP4, PP5, PP2B) [126, 130]. Τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν γίνει πολλές μελέτες διερευνώντας τις πιθανές τοξικές επιδράσεις του ΟΑ. Οι μεταβολές στο DNA και τα κυτταρικά συστατικά, καθώς και οι επιδράσεις στο ανοσοποιητικό και το νευρικό σύστημα, ακόμη και στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, αναφέρονται όλο και περισσότερο. Αξιοσημείωτο είναι ότι πιθανά να λειτουργεί ως καρκινογόνος παράγοντας. Επιπλέον, υπάρχει η υποψία ότι αυτή η τοξίνη είναι κάτι πολύ περισσότερο από ένας απλός διαρροϊκός παράγοντας. Ο μηχανισμός δράσης φαίνεται να είναι πολύ περίπλοκος. Τα περισσότερα αποτελέσματα σχετίζονται με την αναστολή των πρωτεϊνικών φωσφατάσων και τις συνέπειές τους, όμως δεν μπορούν να εξηγηθούν όλες οι επιδράσεις σε κυτταρικό, μοριακό και γενετικό επίπεδο από αυτή την αναστολή. Οι βαριές επιδράσεις στο γαστρεντερικό σύστημα είναι χαρακτηριστικές της δηλητηρίασης της DSP: Η διάρροια, η ναυτία, ο έμετος, ο κοιλιακός πόνος και το ρίγος μπορεί να εμφανιστούν μεταξύ 30 λεπτών και 4 ωρών μετά την

κατάποση των DSTs. Ωστόσο, η πλήρης ανάκτηση συμβαίνει συνήθως εντός τριών ημερών. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ανεπαρκή αναφορά περιστατικών δηλητηρίασης καθώς τα συμπτώματα μπορεί να συγχέονται με δυσπεψία ή αλλοίωση των τροφίμων.

Δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με χρόνιες επιδράσεις του ΟΑ στους ανθρώπους. Ωστόσο, με βάση ορισμένες *in vitro* και *in vivo* μελέτες, η ύπαρξη χρόνιας έκθεσης σε DSP σχετίζεται με σχηματισμό όγκων στο πεπτικό σύστημα. Κατά συνέπεια, απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για να αποσαφηνιστεί η τοξικότητα του ΟΑ στους ανθρώπους και να κατανοηθεί ο κίνδυνος έκθεσης στην τοξίνη αυτή, όχι μόνο ως αιτία του DPS, αλλά και ως δυνητικά μεταλλαξογόνο και καρκινογόνο συστατικό [131].

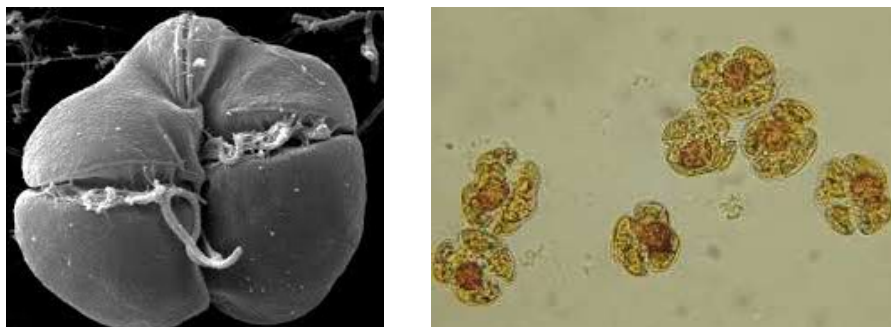
Ο ισχύων ευρωπαϊκός κανονισμός (ΕΚ αριθ. 853/2004, 29 Απριλίου 2004) [132] σχετικά με το επίπεδο των τοξινών DSP στα οστρακοειδή που προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο, εστιάζει αποκλειστικά στη μείωση των γαστρεντερικών συμπτωμάτων. Έτσι, καθορίζει ως μέγιστο επιτρεπτό όριο 160 μg ισοδύναμου ΟΑ ανά kg. Αυτό σημαίνει ότι μικρές ποσότητες ΟΑ μπορεί να υπάρχουν σε μαλάκια που έχουν περάσει από τους νόμιμους ελέγχους πριν από την εμπορία τους και επομένως οι τακτικοί καταναλωτές ενδέχεται να εκτίθενται χρόνια σε αυτή την τοξίνη. Συνεπώς, σε μια πρόσφατη έκθεση της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (ΕΑΑΤ), η οποία έχει ως βάση τις οξείες επιπτώσεις στους καταναλωτές, έχει ήδη προταθεί μείωση αυτού του επιπέδου (από 160μg/kg σε 45μg/kg) [67].

1.2.9.2.2. Μπρεβετοξίνες: Τοξίνες Νευροτοξικού Συνδρόμου (NST)

Οι μπρεβετοξίνες (BTX) είναι θαλάσσιες βιοτοξίνες που μπορούν να συσσωρευθούν στα οστρακοειδή και στα ψάρια. Παράγονται από το γένος των δινομαστιγιωτών *Karenia*, με πιο γνωστό είδος το *Karenia brevis*. Στη βιβλιογραφία, οι οργανισμοί αυτοί αναφέρονται και ως *Gymnodinium breve* ή *Ptychodiscus breve* [133]. Αυτές οι τοξίνες έχουν ανιχνευθεί σε (θαλάσσια) κυδώνια, μύδια και στρείδια, και παραμένουν σε ιζήματα και την κοινότητα των μικρών οργανισμών γύρω από λιβάδια Ποσειδωνίας.

Οι BTX είναι λιποδιαλυτές κυκλικές πολυαιθερικές ενώσεις, οι οποίες ομαδοποιούνται σε δύο χημικές δομές (Α και Β), με βάση τον σκελετό του μορίου τους. Στην ομάδα των BTX ανήκουν αρκετές τοξίνες. Η BTX-2 (τύπος Β) αναφέρεται ως η πλέον άφθονη τοξίνη στο *K. brevis*. Οι BTX-1 (τύπος Α) και BTX-2 θεωρούνται οι αρχικές τοξίνες από τις οποίες προέρχονται οι άλλες τοξίνες της ομάδας. Οι τοξίνες αυτές μεταβολίζονται σε οστρακόδερμα και ψάρια και έχουν απομονωθεί διάφοροι μεταβολίτες τους. Κατά συνέπεια, οι καταναλωτές μολυσμένων οστρακοειδών και ψαριών εκτίθενται κατ' εξοχήν

σε μεταβολίτες των τοξινών της ομάδας ΒΤΧ και σπανιότερα στις αρχικές τοξίνες (ΒΤΧ-1 και ΒΤΧ-2) [134].



Εικόνα 1.14: *Karenia brevis* α. εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο β. εικόνα από οπτικό μικροσκόπιο [134]

Η χημική δομή των ΒΤΧ που παράγονται από τα φύκη και των κυριότερων μεταβολιτών τους φαίνεται στην Εικόνα 1.16. Η δομή τους καταδικνύει ότι αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες που συντίθεται μέσω πολυκετιδικών συνθετασών. Το εκτεταμένο μέγεθος του γονιδιώματος και η έλλειψη ιστονών και νουκλεοσωμάτων σε συνδυασμό με το επιπρόσθετο ρυθμιστικό στάδιο μιας αλληλουχίας μεταβλητού ματίσματος (splicing) καθιστούν τις κανονικές μοριακές τεχνικές αναποτελεσματικές στον προσδιορισμό των γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση τοξινών [135].

Τα *Karenia brevis* (αλλά και τα *Karenia spp.* γενικότερα) είναι υπεύθυνα για τις γνωστές κόκκινες παλίρροιες. Κατά τη διάρκεια αυτών των «ανθήσεων», παρατηρείται υπέρμετρη αύξηση του πληθυσμού των συγκεκριμένων δινομαστιγωτών. Οι περισσότερες από αυτές τις «ανθήσεις» συνήθως συνοδεύονται από παραγωγή μπρεβετοξινών, με επιπτώσεις στην υγεία όλων των οργανισμών του οικοσυστήματος [136].



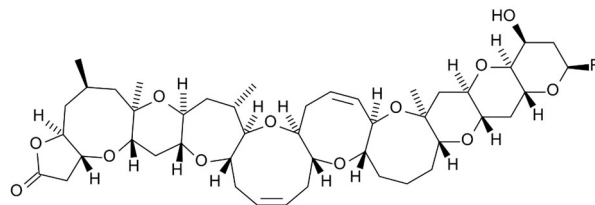
Εικόνα 1.15: Ερυθρά παλίρροια [91]

Η κατανάλωση μολυσμένων από ΒΤΧ οστρακοειδών από τον άνθρωπο, μπορεί να προκαλέσει νευροτοξική ή νευρολογική δηλητηρίαση από

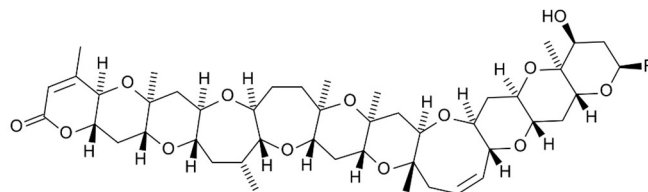
οστρακοειδή (NSP). Αυτό μπορεί επίσης να προκληθεί από την έκθεση των ανθρώπων σε αερολύματα κοντά σε θαλάσσιες περιοχές που έχει καταγραφεί HAB. Η έκθεση της Ευρωπαϊκής Υπηρεσίας Τυποποίησης για τα Τρόφιμα (EFSA) αναφέρει ότι τα διαθέσιμα δεδομένα τοξικότητας για την ομάδα ΒΤΧ και τους μεταβολίτες τους είναι περιορισμένα. Μετά την έκθεση του ανθρώπου σε μολυσμένα με ΒΤΧ οστρακόδερμα, τα συμπτώματα του NSP περιλαμβάνουν γαστρεντερικές και νευρολογικές διαταραχές. Αυτά είναι εμφανή μέσα σε 30 λεπτά έως 3 ώρες μετά την κατανάλωση των οστρακοειδών και μπορεί να διαρκέσουν αρκετές ημέρες. Αναφορές θανάτων ή χρόνιων επιπτώσεων δεν έχουν καταγραφεί [134]. Πιστεύεται ότι αερολύματα μολυσμένα από ΒΤΧ είναι πιο επικίνδυνα από την κατανάλωση οστρακοειδών που περιέχουν ΒΤΧ [137]. Καθώς τα δινομαστιγιωτά καταστρέφονται, απελευθερώνουν τις τοξίνες στο νερό και ακολούθως μεταφέρονται στην ατμόσφαιρα, όταν οι συνθήκες το ευνοούν, με μορφή αερολυμάτων.

Η εισπνοή τοξικών αερολυμάτων μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό στα μάτια, τη μύτη και το λαιμό και αναπνευστική δυσχέρεια, ιδιαίτερα στους πάσχοντες από άσθμα. Τα συμπτώματα είναι αναστρέψιμα όταν τα άτομα απομακρύνονται από την περιοχική έκθεση, παρόλο που υπάρχουν πρόσφατα στοιχεία για υπερευαισθησία και φλεγμονή των πνευμόνων μετά από επανειλημμένη έκθεση σε αερολύματα PbTx-3 [138].

Έχουν αναφερθεί μεγάλες διαφορές μεταξύ των διάφορων ειδών οστρακοειδών σχετικά με τη συσσώρευση και την ανοικοδόμηση των τοξινών και των συναφών μεταβολιτών τους. Υπάρχει μεταβλητότητα στο ποσοστό αποβολής τοξινών μεταξύ των διαφόρων ΒΤΧ και των σχετικών μεταβολικών προϊόντων τους, δεδομένου ότι υπάρχουν μεγάλες διαφορές στη δομή των μορίων αυτών, όσον αφορά την πολικότητα και την υδροφοβία. Σε μερικές περιπτώσεις, οστρακοειδών όπως στρειδιών, έχει διαπιστωθεί ότι παραμένουν τοξικά περισσότερες από 70 ημέρες [139] μετά την απομάκρυνσή τους από την περιοχή του HAB ακόμη και για έναν χρόνο [136].



Brevetoxin - a



Brevetoxin - b

Brevetoxin - a	Brevetoxin - b
Brevetoxin-1 (PbTx-1) R = -CH ₂ C(=CH ₂)CHO	Brevetoxin-2 (PbTx-2) R = -CH ₂ C(=CH ₂)CHO
Brevetoxin-7 (PbTx-7) R = -CH ₂ C(=CH ₂)CH ₂ OH	Brevetoxin-3 (PbTx-3) R = -CH ₂ C(=CH ₂)CH ₂ OH
Brevetoxin-10 (PbTx-10) R = -CH ₂ CH(-CH ₃)CH ₂ OH	Brevetoxin-8 (PbTx-8) R = -CH ₂ COCH ₂ Cl
	Brevetoxin-9 (PbTx-9) R = -CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ OH

Εικόνα 1.16: Χημική δομή μπρεβετοξινών και των μεταβολιτών τους [134]

Ιστορικά, τα *K. brevis* περιοριζόταν στον Κόλπο του Μεξικού και στην ανατολική ακτή της Φλώριντας, όπου είναι ενδημικά. Το καλοκαίρι του 1992-1993, στην ΒΑ ακτή της Νέας Ζηλανδίας καταγράφηκαν περιστατικά ανθρώπων με συμπτώματα NSP. Αυτά συσχετίστηκαν με ένα, προηγουμένως άγνωστο, δινομαστιγυτό, το *K. cf brevis*. Αυτός ο οργανισμός είναι παρόμοιος μορφολογικά με άλλα είδη *Karenia* (*K. mikimotoi* και *K. brevis*), και παρήγαγε λιποδιαλυτές τοξίνες "παρόμοιες με μπρεβετοξίνη" [133]. Στη συνέχεια βρέθηκε ένα είδος *Karenia brevisulcata* στα νερά της Νέας Ζηλανδίας. Το 1998 προκάλεσε σοβαρό HAB στην κεντρική και νοτιοανατολική ακτή του Βόρειου νησιού της Νέας Ζηλανδίας καταστρέφοντας όλη τη θαλάσσια ζωή στο Λιμάνι του Ουέλλινγκτον. Σε μεικτές καλλιέργειες φυκών, προσδιορίστηκε ένα πλήθος νέων τοξινών με παρόμοια δομή με τις ΒΤΧ. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι κατά τη διάρκεια αυτού του HAB, το νερό ήταν ασυνήθιστα (για την περιοχή) ζεστό και στρωματοποιημένο [140].

Σε περιοχές του κόσμου που επλήγησαν από NSP, έχουν πραγματοποιηθεί μετρήσεις ΒΤΧ σε οστρακοειδή ή ψάρια. Για παράδειγμα, οι συγκεντρώσεις των τοξινών της ομάδας ΒΤΧ στα οστρακοειδή έχουν αναφερθεί ότι κυμαίνονται από 880 έως 49.000 μgΒΤΧ-2 ισοδύναμα/kg, με τη μετατροπή ενός ΜU να είναι 4 μg ΒΤΧ-2 ισοδύναμα (οι ΒΤΧ σε μολυσμένα οστρακοειδή έχουν αναφέρονται κυρίως σε ΜUs/100g) [141] [141] [141] [141] [141] [141] [141] [141] [141] [141] [141] [140] [139] [139] [139] [139] [139] [139] [140]. Στη Φλόριντα, οι συγκεντρώσεις των ΒΤΧ σε ψάρια που μετρήθηκαν με ανταγωνιστική ELISA, χρησιμοποιώντας πρότυπο ΒΤΧ-3, κυμαίνονταν από 580 έως 6000 μg ΒΤΧ-3 ισοδύναμα/kg [142].

Η ομάδα υπεύθυνη για τις τοξικές ενώσεις (επιτροπή CONTAM) διαπίστωσε ωστόσο ότι ο αριθμός των τοξινών της ομάδας ΒΤΧ που αναφέρθηκαν εξαρτάται από τις χρησιμοποιούμενες αναλυτικές μεθόδους και τα διαθέσιμα πρότυπα.

Οι Turner et al [100] ήρθαν σε επαφή με μια σειρά ευρωπαϊκών οργανισμών, ερευνητικών ιδρυμάτων και πανεπιστημίων όσον αφορά πιθανό προσδιορισμό νέων ειδών που παράγουν ΒΤΧ. Από την Marine Scotland

Science αναφέρθηκε ότι το *Karenia papilionacea* μπορεί να παράγει BTXs [143].

Από όσο γνωρίζουμε, μέχρι στιγμής, δεν έχει αναφερθεί HAB με παραγωγή BTX στην Ευρώπη. Ωστόσο, στο μέλλον, ένας αριθμός παραγόντων θα μπορούσε ενδεχομένως να συμβάλει στην εγκαθίδρυση ή την άνθηση του φυτοπλαγκτού που παράγει BTX. Πιθανοί παράγοντες περιλαμβάνουν τη μεταφορά υδάτινου έρματος, την αλλαγή του κλίματος και τις μεταβολές στις αναλογίες θρεπτικών συστατικών στους υδάτινους όγκους [65]. Επί του παρόντος, δεν υπάρχουν ρυθμιστικά όρια για τις BTX σε οστρακοειδή ή ψάρια στην Ευρώπη.

Υπάρχουν μελέτες μόνο για την οξεία τους τοξικότητα μετά από ενδοφλέβια, ενδοπεριτοναϊκή και από του στόματος χορήγηση, και όχι για χρόνια έκθεση σε μικρές ποσότητες. Οι τοξίνες της ομάδας BTX δεσμεύονται με τις αντλίες νατρίου στην κυτταρική μεμβράνη προκαλώντας έτσι αποπόλωση νευρωνικών και μυϊκών κυτταρικών μεμβρανών [136].

Υπάρχουν διάφορες ενδείξεις κλαστογονικής δράσης (χρωμοσωμικές ανωμαλίες και βλάβες στο DNA) των BTX *in vitro*. Επίσης, η BTX-2 προκαλεί βλάβη στο DNA *in vivo*. Ούτε η BTX-2 ούτε η BTX-6 είναι μεταλλαξογόνες σε αναλύσεις αντίστροφης μετάλλαξης. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η BTX-2 προκαλεί προσθήκες βάσεων στο DNA απομονωμένων πνευμονικών κυττάρων αρουραίου, που υποβάλλονται σε αγωγή *in vitro*. Αυτές οι παρατηρήσεις εγείρουν ανησυχία σχετικά με την πιθανή καρκινογενετική δράση της BTX-2 και τις επακόλουθες μακροπρόθεσμες επιπτώσεις της.

Δεν υπάρχουν μακροπρόθεσμες μελέτες για τις BTX σε πειραματόζωα που θα επέτρεπαν την καθιέρωση μιας ανεκτής ημερήσιας πρόσληψης (TDI). Εξαιτίας των περιορισμένων ποσοτικών δεδομένων τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε σχέση με περιστατικά ανθρώπινων δηλητηριάσεων, η ομάδα CONTAM κατέληξε στο συμπέρασμα ότι δεν ήταν δυνατή η καθιέρωση μιας οξείας δόσης αναφοράς (ARfD) χορήγησης BTX από του στόματος. Περιορισμένα ποσοτικά δεδομένα για δηλητηριάσεις από ανθρώπους υποδεικνύουν ότι συμπτώματα του NSP μπορεί να εμφανιστούν μετά από έκθεση σε τροφή που περιέχει 2,8-4,8μg BTX-2/kg σωματικού βάρους [134].

Το ισχύον ανώτατο όριο που έχει οριστεί για τα NST στα οστρακοειδή είναι 800mg ισοδύναμα PbTX-2/kg. Ωστόσο, μέχρι σήμερα, το επίπεδο αυτό υιοθετήθηκε μόνο στις ΗΠΑ, τη Νέα Ζηλανδία και την Αυστραλία.

1.3. Μύδια

Οι θαλάσσιες βιοτοξίνες παράγονται από κυανοβακτήρια και πρώτιστα, αλλά συσσωρεύονται στον μυϊκό ιστό των οστρακοειδών (μύδια, χτένια,

κυδώνια, γυαλιστερές, στρείδια κ.ά.). Τα οστρακοειδή με την μεγαλύτερη κατανάλωση παγκοσμίως είναι τα μύδια [144].

Η παγκόσμια παραγωγή μυδιών υπολογίσθηκε στα 1,8 εκατομμύρια τόνους το 2012 και αντιστοιχεί στο 13,7% της παγκόσμιας παραγωγής και στο 15,8% της συνολικά παραγόμενης αξίας από τη καλλιέργεια των δίθυρων μαλακίων [144]. Οι χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή είναι η Κίνα, και κάποιες χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης όπως η Ισπανία, η Γαλλία η Ολλανδία και η Ελλάδα. Τα δύο είδη μυδιών που κυρίως καλλιεργούνται είναι το κοινό ή μπλε μύδι, *Mytilus edulis*, και το μεσογειακό μύδι, *Mytilus galloprovincialis* (Κλάση: Bivalvia, Υποκλάση: Pteriomorpha, Τάξη: Mytiloidea, Οικογένεια: Mytilidae, Γένος: *Mytilus*), τα οποία έχουν ευρεία κατανομή [145].

Απαντούν σε μεγάλη ποικιλία ενδιαιτημάτων, από περιοχές που υφίστανται τη δράση της παλίρροιας έως εξογκλήρου βυθισμένες ζώνες, σε μεγάλο εύρος θερμοκρασίας και αλατότητας. Τρέφονται με πλαγκτόν και οργανική ύλη, τα οποία συλλέγει φιλτράροντας νερό του περιβάλλοντός του. Ένα ενήλικο μύδι για να τραφεί, φιλτράρει 57 L νερό ημερησίως [19].

Αυτό το ζώο αναπτύσσεται έως 140 mm σε μήκος. Το κέλυφος του είναι μπλε-ιώδες ή μαύρο και σπανιότερα ανοικτό καφέ. Αν και το σχήμα του κελύφους ποικίλλει ανά περιοχή, στη μία πλευρά το χείλος του κελύφους τελειώνει με ένα μυτερό και ελαφρώς λυγισμένο πλέγμα, ενώ η άλλη πλευρά είναι στρογγυλεμένη. Οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης του είναι: θερμοκρασία 17°C και διαλυμένο οξυγόνο 9,3 ml /L [146].

Στην Ελλάδα, μύδια απαντώνται κατά μήκος όλης της ακτογραμμής, κυρίως σε βραχώδεις ακτές. Μονάδες καλλιέργειας μυδιών υπάρχουν στην περιφέρεια Ανατολικής Μακεδονίας και Θράκης (Ν. Ροδόπης, Ξάνθης, Καβάλας), στην περιφέρεια Κεντρικής Μακεδονίας (Ν. Θεσσαλονίκης, Ημαθίας, Πιερίας, Χαλκιδικής και Σερρών,) στην περιφέρεια Δυτικής Ελλάδας (Ν. Πρεβέζης και Θεσπρωτίας), στην Αττική και στον Νομό Φθιώτιδας. Το συντριπτικά μεγαλύτερο τμήμα αυτής της δραστηριότητας εντοπίζεται στην Κεντρική Μακεδονία. Οι Ν. Θεσσαλονίκης, Πιερίας και Ημαθίας συγκεντρώνουν περίπου το 90% των μονάδων εκτροφής μυδιών που υπάρχουν στον Ελλαδικό χώρο [19].

1.4. Μικροοργανισμοί της θάλασσας

Ως θαλάσσιοι μικροοργανισμοί ορίζονται οι μικροοργανισμοί που ζουν σε θαλάσσιο περιβάλλον, δηλαδή στο θαλάσσιο νερό μιας θάλασσας ή ωκεανού ή στο υφάλμυρο νερό μιας παράκτιας εκβολής. Μπορούν να είναι μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι και περιλαμβάνουν βακτήρια (ετερότροφα και κυανοβακτήρια), Αρχαία, τα περισσότερα πρωτόζωα, ορισμένα είδη μυκήτων,

φύκη και ορισμένα μικροσκοπικά ζώα, όπως τροχόζωα και κωπήποδα. Πολλά μακροσκοπικά ζώα και φυτά έχουν μικροσκοπικά νεανικά στάδια. Οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί αποτελούν περίπου το 70% της βιομάζας στη θάλασσα [147]. Παρά την ποικιλομορφία της, η μικροσκοπική ζωή στους ωκεανούς εξακολουθεί να είναι ελάχιστα κατανοητή, τόσο ως προς τη σύστασή της, όσο και προς την δυναμική της.

1.4.1. Τα πρώτιστα στα θαλάσσια οικοσυστήματα

Τα πρώτιστα είναι ένα ευρύ σύνολο οργανισμών, το καθένα από τα οποία παίζει έναν ειδικό ρόλο σε μια ποικιλία περιβαλλοντικών οικοσυστημάτων. Ως ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί, τα πρώτιστα κυμαίνονται σε μέγεθος από 1μm έως 2mm, μπορούν να είναι αυτότροφοι, ετερότροφοι ή και τα δύο, κινητοί ή μη κινητοί και μπορούν να αναπαραχθούν σεξουαλικά ή ασεξουαλικά. Οι μικροοργανισμοί με ένα τόσο μεγάλο φυλογενετικό και φυσικό πεδίο διαδραματίζουν έναν αναπόσπαστο ρόλο στον ιστό των μικροβιακών τροφών, με αναπόφευκτες συνέπειες για την κλασική τροφική αλυσίδα στο σύνολό της. Η σωστή κατανόηση της κατανομής και της σύνθεσής τους κατά τις περιβαλλοντικές διαταραχές είναι το κλειδί για την αναγνώριση του τρόπου με τον οποίο επηρεάζεται η ισορροπία ενός οικοσυστήματος [148].

Τα φωτοσυνθετικά πρώτιστα συμβάλλουν σημαντικά στη βιομάζα και στη πρωτογενή παραγωγή του οικοσυστήματος [149, 150]. Μέσα στην κοινότητα των φωτοσυνθετικών οργανισμών, η κατηγορία μεγέθους pico (0,2-2,0 μm) έως νανο (2-20 μm) βρέθηκε να κυριαρχεί συχνά στη βιομάζα [151]. Ωστόσο, τα ετερότροφα πρώτιστα διαδραματίζουν βασικό ρόλο τόσο μέσω της βόσκησης του φυτοπλαγκτόν και των ετεροτροφικών μικροβίων, όσο και ως πηγή τροφής για το ζωοπλαγκτόν [152-154]. Επιπλέον, πολλά πρώτιστα είναι μιξότροφα [155, 156], ενδοσυμβιωτικοί οργανισμοί [157, 158] ή παράσιτα άλλων ευκαρυωτικών [159]. Αυτό δείχνει τον σύνθετο ρόλο τους στο οικοσύστημα, το πλήθος των διεργασιών στις οποίες εμπλέκονται και καταδεικνύει πόσο μεγάλη προσαρμοστικότητα απαιτείται από αυτά, όταν αντιμετωπίζουν αλλαγές στο περιβάλλον τους. Η πρόσφατη βιβλιογραφία αρχίζει να υποθέτει ότι η λειτουργία της «κοινότητας» είναι ιδιαίτερα προσαρμόσιμη στις περιβαλλοντικές αλλαγές. Τόσο οι μεγάλες, όσο και οι μικρές περιβαλλοντικές διαταραχές θα προκαλέσουν μεγάλες μεταβολές των ειδών στις «κοινότητες» [160]. Οι συναθροίσεις αυτές λειτουργούν ως ένα βιολογικό «ρυθμιστικό σύστημα», κατά το οποίο ορισμένα λιγότερο άφθονα είδη είναι λειτουργικά παρόμοια, αλλά ανταγωνιστικά κατώτερα από τα πιο κυρίαρχα είδη, σε συγκεκριμένο χρόνο και τόπο. Η ανάπτυξη των μοριακών προσεγγίσεων επέτρεψε κάποια κατανόηση αυτής της θεωρίας.

1.4.1.1. Νέα είδη Πρωτίστων

Ένα μεγάλο μέρος της ποικιλομορφίας των πρωτίστων που διαπιστώθηκε σε όλο τον κόσμο συνίσταται σε άγνωστα είδη ή ακόμα και σε ολόκληρους κλάδους άγνωστων ειδών. Με βάση αυτά τα νέα δεδομένα άλλαξε η κοινή άποψη της δομής του θαλάσσιου τροφικού δικτύου [161, 162]. Τα περισσότερα από αυτά έχουν προκύψει από μελέτες με επίκεντρο το μικρότερο κλάσμα (<20μm) των πρωτίστων, των οποίων η ταξινομική ποικιλομορφία είναι η λιγότερο γνωστή λόγω της δυσκολίας να αναγνωριστούν μορφολογικά. Αυτές οι νέες ανακαλύψεις έχουν ως επί το πλείστον νέα είδη γνωστά ως Marine Stramenopile (MAST), άγνωστους κλάδους των κυψελιδωτών, των τελονεμιδίων και μια ποικιλία φωτοσυνθετικών πικοευκαρυωτικών [161, 163-165]. Ως αποτέλεσμα, οι προσπάθειες για την αναγνώριση αυτών των ταξινομικών κατηγοριών είναι πολλές.

Μελετώντας τις κοινοτικές μετατοπίσεις σπάνιων και άγνωστων ειδών πρωτίστων, παρατηρείται ότι οι αλλαγές στην σύνθεση της βιοκοινότητας συμβαίνουν ταχύτερα από ό,τι έχει τεκμηριωθεί πριν [166]. Ακόμη πιο ενδιαφέρον είναι ότι κοινές ομάδες πρωτίστων βρέθηκαν σε περιοχές με παρόμοιες ωκεανογραφικές συνθήκες σε όλο το πλανήτη. Αυτό υποδηλώνει ότι υπάρχουν οικολογικές συνδέσεις μεταξύ αυτών των ειδών και του περιβάλλοντος τους. Μια πρόσφατη μελέτη συγκεκριμένα έδειξε πολλά μικροβιακά είδη που μοιράζονται χρονικές κατανομές στις ακτές της Καλιφόρνιας [167]. Σε μια προσπάθεια να χαρτογραφηθούν οι σχέσεις μεταξύ των πρωτίστων, των βακτηρίων και του περιβάλλοντος τους, οι Steele et al [167] υπολόγισαν συσχετισμούς τοπικής ομοιότητας μεταξύ όλων των ειδών και των φυσικοχημικών παραμέτρων. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια αξιοσημείωτη συσχέτιση μεταξύ των κύριων πρωτίστων με άλλα πρώτιστα ή βακτήρια, περισσότερο από ό,τι με τις περιβαλλοντικές παραμέτρους. Αυτή η μελέτη μαζί με άλλους υποδηλώνουν τη σημασία της συμβίωσης και του παρασιτισμού. Οι σχέσεις μεταξύ των οργανισμών εμφανίζονται ως αναπόσπαστο στοιχείο για την επιβίωση ορισμένων ειδών και τη λειτουργία τους σε περιβάλλον με χαμηλό διαλυμένο οξυγόνο [168, 169]. Η σωστή κατανόηση αυτών των ομάδων και των ρόλων που παίζουν στον κύκλο του άνθρακα στα θαλάσσια περιβάλλοντα, έχει κεντρική σημασία για την κατανόηση και την αντιμετώπιση του ευρέος φάσματος περιβαλλοντικών διαταραχών των θαλάσσιων οικοσυστημάτων, αλλά και όσων εμφανιστούν στο μέλλον.

Αυτές είναι όλες οι σημαντικές θεωρίες και γεγονότα που πρέπει να ληφθούν υπόψη όταν αναλύονται ολόκληρες κοινότητες πρωτίστων. Μέχρι τώρα οι μελέτες δεν έχουν ακόμη δειγματοληπτικά λάβει κανένα περιβάλλον, προκειμένου να αποκτήσουν ακριβή εικόνα της διανομής των ειδών και,

κυρίως, της αφθονίας. Η αυξανόμενη χρήση μεθόδων υψηλής απόδοσης αρχίζει να συμβάλλει στην αποσαφήνιση της ειδικής σύνθεσης της τεράστιας παρουσίας σπάνιων ειδών και της ποικιλομορφίας των ειδών σε όλα τα ενδιαιτήματα.

1.4.1.2. Τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην ταξινόμηση των πρωτίστων

Μεγάλο μέρος της βιβλιογραφίας μέχρι σήμερα χρησιμοποιεί είτε τυποποιημένες τεχνικές οικολογίας είτε μοριακά εργαλεία. Έτσι, ενδεχομένως στις μελέτες που χρησιμοποιούν μια από τις δυο μεθόδους, να λείπουν πολύτιμα δεδομένα, τα οποία θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην καλύτερη περιγραφή ενός οικοσυστήματος. Οι μοριακές τεχνικές είναι ανεκτίμητες στην περιγραφή της δομής των ειδών. Η ικανότητα να συλλέγονται διαφορές στο DNA σε διαφορετικά περιβάλλοντα ή και με την πάροδο του χρόνου στο ίδιο περιβάλλον μπορεί να μας βοηθήσει να κατανοήσουμε πώς μεταβάλλονται τα είδη σε μοριακό επίπεδο, αλλιώς δεν είναι δυνατή με τέτοια λεπτομέρεια χρησιμοποιώντας πιο παραδοσιακές παρατηρήσεις μικροσκοπίου. Οι πληθυσμοί των πρωτίστων, ειδικότερα, συνεχώς ανα-ταξινομούνται, λόγω νέων δεδομένων που προκύπτουν από αναλύσεις διαφόρων περιβάλλοντων.

Παρά την πολύτιμη γνώση που μπορούν να προσφέρουν οι μοριακές τεχνικές, γίνεται ολοφάνερο ότι εξακολουθεί να είναι κρίσιμο να συνεχίσουμε να παρακολουθούμε επίσης τι συμβαίνει χρησιμοποιώντας ένα μικροσκόπιο. Παραδείγματος χάριν, οι συμβιωτικές σχέσεις μεταξύ των βακτηρίων και των πρωτίστων καθώς και σχέσεις ανάμεσα σε μεγαλύτερα και μικρότερα (συνήθως φωτοσυνθετικά) είδη πρωτίστων αρχίζουν να εμφανίζονται σε πολλές πρόσφατες μελέτες [158, 170]. Αυτές οι σχέσεις θα ήταν λιγότερο προφανείς χρησιμοποιώντας μόνο μια μοριακή προσέγγιση. Φαίνεται ότι αυτές οι συσχετίσεις προκαλούνται από βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες οι οποίοι μέχρι σήμερα δεν μπορούν να αναπαραχθούν σε εργαστηριακό περιβάλλον. Αυτές οι σχέσεις σίγουρα αλλάζουν τον μεταβολισμό των πρωτίστων και σε πολλές περιπτώσεις η πολυγονιδιακή ανάλυση υποδηλώνει ότι πραγματοποιείται γενετική ανταλλαγή δημιουργώντας νέα είδη ακόμη και κλάδους [170]. Εκτός από τα υποτιθέμενα συμβιωτικά βακτήρια-πρώτιστα, η αφθονία των ειδών είναι δύσκολο να εκτιμηθεί χρησιμοποιώντας μοριακές μεθόδους. Δεδομένου ότι τα είδη των πρωτίστων περιέχουν διαφορετικές ποσότητες DNA και διαφορετικούς αριθμούς αντιγράφων γονιδίων, η ανάλυση της αφθονίας των ειδών τους χρησιμοποιώντας αλληλούχιση νέας γενιάς πρέπει να εξεταστεί με προσοχή, δεδομένου του σταδίου PCR που εμπλέκεται πριν από την ανάλυση του δείγματος. Ακόμη και αποτελέσματα από qPCR πρέπει να εξετάζονται με προσοχή, ότι αφορά την αφθονία πρωτίστων. Σε αυτή την περίπτωση, οι παρατηρήσεις μικροσκοπίου, χρησιμοποιώντας

τεχνικές όπως η φθορίζουσα *in situ* υβριδοποίηση (FISH), μπορούν να οδηγήσουν σε πολύ πιο ακριβείς εκτιμήσεις των ενεργών κυρίαρχων ειδών. Είναι ξεκάθαρο ότι πολλά από τα μικρότερα είδη μπορεί να καθούν χρησιμοποιώντας τεχνικές σαν την FISH. Συνεπώς, ο συνδυασμός μοριακών και μικροσκοπικών τεχνικών θα πρέπει να εφαρμόζεται σε κάθε μελέτη [160, 166, 168].

1.4.2. Κυανοβακτήρια

Τα κυανοβακτήρια είναι gram-αρνητικά φωτοσυνθετικά βακτήρια. Εμφανίστηκαν πριν από περίπου 2600-3500 εκατομμύρια χρόνια και έχουν αναλυθεί βάσει απολιθωμάτων, βιολογικών δεικτών και φυλογενετικών σχέσεων με άλλες μορφές ζωής [171]. Η μορφολογία τους είναι ποικίλη, εμφανίζονται ως νηματοειδείς, μονοκύτταρες, πλαγκτονικές, βενθικές και αποικιακές μορφές [172]. Βρίσκονται σε ψυχρά και ζεστά, αλκαλικά και όξινα, θαλάσσια, γλυκά και υφάλμυρα ύδατα, σε χερσαία οικοσυστήματα αλλά και συμβιωτικά με άλλους οργανισμούς, καθιστώντας ανταγωνιστική την ανάπτυξη σχεδόν σε οποιοδήποτε περιβάλλον που έχει νερό και ηλιακό φως [173].

1.4.2.1. Ποικιλότητα κυανοβακτηρίων

Με περισσότερα από 1000 είδη και 150 γένη [174] που έχουν περιγραφεί μέχρι τώρα, τα κυανοβακτήρια είναι σημαντικοί παράγοντες σταθεροποίησης του ατμοσφαιρικού αζώτου στα υδρόβια οικοσυστήματα. Παράγουν οξυγόνο ως υποπροϊόν αυτής της διαδικασίας [175] και έχουν πρόσφατα προταθεί ως πηγή υδρογόνου για την παραγωγή καυσίμων [176].

Τα θαλάσσια κυανοβακτήρια έχουν μια ιστορία που μπορεί να εντοπιστεί πριν από σχεδόν τρία δισεκατομμύρια χρόνια, πριν το αρχείο των απολιθωμάτων κατά τη διάρκεια της προκάμβριας περιόδου. Είναι σημαντικοί πρωτογενείς παραγωγοί, και χωρίς αυτά δεν μπορούν να υπάρχουν ζωικοί πληθυσμοί συμπεριλαμβανομένων των ψαριών σε φυσικά ύδατα. Καλούνται επίσης μπλε πράσινα φύκη [148].

Αρκετά στελέχη κυανοβακτηρίων χρησιμοποιούνται ως συμπληρώματα διατροφής, στην απομόνωση άνθρακα και στη βιοαποκατάσταση [177]. Επιπλέον, τα κυανοβακτήρια παράγουν μια ευρεία ομάδα βιοδραστικών ενώσεων (δευτερογενών μεταβολιτών) που συντίθενται μέσω μιας μη ριβοσωματικής οδού από μια οικογένεια ενζυμικών συμπλόκων που αποκαλούνται μη ριβοσωμικές πεπτιδικές συνθετάσες (NRPS) και συνθετάσες πολυκετιδίων (PKS) [83]. Έχουν ποικίλες βιολογικές δράσεις μεταξύ των

οποίων αντιιικές, αντιβακτηριακές, αντιμυκητιασικές, ανθελονοσιακές, αντικαρκινικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, που έχουν θεραπευτική, βιομηχανική και γεωργική σημασία [173]. Λόγω των απλών αναγκών ανάπτυξής τους, είναι οι ιδανικοί οργανισμοί - μοντέλα μελέτης για βαθύτερη κατανόηση αρκετών μεταβολικών διεργασιών και για την παραγωγή ανασυνδυασμένων ενώσεων με φαρμακευτική και εμπορική αξία. Τα τελευταία χρόνια, τα κυανοβακτήρια έχουν αποκτήσει ενδιαφέρον για την παραγωγή βιοκαυσίμων τρίτης γενεάς τόσο από τη βιομάζα τους, όσο και από την παραγωγή υδρογόνου [173].

Οι κυανοτοξίνες είναι επίσης προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των κυανοβακτηρίων, τα οποία συντίθενται μη ριβοσωμικά, αλλά έχουν τοξικές ιδιότητες λόγω του τρόπου δράσης τους. Μερικές από αυτές είναι νευροτοξίνες (ανατοξίνη-α, σαξιτοξίνες), δερματικές τοξίνες (lyngbyatoxin) και ηπατοτοξίνες (μικροκυστίνες, νοντουλαρίνες, κυλινδροσπερμοψίνη) [83]. Η χημική τους δομή εμπίπτει σε τρεις ευρείες ομάδες: κυκλικά πεπτίδια, αλκαλοειδή και λιποπολυσακχαρίτες [80]. Η εμφάνιση αυτών των τοξινών σε φυσικά περιβάλλοντα μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις στα υδρόβια οικοσυστήματα. Άνθηση κυανοβακτηρίων σε ευτροφικά οικοσυστήματα, οδηγεί σε υποβάθμιση της ποιότητας του νερού προσδίδοντας του, εκτός από την ύπαρξη κυανοτοξινών, χαρακτηριστική οσμή και χρώμα [80].

Οι κυανοτοξίνες έχουν μελετηθεί διεξοδικά σε οικοσυστήματα εσωτερικών υδάτων. Για τα θαλάσσια οικοσυστήματα και την ύπαρξη κυανοτοξινών τα δεδομένα είναι περιορισμένα. Έχει αναφερθεί η ύπαρξη νοντουλαρινών [80, 111] και μικροκυστινών [74, 77].

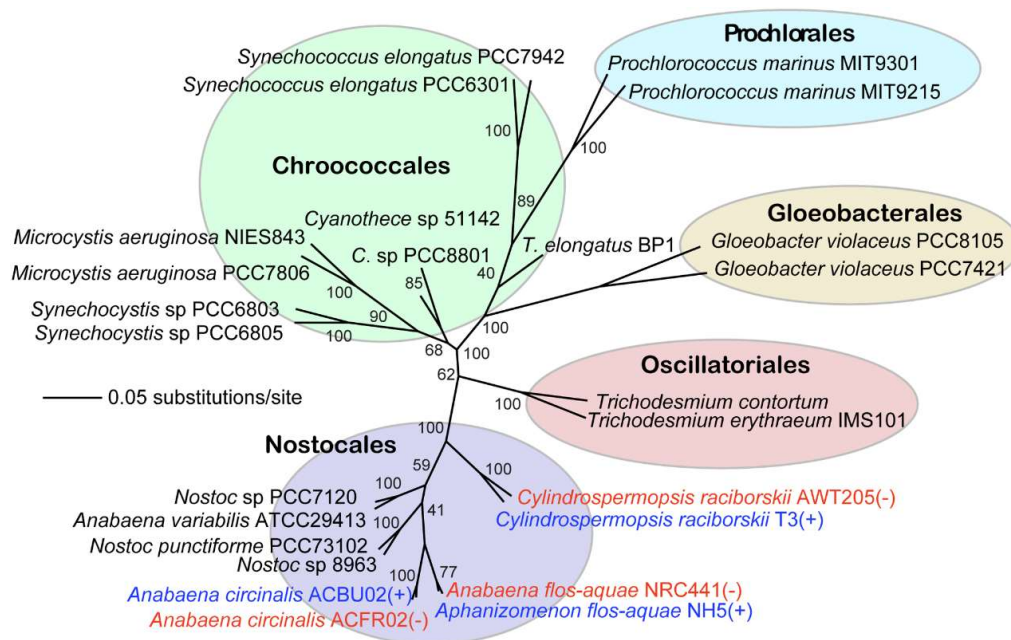
1.4.2.2. Φυλογένεση κυανοβακτηρίων

Αρχικά, η ανίχνευση, η ταυτοποίηση και η απαρίθμηση των κυανοβακτηρίων διεξάγονταν με μικροσκοπικές τεχνικές, οι οποίες βασίζονται σε μορφολογικά κριτήρια που απαιτούν την παρουσία έμπειρου παρατηρητή. Έτσι, τα κυανοβακτήρια ταξινομήθηκαν αρχικά ως φύκη και συνεπώς ομαδοποιήθηκαν με φυτά σύμφωνα με τα κριτήρια του βοτανικού κώδικα [178]. Κάτω από αυτό το είδος ταξινόμησης, χρησιμοποιήθηκαν μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Αργότερα, τα κυανοβακτήρια αναταξινομήθηκαν εφαρμόζοντας βακτηριολογικά κριτήρια που χρησιμοποιούν μορφολογικά και αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά [179].

Σύμφωνα με τον βακτηριολογικό κώδικα, τα κυανοβακτήρια ταξινομούνται σε πέντε υποτμήματα (subsection). Αυτά είναι τα *Chroococcales*, *Prochlorales*, *Oscillatoriales*, *Nostocales* και *Gleobacterales* [94]. Είναι πλέον σαφές ότι μόνο δύο γένη, τα *Prochlorococcus* και *Synechococcus*, κυριαρχούν στο φωτοαυτοτροφικό πικοπλαγκτόν (0.2 - 2μm) στις τεράστιες εκτάσεις των

ωκεανών του πλανήτη συμβάλλοντας σημαντικά στην παγκόσμια πρωτογενή παραγωγικότητα [9].

Σήμερα χρησιμοποιούνται μοριακά δεδομένα και φυλογενετικές αναλύσεις για την αναθεώρηση της ταξινόμησης των κυανοβακτηρίων [180-182], οι οποίες έχουν πλεονεκτήματα (εξειδίκευση, ευαισθησία, ταχύτητα) σε σύγκριση με τις παραδοσιακές τεχνικές. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι ένα μοριακό εργαλείο που εφαρμόζεται σε έρευνες για ταυτοποίηση κυανοβακτηρίων. Μαζί με την αλληλούχιση γονιδίων επιτρέπουν την γρήγορη ταυτοποίηση των κυανοβακτηρίων από περιβαλλοντικά δείγματα, με κύριο πλεονέκτημα ότι δεν απαιτείται η εργαστηριακή ανάπτυξη καλλιεργειών [183]. Άλλες μελέτες βασίστηκαν σε μοριακές προσεγγίσεις για την κατανόηση της ποικιλομορφίας των μικροοργανισμών και των μεταβολιτών τους σε φυσικά περιβάλλοντα [184]. Οι αλληλουχίες DNA που χρησιμοποιούνται στον προσδιορισμό των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των οργανισμών έχουν οδηγήσει σε νέες γενετικές συστηματικές ταξινομήσεις, εφαρμόζοντας μοριακές τεχνικές για την ενίσχυση ορισμένων τμημάτων του γονιδιώματος προκειμένου να χαρακτηριστούν και να εξαχθούν φυλογενετικές σχέσεις των κυανοβακτηρίων. Η φυλογενετική ανάλυση έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια βοηθώντας στην επιβεβαίωση ή την αναθεώρηση παραδοσιακών ταξινομικών μελετών [185].



Εικόνα 1.17: Φυλογενετικό δέντρο των κυανοβακτηρίων, βασισμένο στην αλληλουχία του 16S rDNA γονιδίου.

Για να συγκεντρωθούν σχέσεις που καλύπτουν την ποικιλομορφία της γνωστής ζωής, είναι απαραίτητο να δούμε τα γονίδια που διατηρούνται μέσα από τα δισεκατομμύρια χρόνια εξελικτικής απόκλισης. Αυτά τα γονίδια

αποτελούνται από υπερμεταβλητές περιοχές, όπου οι αλληλουχίες έχουν αποκλίνει πάνω στον εξελικτικό χρόνο καθώς επίσης και από έντονα συντηρημένες περιοχές που συχνά πλαισιώνουν αυτές τις υπερμεταβλητές περιοχές. Οι εκκινήτες σχεδιάζονται έτσι ώστε να συνδέονται με τις διατηρημένες περιοχές και να ενισχύουν τις μεταβλητές περιοχές [186]. Ακολουθίες από δεκάδες χιλιάδες καλλιεργούμενων και περιβαλλοντικών απομονωμένων στελεχών διατίθενται μέσω του Διαδικτύου μέσω του Εθνικού Κέντρου Βιοτεχνολογικών Πληροφοριών (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) που παρέχουν επίσης αλγόριθμους αναζήτησης για να συγκρίνουν νέες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων τους.

Πίνακας 1.4: Κατάλογος των γενετικών δεικτών που χρησιμοποιούνται και της αντίστοιχης εφαρμογής τους στη φυλογένεση και σε βιογεωγραφικές μελέτες των κυανοβακτηρίων [183].

Γενετικός Δείκτης	Ταξινόμηση	Φυλογένεση	Φυλογεωγραφία	Εξέλιξη	Βιογεωγραφία
<i>PC-IGS</i>	✓	✓	✓		✓
<i>ftsZ</i>		✓			
<i>glnA</i>		✓			
<i>gltX</i>		✓			
<i>gyrB</i>		✓			
<i>pgi</i>		✓			
<i>recA</i>		✓			
<i>tpi</i>		✓			
<i>16S - 23S ITS1 - L</i>		✓	✓		
<i>16S - 23S ITS1 - S</i>		✓			
<i>rpoB</i>	✓				
<i>rpoC1</i>	✓	✓	✓	✓	
<i>nifH</i>	✓	✓	✓	✓	
<i>nifD</i>	✓				
<i>16S rDNA</i>	✓	✓	✓	✓	✓
<i>16S - 23S ITS</i>	✓	✓	✓		✓
<i>rbcLX</i>	✓				
<i>hetR</i>	✓				
<i>psbA</i>		✓			
<i>rbcL</i>		✓			
<i>rbcS</i>		✓			

Σε φυλογενετικές μελέτες κυανοβακτηρίων και των τοξινών που αυτά παράγουν, χρησιμοποιήθηκαν αρκετοί γενετικοί δείκτες (Πίνακας 1.4), ο κάθε ένας με διαφορετικό σκοπό: να προσδιοριστεί η ποσότητα των γονοτύπων, να διευκρινιστεί η ταξινόμηση σε επίπεδο γενών ή ειδών ακόμη και στη προσπάθεια δημιουργίας βιογεωγραφικών προτύπων. Άλλες μελέτες χρησιμοποίησαν περισσότερους από έναν γενετικούς δείκτες [187, 188]. Η επιλογή του καλύτερου φυλογενετικού δείκτη είναι κάπως αμφισβητούμενη, καθώς σε μερικές μελέτες, οι οποίες χρησιμοποίησαν περισσότερους από έναν γενετικούς δείκτες, τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα [189], ενώ σε άλλες υπάρχει σαφής συμφωνία μεταξύ όλων των εφαρμοζόμενων δεικτών [190-192]. Άλλες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει πρόσφατα μια ανάλυση πολλαπλών

γονιδίων και όχι έναν γενικό γενετικό δείκτη [187, 188]. Σε αυτές, η ακρίβεια και η αξιοπιστία του φυλογενετικού συμπεράσματος αυξάνεται καθώς μπορούν να αναλυθούν περισσότερες γενετικές πληροφορίες [193]. Παρ' όλα αυτά, αυτός ο τύπος ανάλυσης έχει τα μειονεκτήματά του δεδομένου ότι απαιτεί περισσότερες αντιδράσεις PCR και περισσότερη αλληλούχιση DNA, η οποία με τη σειρά της καθιστά πιο ακριβή από ό,τι όταν χρησιμοποιείται ένας μοναδικός γενετικός δείκτης.

1.5. Αμβρακικός κόλπος

Στη Μεσόγειο, οι κλειστοί κόλποι με εκβολές ποταμών, όπως είναι ο Αμβρακικός κόλπος, είναι περιοχές με μεγάλο οικολογικό και οικονομικό ενδιαφέρον. Ο Αμβρακικός κόλπος αποτελεί έναν από τους μεγαλύτερους κλειστούς κόλπους της Ελλάδος. Ανήκει στο δίκτυο Natura 2000, αλλά προστατεύεται και από τη συνθήκη Ramsar, την σύμβαση της Βαρκελώνης (προστασία της Μεσογείου από τη ρύπανση), τη σύμβαση της Βέρνης (διατήρηση της άγριας ζωής και του φυσικού περιβάλλοντος της Ευρώπης) και τη σύμβαση της Βόννης (διατήρηση των αποδημητικών ειδών της άγριας πανίδας). Πρόκειται για ένα εκτεταμένο μωσαϊκό υγροτοπικών συστημάτων, απαρτιζόμενο από πολλές ρηχές λιμνοθάλασσες, γεμάτες από μεγάλη ποικιλία ψαριών και οστρακοειδών, από καταπράσινες παραποτάμιες ζώνες με αλύλλια, από απέραντους πυκνοθάλαμους καλαμιώνες, από κατάφυτα λασποτόπια, από αλμυρόβαλτους κοντά στη θάλασσα και γλυκόβαλτους κοντά στις εκβολές των ποταμών, από επιμήκεις γραφικές νησίδες, από υγρολίβαδα, από αλίπεδες εκτάσεις, από γήλοφους και γόνιμες πεδιάδες. Είναι ένας ξεχωριστός χώρος με πληθώρα υδρόβιων ζώων, αμφιβίων, θηλαστικών, με πολλές θαλάσσιες χελώνες, με ρινοδέλφια και με αμέτρητες βιοκοινωνίες έμβιων όντων. Σύμφωνα με την Οδηγία 92/43/ΕΟΚ, η περιοχή απαρτίζεται από δεκαπέντε τύπους οικοτόπων, από τους οποίους μάλιστα οι λιμνοθάλασσες θεωρούνται τύπος προτεραιότητας, και χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενδημικών, σπάνιων ή προστατευόμενων ειδών χλωρίδας και πανίδας [194].

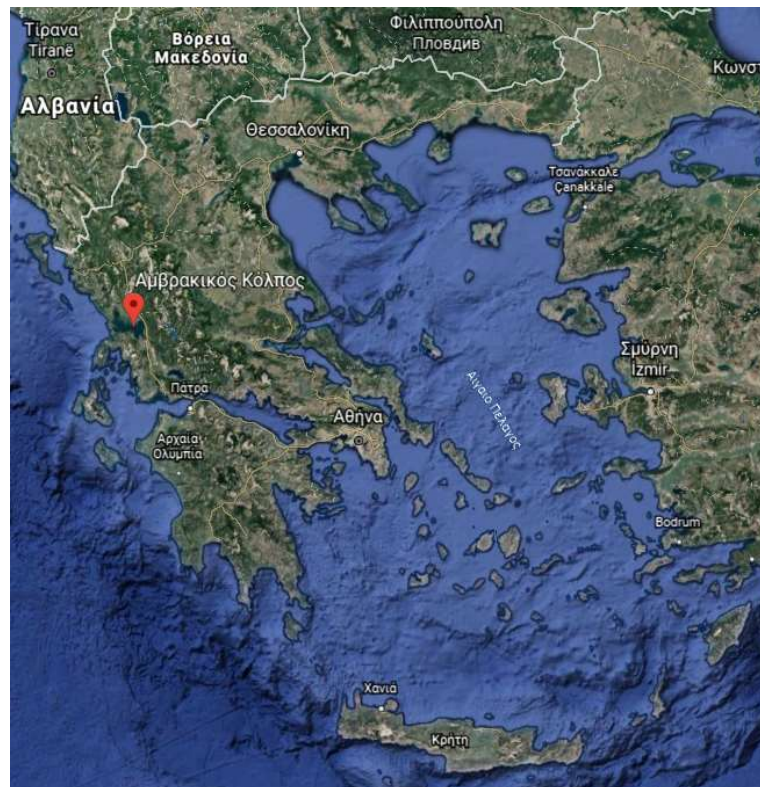
Η έκταση του Αμβρακικού Κόλπου φτάνει τα 405 km², το συνολικό μήκος ακτών χωρίς τις λιμνοθάλασσες τα 180 km και το μεγαλύτερο μήκος του τα 33 km. Το πλάτος του κυμαίνεται από 6 μέχρι 21km, ενώ το μέσο βάθος του είναι περίπου 26m. Τα μεγαλύτερα βάθη (60-65m) παρατηρούνται στην ανατολική πλευρά του κόλπου. Βάθη έως 5m καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο τμήμα του κόλπου, κυρίως στο βόρειο τμήμα του, όπου εκβάλλουν τα ποτάμια Άραχθος και Λούρος και σχηματίζονται οι σημαντικότερες σε έκταση λιμνοθάλασσες. Ο Αμβρακικός Κόλπος είναι ο φυσικός αποδέκτης των επιφανειακών υδάτινων απορροών που προέρχονται από λεκάνες συνολικής έκτασης 3.670 km² περίπου και κατανέμονται σε τρεις υδρομορφολογικές ενότητες: βόρειο τμήμα 3.140 km², ανατολικό τμήμα 260 km² και νότιο 270 km². Τα υδάτινα συστήματα που εκβάλλουν στον κόλπο είναι ποικίλου τύπου και σε μεγάλο ποσοστό ελέγχονται από τη λιθολογία, τη μορφολογία της λεκάνης απορροής και το καθεστώς πηγών τροφοδοσίας τους. Οι σημαντικότεροι κλάδοι του υδρογραφικού δικτύου (ποταμοί-χείμαρροι) που έχουν τις εκβολές τους στον Αμβρακικό κόλπο φτάνουν τους 24, ενώ παρεμβάλλονται και άλλοι μικρότερης δυναμικότητας [195].

Συνδέεται με το Ιόνιο Πέλαγος, μέσω της διώρυγας του Ακτίου η οποία κατασκευάστηκε την ρωμαϊκή εποχή από τον Ιούλιο Καίσαρα κατά τη

ναυμαχία του Ακτίου. Τα δελταϊκά τόξα των ποταμών Λούρου και Αράχθου, αποτελούν τις φυσικότερες διαπλαστικές ενέργειες των ποταμών της Μεσογείου και συμβάλλουν στην βιοποικιλότητα του Αμβρακικού. Οι ποταμοί εφοδιάζουν τα αλμυρά νερά της θάλασσας με άφθονη βιομάζα φυτικής και ζωικής προέλευσης, εμπλουτίζουν τα θαλάσσια οικοσυστήματα με νερό πλούσιο σε οξυγόνο, ενώ με τα γλυκά νερά τους, μειώνουν την αλατότητα των δύσκολα ανανεωμένων νερών του Κόλπου [196].

Οι περισσότερες μελέτες σχετικά με τον Αμβρακικό κόλπο αφορούν την χημική ρύπανση της περιοχής (βαρέα μέταλλα, κατάλοιπα φυτοφαρμάκων) καθώς και τις συνθήκες του πυθμένα του κόλπου που τείνουν να είναι σχεδόν ανοξικές. Επιπλέον πολλές μελέτες αναφέρονται στις λιμνοθάλασσες του Αμβρακικού, καθώς παρουσιάζουν έντονο ενδιαφέρον ως βιότοποι, αλλά και ως περιοχές που δέχονται μεγάλες ανθρωπογενείς παρεμβάσεις.

Οι μεγάλες ποσότητες θρεπτικών αλάτων που μεταφέρονται στον Αμβρακικό από τον Άραχθο και το Λούρο έχουν σαν αποτέλεσμα μεγάλες τιμές αφθονίας φυτοπλαγκτού και συγκέντρωσης χλωροφύλλης. Οι τιμές που έχουν μετρηθεί από το ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε είναι πολύ υψηλές και μπορούν να συγκριθούν με τις τιμές που παρατηρούνται σε ευτροφικές περιοχές της Ελλάδας (εσωτερικός Θερμαϊκός και Κόλπος της Ελευσίνας) αλλά και άλλες ευτροφικές περιοχές της Μεσογείου (Κόλπος Fos στη Γαλλία, εκβολές Πάδου στη Βόρεια Αδριατική) [197, 198].



Εικόνα 1.18: Ο Αμβρακικός Κόλπος

Με βάση μια περιβαλλοντική αξιολόγηση [196], προκύπτει ότι το σημαντικότερο πρόβλημα της περιοχής του Αμβρακικού, από περιβαλλοντικής σκοπιάς είναι η οργανική ρύπανση και η διατάραξη της υδρολογικής ισορροπίας του οικοσυστήματος. Πηγές της είναι κατά κύριο λόγο οι μονάδες επεξεργασίας γεωργικών και κτηνοτροφικών προϊόντων, τα χοιροτροφία και οι εντατικά καλλιεργούμενες εκτάσεις κυρίως στην πεδιάδα της Άρτας, καθώς και τα αστικά λύματα και απορρίμματα των οικισμών που περιβάλλουν τον Αμβρακικό. Κυρίως η κλειστή θάλασσα του Αμβρακικού κόλπου στην οποία καταλήγουν άμεσα ή έμμεσα μεγάλες ποσότητες οργανικών φορτίων επιβαρύνεται σημαντικά και φαινόμενα ευτροφισμού είναι ιδιαίτερα εμφανή με σημαντική έξαρση τα τελευταία χρόνια. Βασική παράμετρος που συντείνει σε μια ιδιαίτερα αρνητική αξιολόγηση της υφιστάμενης κατάστασης περιβάλλοντος στον Αμβρακικό κόλπο είναι οι εκτεταμένες ανοξικές συνθήκες που επικρατούν ακόμη και σε μικρά βάθη στον κόλπο [199]. Εκτιμάται ότι εάν δεν εφαρμοστούν οι προτεινόμενες παρεμβάσεις και συνεχιστεί η υφιστάμενη κατάσταση, σε διάστημα 10 ετών θα ανακύψουν ιδιαίτερα εμφανή προβλήματα οικολογικής απορρύθμισης του οικοσυστήματος της περιοχής με επίκεντρο τον Αμβρακικό κόλπο.

Σχετικά με το φυτοβένθος της περιοχής, ο Αμβρακικός διαφοροποιείται από το Ιόνιο, από την απουσία του αγγειόσπερμου *Posidoneia oceanica* και από τη σπανιότητα των μακροφυκών. Η απουσία υποθάλασσιων λιβαδιών του *Roseidonia oceanica* αποτελεί επιβεβαίωση της περιορισμένης ανανέωσης των υδάτων ενώ η σπανιότητα Χλωροφυκών, Ροδοφυκών και Φαιοφυκών οφείλεται στη παρουσία μεγάλου πληθυσμού αχινών στις ακτές [194].

Όσον αφορά τη σύνθεση του φυτοπλαγκτού σχεδόν σε όλη τη διάρκεια του χρόνου επικρατούν τα διάτομα με εξαίρεση τον Οκτώβριο που επικρατούν τα δινομαστιγωτά. Τα επικρατέστερα είδη φυτοπλαγκτού είναι τα διάτομα *Rhizosolenia fragilissima*, *Leptocylindrus minimus*, *Nitzschia closterium*, *Cerataulina dergoni* (χειμώνας - άνοιξη). Τα επικρατέστερα είδη φυτοπλαγκτού το καλοκαίρι είναι: *Thalassionema nitzschiolides*, *Thalassiospira sp.*, *Prorocentrum balticum* και *Prorocentrum compressum* ενώ το φθινόπωρο επικρατούν τα δινομαστιγωτά *Peridinium sp.* και *Chaetoceros socialis* [195].

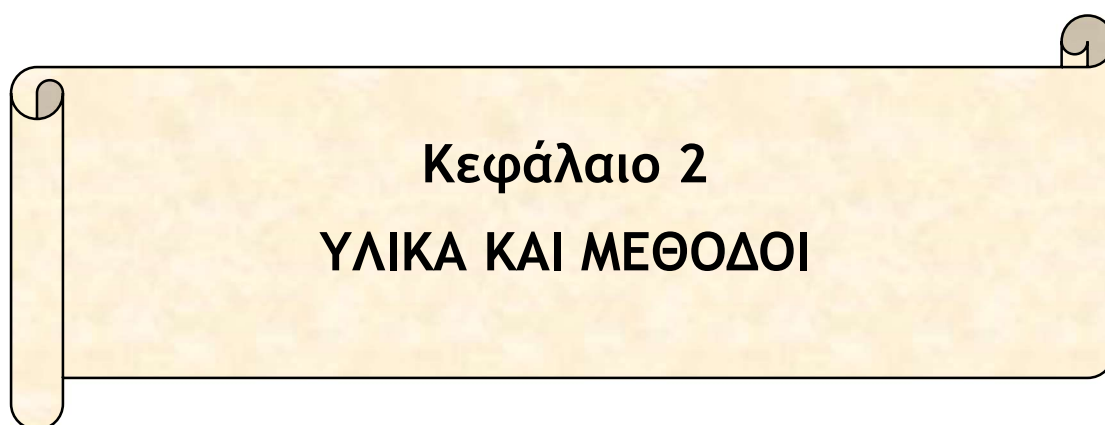
Ο Αμβρακικός αποτελεί έναν σημαντικό βιότοπο πλούσιο σε αλιεύματα. Εντός του κόλπου, υπάρχουν μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας και μυδοκαλλιέργειας, με μεγάλη παραγωγή. Στο πλαίσιο των οδηγιών της ευρωπαϊκής ένωσης, υπάρχει εβδομαδιαίος έλεγχος της ποιότητας του νερού και της ύπαρξης θαλάσσιων βιοτοξινών. Στον έλεγχο αυτό, πολλές είναι φορές που απαγορεύεται η εμπορεία των αλιευμάτων λόγω αύξησης θαλάσσιων τοξινών, που επιβεβαιώνονται με χρήση επίμυων (MBA) και με μικροσκοπική παρατήρηση του αριθμού των δυνητικώς τοξινών πρωτίστως.

1.6. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο Αμβρακικός κόλπος είναι μια από τις σημαντικότερες ιχθυοπαραγωγικές περιοχές της Ελλάδας αλλά και ένας υγροβιότοπος μεγάλης οικολογικής αξίας. Ωστόσο, το υδάτινο αυτό οικοσύστημα αντιμετωπίζει πολλά προβλήματα με κυριότερο αυτό της ρύπανσης από οικιστικά και γεωργοκτηνοτροφικά απόβλητα. Αποτέλεσμα της ρύπανσης αυτής είναι ο ευτροφισμός, φαινόμενο που εντείνεται τα τελευταία χρόνια. Συνέπεια του φαινομένου αυτού είναι και οι αριθμητικές εκρήξεις (bloom) φυτοπλαγκτονικών μικροοργανισμών (κυανοβακτήρια και κυανοφύκη). Πολλά από τα είδη των φυτοπλαγκτονικών μικροοργανισμών είναι δυνητικώς τοξικά. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, οι κυριότερες βιοτοξίνες που δυνητικά μπορούν να παραχθούν στον Αμβρακικό κόλπο είναι οι: μικροκυστίνες, μπρεβετοξίνες, σαξιτοξίνες, οκαδαϊκό οξύ και δομοϊκό οξύ. Τα αποτελέσματα αυτά εκφράζονται μετά από μικροσκοπική παρατήρηση των πλαγκτονικών οργανισμών και συσχέτιση των αποτελεσμάτων με εκείνα από την βιοδοκιμασία επίμυων για την ύπαρξη τοξινών.

Στη παρούσα διατριβή σκοπός μας ήταν :

- 1) Η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση θαλασσιών βιοτοξινών, που πιθανά υπάρχουν στον Αμβρακικό Κόλπο.
- 2) Προσδιορισμός της αφθονίας κυανοβακτηρίων και πρωτίστων, με έμφαση στα δυνητικώς τοξικά στελέχη αυτών.
- 3) Απομόνωση και καλλιέργεια κυανοβακτηρίων από τον Αμβρακικό Κόλπο που παράγουν μικροκυστίνες.



2.1. Συλλογή, επεξεργασία και αποθήκευση δειγμάτων

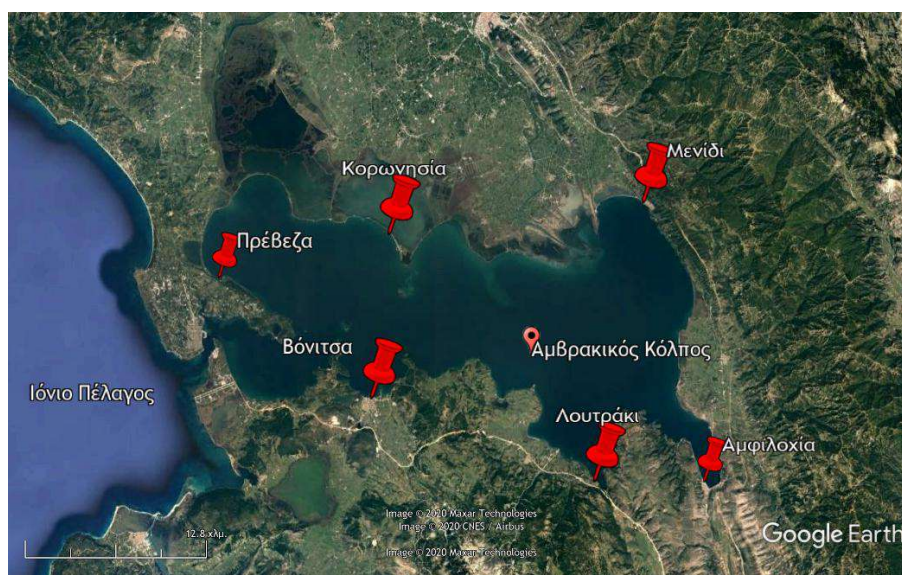
2.1.1. Συλλογή δειγμάτων

Η συλλογή δειγμάτων πραγματοποιήθηκε άπαξ κάθε εποχή για το χρονικό διάστημα Ιούλιος 2013 - Ιούνιος 2014, από 6 θέσεις περιμετρικά του Αμβρακικού κόλπου: Κορωνησία, Μενίδι, Αμφιλοχία, Λουτράκι, Βόνιτσα, Πρέβεζα (Εικόνα 2.1 και Πίνακας 2.1).

Πίνακας 2.1: Γεωγραφικές συντεταγμένες των θέσεων δειγματοληψίας

Θέση Δειγματοληψίας	Γεωγραφικό Πλάτος	Γεωγραφικό Μήκος
Κορωνησία	39 ° 1 ' 27 " N	20 ° 54 ' 24 " E
Μενίδι	39 ° 2 ' 39 " N	21 ° 6 ' 48 " E
Αμφιλοχία	38 ° 52 ' 5 " N	21 ° 9 ' 45 " E
Λουτράκι	38 ° 52 ' 7 " N	21 ° 4 ' 25 " E
Βόνιτσα	38 ° 55 ' 15 " N	20 ° 53 ' 34 " E
Πρέβεζα	38 ° 59 ' 48 " N	20 ° 46 ' 8 " E

Από κάθε θέση συλλέχθηκαν 15L νερό σε δοχεία του 1.5L. Επιπλέον, συλλέχθηκαν 20 - 30 μύδια, το κέλυφος των οποίων ξεπερνούσε τα 4cm σε μήκος. Στο σημείο της δειγματοληψίας, καταγράφηκε η θερμοκρασία του νερού, η αγωγιμότητα και το pH του, χρησιμοποιώντας τον φορητό μετρητή HANNA HI 9811-5. Οι ακριβείς θέσεις δειγματοληψίας φαίνονται στην Εικόνα 2.1 και στον Πίνακα 2.1.



Εικόνα 2.1: Θέσεις δειγματοληψίας στον Αμβρακικό κόλπο.

2.1.2. Επεξεργασία και αποθήκευση δειγμάτων

2.1.2.1.1. Επεξεργασία και αποθήκευση δειγμάτων νερού

Τα δείγματα νερού φιλτραρίστηκαν με τη χρήση συσκευής φιλτραρίσματος (PALL CORPORATION) και φίλτρων 0.45 μ m (S-Pak Membrane Filters Millipore Corporation, Billerica, USA). Τα φίλτρα (1000ml νερό/ φίλτρο) αποθηκεύτηκαν στους -20 $^{\circ}$ C για μελλοντική χρήση.

2.1.2.1.2. Επεξεργασία και αποθήκευση δειγμάτων δίθυρων

Τα οστρακοειδή καθαρίστηκαν με γλυκό νερό και ανοίχθηκαν τα κελύφη τους, κόβοντας τους προσαγωγούς μύες. Για την απομάκρυνση της άμμου ή άλλου ξένου υλικού, τα οστρακοειδή εκπλύθηκαν μέσα με γλυκό νερό. Στη συνέχεια, ο (μυϊκός) ιστός απομακρύνθηκε από το κέλυφος με διαχωρισμό των προσαγωγέων μυών και του ιστού που συνδέεται στο κέλυφος. Οι ιστοί μεταφέρθηκαν σε διηθητικό χαρτί και αφέθηκαν να στραγγίσουν [200]. Αποθηκεύτηκαν ως έχουν στους -20 $^{\circ}$ C για μελλοντική χρήση.

2.2. Μέτρηση φυσικοχημικών παραμέτρων των δειγμάτων

Μέρος των δειγμάτων νερού που συλλέχθηκαν, χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση φυσικοχημικών παραμέτρων.

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

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 [201] και DIN EN 26777. Τα NO_3^- (mg/L) προσδιορίστηκαν με μέθοδο ανάλογη του προτύπου DIN 38405-9. Τέλος, τα ορθοφωσφορικά και ο ολικός φωσφόρος προσδιορίστηκαν με μέθοδο ανάλογη της EPA 365.2+3 και των προτύπων 4500-P E [201] και ISO 6878.

2.3. Ποσοτικός προσδιορισμός τοξινών στον Αμβρακικό κόλπο

Ο προσδιορισμός θαλάσσιων βιοτοξινών κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης έγινε σε ιστούς μυδιών που συλλέχθηκαν από τον Αμβρακικό κόλπο. Αρχικά, οι τοξίνες εκχυλίστηκαν από τον μυϊκό ιστό των μυδιών και στη

συνέχεια έγινε ποσοτικός προσδιορισμός τους, με την μέθοδο του ενζυμοσυνδεόμενου ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού.

2.3.1. Εκχύλιση τοξινών από μυϊκό ιστό δίθυρων

Η εκχύλιση των τοξινών από τον μυϊκό ιστό δίθυρων έγινε σύμφωνα με την ευρωπαϊκή οδηγία EC 2008 [202]. Σε κάθε περίπτωση ομογενοποιήθηκαν 15g ιστού. Από το ομογενοποίηση, 5 δείγματα (aliquot) βάρους $1\pm 0,1g$, μεταφέρθηκαν σε μικρούς φυγοκεντρικούς σωλήνες των 2ml και προστέθηκαν σφαιρίδια από ανοξειδωτο χάλυβα (Qiagen, διάμετρος 5mm) και 1ml κατάλληλου διαλύτη (ο διαλύτης είναι υδατικό διάλυμα μεθανόλης, η περιεκτικότητα του οποίου εξαρτάται από την προς μελέτη τοξίνη, βλ. Πίνακας 2.2). Ακολούθησε ομογενοποίηση σε beat beader για 5 λεπτά.

Η θραύση των κυττάρων ολοκληρώθηκε με επώαση σε υδατόλουτρο υπερήχων, για 15 λεπτά και στη συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ήπια ανάδευση, για 20 λεπτά. Η διαδικασία αυτή (υπέρηχοι και επώαση υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου) επαναλήφθηκε τέσσερις φορές.

Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 8500rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο υγρό φυλάσσεται στους 4°C, ενώ το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 10ml διαλύτη και επώαστηκε ολονύκτια σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση.

Την επόμενη ημέρα, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία δύο φορές, με τη διαφορά ότι:

- το υπερκείμενο μετά τις φυγοκεντρήσεις συλλέχθηκε στον ίδιο φυγοκεντρικό σωλήνα των 50ml, με αυτό της προηγούμενης ημέρας,
- δε μεσολάβησε ολονύκτια επώαση μεταξύ των δύο επαναλήψεων της διαδικασίας.

Τελικά κάθε 1g ομογενοποιημένου δείγματος (aliquot) εκχυλίστηκε σε τελικό όγκο 30ml κατάλληλου διαλύτη.

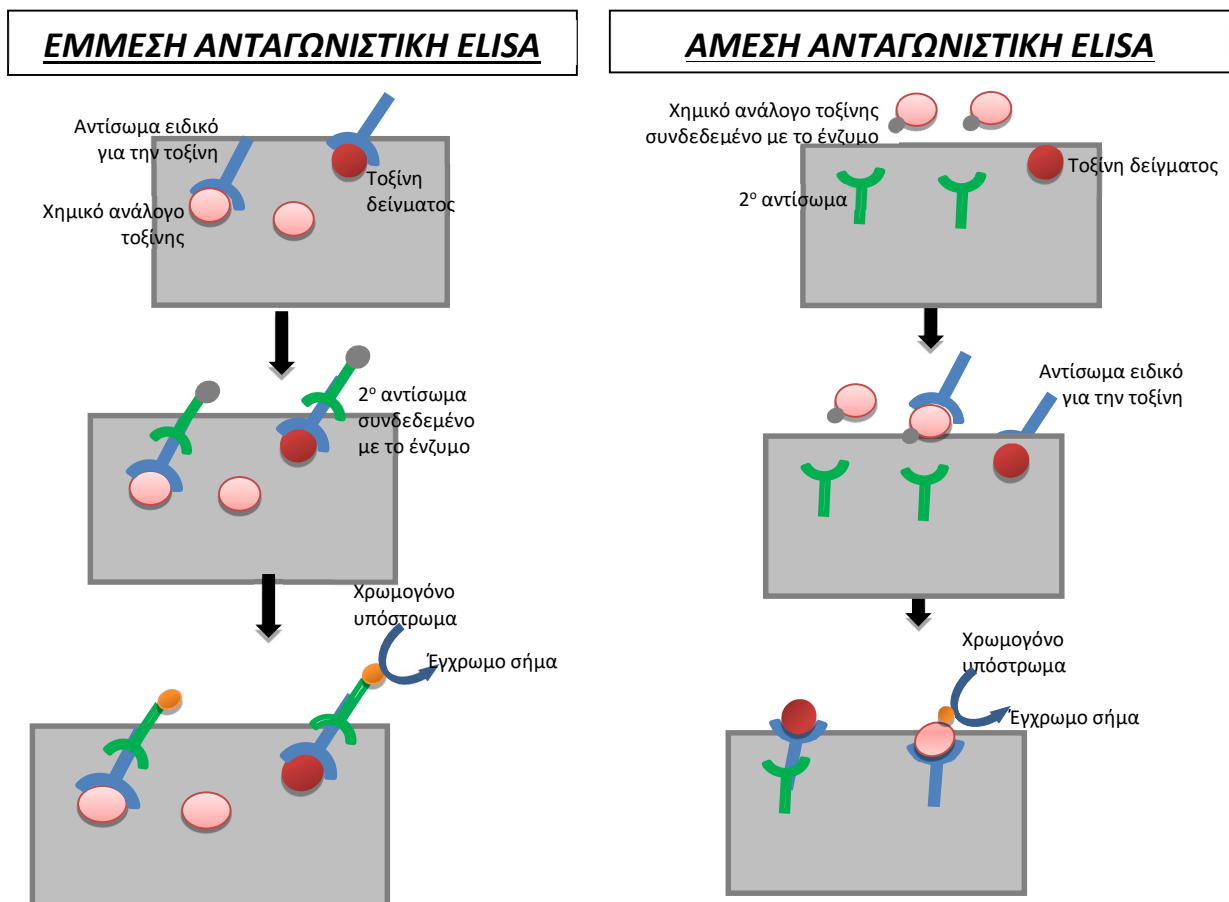
Πίνακας 2.2: Περιεκτικότητα διαλύτη (υδατικό διάλυμα μεθανόλης) εκχύλισης τοξινών από μυϊκό ιστό μυδιών και τύπος ELISA για τον ποσοτικό προσδιορισμό των προς μελέτη τοξινών.

Τοξίνη	Περιεκτικότητα διαλύτη (υδατικό διάλυμα μεθανόλης)	Τύπος ELISA
Μπρεβετοξίνη	90%	Άμεση ανταγωνιστική
Οκαδαϊκό οξύ	80%	Άμεση ανταγωνιστική
Δομοϊκό οξύ	50%	Άμεση ανταγωνιστική
Σαξιτοξίνη	80%	Άμεση ανταγωνιστική
Μικροκυστίνη	75%	Έμμεση ανταγωνιστική

2.3.2. Ενζυμοσυνδεόμενος ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός (ELISA) τοξινών

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των προς μελέτη τοξινών (μπρεβετοξίνη, οκαδαϊκό οξύ, δομοϊκό οξύ, σαξιτοξίνη και μικροκυστίνη) σε ιστούς μυδιών έγινε με την μέθοδο του ενζυμοσυνδεόμενου ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού (ELISA) χρησιμοποιώντας συσκευασίες υλικών ξεχωριστή για κάθε τοξίνη της εταιρείας Abraxis® (Brevetoxin (NSP) PN 520026, Domoic Acid (ASP) (AOAC Method 2006.02) PN 520501, Okadaic Acid (DSP) (EC 2002/225 Compliant) PN 520021, Saxitoxins, PN 52255B, Microcystins/Nodularins (ADDA), U.S. EPA Method 546, PN 520011). Οι τύποι ELISA που χρησιμοποιήθηκαν είναι: άμεση ανταγωνιστική και έμμεση ανταγωνιστική, ανάλογα την συσκευασία υλικών κάθε τοξίνης.

Η βασική αρχή της μεθόδου είναι η αναγνώριση της τοξίνης από ειδικά για αυτήν αντισώματα. Συνοπτικά, οι διαφορές μεταξύ των δύο τύπων ELISA φαίνονται στην Εικόνα 2.2.



Εικόνα 2.2: Διαγραμματική απεικόνιση της αρχής μεθόδου κάθε τύπου ELISA

Στην άμεση ανταγωνιστική ELISA η τοξίνη, όταν υπάρχει σε ένα δείγμα, ανταγωνίζεται με ένα σύμπλοκο τοξίνης-ένζυμου HRP για την πρόσδεση στο ειδικό για την τοξίνη αντίσωμα. Αυτό συμβαίνει στο διάλυμα που υπάρχει σε κάθε φρεάτιο της πλάκας μικροτιτλοδότησης. Επιπλέον, σε κάθε φρεάτιο της πλάκας υπάρχει ακινητοποιημένο το δεύτερο αντίσωμα, ειδικό για το αντίσωμα αντι-τοξίνης. Μετά από ένα στάδιο έκπλυσης και προσθήκη του διαλύματος υποστρώματος (ειδικό για το ένζυμο της υπεροξειδάσης HRP), παράγεται ένα έγχρωμο σήμα. Η ένταση του μπλε χρώματος είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης της τοξίνης που υπάρχει στο δείγμα. Η αντίδραση παραγωγής χρώματος διακόπτεται μετά από ένα καθορισμένο χρονικό διάστημα και η έντασή του αξιολογείται με ειδικό για ELISA φωτόμετρο (ELISA reader).

Στην έμμεση ανταγωνιστική ELISA η τοξίνη, όταν υπάρχει σε ένα δείγμα, και ένα ανάλογό της ακινητοποιημένο στην πλάκα ανταγωνίζονται για τις θέσεις πρόσδεσης των αντισωμάτων αντι-τοξίνης στο διάλυμα. Η πλάκα στη συνέχεια ξεπλένεται και προστίθεται δεύτερο αντίσωμα συνδεδεμένο με το ένζυμο HRP. Μετά από ένα δεύτερο στάδιο έκπλυσης και προσθήκη του διαλύματος υποστρώματος για το ένζυμο HRP, παράγεται ένα έγχρωμο προϊόν. Η ένταση του μπλε χρώματος είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης των τοξινών που υπάρχουν στο δείγμα. Η αντίδραση έγχρωμου προϊόντος διακόπτεται μετά από ένα καθορισμένο χρονικό διάστημα και η ένταση του χρώματος αξιολογείται σε ειδικό για ELISA φωτόμετρο.

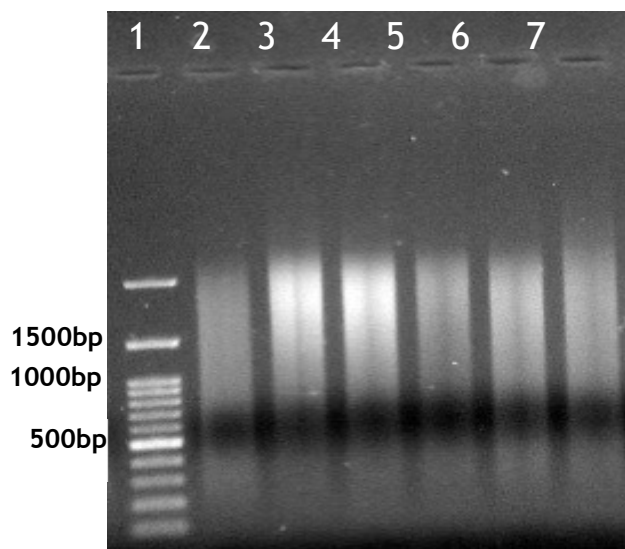
Με βάση τις τιμές της απορρόφησης των δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη, χρησιμοποιώντας προσαρμογή 4 παραμέτρων. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων προσδιορίζονται χρησιμοποιώντας την απορρόφηση κάθε δείγματος και την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης.

2.4. Μοριακός χαρακτηρισμός πρωτίστων στον Αμβρακικό Κόλπο

Η μικροβιακή ποικιλότητα στον Αμβρακικό Κόλπο μελετήθηκε με τεχνικές μοριακής βιολογίας. Για να ανιχνεύσουμε τα πρώτιστα στον Αμβρακικό Κόλπο, πραγματοποιήσαμε αρχικά εκχύλιση DNA από τις θέσεις Πρέβεζα και Αμφιλοχία, τον χειμώνα και το καλοκαίρι (σύνολο 4 δείγματα). Ακολούθησε NGS για ευκαρυωτικά, καθώς δεν υπάρχουν εξειδικευμένοι εκκινητές για πρώτιστα. Τα αποτελέσματα περιλαμβάνουν OTU για την περιοχή V4 του 18S rDNA.

2.4.1. Εκχύλιση DNA από τα δείγματα νερού

Η εκχύλιση του DNA πραγματοποιήθηκε με τη συσκευασία υλικών Power Soil DNA Isolation (MOBIO 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 2.3).



Εικόνα 2.3: Παράδειγμα ηλεκτροφόρησης DNA σε πηκτή αγαρόζης 0.7%w/v. 1. Ladder 1kb 2-7. DNA από επιφανειακό νερό από τη δειγματοληψία του καλοκαιριού στις θέσεις: Κορωνησία, Μενίδι, Αμφιλοχία, Λουτράκι, Βόνιτσα, Πρέβεζα.

Για τον ποσοτικό έλεγχο του DNA που απομονώθηκε πραγματοποιήθηκε φωτομετρική μέτρηση με NanoDrop® ND-1000. Το φασματοφωτόμετρο μετρά την απορρόφηση του δείγματος στα 260nm (A_{260}). Πριν από την μέτρηση, οι κυψελίδες του μηχανήματος καθαρίζονται και το μηχάνημα μηδενίζεται χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης. Για την 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.

2.4.2. Αλληλούχιση DNA επόμενης γενιάς (NGS)

Για αλληλούχιση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing - NGS) στείλαμε DNA από δείγματα νερού επιφάνειας, από δύο θέσεις δειγματοληψίας (Αμφιλοχία και Πρέβεζα) και από δύο εποχές (χειμώνας και καλοκαίρι).

Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς πραγματοποιήθηκε στο MR DNA Lab, Shallowater, TX, USA με πρωτόκολλο της Illumina. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης περιλαμβάνουν 16S λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (Operational Taxonomic Units (OTU)), για τα κυανοβακτήρια που ανιχνεύθηκαν στα δείγματά μας.

2.4.2.1. Επεξεργασία δεδομένων από την NGS

Οι παραγόμενες αναγνώσεις (reads) επεξεργάστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό mothur v1.34.0 [203], ακολουθώντας την τυποποιημένη διαδικασία λειτουργίας [204].

Εν συντομία, από τις αναγνώσεις αφαιρέθηκαν οι γραμμωτοί κώδικες. Στη συνέχεια αφαιρέθηκαν αναγνώσεις με μήκος κάτω από 200 bp, με ομοπολυμερή υψηλότερα από 8 bp και με διφορούμενες βάσεις. Από τις υπόλοιπες αναγνώσεις, ξεκαθαρίστηκαν οι μοναδικές αλληλουχίες και ευθυγραμμίστηκαν ανεξάρτητα έναντι της βάσης δεδομένων SILVA 128, που περιείχε 1.719.541 βακτηριακές αλληλουχίες SSU rDNA [205]. Οι χιμαιρικές αναγνώσεις απομακρύνθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό UCHIME [206]. Οι υπόλοιπες αναγνώσεις με ομοιότητα 97%, συγκεντρώθηκαν σε λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (OTU). Για να ληφθεί ένα αυστηρό σύνολο δεδομένων, τα OTU με μία μόνο ανάγνωση αφαιρέθηκαν από την ανάλυση, καθώς μπορεί να είναι εσφαλμένες αλληλουχίες [207]. Το σύνολο δεδομένων που προέκυψε εξομαλύνθηκε στο χαμηλότερο αριθμό αναγνώσεων με την εντολή υποδείγματος (subsample) στο mothur. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με δεδομένα που υπάρχουν σε ήδη γνωστές βάσεις δεδομένων. Πιο συγκεκριμένα για τα κυανοβακτήρια χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων Silva (αναζήτηση SINA) [208] και NCBI (blastn χρησιμοποιώντας τις βάσεις δεδομένων nr/nt και Bacterial and Archaea), ενώ για τα πρώτιστα χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων PR² [209] και NCBI (blastn χρησιμοποιώντας τις βάσεις δεδομένων nr/nt).

Το ποσοστό ομολογίας είναι αυτό που σχολιάζουμε τελικά για την κάθε αλληλουχία, λαμβάνοντας υπόψιν το ποσοστό κάλυψης και το e-value.

Ομολογίες μικρότερες από 97% στις αλληλουχίες 16S rDNA κυανοβακτηρίων ή 18S rDNA ευκαρυωτικών, αξιολογούνται και σχολιάζονται περαιτέρω καθώς μπορούν να κατατάξουν την αλληλουχία μας σε νέα οικογένεια, γένος, είδος. Ο

Πίνακας 2.3 παραθέτει τα ποσοστά ομολογίας και την αντίστοιχη κατάταξη.

Πίνακας 2.3: Ποσοστό ταυτότητας/ομολογίας μεταξύ δυο αλληλουχιών >97% υποδηλώνει ομοιότητα και κατάταξη στην ίδια ομάδα, όμως ποσοστό ταυτότητας/ομολογίας <97% υποδηλώνει νέο είδος, γένος κλπ. (MR DNA 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)

2.4.2.2. Ανάλυση δεδομένων από την NGS

Χρησιμοποιήσαμε το κανονικοποιημένο σύνολο (subsampling) δεδομένων για όλες τις αναλύσεις μας.

Για την εκτίμηση της ποικιλομορφίας (α-diversity), οι δείκτες Shannon, Simpson (1-D), ENS και Piellou υπολογίστηκαν με το λογισμικό PAST 2.17c [210] σε όλα τα δείγματα. Όσο μικρότερη η τιμή του δείκτη Shannon, τόσο λιγότερα OTU κυριαρχούν στο δείγμα. Ο δείκτης Simpson έχει τιμές μεταξύ 0 και 1. Όσο μεγαλύτερη η ποικιλομορφία του δείγματος, τόσο μεγαλύτερος και η τιμή του δείκτη Simpson. Ο δείκτης ENS δείχνει την πραγματική βιοποικιλότητα ενός δείγματος και είναι πιο αξιόπιστος από τον δείκτη Simpson στην σύγκριση βιοποικιλότητας μεταξύ κοινοτήτων [211]. Ο δείκτης Piellou μετρά την ομαλότητα με την οποία τα άτομα χωρίζονται στις υπάρχοντες ομάδες [210].

Ως γενικά άφθονες OTU ορίστηκαν εκείνες με σχετική αφθονία > 1%, ενώ γενικά σπάνιες OTU εκείνες με αφθονία <0,1% του συνολικού αριθμού των αναγνώσεων σε κάθε δείγμα. Καθώς αυτή η ταξινόμηση λειτουργεί σε δύο επίπεδα, οι OTU μπορούν επίσης να διακριθούν ως τοπικά σπάνιες ή τοπικά άφθονες [212].

2.5. Μοριακός χαρακτηρισμός κυανοβακτηρίων στον Αμβρακικό Κόλπο

Αρχικά από τα δείγματα απομονώθηκε DNA. Στη συνέχεια με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ενισχύθηκε τμήμα της περιοχής των γονιδίων 16S rDNA - ITS - 23S rDNA για τα κυανοβακτήρια, το οποίο κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακούς φορείς και αλληλουχήθηκε. Οι αλληλουχίες αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή φυλογενετικού δέντρου. Επιπλέον, προχωρήσαμε σε αλληλούχιση επόμενης γενιάς για πλήρη χαρακτηρισμό της βιοκοινότητας των κυανοβακτηρίων.

2.5.1. PCR για 16S rDNA-ITS-23S

Για να ανιχνεύσουμε τα κυανοβακτήρια στον Αμβρακικό κόλπο πραγματοποιήσαμε PCR έναντι ενός τμήματος του 16S rDNA-ITS-23S.

Το τμήμα ITS (Internal Transcribed Spacer) βρίσκεται μεταξύ της μικρής (16S) και της μεγάλης υπομονάδας (23S) των γονιδίων rDNA στο χρωμόσωμα. Το τμήμα 16Sr DNA-ITS-23S που ενισχύσαμε, περιλαμβάνει περιοχή του 16S ριβοσωμικού DNA, ολόκληρη την περιοχή ITS και τμήμα του γονιδίου 23S, επιτρέποντας μας καλύτερο χαρακτηρισμό των κυανοβακτηρίων.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε μια παραλλαγή της αντίδρασης PCR, η touchdown PCR.

Η touchdown PCR χρησιμοποιεί ένα κυκλικό πρόγραμμα επώασης με διάφορες θερμοκρασίες πρόσδεσης εκκινητών. Είναι μια χρήσιμη μέθοδος για την αύξηση της εξειδίκευσης της PCR. Η θερμοκρασία πρόσδεσης εκκινητών (annealing temperature) στον αρχικό κύκλο πρέπει να είναι 5-10°C πάνω από το T_m των εκκινητών. Στους επόμενους κύκλους, η θερμοκρασία αυτή μειώνεται κατά 0,5°C ανά κύκλο, μέχρις ότου επιτευχθεί θερμοκρασία που είναι ίση με, ή 2-5°C μικρότερη της T_m των εκκινητών. Η PCR Touchdown ενισχύει την εξειδίκευση του αρχικού σχηματισμού δίκλωνου εκμαγείου-εκκινητή και συνεπώς την εξειδίκευση του τελικού προϊόντος PCR.

Για την ενίσχυση του τμήματος 16S-ITS-23S rDNA χρησιμοποιήσαμε τους παρακάτω εκκινητές:

GC - CSIF	5' -CGCCCCGCCGCGCCCCGCGCCCCGGCCCCGCCGCCCCCGCCCCG- -(T/C)CACGCCCGAAGTC(G/A)TTAC - 3'
ULR	5' -CCTCTGTGTGCCTAGGTATC - 3'

Η περιοχή που ενισχύσαμε με τους συγκεκριμένους εκκινητές δεν έχει σταθερό μέγεθος σε όλα τα είδη των βακτηρίων. Έτσι, το αναμενόμενο

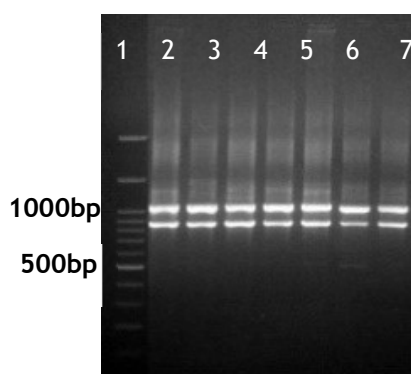
μέγεθος των προϊόντων είναι περίπου 500 - 1500bp. Χρησιμοποιήθηκε ο θερμοκυκλοποιητής Biorad iCycler.

Η PCR εφαρμόστηκε με τις εξής εναλλαγές θερμοκρασίας :

Αρχικά		95°C για 1min
Για 20 κύκλους:	Αποδιάταξη δίκλωνου DNA	95°C για 1min
	Πρόσδεση εκκινητών	62°C για 1min
	Επιμήκυνση DNA	72°C για 1min
	Σε κάθε κύκλο η θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών μειώνεται κατά 0,5°C	
Για 15 κύκλους:	Αποδιάταξη δίκλωνου DNA	95°C για 1min
	Πρόσδεση εκκινητών	52°C για 1min
	Επιμήκυνση DNA	72°C για 1min
Για 1 κύκλο:	Τελική επιμήκυνση DNA	75°C για 30min
Ψύξη		4°C

Η DNA πολυμεράση και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήσαμε είναι της εταιρείας KAPA Biosystems (KAPA Taq PCR Kit). Η συγκεκριμένη πολυμεράση προσθέτει στα προϊόντα της PCR μια ουρά από αδενίνες. Τα προϊόντα PCR που περιέχουν ουρά από αδενίνες μπορούν να κλωνοποιηθούν σε TA πλασμίδια.

Τα προϊόντα της PCR ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε 1% w/v πήγμα αγαρόζης (Εικόνα 2.4).



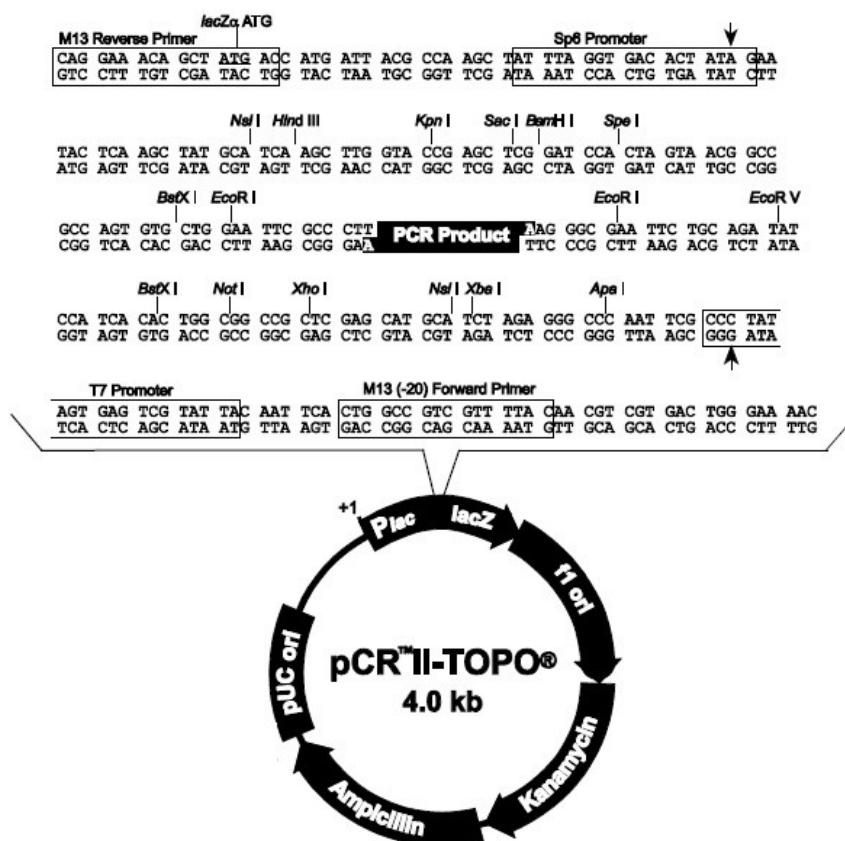
Εικόνα 2.4: Παράδειγμα ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR για 16S-ITS-23S κυανοβακτηρίων σε 1%w/v πήγμα αγαρόζης. 1. Ladder 1kb 2-8. DNA από επιφανειακό νερό από τη δειγματοληψία του καλοκαιριού στις θέσεις: Κορωνησία, Μενίδι, Αμφιλοχία, Λουτράκι, Βόνιτσα, Πρέβεζα.

Τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν από εκκινητές και ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης χρησιμοποιώντας την συσκευασία υλικών NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, Macherey - Nagel.

2.5.2. Κλωνοποίηση επιθυμητών τμημάτων DNA σε πλασμίδια

Για την αλληλούχηση των προϊόντων PCR, αυτά κλωνοποιήθηκαν σε 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. 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 αμικικιλίνη και καναμυκίνη. Ο χάρτης του πλασμιδίου pCRII-TOPO® που χρησιμοποιήσαμε φαίνεται στην Εικόνα 2.5.

Το πρωτόκολλο κλωνοποίησης που ακολουθήσαμε είναι το TOPO TA (TOPO TA Cloning kit, Invotrogen). Χωρίζεται σε διάφορα στάδια σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Επιπλέον χρησιμοποιήσαμε αντιβιοτικό καναμυκίνη και χρωμοφόρο παράγοντα X-Gal ως δείκτες επιλογής των μετασχηματισμένων με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο βακτηρίων.



Εικόνα 2.5 : Χάρτης του πλασμιδίου pCRII-TOPO που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση

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 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 ένθεμα 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 ένθεμα. 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 2.6).



Εικόνα 2.6 : 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.

2.5.3. Γονιδιακή Βιβλιοθήκη για 16S rDNA-ITS-23S κυανοβακτηρίων

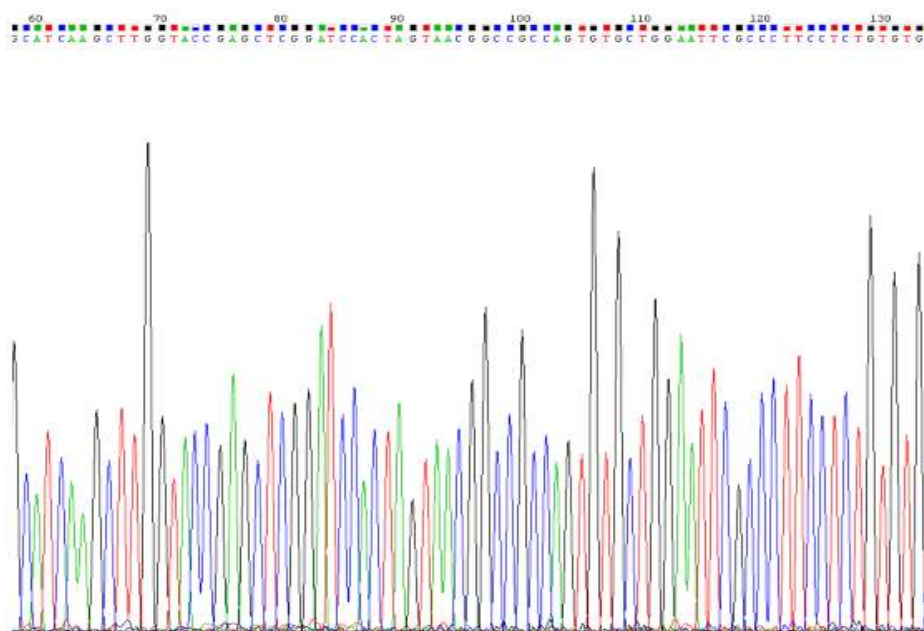
Η δημιουργία βιβλιοθήκης πραγματοποιήθηκε με σκοπό να χαρακτηρίσουμε και να μελετήσουμε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο ποσοστό της ποικιλότητας των κυανοβακτηρίων στη θέση δειγματοληψίας Πρέβεζα για το καλοκαίρι.

Επιλέξαμε τυχαία 150 μετασχηματισμένες αποικίες για περαιτέρω ανάλυση. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πέψη των πλασμιδίων για αποκοπή των ενθεμάτων με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (HT Biotechnology Ltd, Cambridge, United Kingdom). Στα ενθέματα των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων έγινε επιπλέον πέψη με το περιοριστικό ένζυμο HindIII για να ανιχνεύσουμε διαφορετικά πολυμορφικά πρότυπα (Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLPs)). Οι κλώνοι που

παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα, στάλθηκαν για αλληλούχιση (Eurofins Genomics, VBCBiotech, Austria) [212, 213].

2.5.4. Αλληλούχιση κλώνων και ταυτοποίηση κυανοβακτηρίων

Τα δείγματά μας (πλασμιδιακό DNA με ένθεμα) στάλθηκαν για αλληλούχιση Sanger σε μικροπλάκες (plate sequencing) στην εταιρία Eurofins Genomics/VBC Biotech Αυστρίας. Τα δείγματά μας είχαν μέγεθος 800-1000 ζεύγη βάσεων. Τα αποτελέσματα ποιότητας για κάθε βάση που αλληλουχήθηκε παρουσιάζονται σε διάγραμμα (Εικόνα 2.7). Μετατρέψαμε την αλληλουχία σε μορφή FASTA, βρήκαμε την αλληλουχία μεταξύ των εκκινήτων και την αποκόψαμε ώστε να την χρησιμοποιήσουμε για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για όλες τις αλληλουχίες κυανοβακτηρίων που μελετήσαμε. Επίσης, οι αλληλουχίες ελέγχθηκαν για πιθανές χίμαιρες με το πρόγραμμα Bellerophone [214]. Οι αλληλουχίες που χαρακτηρίστηκαν ως χίμαιρες δεν χρησιμοποιήθηκαν στην περαιτέρω ανάλυση.



Εικόνα 2.7 : Παράδειγμα διαγράμματος μετά από αλληλούχιση δείγματος

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

Επόμενο βήμα ήταν η σύγκρισή τους με άλλες αλληλουχίες που έχουν ήδη χαρακτηρισθεί και η εύρεση ομοιοτήτων και διαφορών. Αυτό το βήμα είναι

απαραίτητο για να καταφέρουμε να κατατάξουμε τις αλληλουχίες μας στην ομάδα των κυανοβακτηρίων. 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 [215], το οποίο αναζητά περιοχές με ομοιότητες μεταξύ αλληλουχιών. Το πρόγραμμα συγκρίνει 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. Από τα προγράμματα του εργαλείου BLAST, χρησιμοποιήσαμε το nucleotide blast (blastn) για τη σύγκριση των αλληλουχιών μας (nucleotide query) με ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες σε βάσεις δεδομένων

Από το αποτέλεσμα της σύγκρισης λαμβάνουμε διάφορες πληροφορίες. Βλέπουμε το ποσοστό ταυτότητας/ομολογίας (identity) της υπό μελέτη αλληλουχίας με τις ήδη γνωστές, 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.).

2.5.6. 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 MEGA 7.0 με τη μέθοδο Neighbor-Joining και τον αλγόριθμο υπολογισμού αποστάσεων Jukes-Cantor [216].

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 τις φυλογενετικές ομάδες (clusters).

2.6. Εμπλουτισμένη καλλιέργεια επιφανειακού νερού

2.6.1. Ανάπτυξη και απομόνωση κυανοβακτηρίων από δείγματα νερού του Αμβρακικού κόλπου

Για την ανάπτυξη κυανοβακτηρίων σε συνθήκες εργαστηρίου χρησιμοποιήσαμε ένα γενικό θρεπτικό μέσο, το BG11 (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich).

Για την παρασκευή υγρού θρεπτικού υλικού BG11 (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich), τοποθετήσαμε σε φιάλη 495ml θαλασσινό νερό από την θέση δειγματοληψίας 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.

Αναπτύξαμε υγρές καλλιέργειες (5 για κάθε δείγμα) από τις θέσεις δειγματοληψίας: Αμφιλοχία και Πρέβεζα, για τις δειγματοληψίες του καλοκαιριού και του χειμώνα. Φιλτράραμε 200ml επιφανειακό νερό για κάθε δείγμα χωριστά και στη συνέχεια το φίλτρο εμβαπτίστηκε σε 100 ml υγρό θρεπτικό υλικό BG11. Οι καλλιέργειες κυανοβακτηρίων αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 26°C, 12 ώρες φως/12 ώρες σκοτάδι.

Όταν οι καλλιέργειες έφταναν σε εκθετική φάση, 10ml από την καλλιέργεια μεταφέρθηκαν σε 90ml νέο θρεπτικό υλικό για την δημιουργία νέας καλλιέργειας. Τα υπόλοιπα 90ml της καλλιέργειας μοιράστηκαν σε 2 δείγματα και μετά από φυγοκέντρηση, το ίζημα αποθηκεύτηκε στους -20°C.

2.6.2. Έλεγχος παραγωγής μικροκυστίνης στις καλλιέργειες

Οι καλλιέργειες επωάζονται για 24 ώρες στο σκοτάδι. Την επόμενη ημέρα, η καλλιέργεια μοιράστηκαν σε 2 μέρη των 20ml και φυγοκεντρήθηκαν. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε για ποσοτικό προσδιορισμό μικροκυστινών με ELISA, σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφηκε νωρίτερα. Το ένα ίζημα αποθηκεύθηκε στους -20°C και το άλλο για απομόνωση DNA.

2.6.3. Μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας στην καλλιέργεια A10

Από το σύνολο των καλλιεργειών, η καλλιέργεια A10 (Αμφιλοχία, Καλοκαίρι) βρέθηκε να παράγει μικροκυστίνη. Έτσι, προχωρήσαμε σε μοριακό χαρακτηρισμό των κυανοβακτηρίων που υπάρχουν σε αυτή με NGS για την

περιοχή 16S και ανίχνευση των γονιδίων που παράγουν μικροκυστίνη *msyA-NMT* και *msyA-cd* με PCR, κλωνοποίηση και αλληλούχιση.

Η εκχύλιση DNA από την καλλιέργεια A10 πραγματοποιήθηκε όπως και στα δείγματα από τον Αμβρακικό, χρησιμοποιώντας τη συσκευή υλικών Power Soil DNA Isolation (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA 92010). Ο έλεγχος της εκχύλισης DNA έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαροζης.

Για την NGS χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές: *cyano106F* και *519R*. Η επεξεργασία των δεδομένων της NGS για την A10 έγινε όπως περιεγράφηκε ωρύτερα (§2.4.2) εκτός από το στάδιο της κανονικοποίησης.

2.6.4. PCR για γονίδια του οπερονίου της μικροκυστίνης

Στο *Microcystis aeruginosa*, η συστοιχία των γονιδίων που χρησιμοποιούνται στη βιοσύνθεση της μικροκυστίνης (*msyS*) έχει μήκος 55 kb και περιλαμβάνει 10 γονίδια οργανωμένα σε δύο οπερόνια (*msyA-C* και *msyD-J*). Το γονίδιο *msyA* περιέχει δύο περιοχές αδενυλίωσης και θειολίωσης, μια συμπύκνωσης (*msyA-cd*), μία N-μεθυλοτρανσφεράση (*msyA-NMT*) και μία περιοχή επιμερισμού. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε εμείς στοχεύουν στην περιοχή της N-μεθυλοτρανσφεράσης και στην περιοχή της συμπύκνωσης [217].

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθοι:

Για την περιοχή *msyA-NMT* : **MSF**:5' - ATCCAGCAGTTGAGCAAGC - 3'
MSR: 5' - TGCAGATAACTCCGCAGTTG - 3'

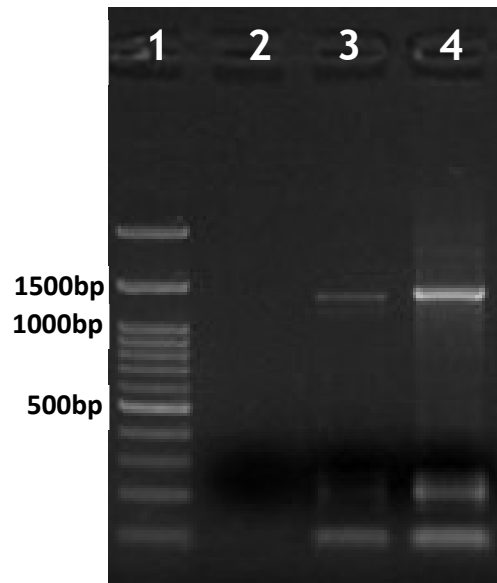
Το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων είναι 1300bp [218].

Για την περιοχή *msyA-cd*: **1F**: 5'-AAAATTTAAAAGCCGTATCAA - 3'
1R: 5'-AAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT-3'

Το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων είναι 297bp [218].

Η PCR εφαρμόστηκε με τις ακόλουθες εναλλαγές θερμοκρασίας:

		<i>msyA - NMT</i>	<i>msyA - cd</i>
Αρχικά		95°C για 3min	95°C για 3min
Για 35 κύκλους:	Αποδιάταξη δίκλωνου DNA	95°C για 1min	95°C για 1min
	Πρόσδεση εκκινητών	50°C για 1min	52°C για 1min
	Επιμήκυνση DNA	72°C για 1min	72°C για 1min
Για 1 κύκλο:	Τελική επιμήκυνση DNA	75°C για 10min	75°C για 10min
Ψύξη		4°C	4°C



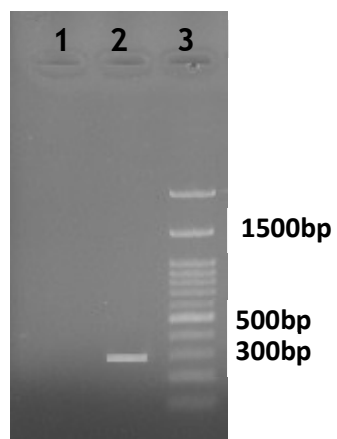
Εικόνα 2.8: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για την περιοχή *msyA-NMT*.

Θέση 1: ladder

Θέση 2: καλλιέργεια A1

Θέση 3: καλλιέργεια A10

Θέση 4: θετικό κοντρόλ (DNA από Παμβώτιδα).

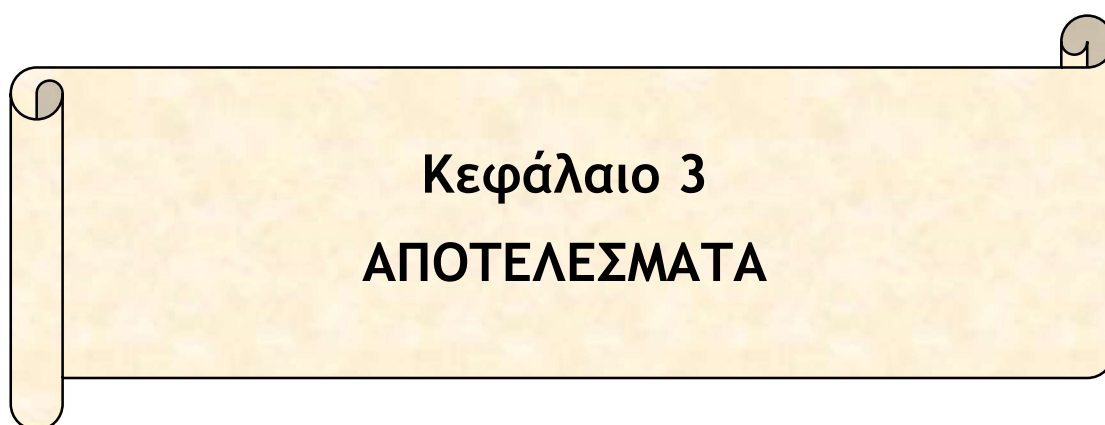


Εικόνα 2.9: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για την περιοχή *msyA-cd*.

Θέση 1: καλλιέργεια A10,

Θέση 2: θετικό control (DNA από Παμβώτιδα),

Θέση 3: ladder



Κεφάλαιο 3
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Δειγματοληψία

Η επιλογή των θέσεων δειγματοληψίας ήταν τέτοια ώστε να καλύπτονται διαφόρων τύπων οικοσυστήματα, όπως: κοντά σε εκβολές ποταμών (Κορωνησία και Πρέβεζα), κοντά σε κατοικημένες περιοχές (Μενίδι, Αμφιλοχία, Βόνιτσα), κοντά σε μονάδες εκτροφής μυδιών (Πρέβεζα), απομονωμένες από οικισμό περιοχές (Λουτράκι). Επιπλέον οι θέσεις δειγματοληψίας φροντίσαμε να είναι τέτοιες ώστε να βρίσκονται περιμετρικά του Αμβρακικού κόλπου, να έχουν σχετικά εύκολη πρόσβαση και να υπάρχουν και μύδια προς συλλογή καθ' όλη την διάρκεια του έτους.

3.2. Φυσικοχημικές μετρήσεις δειγμάτων νερού

Πραγματοποιήσαμε φυσικοχημικές μετρήσεις σε δείγματα νερού επιφάνειας από όλες τις θέσεις δειγματοληψίας, κατά τις τέσσερις εποχές του έτους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε..**

Σύμφωνα με τις μετρήσεις των φυσικοχημικών παραμέτρων του νερού, παρατηρούμε ότι η θερμοκρασία και το pH δεν παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ των σταθμών δειγματοληψίας. Κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης, η μέση θερμοκρασία του νερού σε όλες τις εποχές κυμάνθηκε μεταξύ 14,5°C κατά τη διάρκεια του χειμώνα (ελάχιστη 10°C στη θέση «Κορωνησία») και 26,8°C κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού (μέγιστη 28°C στη θέση «Λουτράκι»). Η αλατότητα κυμαίνεται μεταξύ 30‰ και 34‰ καθ' όλη την διάρκεια του χρόνου, ενώ το pH είναι σχεδόν σταθερό όλο τον χρόνο στη τιμή 8.2 ± 0.2 .

Το αμμώνιο (NH_4^+) παρατηρείται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις την άνοιξη. Οι συγκεντρώσεις των νιτρωδών (NO_2^-) και νιτρικών (NO_3^-) δεν εμφανίζουν διαφορές μεταξύ των σταθμών και των εποχών.

Στην περίπτωση του ολικού φωσφόρου μέγιστες τιμές παρατηρούνται το καλοκαίρι (11,46mg/l).

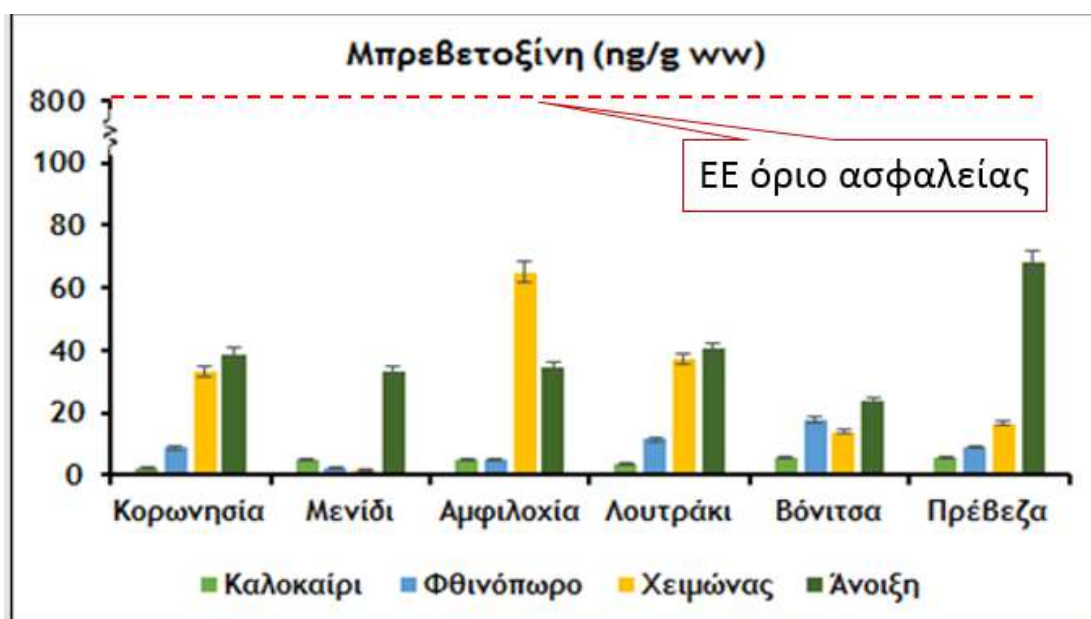
3.3. Ποσοτικός προσδιορισμός θαλάσσιων βιοτοξινών σε δίθυρα

Ο προσδιορισμός των θαλάσσιων βιοτοξινών στον μυϊκό ιστό των μυδιών έγινε με την μέθοδο της ELISA. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα (§2.3) η επεξεργασία των δίθυρων για την εκκύλιση των τοξινών έγινε σύμφωνα με την ευρωπαϊκή οδηγία [202], με μικρές διαφοροποιήσεις [213]. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ng τοξίνης ανά γραμμάριο μυϊκού ιστού (ng/g wet weight). Έτσι, για τις μπρεβετοξίνες τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα της ΒΤΧ-1, για το οκαδαϊκό οξύ ως ισοδύναμα του ΟΑ-1, για τις

σαξιτοξίνες ως γενικό σύνολο σαξιτοξινών και για τις μικροκυστίνες ως ισοδύναμα της MC-LR. Σε όλες τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν, τα αποτελέσματα δείχνουν ικανοποιητική γραμμικότητα με την συγκέντρωση των πρότυπων διαλυμάτων ($R^2 > 0.9998$). Για μέτρηση δείγματος 50ml το όριο ανίχνευσης ήταν 0.025, 0.2, 0.00056, 0.015, 0.1ng/ml για τις μπρεβετοξίνες, το οκαδαϊκό οξύ, το δομοϊκό οξύ, τις σαξιτοξίνες και τις μικροκυστίνες, αντίστοιχα.

Στον Πίνακα 8.2 φαίνεται η εποχιακή διακύμανση της συγκέντρωσης κάθε τοξίνης ανά περιοχή.

Οι συγκεντρώσεις των μπρεβετοξινών κυμαίνονται μεταξύ 1.65 και 68.25 ng/g ww. Πιο συγκεκριμένα, είναι υψηλότερη το χειμώνα (μ.ο. 50.34ng/g) και χαμηλότερη το καλοκαίρι (μ.ο. 7.90ng/g).

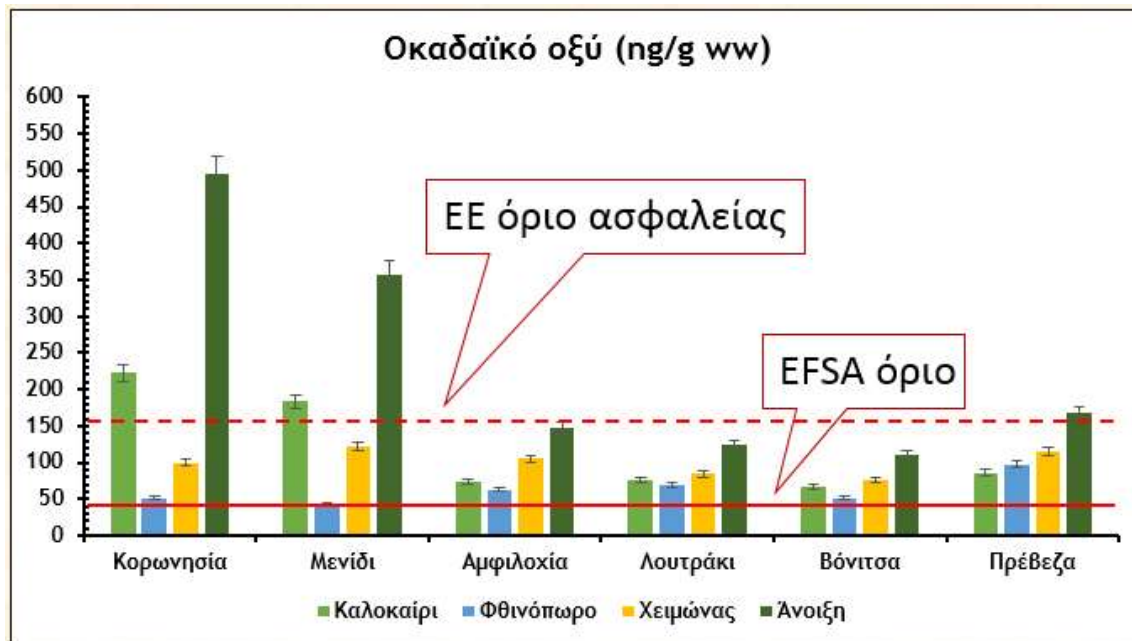


Εικόνα 3.1: Διαγραμματική απεικόνιση συγκέντρωσης μπρεβετοξίνης στην περιοχή μελέτης. Κάθε στήλη απεικονίζει τον μέσο όρο των μετρήσεων (10 για κάθε δείγμα, §2.3.2). Η γραμμή σφάλματος αντιστοιχεί στην τυπική απόκλιση. Με διακεκομμένη γραμμή φαίνεται το όριο «ασφαλείας» που έχει θεσπιστεί από τον FDA.

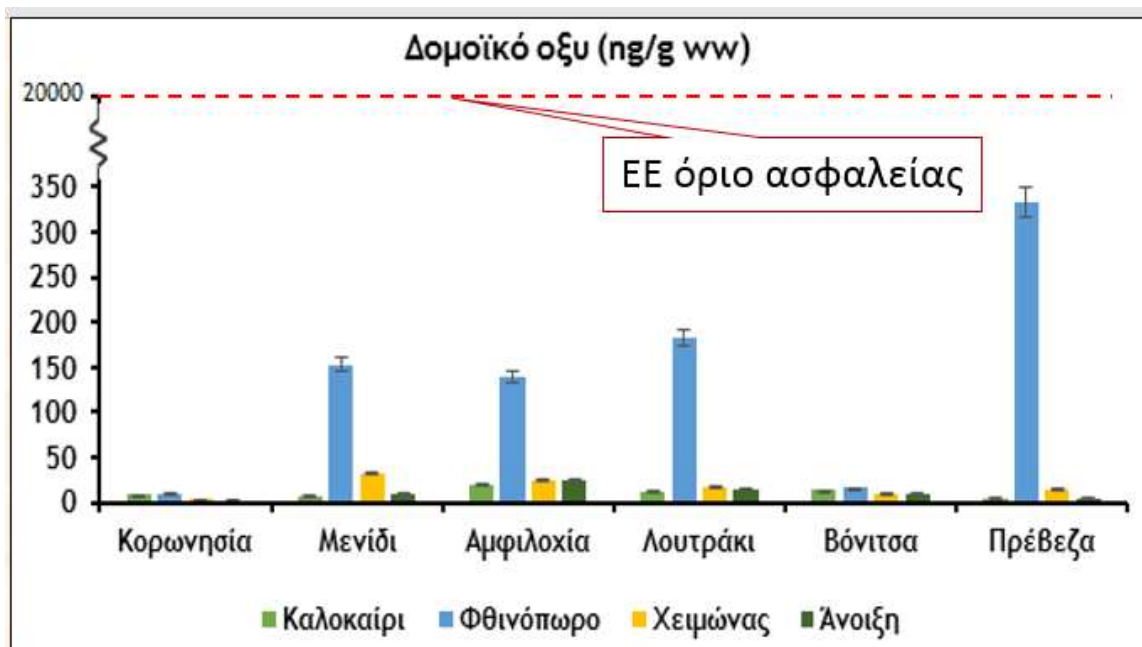
Η μεγαλύτερη συγκέντρωση οκαδαϊκού οξέος που καταγράφηκε ήταν την άνοιξη στη θέση «Κορωνησία» (494.1ng/g) και η μικρότερη 19,6ng/g το φθινόπωρο, στη θέση «Λουτράκι». Φαίνεται ότι υπάρχει μια εποχική διακύμανση: ελάχιστη συγκέντρωση εμφανίζεται το φθινόπωρο ενώ η μέγιστη την άνοιξη. Οι τιμές του καλοκαιριού και του χειμώνα είναι ενδιάμεσες.

Παρατηρώντας την συγκέντρωση του δομοϊκού οξέος κατά την διάρκεια του έτους, καταλήγουμε στο συμπέρασμα το φθινόπωρο, σε σχέση με τις άλλες εποχές, εμφανίζονται υψηλότερες συγκεντρώσεις δομοϊκού οξέος. στις υπόλοιπες εποχές η συγκέντρωση του δομοϊκού οξέος είναι μετρήσιμη σε όλες τις περιοχές.

Σε όλα τα δείγματα, η σαξιτοξίνη είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (0,45ng/g ww).



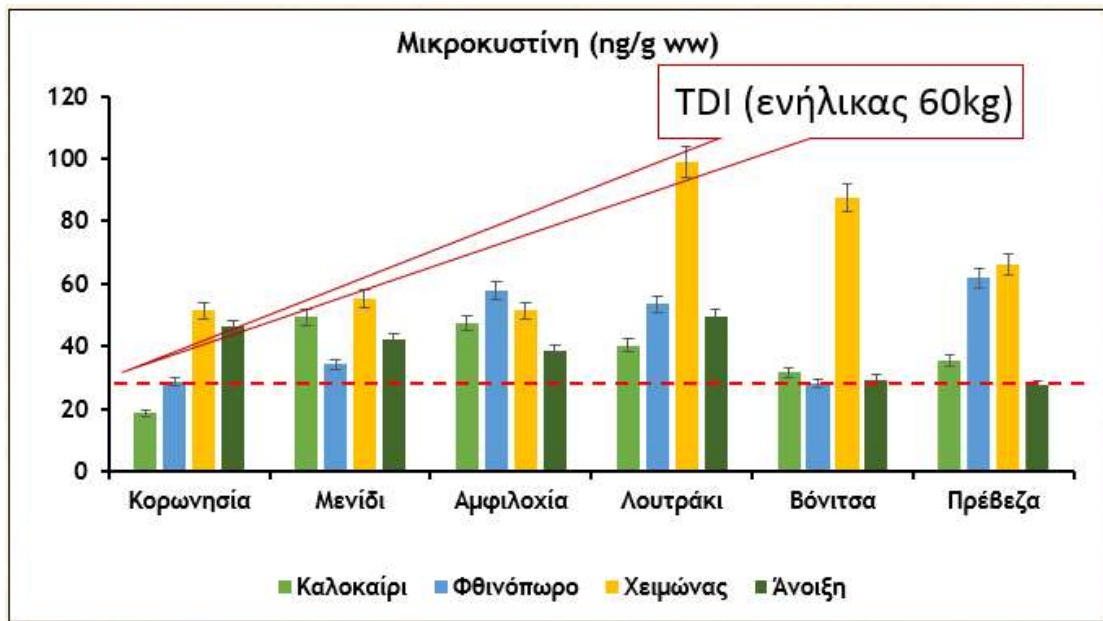
Εικόνα 3.2: Διαγραμματική απεικόνιση συγκέντρωσης οκαδαϊκού οξέος στην περιοχή μελέτης. Κάθε στήλη απεικονίζει τον μέσο όρο των μετρήσεων (10 για κάθε δείγμα, §2.3.2). Η γραμμή σφάλματος αντιστοιχεί στην τυπική απόκλιση. Με διακεκομμένη γραμμή φαίνεται το όριο «ασφαλείας» που έχει θεσπιστεί την Ευρωπαϊκή Ένωση.



Εικόνα 3.3: Διαγραμματική απεικόνιση συγκέντρωσης δομοϊκού οξέος στην περιοχή μελέτης. Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με ELISA. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ng τοξίνης/g μυϊκού ιστού μυδιού. Κάθε στήλη απεικονίζει τον μέσο όρο των μετρήσεων (10 για κάθε δείγμα, §2.3.2). Η γραμμή σφάλματος αντιστοιχεί στην

τυπική απόκλιση. Με διακεκομμένη γραμμή φαίνεται το όριο «ασφαλείας» που έχει θεσπιστεί την Ευρωπαϊκή Ένωση.

Η μέγιστη συγκέντρωση μικροκυστίνης ήταν 117.5ng/g στην θέση «Βόνιτσα» τον χειμώνα και η ελάχιστη 18.6ng/g στη θέση «Κορωνησία» το καλοκαίρι. Η συγκεκριμένη τοξίνη εντοπίζεται στους ιστούς των μυδιών σε όλη τη διάρκεια του έτους και σε όλες τις θέσεις δειγματοληψίας. Αν και γενικά η συγκέντρωσή της είναι υψηλή σε όλα τα δείγματα, με επιφύλαξη θα μπορούσαμε να πούμε ότι εμφανίζει ένα μέγιστο τον χειμώνα και ένα ελάχιστο την άνοιξη.



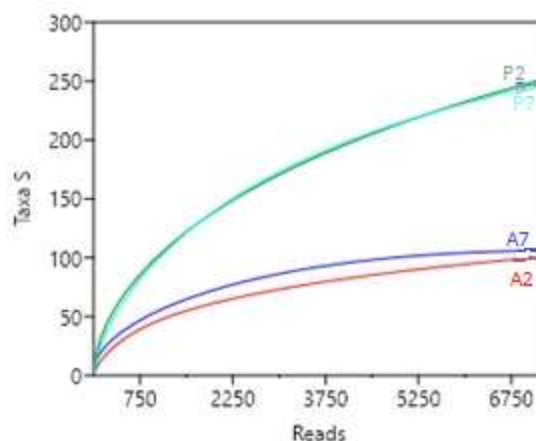
Εικόνα 3.4: Διαγραμματική απεικόνιση συγκέντρωσης μικροκυστίνης στην περιοχή μελέτης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ng τοξίνης/ g μυϊκού ιστού μυδιού. Κάθε στήλη απεικονίζει τον μέσο όρο των μετρήσεων (10 για κάθε δείγμα, §2.3.2). Η γραμμή σφάλματος αντιστοιχεί στην τυπική απόκλιση. Με διακεκομμένη γραμμή φαίνεται το όριο που αντιστοιχεί στην T.D.I. για έναν ενήλικα 60Kg.

3.4. Μοριακός χαρακτηρισμός των πρωτίστων

Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS) έγινε για την V4 περιοχή του 18S rDNA γονιδίου. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για ευκαρυωτικά, καθώς δεν υπάρχουν εξειδικευμένοι για τα πρώτιστα.

Τα αποτελέσματα από την NGS επεξεργάστηκαν όπως αναφέρθηκε προηγούμενα (§2.4.2). Μετά την κανονικοποίηση των δειγμάτων στις 7299 αναγνώσεις ανά δείγμα, προέκυψαν 485 OTU με μέγεθος περίπου 400bp. Από αυτές σε πρώτιστα ανήκουν οι 390 OTU (76 OTU σε άλλα ευκαρυωτικά και 20 OTU είναι unclassified ευκαρυωτικά).

Οι καμπύλες εξομάλυνσης (Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.) για όλα τα δείγματα, προσέγγιζαν ένα πλατώ, όταν εφαρμόστηκε αποκοπή ομοιοτήτων σε επίπεδο $\geq 97\%$, υποδεικνύοντας ότι η ποικιλία των δειγμάτων ανακτήθηκε με την εφαρμοζόμενη προσπάθεια προσδιορισμού των αλληλουχιών.



Εικόνα 3.5: Καμπύλες εξομάλυνσης για τις αναγνώσεις των πρωτίστων

Στο σύνολο των OTU των πρωτίστων από τα γνωστά δυνητικά τοξικά γένη υπάρχουν τα *Alexandrium* και *Gymnodinium* - υπεύθυνα για την παραγωγή τοξινών παραλυτικής δηλητηρίασης - και *Prorocentrum* και *Dinophysis* - υπεύθυνα για την παραγωγή τοξινών διαρροϊκής δηλητηρίασης (Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.).

Οι δείκτες ποικιλότητας Shannon, Simpson (1-D) και Piellou είναι χαμηλότεροι τον χειμώνα σε σχέση με το καλοκαίρι. Το ίδιο ισχύει και για τον δείκτη βιοποικιλότητας ENS. Αντίστοιχη διαφορά παρατηρείται και μεταξύ των θέσεων δειγματοληψίας, με την Πρέβεζα να έχει υψηλότερους δείκτες. Μάλιστα, η διαφορά μεταξύ των θέσεων δειγματοληψίας είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με την διαφορά μεταξύ των εποχών (Σφάλμα! Το αρχείο

προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.).

Πίνακας 3.1: Δυνητικά τοξικά γένη πρωτίστων που υπάρχουν στα OTU των δειγμάτων μας που προέκυψαν από την NGS. Ο αριθμός δείχνει το πλήθος των αναγνώσεων κάθε μιας OTU, σε κάθε δείγμα.

OTU	Είδος	Αμφιλοχία Χειμώνας	Αμφιλοχία Καλοκαίρι	Πρέβεζα Χειμώνας	Πρέβεζα Καλοκαίρι
Otu004	<i>Prorocentrum unclassified</i>	137	220	185	586
Otu016	<i>Alexandrium unclassified</i>	263	6	4	3
Otu053	<i>Alexandrium andersonii</i>	3	7	12	2
Otu069	<i>Alexandrium unclassified</i>	0	2	7	0
Otu075	<i>Alexandrium fraterculus</i>	0	0	9	0
Otu235	<i>Alexandrium insuetum</i>	0	0	0	2
Otu158	<i>Gymnodinium_impudicum</i>	0	0	0	7
Otu441	<i>Dinophysis unclassified</i>	0	0	2	0

Πίνακας 3.2 : Δείκτης Simpson, Shannon, ENS και Piellou ανά εποχή και θέση δειγματοληψίας

Δείκτης	Χειμώνας	Καλοκαίρι	Αμφιλοχία	Πρέβεζα
Simpson (1-D)	0,6965±0,001	0,7949±0,0012	0,6417±0,001	0,8341±0,0008
Shannon (H)	2,322±0,0012	2,641±0,0024	1,918±0,009	2,967±0,014
ENS	10,196±0,015	14,0273±0,003	6,8074±0,003	19,4335±0,003
Piellou	0,4071±0,0003	0,4639±0,0012	0,3713±0,003	0,4938±0,002

Πίνακας 3.3: Πλήθος των OTU των πρωτίστων

Είδος των OTU	Πλήθος	Είδος των OTU	Πλήθος
OTU πρωτίστων	390	OTU κοινά σε όλα τα δείγματα (universal OTU)	23
OTU χειμώνα	244	OTU μόνο χειμώνα	155
OTU καλοκαίρι	235	OTU μόνο καλοκαίρι	146
OTU Αμφιλοχία	139	OTU μόνο Αμφιλοχία	59
OTU Πρέβεζα	331	OTU μόνο Πρέβεζα	251
OTU Αμφιλοχία - χειμώνα	84	OTU μόνο Αμφιλοχία - χειμώνα	31

OTU Αμφιλοχία - καλοκαίρι	81	OTU μόνο Αμφιλοχία - Καλοκαίρι	27
OTU Πρέβεζα - χειμώνα	204	OTU μόνο Πρέβεζα - χειμώνα	113
OTU Πρέβεζα - καλοκαίρι	199	OTU μόνο Πρέβεζα - καλοκαίρι	105

Πίνακας 3.4: Πλήθος γενικά άφθονων και σπάνιων OTU στα δείγματα

	Γενικά άφθονα OTU (>1%)	Γενικά σπάνια OTU (<0,1%)
Συνολικά	11	341
Χειμώνα	7	201
Καλοκαίρι	13	199
Αμφιλοχία	10	105
Πρέβεζα	10	286
Αμφιλοχία - Χειμώνας	3	56
Αμφιλοχία - Καλοκαίρι	12	56
Πρέβεζα - Χειμώνας	11	159
Πρέβεζα - Καλοκαίρι	9	163

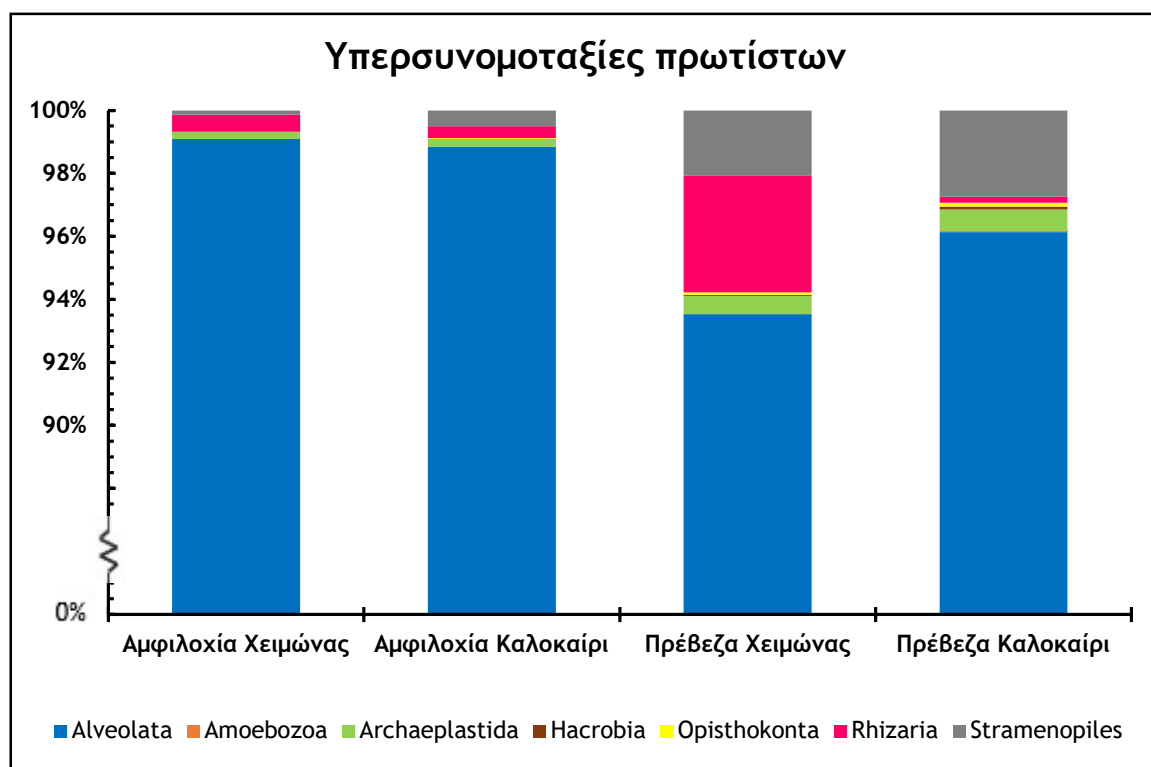
Το πλήθος των OTU σε κάθε εποχή είναι σχεδόν ίδιο, όμως τα OTU στην Πρέβεζα είναι σχεδόν διπλάσια από αυτά που εμφανίζονται στην Αμφιλοχία. Τα αποτελέσματα για το πλήθος των OTU παρουσιάζονται στον **Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε..** Μόνο 23 OTU είναι παρόντα σε όλα τα δείγματα (**Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.**) και εμφανίζονται με διαφορετική συχνότητα σε κάθε δείγμα (**Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.**)

Από αυτά μόνο 11 είναι συνολικά άφθονα (>1% αναγνώσεις στο σύνολο των αναγνώσεων των δειγμάτων) (**Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.**)

Συνολικά, τα OTU που ταυτοποιήθηκαν ανήκουν σε 7 υπερσυνομοταξίες: *Alveolata*, *Amoebozoa*, *Archaeplastida*, *Hacrobia*, *Opisthokonta*, *Rhizaria* και *Stramenopiles* (**Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.**)

Τα *Dinoflagellata* είναι η πολυπληθέστερη συνομοταξία με 272 OTU.

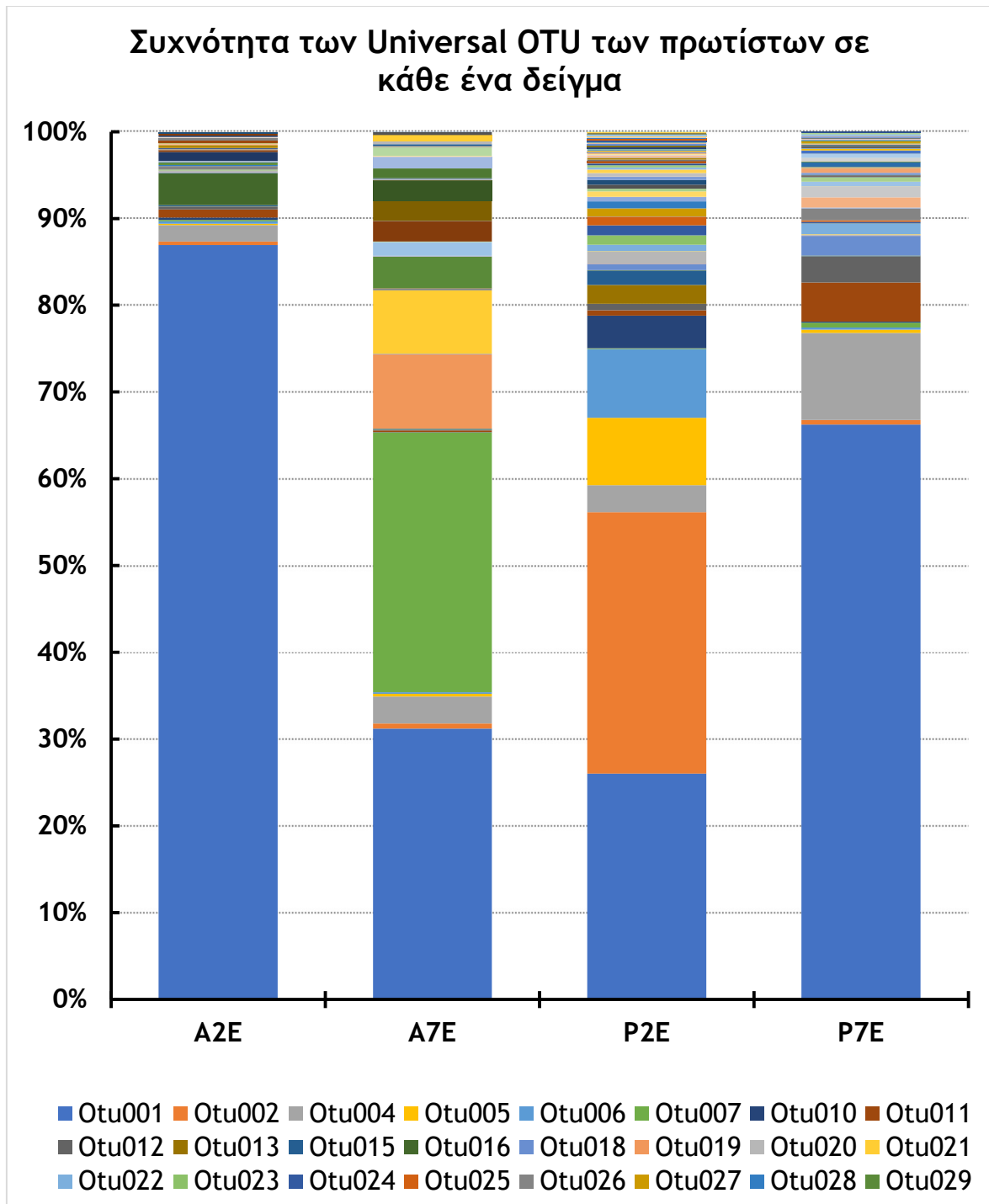
Για τις OTU που προέκυψαν μετά την ανάλυση των δεδομένων από την NGS έγινε φυλογενετικός χαρακτηρισμός χρησιμοποιώντας την βάση δεδομένων PR2, ειδική για αλληλουχίες πρωτίστων. Επιπλέον για τις 23 OTU που υπάρχουν σε όλα τα δείγματα έγινε φυλογενετικός χαρακτηρισμός χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο BLASTN της βάσης δεδομένων NCBI (Πίνακας 8.7).



Εικόνα 3.6: Σχετική συχνότητα των πρωτίστων στο επίπεδο της υπερσυνομοταξίας.

Πίνακας 3.5: Αναγνώσεις ανά δείγμα σε επίπεδο συνομοταξίας

Υπερσυνομοταξία	Συνομοταξία	Αμφιλοξία Χειμώνας	Αμφιλοξία Καλοκαίρι	Πρέβεζα Χειμώνας	Πρέβεζα Καλοκαίρι
Alveolata	Apicomplexa	0	2	2	5
	Ciliophora	2	29	34	10
	Dinoflagellata	7159	7065	5759	5875
Amoebozoa	Amoebozoa unclassified	0	0	0	1
	Lobosa	0	0	0	1
Archaeplastida	Rhodophyta	0	5	0	2
	Chlorophyta	16	13	36	40
Hacrobia	Centrohelioczoa	1	0	2	6
Opisthokonta	Choanoflagellida	0	2	3	6
	Mesomycetozoa	0	0	2	1
Rhizaria	Cercozoa	6	0	12	2
	Radiolaria	33	27	217	10
Stramenopiles	Ochrophyta	4	5	60	88
	Stramenopiles_X	6	31	69	80



Εικόνα 3.7: Ποσοστιαία απεικόνιση της συμμετοχής κάθε ενός από τα OTU που υπάρχουν σε όλα τα δείγματα (universal OTU) σε κάθε ένα δείγμα.

3.5. Μοριακός χαρακτηρισμός των κυανοβακτηρίων

Η ποικιλότητα των κυανοβακτηρίων στο επιφανειακό νερό στη θέση Πρέβεζα κατά την θερινή δειγματοληψία αναδείχθηκε με τη κατασκευή γονιδιακής βιβλιοθήκης για την περιοχή 16S - ITS - 23S rDNA των κυανοβακτηρίων.

3.5.1. Με γονιδιακή βιβλιοθήκη για την περιοχή 16S - ITS - 23S rDNA και φυλογενετική ανάλυση

Το προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης κλωνοποιήθηκε σε πλασμίδια pCRTMII - TOPO[®]. Με τα πλασμίδια αυτά μετασχηματίστηκαν βακτήρια *E.coli* Mach1TM-T1R. Από τα μετασχηματισμένα βακτήρια, αφού απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA, ελέγχθηκε μέσω πέψης και ηλεκτροφόρησης το ένθεμα του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου. Από αυτό τον έλεγχο προέκυψαν 120 κλώνοι, οι οποίοι στάλθηκαν για αλληλούχιση στην εταιρεία Eurofins Genomics/ VBC Biotech Αυστρίας.

Από τους 120 κλώνους που στάλθηκαν για αλληλούχιση, οι 30 ήταν χιμαιρικοί. Οι 90 αλληλουχίες ITS που προέκυψαν μετά την αλληλούχιση, συγκρίθηκαν με τον αλγόριθμο BLASTN με ήδη καταχωρημένες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων NCBI.

Οι περισσότερες αλληλουχίες ανήκουν στο γένος *Synechococcus* (Πίνακας 8.3) και μόνο 10 ανήκουν στο γένος *Synechocystis*, 14 στο γένος *Leptolyngbya*, 8 σε χλωροπλάστες και 7 σε μη καλλιεργούμενα μερικώς χαρακτηρισμένα κυανοβακτήρια (Πίνακας 8.4).

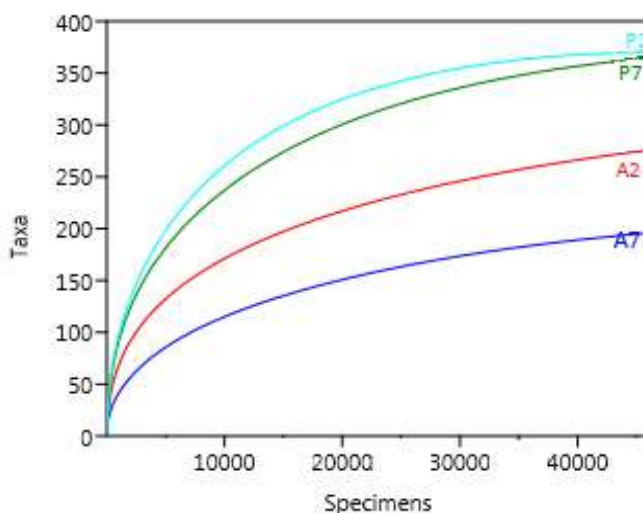
Κατασκευάσαμε ένα φυλογενετικό δέντρο (Εικόνα 3.8) για τις αλληλουχίες των *Synechococcus*, βασιζόμενοι στο φυλογενετικό δέντρο των Choi και Noh [219].

3.5.2 Με NGS

Η NGS έγινε για περιοχή του 16S rDNA γονιδίου. Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 106F, εξειδικευμένος για το 16S rDNA γονίδιο κυανοβακτηρίων και ο 519R, εξειδικευμένος για το 16S rDNA βακτηρίων.

Τα αποτελέσματα από την NGS επεξεργάστηκαν όπως αναφέρθηκε προηγούμενα (§2.4.2). Μετά την κανονικοποίηση των δειγμάτων στις 46235 αναγνώσεις ανά δείγμα, προέκυψαν 718 Λειτουργικές Ταξινομικές Ομάδες (Operational Taxonomic Units - OTU) με μέγεθος περίπου 400bp. Από αυτές 43 ανήκουν σε κυανοβακτήρια, 143 σε χλωροπλάστες και 381 σε άλλα βακτήρια.

Οι καμπύλες εξομάλυνσης (rarefaction curves) που υπολογίστηκαν για όλα τα δείγματα, προσέγγιζαν ένα πλατώ, όταν εφαρμόστηκε αποκοπή ομοιοτήτων σε επίπεδο $\geq 97\%$, υποδεικνύοντας ότι η ποικιλία των δειγμάτων ανακτήθηκε με την εφαρμοζόμενη προσπάθεια προσδιορισμού των αλληλουχιών.



Εικόνα 3.9: Καμπύλες εξομάλυνσης για τις αναγνώσεις των κυανοβακτηρίων

Στο σύνολο των OTU των κυανοβακτηρίων από τα γνωστά δυνητικά τοξικά γένη που παράγουν μικροκυστίνες, δεν βρέθηκε κανένα.

Οι δείκτες ποικιλότητας Shannon, Simpson (1-D) και Piellou είναι χαμηλότεροι το καλοκαίρι σε σχέση με τον χειμώνα. Το ίδιο ισχύει και για την Αμφιλοχία σε σχέση με την Πρέβεζα. Ο δείκτης βιοποικιλότητας ENS είναι σχεδόν ίδιος στις δύο εποχές, αλλά εμφανίζει μεγάλη διαφορά ανάμεσα στις δυο θέσεις δειγματοληψίας.

Πίνακας 3.6: Δείκτης Simpson, Shannon, ENS και Piellou ανά εποχή και θέση δειγματοληψίας

Δείκτης	Χειμώνας	Καλοκαίρι	Αμφιλοχία	Πρέβεζα
Simpson (1-D)	0,9241±0,0005	0,9063±0,0012	0,8828±0,0001	0,9363±0,0014
Shannon (H)	3,26±0,001	3,03±0,002	2,747±0,01	3,451±0,019
ENS	26,0496±0,02	26,6972±0,001	14,8797±0,003	31,5319±0,003
Piellou	0,522±0,0004	0,5013±0,0012	0,4623±0,003	0,5465±0,0012

Από τις 43 OTU των κυανοβακτηρίων, μόνο 7 εμφανίζονται σε όλα τα δείγματα. Οι OTU του χειμώνα είναι περισσότερες από του καλοκαιριού, και της Αμφιλοχίας περισσότερες από της Πρέβεζας. Η ίδια διαφορά υπάρχει και στις μοναδικές για κάθε εποχή ή περιοχή OTU.

Από τις 7 OTU που υπάρχουν σε όλα τα δείγματα (Otu001, Otu002, Otu003, Otu004, Otu038, Otu116 και Otu256), οι 4 (Otu001, Otu002, Otu003 και Otu004) καλύπτουν περίπου το 99,5% του δείγματος (Εικόνα 3.10) και ανήκουν σε κυανοβακτήρια του γένους *Synechococcus*.

Πίνακας 3.7: Πλήθος των OTU των κυανοβακτηρίων

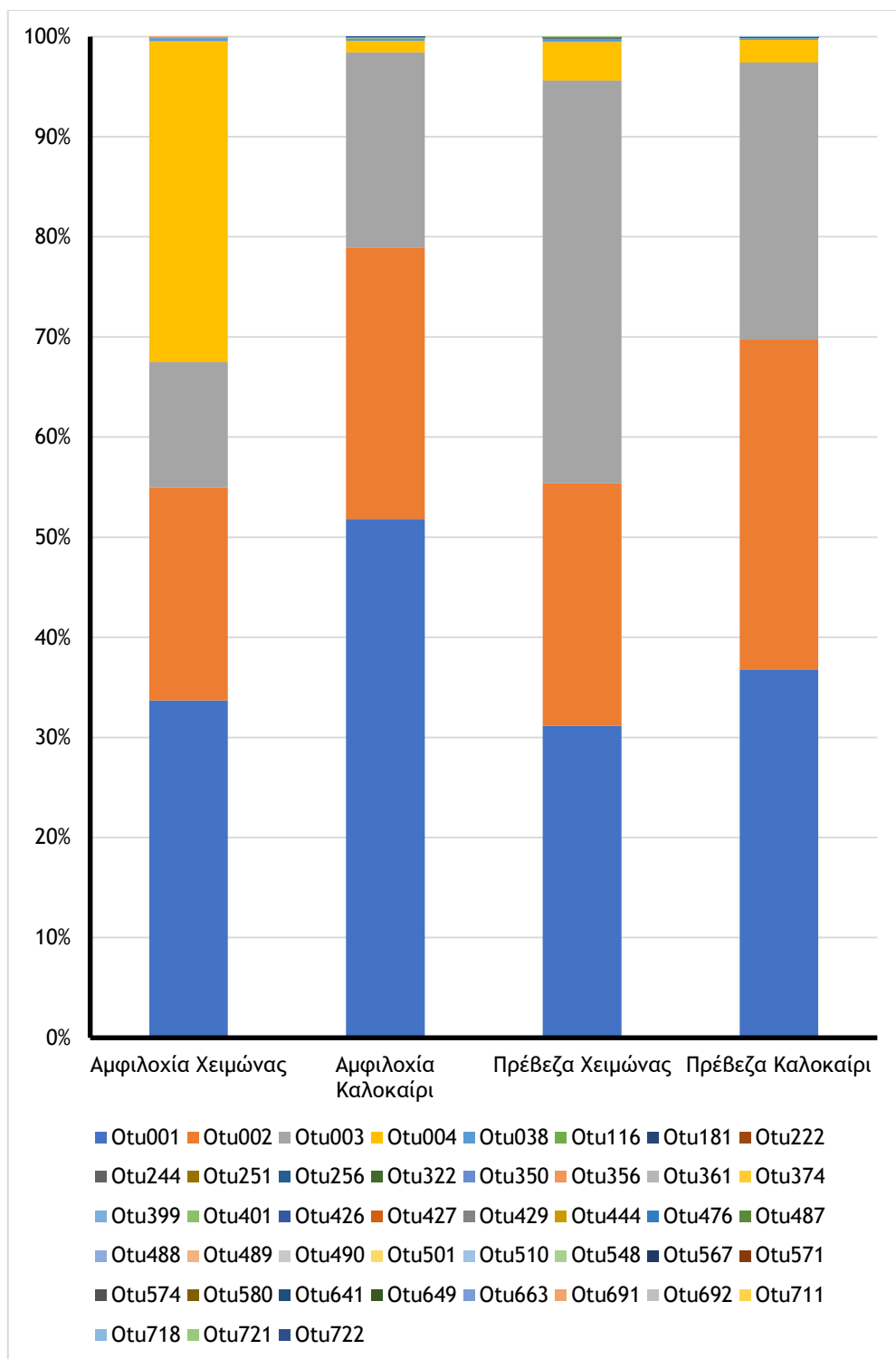
Είδος των OTU	Πλήθος
OTU κυανοβακτηρίων	43
OTU χειμώνα	30
OTU καλοκαίρι	26
OTU Αμφιλοχία	32
OTU Πρέβεζα	25
OTU Αμφιλοχία - χειμώνα	21
OTU Αμφιλοχία - καλοκαίρι	21
OTU Πρέβεζα - χειμώνα	20
OTU Πρέβεζα - καλοκαίρι	13
OTU κοινά σε όλα τα δείγματα (universal OTU)	7
OTU μόνο Χειμώνα	18
OTU μόνο καλοκαίρι	14
OTU μόνο Αμφιλοχία	19
OTU μόνο Πρέβεζα	12
OTU μόνο Αμφιλοχία - χειμώνα	9
OTU μόνο Αμφιλοχία - Καλοκαίρι	9
OTU μόνο Πρέβεζα - χειμώνα	7
OTU μόνο Πρέβεζα - καλοκαίρι	5

Πίνακας 3.8: Πλήθος γενικά άφθονων και σπάνιων OTU στα δείγματα

	Γενικά άφθονα OTU (>1%)	Γενικά σπάνια OTU (<0,1%)
Συνολικά	4	38
Χειμώνα	4	25
Καλοκαίρι	4	20
Αμφιλοχία	4	26
Πρέβεζα	4	20
Αμφιλοχία - Χειμώνας	4	15
Αμφιλοχία - Καλοκαίρι	4	15
Πρέβεζα - Χειμώνας	4	14
Πρέβεζα - Καλοκαίρι	4	7

Για τον φυλογενετικό καθορισμό των OTU χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων Silva. Τα κυανοβακτήρια που υπάρχουν στα δείγματά μας ανήκουν σε 2 ομοταξίες: *Synechoccales* (~99,9% στο σύνολο των κυανοβακτηρίων) και *Nostocales* (~0,01% στο σύνολο των αναγνώσεων) (Πίνακας 8.6).

Από τις OTU που υπάρχουν σε όλα τα δείγματα, 5 ανήκουν στο είδος *Synechococcus* CC9902 και 2 στο είδος *Cyanobium* PCC-630. Οι υπόλοιπες 36 OTU ανήκουν σε κυανοβακτήρια των γενών *Aliterella* (1 OTU), *Arthrospira* (1 OTU), *Chroococcidiopsis* (1 OTU), *Cyanobium* (5 OTU), *Pleurocapsa* (3 OTU), *Prochlorococcus* (1 OTU), *Synechococcus* (28 OTU) και μη καλλιεργούμενα (uncultured) (1 OTU) (Πίνακας 8.5)



Εικόνα 3.10: Ποσοστιαία απεικόνιση της συμμετοχής κάθε ενός από τα OTU κυανοβακτηρίων που υπάρχουν σε κάθε ένα δείγμα.

3.6. Καλλιέργειες κυανοβακτηρίων και τοξικότητα

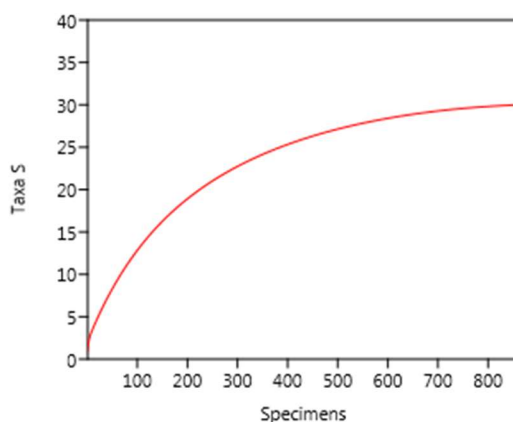
Για την ανάπτυξη κυανοβακτηρίων σε εργαστηριακές συνθήκες, χρησιμοποιήσαμε το θρεπτικό υλικό BG11 σε θαλασσινό νερό της περιοχής δειγματοληψίας (αλατότητα $32 \pm 2\%$).

Από προηγούμενες μελέτες [125] έχει δείξει ότι η μικροκυστίνη παράγεται όταν οι καλλιέργειες των κυανοβακτηρίων είναι στο σκοτάδι. Έτσι, πριν τον έλεγχο για ύπαρξη μικροκυστίνης στις καλλιέργειες, αυτές επώαστηκαν στο σκοτάδι για 24 ώρες.

Στο σύνολο των 20 καλλιεργειών που ελέγχθηκαν, αρχικά βρέθηκαν να παράγουν μικροκυστίνη οι 3. Από αυτές, μόνο μία, η A10 (Αμφιλοχία, Χειμώνας), συνέχισε να παράγει μικροκυστίνη μετά από πολλές ανακαλλιέργειες. Η συγκέντρωση της μικροκυστίνης στο υγρό της καλλιέργειας ήταν 1.3ng/ml.

3.6.1. Χαρακτηρισμός κυανοβακτηρίων της καλλιέργειας A10

Προκειμένου να ταυτοποιήσουμε τα κυανοβακτήρια που υπάρχουν στην καλλιέργεια προχωρήσαμε σε NGS για την περιοχή 16S rDNA με τους εκκινητές 106F ειδικό για κυανοβακτήρια και τον 516R ειδικό για βακτήρια. Τα αποτελέσματα περιλαμβάνουν 862 αναγνώσεις οργανωμένα σε 30 OTU. Η καμπύλη εξομάλυνσης προσέγγιζε ένα πλατώ, όταν εφαρμόστηκε αποκοπή ομοιοτήτων σε επίπεδο $\geq 97\%$, υποδεικνύοντας ότι η ποικιλία του δείγματος ανακτήθηκε με την εφαρμοζόμενη προσπάθεια προσδιορισμού των αλληλουχιών. Ο φυλογενετικός χαρακτηρισμός των OTU φαίνεται στον Πίνακα 8.9. Δεδομένου ότι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την NGS ήταν για κυανοβακτήρια, συμπεράσματα για τα μη κυανοβακτηριακά είδη δεν μπορούν να εξαχθούν.

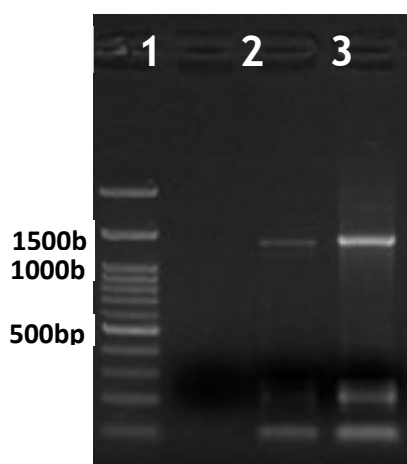


Εικόνα 3.11: Καμπύλη εξομάλυνσης για τις αναγνώσεις των κυανοβακτηρίων στην καλλιέργεια A10

Από τις OTU που ανακτήθηκαν, σε κυανοβακτήρια ανήκουν μόνο 2 (OTU3 και OTU215). Και οι δύο OTU αντιστοιχούν σε διαφορετικά στελέχη του *Microcystis aeruginosa* (Πίνακας 8.9) και πιθανά να παράγουν μικροκυστίνες.

3.6.2. Έκφραση γονιδίων παραγωγής μικροκυστίνης στην καλλιέργεια A10

Σε DNA που εκχυλίστηκε από την καλλιέργεια, έγινε PCR για τις περιοχές *msyA-NMT* και *msyA-cd* (Εικόνα 2.8 και Εικόνα 2.9) του οπερονίου της μικροκυστίνης. Για την καλλιέργεια A10, προϊόν PCR είχαμε μόνο για το γονίδιο *msyA-NMT* και όχι για το γονίδιο *msyA-cd*.



Εικόνα 3.12: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για την περιοχή *msyA-NMT*.

Θέση 1: ladder

Θέση 2: καλλιέργεια A1

Θέση 3: καλλιέργεια A10

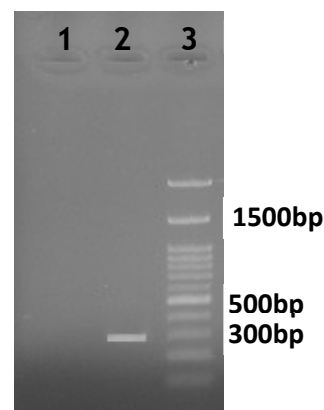
Θέση 4: θετικό κοντρόλ (DNA από Παμβώτιδα).

Εικόνα 3.13: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για την περιοχή *msyA-cd*.

Θέση 1: καλλιέργεια A10,

Θέση 2: θετικό control (DNA από Παμβώτιδα),

Θέση 3: ladder

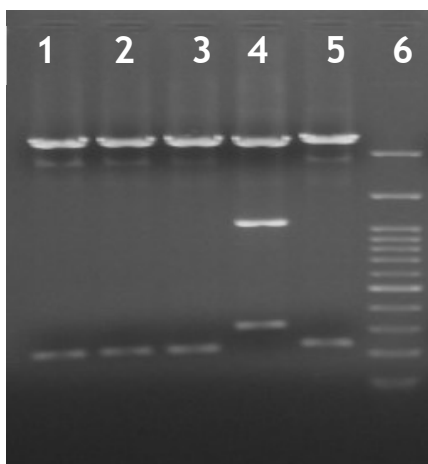


Το προϊόν της PCR για το *msyA-NMT* κλωνοποιήθηκε σε πλασμίδια pCRTMII - TOPO®. Με τα πλασμίδια αυτά μετασχηματίστηκαν βακτήρια *E. coli* Mach1TM-T1R. Από τα μετασχηματισμένα βακτήρια, αφού απομονώθηκε πλασμιδιακό

DNA, ελέγχθηκε μέσω πέψης και ηλεκτροφόρησης το ένθεμα του ανασυνδυσμένου πλασμιδίου.

Οι κλώνοι που προέκυψαν στάλθηκαν για αλληλούχιση στο Vienna Biocenter.

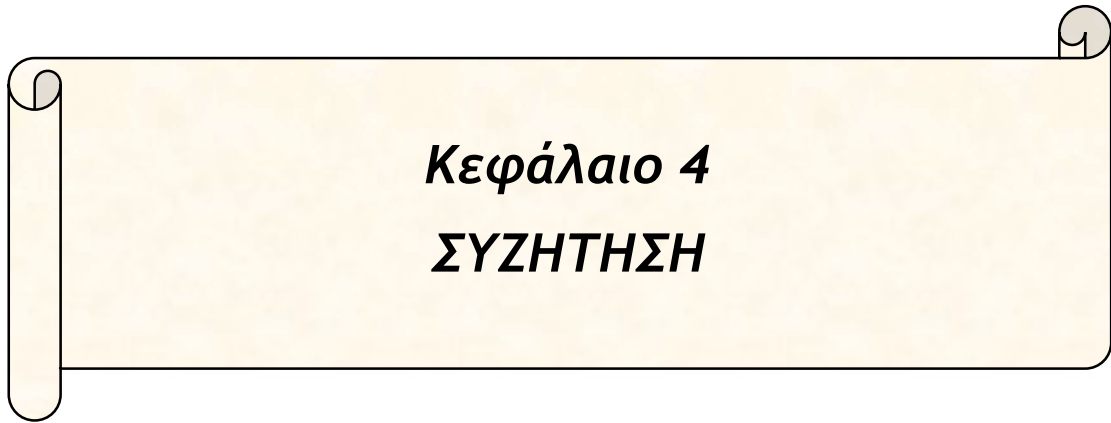
Από τους κλώνους που στάλθηκαν για αλληλούχιση, 3 ήταν χιμαιρικοί. Οι 7 αλληλουχίες *mcyA-NMT* που προέκυψαν, συγκρίθηκαν με τον αλγόριθμο BLASTN με ήδη καταχωρημένες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων NCBI. Τα αποτελέσματα της σύγκρισης φαίνονται στον Πίνακα 3.9. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα αποτελέσματα της σύγκρισης δίνουν κυανοβακτήρια του γένους *Microcystis* σε μεγάλη ομολογία για όλους τους κλώνους.



Εικόνα 3.14: Παραδείγματα πέψης ανασυνδυσμένων πλασμιδίων σε 1%w/v πήγμα αγαρόζης. Θέσεις 1-5: *mcyA-NMT* κλώνοι 6-10, θέση 6. Ladder 1kb.

Πίνακας 3.9: Φυλογενετικός χαρακτηρισμός των κλώνων του mcyA-NMT. Για τον χαρακτηρισμό χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων NCBI.

	Περιγραφή	e-value	Ομοιότητα
A10 - NMT-1	<i>Microcystis viridis</i> N-C 169/7 microcystin synthetase N-methyltransferase domain (mcyA) gene, partial cds	0.0	98.21%
A10 - NMT-2	<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843 DNA, complete genome	0.0	98.84%
A10 - NMT-3	Uncultured <i>Microcystis</i> sp. clone ZnA2 microcystin synthase subunit A (mycA) gene, partial cds	0.0	98.99%
A10 - NMT-6	<i>Microcystis aeruginosa</i> mcyA, mcyB and mcyC genes, complete cds	0.0	98.43%
A10 - NMT-8	<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843 DNA, complete genome	0.0	98.83%
A10 - NMT-9	Uncultured <i>Microcystis</i> sp. clone CS8 microcystin synthase subunit A (mycA) gene, partial cds	0.0	99.45%
A10 - NMT-10	<i>Microcystis aeruginosa</i> FCY-26 McyA (mcyA) gene, complete cds	7,00E-83	93.47%



4.1. Φυσικοχημικά και ωκεανογραφικά χαρακτηριστικά του Αμβρακικού Κόλπου

Ο Αμβρακικός είναι ένας κλειστός κόλπος στον οποίο η επίδραση των επιφανειακών απορροών είναι πολύ σημαντική.

Οι οριζόντιες και κατακόρυφες διακυμάνσεις της αλατότητας, της θερμοκρασίας και της πυκνότητας των νερών είναι μεγάλες σε όλη τη διάρκεια του χρόνου και εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τις διακυμάνσεις των παροχών των ποταμών Άραχθου και Λούρου. Εξαιτίας της εισροής γλυκών νερών οι επιφανειακές αλατότητες είναι σχετικά μικρές (<35,5‰) με αποτέλεσμα την παρουσία ισχυρής στρωμάτωσης. Η στρωμάτωση που εμφανίζεται σε όλη τη διάρκεια του χρόνου είναι ισχυρότερη την άνοιξη λόγω των αυξημένων παροχών των ποταμών και το καλοκαίρι λόγω επιφανειακής εξάτμισης [220].

Οι κατακόρυφες διακυμάνσεις θερμοκρασίας, αλατότητας και πυκνότητας δημιουργούν ισχυρή στρωμάτωση στα νερά του Αμβρακικού όλες τις εποχές, εκτός από το φθινόπωρο εξάτμισης [220].

Οι συγκεντρώσεις των θρεπτικών αλάτων, όπως αυτές προσδιορίστηκαν από το ΕΛΚΕΘΕ, δείχνουν ότι ο Αμβρακικός είναι ευτροφικός. Οι συγκεντρώσεις είναι σχετικά μικρές στη διάρκεια της θερινής περιόδου και υψηλές τις υπόλοιπες εποχές λόγω της συνεισφοράς των ποταμών [194].

Οι τιμές των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών που μετρήθηκαν στην παρούσα μελέτη (**Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.**) και αφορούν το επιφανειακό νερό του Αμβρακικού, συμφωνούν με τα ήδη δημοσιευμένα στοιχεία που αναφέρθηκαν παραπάνω.

4.2. Βιοτοξίνες στον Αμβρακικό Κόλπο

Οι τοξίνες που παράγονται από θαλάσσιους μικροοργανισμούς και μπορούν να συσσωρευτούν σε δίθυρα, είναι αρκετές (οκαδαϊκό οξύ, μπρεβετοξίνη, δομοϊκό οξύ, σαξιτοξίνες, μικροκυστίνες, γιεσσοτοξίνες, αζασπιρίδια κ.α.). Με βάση τη χημική τους δομή διακρίνονται σε υδρόφιλες και λιπόφιλες. Ακόμη και για αυτές που ανήκουν στην ίδια κατηγορία, οι χημικές δομές παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να μην μπορούν όλες να εκχυλιστούν στον ίδιο διαλύτη. Αντίστοιχα, δεν υπάρχει μέθοδος ποιοτικού ή ποσοτικού προσδιορισμού που να ανιχνεύει ταυτόχρονα πολλές τοξίνες μαζί. Αυτός είναι και ο λόγος που χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικής περιεκτικότητας υδατικά διαλύματα μεθανόλης για την εκχύλιση των τοξινών.

Στη δική μας μελέτη προχωρήσαμε σε ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό τοξινών με την μέθοδο της ELISA. Πρόκειται για μια ταχεία και αξιόπιστη μέθοδο που βασίζεται στην αναγνώριση της τοξίνης από εξειδικευμένο

αντίσωμα. Για κάθε τοξίνη που μελετήσαμε, χρησιμοποιήσαμε διαφορετική συσκευασία υλικών. Σχετικά με τα αποτελέσματα των μετρήσεων, έχει αναφερθεί υπερεκτίμηση των συγκεντρώσεων των τοξινών με την συγκεκριμένη μέθοδο [221] αλλά και το αντίθετο [43, 55], σε σχέση με άλλες μεθόδους ποσοτικού προσδιορισμού (LC-MS, MBA). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ELISA μετράει την συνολική συγκέντρωση χημικών αναλόγων τοξίνης ανά δείγμα και όχι κάθε ανάλογο ξεχωριστά. Έτσι, ο ποσοτικός προσδιορισμός των τοξινών θα πρέπει να εξετάζεται με προσοχή, ειδικά για συγκεντρώσεις που είναι κοντά στο όριο ανίχνευσης της μεθόδου. Επιπλέον, καθώς κάθε χημικό ανάλογο έχει διαφορετική τοξικότητα, ο ποσοτικός προσδιορισμός των τοξινών με ELISA δίνει μια πρώτη γενική εκτίμηση της τοξικότητας των διθύρων σε σύντομο χρονικό διάστημα.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ng/g νωπού ιστού μυδιών. Στην εκχύλιση των τοξινών από τα μύδια, χρησιμοποιείται ολόκληρο το ζώο (εκτός από το κέλυφος), γιατί καταναλώνουμε ολόκληρο το ζώο, χωρίς να αφαιρέσουμε κάποιο από τα τμήματά του.

Σύμφωνα με παλαιότερες μελέτες, ο Αμβρακικός χαρακτηρίζεται ως ευτροφικός κόλπος [222, 223]. Αριθμητική έκρηξη της φυτοπλαγκτονικής βιομάζας έχει παρατηρηθεί παροδικά και κατά τόπους, κυρίως σε παράκτιες περιοχές [222]. Από το πρόγραμμα παρακολούθησης των διθύρων για παρουσία βιοτοξινών [20] και από προηγούμενες μελέτες [74, 222] έχει αναφερθεί ότι στον Αμβρακικό μπορεί να παράγονται οι ακόλουθες τοξίνες: μπρεβετοξίνη, οκαδαϊκό οξύ, δομοϊκό οξύ και σαξιτοξίνες. Τα συμπεράσματα αυτά προέκυψαν έπειτα από ταυτοποίηση του φυτοπλαγκτού με μικροσκοπική παρατήρηση και έλεγχο των μυδιών για τοξικότητα σε επίμυες (mouse bioassay). Επιπλέον, έχει επιβεβαιωθεί η ύπαρξη μικροκυστινών στην περιοχή της Αμφιλοχίας, όλη τη διάρκεια του έτους [77].

Μπρεβετοξίνες

Οι συγκεντρώσεις των μπρεβετοξινών στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν χαμηλές, αλλά μετρήσιμες. Η μέγιστη τιμή (68 ng/g) παρατηρήθηκε στην εαρινή δειγματοληψία στη θέση Πρέβεζα. Παρατηρώντας τις τιμές σε όλες τις θέσεις δειγματοληψίας, συμπεραίνουμε ότι η συγκέντρωση των μπρεβετοξινών είναι χαμηλή το καλοκαίρι και το φθινόπωρο, ενώ αυξάνεται τον χειμώνα και την άνοιξη. Μάλιστα, στις περισσότερες θέσεις δειγματοληψίας είναι υψηλότερη την άνοιξη σε σχέση με τον χειμώνα. Σε σχέση με το όριο ασφαλείας, όπως αυτό έχει θεσπιστεί από τον FDA, οι συγκεντρώσεις μπρεβετοξινών στα δείγματά μας είναι χαμηλές.

Οι τοξίνες αυτές, είναι γνωστό ότι παράγονται από πρώτιστα του είδους *Karenia brevis*, *Chatonella antiqua*, *Fibrocapsa japonica* και *Heterosigma akashiwo*. Μέχρι στιγμής, δεν έχουν αναφερθεί κρούσματα NSP σε ανθρώπους στην Ευρώπη. Υπάρχουν όμως καταγεγραμμένα γεγονότα για αυξήσεις του αριθμού των ειδών που παράγουν τις τοξίνες αυτές (Πίνακας 4.1) και

θανάτους ψαριών [224, 225]. Καμμία από τις προαναφερόμενες μελέτες δεν αναφέρει την παραγωγή μπρεβετοξινών, παρά μόνο την αριθμητική αύξηση του πληθυσμού των συγκεκριμένων ειδών.

Πίνακας 4.1: Πληθυσμιακή αύξηση ειδών δυνητικών παραγωγών μπρεβετοξινών στην Ευρώπη

Χώρα	Μικροοργανισμοί	Χρονολογία
Γαλλία	<i>Fibrocapsa japonica</i> [224]	1991
Γερμανία	<i>H. akashiwo</i> [224]	1994
	<i>Fibrocapsa japonica</i> [224]	1996-1997
	<i>H. akashiwo</i> [226]	1997
	<i>Chattonella sp.</i> [225]	1998, 2001, 2003
Ελλάδα	<i>G. breve</i> [227]	1993
Ολλανδία	<i>Fibrocapsa japonica</i> , <i>Chattonella antiqua</i> [224]	1991, 1992, 1993
	<i>Fibrocapsa japonica</i> [224]	1997
Πορτογαλία	<i>G. breve</i> [227]	1993
Ρωσία	<i>Chattonella sp</i> [228]	1987
Ισπανία	<i>G. breve</i> [227]	1993
Ηνωμένο Βασίλειο	<i>Heterosigma akashiwo</i> [224]	2001

Η ομάδα για τις μολυσματικές ουσίες στην αλυσίδα τροφίμων (CONTAM Panel) [229] επισημαίνει πως ο αριθμός των τοξινών της ομάδας ΒΤΧ που ανιχνεύονται σε ένα δείγμα, εξαρτάται από τις χρησιμοποιούμενες αναλυτικές μεθόδους και τα διαθέσιμα πρότυπα.

Δομοϊκό οξύ

Στα δείγματα μας, η συγκέντρωση του δομοϊκού οξέος είναι χαμηλή, αλλά μετρήσιμη όλες τις εποχές σε όλες τις θέσεις δειγματοληψίας και κάτω από το όριο ασφαλείας που έχει θεσπιστεί από την ΕΕ (20mg/kg). Ιδιαίτερα στη φθινοπωρινή δειγματοληψία, παρατηρείται η μεγαλύτερη συγκέντρωση του δομοϊκού οξέος. Από την NGS ανάλυση δεν βρέθηκαν OTU που να αντιστοιχούν σε γένη που παράγουν δομοϊκό οξύ.

Το δομοϊκό οξύ είναι μια από τις πιο «φημισμένες» θαλάσσιες τοξίνες. Υπάρχουν πολλές δημοσιεύσεις που σχετίζονται με την παθογένεια, την φυσιολογία, την χημεία του, την μεταφορά του μέσω των τροφικών αλυσίδων, και τις συνθήκες κάτω από τις οποίες παράγεται [230]. Μέχρι σήμερα, δεν είναι γνωστός ο πιθανός οικολογικός του ρόλος. Έχει προταθεί ότι πρόκειται για: 1) παραπροϊόν του μεταβολισμού των διατόμων, 2) οσμοπροστατευτικό,

3) κηλικό παράγοντα μετάλλων, 4) αλληλοπαθητική ουσία, 5) φερορμόνη ή 6) ότι βοηθάει στον ανταγωνισμό μεταξύ των μικροοργανισμών σε ένα περιβάλλον, όταν οι θεραπευτικές ουσίες περιορίζονται [230].

Έχει καταγραφεί σε πολλές περιοχές του πλανήτη, αλλά συμπτώματα σε ανθρώπους έχουν καταγραφεί μόνο σε περιοχές της Β. Αμερικής. Δεδομένου ότι κάποια από τα συμπτώματα της αμνησιακής δηλητηρίασης είναι κοινά με συμπτώματα δηλητηριάσεων διαφορετικής αιτιολογίας (εμετοί, διάρροιες, ναυτία, κοιλιακές κράμπες), μπορούν εύκολα να παρερμηνευτούν. Σε ήπιες μάλιστα περιπτώσεις, οι ασθενείς πιθανά να μην καταφεύγουν σε ιατρική βοήθεια. Σύγχυση και απώλεια μνήμης είναι συμπτώματα που παρουσιάζονται όταν οι οργανισμοί εκτίθενται σε υψηλές συγκεντρώσεις αυτής της τοξίνης [88].

Σε ότι αφορά τις μεθόδους προσδιορισμού του δομοϊκού οξέος, από το 2014 και μετά η ΕΕ προτείνει την χρήση HPLC-UV για ποσοτικό προσδιορισμό και την ELISA για έλεγχο ύπαρξης ή μη των τοξινών αυτών σε ένα δείγμα (screening). Επίσης, υπάρχει αμφισβήτηση στο όριο ασφαλείας των 200mg δομοϊκού οξέος /kg μυδιών και προτείνεται να μειωθεί σε 600ng/g. Ακόμη και με αυτή τη «νέα ρύθμιση», τα δείγματα της παρούσας μελέτης παραμένουν χαμηλότερα του ορίου ασφαλείας, όλη τη διάρκεια του χρόνου.

Οκαδαϊκό οξύ

Τα επίπεδα οκαδαϊκού οξέος στο σώμα των μυδιών παρακολουθούνται σε εθνικό και πανευρωπαϊκό επίπεδο. Ο ισχύων ευρωπαϊκός κανονισμός (ΕΚ αριθ. 853/2004 της 29ης Απριλίου 2004) σχετικά με το επίπεδο των τοξινών DSP στα οστρακοειδή που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση επικεντρώνεται αποκλειστικά στη μείωση των γαστρεντερικών συμπτωμάτων. Ορίζει επομένως ως μέγιστο επιτρεπτό όριο 160 μg OA ανά kg. Αυτό σημαίνει ότι μικρές ποσότητες OA μπορεί να υπάρχουν στα μαλάκια που έχουν περάσει από τους νόμιμους ελέγχους προτού διατεθούν στο εμπόριο και επομένως οι τακτικοί καταναλωτές ενδέχεται να εκτίθενται σε αυτή την τοξίνη εδώ και χρόνια. Ως εκ τούτου, πρόσφατη έκθεση της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (ΕΑΑΤ), η οποία βασίζεται στις οξείες επιπτώσεις στους καταναλωτές, έχει ήδη προτείνει τη μείωση αυτού του επιπέδου (από 160 μg/kg σε 45 μg/kg). Στην Ευρώπη, μύδια με τοξίνες DSP έχουν αναφερθεί στις ακτές όλων σχεδόν των ευρωπαϊκών χωρών και σε πολλές χώρες της Μεσογείου [231, 232].

Στις δικές μας μετρήσεις σε όλα τα δείγματα η συγκέντρωση του οκαδαϊκού οξέος είναι πάνω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου. Σε μερικά μάλιστα από τα δείγματά μας (Πίνακας 8.2 και Εικόνα 3.2η συγκέντρωσή του ξεπερνάει το όριο ασφαλείας που έχει θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση. Στην προσπάθειά μας για μοριακό χαρακτηρισμό δυνητικώς τοξικών πρωτίστων, βρέθηκαν τα γένη *Dinophysis sp.* και *Prorocentrum sp.*, που έχουν ενοχοποιηθεί για την παραγωγή οκαδαϊκού οξέος.

Σαξιτοξίνες

Στα δείγματά μας οι συγκεντρώσεις των σαξιτοξινών ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης των μεθόδων που χρησιμοποιήσαμε. Στην NGS ανάλυση για χαρακτηρισμό της βιοκοινότητας των πρωτίστων, βρέθηκαν πρώτιστα των γενών *Alexandrium* και *Gymnodinium*, που έχουν ενοχοποιηθεί για την παραγωγή σαξιτοξινών.

Μικροκυστίνες

Οι μικροκυστίνες είναι τοξίνες που παράγονται από κυανοβακτήρια. Έχουν μελετηθεί κυρίως σε γλυκά νερά, ενώ σε θαλάσσια περιβάλλοντα υπάρχουν λίγες βιβλιογραφικές αναφορές [9, 233]. Η παρουσία των μικροκυστινών στον Αμβρακικό κόλπο έχει αναφερθεί και παλαιότερα [74, 77]. Με τα δικά μας αποτελέσματα, επιβεβαιώνεται η ύπαρξη μικροκυστινών σε όλες τις θέσεις δειγματοληψίας περιμετρικά του Αμβρακικού κόλπου και μάλιστα σε μετρήσιμες και υψηλές συγκεντρώσεις, σε όλη τη διάρκεια του χρόνου (18,6 - 98,8ng/g ww). Για την παραγωγή αυτής της κατηγορίας τοξινών, μέχρι στιγμής έχουν ενοχοποιηθεί τα κυανοβακτήρια, κυρίως του γένους *Microcystis*. Η επιτρεπόμενη συγκέντρωση μικροκυστινών που πρέπει να υπάρχει σε ιστούς μυδι, ώστε αυτά να διατεθούν στην αγορά, χωρίς κίνδυνο της δημόσιας υγείας δεν έχει προσδιοριστεί. Από τις υπάρχουσες όμως οδηγίες, ο ΠΟΥ αναφέρει σαν συνιστώμενη ημερήσια δόση, ώστε να μην κινδυνεύει η ανθρώπινη υγεία, τα 0.04μg τοξίνης / kg σωματικό βάρος του ατόμου που θα καταναλώσει. Έτσι δεδομένου ότι το μέσο βάρος ενός ενήλικα είναι περίπου 70kg, θα μπορούσαμε να υπολογίσουμε μια ασφαλής ασφαλείς συγκέντρωση τα 16ng MC/g μυδιών. Σχεδόν όλα τα δείγματα μας έχουν υψηλότερη συγκέντρωση από το όριο αυτό.

Τα τελευταία χρόνια έχουν αυξηθεί οι μελέτες που επιβεβαιώνουν την ύπαρξη μικροκυστινών σε νερά εκβολών ποταμών, σε λιμνοθάλασσες και παράκτιες περιοχές. Πιστεύεται ότι οι μικροοργανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή τους, μεταφέρθηκαν εκεί μέσω ποταμών και προσαρμόστηκαν στο περιβάλλον υψηλής αλατότητας. Μικροκυστίνες σε ιστούς μυδιών έχουν αναφερθεί και σε άλλες περιοχές του πλανήτη (Πίνακας 4.2).

Πίνακας 4.2: Συγκέντρωση μικροκυστινών σε ιστούς μυδιών (*Mytilus galloprovincialis*) σε διάφορες περιοχές [9, 233].

Τοποθεσία	Συγκέντρωση μικροκυστινών σε ιστούς μυδιών (ng/g)
Ιταλία (Αδριατική Θάλασσα)	1,7 - 256
Καλιφόρνια (San Francisco Bay)	22 , 416,23
Ουάσιγκτον (Puget Sound)	2 -15,5

Θέλοντας να εντοπίσουμε τον οργανισμό που παράγει μικροκυστίνες στον Αμβρακικό κόλπο, προχωρήσαμε σε μοριακό χαρακτηρισμό των κυανοβακτηρίων, τόσο με την κατασκευή γονιδιακής βιβλιοθήκης για την περιοχή 16S - ITS - 23S rDNA, όσο και με NGS ανάλυση. Επιπλέον, προσπαθήσαμε να καλλιεργήσουμε κυανοβακτήρια παραγωγούς μικροκυστινών από δείγματα νερού του Αμβρακικού Κόλπου.

4.3. Ποικιλότητα πρωτίστων στα δείγματα νερού

Ορισμένες από τις θαλάσσιες βιοτοξίνες που βρέθηκαν στον Αμβρακικό κόλπο παράγονται από πρώτιστα. Για να διερευνήσουμε ποια από τα δυνητικά τοξικά πρώτιστα υπάρχουν στον Αμβρακικό κόλπο προχωρήσαμε στην NGS ανάλυση. Αυτή έγινε για την περιοχή V4 του 18S rDNA γονιδίου. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για ευκαρυωτικούς οργανισμούς, καθώς δεν υπάρχουν εξειδικευμένοι για τα πρώτιστα. Η μελέτη περιορίστηκε στις δύο θέσεις δειγματοληψίας (Αμφιλοχία και Πρέβεζα), σε δυο εποχές (χειμώνα και καλοκαίρι), για τους λόγους που αναφέρθηκαν προηγουμένως, και επιπλέον για να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα μεταξύ κυανοβακτηρίων και πρωτίστων.

Σχετικά με την ποικιλομορφία των δειγμάτων ανά εποχή, οι τιμές των δεικτών Simpson, Shannon και Piellou είναι σχεδόν ίδιες. Υπάρχει διαφορά μόνο στην τιμή του ENS με αυτή του καλοκαιριού να είναι μεγαλύτερη. Σε ότι αφορά τους δείκτες ποικιλομορφίας ανά θέση δειγματοληψίας, υπάρχει μεγάλη διαφορά μεταξύ των δύο θέσεων. Πιο συγκεκριμένα, οι δείκτες αυτοί για την περιοχή της Πρέβεζας είναι πολύ υψηλότεροι από τους αντίστοιχους για την Αμφιλοχία. Δηλαδή στην Πρέβεζα οι κυρίαρχες OTU είναι περισσότερες, οι αναγνώσεις του είναι ομοιόμορφα κατανομημένες ανάμεσα στις OTU και η πραγματική βιοποικιλότητα είναι μεγαλύτερη.

Το πλήθος των OTU στην Πρέβεζα είναι σχεδόν διπλάσιο από αυτά της Αμφιλοχίας, ενώ οι OTU που υπάρχουν αποκλειστικά στην Πρέβεζα είναι σχεδόν τετραπλάσιες από τις αντίστοιχες της Αμφιλοχίας. Τα γενικά άφθονα OTU όμως είναι τα ίδια σε πλήθος στις δύο περιοχές, ενώ τα σπάνια είναι περισσότερα στην Αμφιλοχία.

Η συχνότητα των 24 OTU που υπάρχουν σε όλα τα δείγματα διαφέρει από δείγμα σε δείγμα, χωρίς να προκύπτει κάποιο πρότυπο ανά θέση ή εποχή.

Στο σύνολο των OTU των πρωτίστων από τα γνωστά δυνητικά τοξικά γένη υπάρχουν τα *Alexandrium* και *Gymnodinium* (ASP) και *Prorocentrum* και *Dinophysis* (DSP). Ο αριθμός των αναγνώσεων για κάθε ένα από αυτά τα OTU είναι πολύ μικρός για να δικαιολογεί την παραγωγή τοξινών σε μετρίσιμες ποσότητες. Βέβαια, τα μύδια συγκεντρώνουν τις τοξικές αυτές ουσίες στους ιστούς τους, ενώ το δείγμα από το οποίο έγινε η απομόνωση γενετικού υλικού είναι επιφανειακό νερό.

Η ανάπτυξη μοριακών προσεγγίσεων επέτρεψε κάποια κατανόηση της διαφοράς μεταξύ δειγμάτων. Μέχρι σήμερα, μελέτες σχετικές με την ποικιλομορφία των πρωτίστων στα υδάτινα οικοσυστήματα έχουν δείξει μια πολύ μεγάλη ποικιλία ειδών, τα περισσότερα από τα οποία οφείλονται σε καμπύλες αφθονίας που εμφανίζουν ένα τεράστιο αριθμό OTU με πολύ χαμηλά ποσοστά αφθονίας [234-236]. Αυτή η κοινότητα έχει αναφερθεί ως η «σπάνια βίοςφαιρα» κάθε δείγματος. Πιστεύεται ότι κατά τη διάρκεια μιας αλλαγής περιβαλλοντικών ή φυσικών συνθηκών, μερικές από αυτές τις «σπάνιες» OTU θα μπορούσαν να αναλάβουν ως κυρίαρχα είδη, ενώ κάποιες κυρίαρχες OTU με παρόμοια λειτουργία στο οικοσύστημα θα εξαφανιστούν. Δεδομένου ότι υπάρχει ένας τόσο μεγάλος αριθμός σπάνιων OTU, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα αυτά τα είδη να δουλεύουν μαζί σε ομάδες. Μια τέτοια δυνατότητα ρύθμισης μπορεί να εξηγήσει τον τρόπο με τον οποίο το σύνολο των ειδών φαίνεται να παραμένουν σταθερό κατά τη διάρκεια της περιβαλλοντικών αλλαγών. Υπάρχουν και άλλες πιθανές εξηγήσεις: είδη που βρίσκονται σε χαμηλούς πληθυσμούς θα μπορούσαν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο ως κορυφαίοι καταναλωτές. Εναλλακτικά αυτά τα είδη θα μπορούσαν να είναι νεκρά, ένας λόγος για τον οποίο τα δεδομένα RNA είναι εξίσου σημαντικά με τα δεδομένα του DNA, προκειμένου να επιχειρήσουμε απαντήσεις σε οποιαδήποτε από αυτές τις ερωτήσεις. Η πηγή αυτών των σπάνιων OTU θα μπορούσε επίσης να είναι σφάλματα που δημιουργήθηκαν κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, υπογραμμίζοντας έτσι τη σημασία του ποιοτικού ελέγχου κατά την επεξεργασία και την ανάλυση ακολουθιών.

4.4. Ποικιλότητα κυανοβακτηρίων στα δείγματα νερού

Για την μελέτη της ποικιλότητας των κυανοβακτηρίων στον Αμβρακικό κόλπο ξεκινήσαμε με την κατασκευή βιβλιοθηκών για την περιοχή 16S-ITS-23S rDNA σε δείγμα από την Πρέβεζα (θερινή δειγματοληψία). Η συγκεκριμένη θέση δειγματοληψίας παρουσιάζει έντονο ενδιαφέρον καθώς υπάρχει η μοναδική μονάδα μυδοκαλλιέργειας στον Αμβρακικό [20]. Η συγκέντρωση της μικροκυστίνης στο συγκεκριμένο δείγμα είναι κοντά στον μέσο όρο των τιμών του καλοκαιριού. Επιπλέον, η συγκεκριμένη θέση δειγματοληψίας βρίσκεται αντιδιαμετρικά σε σχέση με την Αμφιλοχία, που έχει ήδη μελετηθεί διεξοδικά [77].

Η κατασκευή βιβλιοθήκης για την περιοχή 16S-ITS-23S των κυανοβακτηρίων στα δείγματα της Πρέβεζας και η αλληλούχιση των κλώνων, έδειξε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των κυανοβακτηρίων ανήκουν στο γένος *Synechococcus*. Στο ίδιο αποτέλεσμα είχε καταλήξει και η μελέτη των Vareli et al [77] για την περιοχή της Αμφιλοχίας.

Τα *Synechococcus* είναι χαρακτηριστικά πλαγκτονικά θαλάσσια κυανοβακτήρια, αν και μερικά στελέχη έχουν βρεθεί και σε λίμνες [237, 238]. Διαβιούν κυρίως στη ευφωτική ζώνη, ενώ σε μεγαλύτερα βάθη εμφανίζουν χαμηλούς μεταβολικούς ρυθμούς. Είναι οργανισμοί που προσαρμόζονται εύκολα στις συνθήκες του περιβάλλοντός τους. Τα θαλάσσια *Synechococcus* παρουσιάζουν υψηλή γενετική ποικιλοτητα. Πρόσφατα υποδιαιρέθηκαν σε 3 ομάδες (subcluster) τις 5.1, 5.2 και 5.3 [239, 240]. Τα περισσότερα ανήκουν στην ομάδα 5.1, που περιέχει τουλάχιστον 20 αναγνωρίσιμους γενετικούς κλάδους που χαρακτηρίστηκαν με πολλούς διαφορετικούς γονιδιακούς δείκτες [219, 241-245]. Φαίνεται να παρουσιάζουν συγκεκριμένη γεωγραφική κατανομή. Τα *Synechococcus* των κλάδων I, II και IV κυριαρχούν σε παγκόσμια κλίμακα [246]. Πιο συγκεκριμένα, ο κλάδος II είναι συνηθισμένος στα υποτροπικά / τροπικά ανοιχτά ωκεάνια ύδατα, ενώ τα *Synechococcus* των κλάδων I και IV περιορίζονται σε μεγάλο βαθμό στις παράκτιες περιοχές και σε μεγαλύτερα γεωγραφικά πλάτη (άνω των 30°N ή κάτω από 30°S) [246-248]. Τα *Synechococcus* που βρεθήκανε στους κόλπους των εκβολών ποταμών ή των παράκτιων περιοχών περιέχουν συχνά μοναδικούς γονότυπους διαφορετικούς από αυτούς που συναντώνται στους ανοικτούς ωκεανούς. Για παράδειγμα, τα στελέχη *Synechococcus* που απομονώθηκαν από το Chesapeake Bay και την Θάλασσα της Ιαπωνίας, ταξινομήθηκαν στις ομάδες 5.2 και 5.3 αντίστοιχα [219, 249]. Για αυτές τις ομάδες, ελάχιστα είναι γνωστά σε ότι αφορά την γεωγραφική τους κατανομή.

Η ομάδα 5.3 μέχρι πρόσφατα [239, 240] ήταν ελάχιστα μελετημένη και περιείχε τρία στελέχη *Synechococcus*, τα RCC307 [244], KORDI-15 και KORDI-30 [219]. Σε μια μελέτη των Chen et al [249], 40 αλληλουχίες από τον Ατλαντικό και τον Ειρηνικό Ωκεανό βρέθηκαν να ανήκουν σε αυτή την ομάδα. Οι ερευνητές προτείνουν η ομάδα 5.3 ότι μπορεί να διαιρεθεί σε 6 επιμέρους κλάδους (5.3 I - 5.3 VI). Από αυτούς, οι κλάδοι 5.3 I και 5.3 III περιλαμβάνουν κυρίως βακτήρια που διαβιούν σε επιφανειακά νερά, μεταξύ των οποίων και τα RCC307, KORDI-15 και KORDI-30. Οι υπόλοιποι κλάδοι εμφανίζονται σε πιο μεγάλα βάθη. Φαίνεται ότι τα μέλη της ομάδας 5.3 είναι παρόντα σε διάφορους ωκεανούς, αλλά μερικοί κλάδοι της μπορεί να περιορίζονται σε ορισμένα βάθη. Αν αυτοί οι κλάδοι αντιπροσωπεύουν συγκεκριμένη προσαρμογή στην στήλη του νερού, είναι αντικείμενο που χρήζει περισσότερης μελέτης στο μέλλον.

Σύμφωνα με τα δικά μας αποτελέσματα, οι περισσότεροι κλώνοι ανήκουν στην ομάδα (subcluster) 5.3, αποτελέσματα που συμφωνούν και με την μελέτη των Vareli et al [77]. Επίσης, υπάρχουν κλώνοι που κατατάσσονται στην ομάδα 5.1 και συγκεκριμένα στους κλάδους I, VI, WPC1 και WPC2.

Εκτός από τα κυανοβακτήρια του γένους *Synechococcus*, στην γονιδιακή βιβλιοθήκη βρέθηκαν και κλώνοι που αντιστοιχούν σε κυανοβακτήρια των γενών *Synechocystis* και *Leptolyngbya*, με χαμηλή όμως ομολογία (70 - 90%) (Πίνακας 8.4).

Πίνακας 4.3: Γεωγραφική κατανομή των φυλογενετικών ομάδων *Synechococcus* στη θάλασσα

Φυλογενετική Ομάδα <i>Synechococcus</i>	Πηγή ή διανομή που έχει αναφερθεί
Ομάδα 5.1	
I	Νερά εύκρατων και πολικών περιοχών, συνύπαρξη με την ομάδα IV [246, 248]
II	Τροπικά / υποτροπικά ύδατα [243, 246]
III	Ολιγοτροφικά ύδατα [246]
IV	Νερά εύκρατων και πολικών περιοχών, συνύπαρξη με την ομάδα I [246, 248]
V-VII	Ωκεανοί [246]
VIII	Υπερ-αλατούχα ύδατα [239]
IX	Εντοπίζονται σπάνια [246]
XI-XIV	Κυρίαρχο στον Κόλπο της Ακάμπα [245]
XV/XVI	Θάλασσα των Σαργασών (απομονωμένες και περιβαλλοντικές αλληλουχίες) [244]
CRD1/CRD2	Κόστα Ρίκα (κυρίαρχο) [250]
WPC1/WPC2	Ανατολική Θάλασσα της Κίνας και Ανατολική θάλασσα (απομονωμένες και περιβαλλοντικές αλληλουχίες) [219]
CB1-CB3	Κόλπος Chesapeake, καλοκαίρι [249, 251]
Ομάδα 5.2	
CB4	Κόλπος Chesapeake, καλοκαίρι [249, 251]
CB5	Κόλπος Chesapeake, καλοκαίρι [249, 251]
Ομάδα 5.3	Μεσόγειος, Ανατολική Θάλασσα και Θάλασσα των Σαργασών [219, 239, 244]

Στη συνέχεια προχωρήσαμε σε NGS για λεπτομερέστερη μελέτη των κυανοβακτηριακών πληθυσμών. Η NGS έγινε για το 16S rDNA γονίδιο. Η μελέτη περιορίστηκε στις δύο θέσεις δειγματοληψίας (Αμφιλοχία και Πρέβεζα), σε δυο εποχές (χειμώνα και καλοκαίρι).

Με βάση τους δείκτες ποικιλομορφίας, στον χειμώνα έχουμε λιγότερες κυρίαρχες OTU σε σχέση με το καλοκαίρι. Και στις δύο εποχές οι δείκτες ποικιλότητας Shannon και ENS, είναι σχεδόν ίδιοι υποδεικνύοντας ότι η βιοποικιλότητα των δειγμάτων δεν διαφέρει. Ο δείκτης Piellou είναι αυξημένος τον χειμώνα, συγκριτικά με το καλοκαίρι, εξηγώντας ότι οι αναγνώσεις κατανέμονται ομαλά ανάμεσα στις OTU. Οι ίδιοι δείκτες είναι χαμηλότεροι στην Αμφιλοχία συγκριτικά με την Πρέβεζα. Μάλιστα, ο δείκτης

ENS που αφορά την πραγματική βιοποικιλότητα είναι κατά πολύ μεγαλύτερος στην Πρέβεζα.

Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς αποκάλυψε πως τα γένη των κυανοβακτηρίων που κυριαρχούν στο νερό του Αμβρακικού κόλπου είναι τα *Synechococcus*, *Cyanobium* και κάποια unclassified. Αυτά εντοπίστηκαν σε όλα τα δείγματα της NGS ανάλυσης. Προκαλεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον ότι μόλις 7 OTU είναι κοινές σε όλα τα δείγματα, ενώ 4 από αυτές καλύπτουν >90% του δείγματος. Το πλήθος των σπάνιων OTU (<0.1%) διαφέρει ανά θέση και ανά εποχή.

Για τον φυλογενετικό καθορισμό των OTU χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων SILVA. Επιπλέον οι 7 OTU που βρίσκονται σε όλα τα δείγματα, χαρακτηρίστηκαν και με δεδομένα από την βάση δεδομένων NCBI (nr/nt και 16S ribosomal sequences (Bacteria and Archaea)) (Πίνακας 8.6). Όλες οι OTU ανήκουν σε βακτήρια του γένους *Synechococcus* με ομολογία μεγαλύτερη από 97%. Αυτό δικαιολογεί και τα αποτελέσματα από τις βιβλιοθήκες που αναφέρθηκαν νωρίτερα.

Οι δύο βάσεις δεδομένων (SILVA και NCBI) που χρησιμοποιήσαμε στη συγκεκριμένη μελέτη, έχουν μικρές διαφορές μεταξύ τους.

Η βάση δεδομένων SILVA [252] περιέχει ταξινομικές πληροφορίες για Βακτήρια, Αρχαία και Ευκαρυωτικά. Βασίζεται κυρίως σε φυλογένεση για τις μικρές υπομονάδες των rDNA (16S για προκαρυωτικά και 18S για ευκαρυωτικά). Οι πληροφορίες ταξινομικής κατάταξης για τα Αρχαία και τα Βακτήρια προέρχονται από τα Taxonomic Outlines της Bergey [253-255] και από τον Κατάλογο Ονοματολογίας Προκαρυωτικών (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature - LPSN) [256], ενώ η ευκαρυωτική ταξινόμηση βασίζεται στις κοινές απόψεις της Διεθνούς Εταιρείας Πρωτίστων [209, 257, 258]. Οι ταξινομήσεις στη βάση δεδομένων SILVA επιμελούνται χειροκίνητα [252]. Τον Δεκέμβριο του 2019, υπήρχαν 9400000 κατατεθειμένες αλληλουχίες και με βάση αυτές έγινε η σύγκριση των αποτελεσμάτων μας.

Η ταξινόμηση NCBI [259] περιέχει τα ονόματα όλων των οργανισμών που σχετίζονται με τις βάσεις δεδομένων αλληλουχιών του NCBI. Χειρίζεται επιμελώς με βάση τη συστηματική βιβλιογραφία και χρησιμοποιεί πάνω από 150 πηγές, για παράδειγμα, τον Κατάλογο της Ζωής [260], την Εγκυκλοπαίδεια της Ζωής [261], το Name Bank [262] και το Wiki Species [263] καθώς και ορισμένες συγκεκριμένες βάσεις δεδομένων αφιερωμένες σε συγκεκριμένες ομάδες οργανισμών. Περιέχει μερικά διπλά ονόματα που αντιπροσωπεύουν διαφορετικούς οργανισμούς. Κάθε κόμβος έχει επιστημονικό όνομα και μπορεί να έχει ορισμένα συνώνυμα [259]. Τα αρχεία ταξινόμησης NCBI ενημερώνονται καθημερινά. Τον Δεκέμβριο του 2019 υπήρχαν κατατεθειμένες 215333020 αλληλουχίες και με βάση αυτές έγινε η σύγκριση των αποτελεσμάτων μας.

Εκτός από αυτές τις δύο βάσεις δεδομένων υπάρχουν και οι RDP, Greengenes και OTT. Μελέτες που συγκρίνουν τις βάσεις δεδομένων μεταξύ

τους για την ανάλυση αποτελεσμάτων από NGS, καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι ναι μεν η SILVA αφορά κυρίως περιοχές των μικρών ριβοσωμικών υπομονάδων αλλά τα αποτελέσματά της είναι αξιόπιστα μέχρι την βαθμίδα του γένους. Από την άλλη η ταξινόμηση με βάση το NCBI είναι πιο ενημερωμένη και ακριβής ακόμη και στην βαθμίδα του Είδους. Καλό είναι πάντως να συνδυάζονται αποτελέσματα και από τις δύο αυτές βάσεις δεδομένων [264].

Ως εκ τούτου, συνίσταται η χρήση της ταξινόμησης NCBI ως κοινού πλαισίου κατά τη σύγκριση των αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικές ταξινομικές ταξινομήσεις. Ενώ η ταξινομία SILVA χρησιμοποιείται ευρέως για τις μελέτες 16S, θα πρέπει να εξεταστεί η χρήση της ταξινόμησης NCBI [264].

Η ύπαρξη τόσων λίγων κυρίαρχων OTU μπορεί να ερμηνευθεί με δύο τρόπους:

- α) τα συγκεκριμένα βακτήρια έχουν προσαρμοστεί καλά στις συνθήκες του Αμβρακικού κόλπου και δεν αφήνουν άλλα κυανοβακτήρια να αναπτυχθούν εξίσου εύκολα. Έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές ότι τα *Synechococcus* προσαρμόζονται εύκολα σε διαφορετικά περιβάλλοντα [219] και για τον σκοπό αυτό έχουν προσαρμόσει την διάμετρο του κυττάρου τους στο ελάχιστο δυνατό μέγεθος [265].
- β) Μια άλλη εξήγηση είναι ότι η μικρή γενετική ποικιλομορφία του Αμβρακικού σε επίπεδο κυανοβακτηρίων μπορεί να είναι αποτέλεσμα του ευτροφισμού. Δεδομένου ότι, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα τα μακροφυκη είναι ελάχιστα [17], οι παραγωγοί του οικοσυστήματος έχουν μικρή ποικιλομορφία και το οικοσύστημα μπορεί να χαρακτηριστεί εύθραυστο.

Αν και στην NGS ανάλυση, η ποικιλία των δειγμάτων ανακτήθηκε ικανοποιητικά, δεν βρέθηκε κάποιο κυανοβακτήριο να ανήκει σε γένος που ξέρουμε πως παράγει μικροκυστίνη (*Microcystis*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Oscillatoria*).

4.5. Εμπλουτισμένη καλλιέργεια κυανοβακτηρίων από δείγματα του Αμβρακικού Κόλπου

Στο πλαίσιο της μελέτης των δυνητικά τοξικών κυανοβακτηρίων στον Αμβρακικό κόλπο, θελήσαμε να διαπιστώσουμε αν υπάρχει δυνατότητα απομόνωσης τοξικών κυανοβακτηρίων έπειτα από καλλιέργεια.

Για την καλλιέργεια κυανοβακτηρίων από δείγμα του Αμβρακικού Κόλπου, χρησιμοποιήθηκε το υγρό θρεπτικό υλικό BG11. Συνολικά απομονώσαμε 20 εμπλουτισμένες καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο.

Από τις καλλιέργειες αυτές πραγματοποιήσαμε εκχύλιση πιθανών τοξινών σε υδατικό διάλυμα μεθανόλης 75% και τα κυτταρικά εκχυλίσματα ελέγχθηκαν για την ύπαρξη μικροκυστινών με τη μέθοδο της ELISA.

Από τις 20 εμπλουτισμένες καλλιέργειες βρέθηκε να παράγει μικροκυστίνη μόνο μια. Η καλλιέργεια αυτή χαρακτηρίστηκε μοριακά μέσω ενίσχυσης του 16S rDNA και αλληλούχισης επόμενης γενιάς. Από την ανάλυση αυτή προέκυψαν 30 OTU. Το 43% του πληθυσμού των OTU είναι βακτήρια του γένους *Thalassospira*, ενώ υπάρχει και 1 OTU με 7 αναγνώσεις του κυανοβακτηρίου *Microcystis aeruginosa* με ομολογία 98%. Η σύγκριση των αλληλουχιών των OTU στη βάση δεδομένων SILVA, έδειξε και κάποιες αλληλουχίες «άγνωστες». Οι αλληλουχίες αυτές, στη βάση δεδομένων NCBI χαρακτηρίζονται ως κυανοβακτήρια (*Synechococcus* ή *Microcystis*) με χαμηλή όμως ομολογία (<95%).

Αν και τα κυανοβακτήρια του γένους *Microcystis* είναι χαρακτηριστικά των γλυκών νερών, από το 2012 και μετά έχουν καταγραφεί αρκετά στελέχη του *Microcystis* και σε αλμυρά ή υφάλμυρα ύδατα [266]. Αν και τα περισσότερα κυανοβακτήρια γλυκού νερού δεν μπορούν να επιβιώσουν για παρατεταμένες περιόδους σε αλατούχα νερά, κάποια γένη έχουν σχετικά υψηλή ανοχή σε αλάτι. Πολλά κοινά γένη που παράγουν μικροκυστίνες (*Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Microcystis* και *Oscillatoria*) μπορεί ακόμη και να επιδείξουν ταχείς ρυθμούς ανάπτυξης σε αλατούχα περιβάλλοντα [77, 83, 233]. Γενικά τα *Microcystis*, επιβιώνουν σε ύδατα υψηλής αλατότητας μόνο για μικρό χρονικό διάστημα (από λίγες μέρες μέχρι λίγες ώρες) [93, 267-271]. Μόνο μία μελέτη κατέδειξε ότι το *Microcystis spp.* μπορούν να επιβιώσουν στο θαλασσινό νερό (μέση αλατότητα 35). Ο Miller et al (2010) [272] βρήκαν *Microcystis spp.* θα μπορούσε να επιβιώσει σε πειραματικό περιβάλλον για περίπου 48 ώρες όταν καλλιεργείται σε θαλασσινό νερό από τον Monterey Bay της Καλιφόρνια.

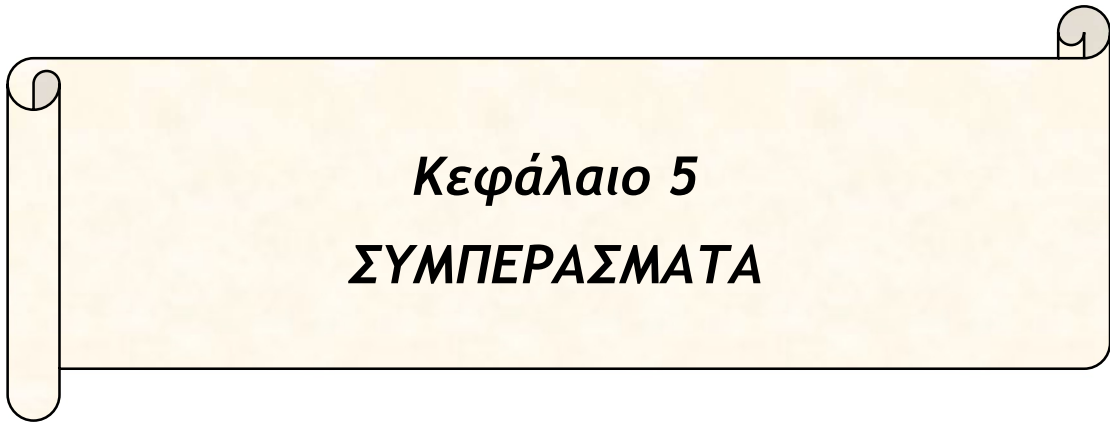
Στην εμπλουτισμένη καλλιέργεια A10, η αλατότητα είναι 34‰ και υπάρχουν κυανοβακτήρια του γένους *Microcystis*.

Προκειμένου να ελέγξουμε την ύπαρξη γονιδίων του οπερονίου παραγωγής της μικροκυστίνης στη καλλιέργεια αυτή ελέγξαμε με PCR την ύπαρξη των περιοχών NMT και cd του γονιδίου *mscA*, υπεύθυνο για την παραγωγή μικροκυστίνης (Εικόνα 1.10). Από αυτά θετικό αποτέλεσμα έδειξε μόνο αυτό για το *mscA*-NMT. Το προϊόν κλωνοποιήθηκε και αλληλουχήθηκε. Τα αποτελέσματα έδειξαν ομοιότητα 100% με τα αντίστοιχα γονίδια των κυανοβακτηρίων του γένους *Microcystis*.

Η αδυναμία πολλαπλασιασμού μέσω PCR της περιοχής *mscA*-Cd μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το γονίδιο αυτό: είναι σε μικρή ποσότητα [9, 268] ή απουσιάζει ή έχει μεταλλαχθεί και δεν αναγνωρίζεται από τους εκκινητές. Μέχρι σήμερα είναι γνωστό πως για την παραγωγή της μικροκυστίνης είναι απαραίτητα όλα τα γονίδια του οπερονίου και ότι αυτά βρίσκονται μια φορά σε κάθε οπερόνιο. Δεδομένου ότι η PCR για το γονίδιο *mscA*-NMT ήταν θετική,

το γονίδιο *mcyA-Cd* δεν μπορεί ούτε να είναι σε μικρή ποσότητα, ούτε να απουσιάζει.

Από τις παραπάνω παρατηρήσεις μπορούμε εύκολα να συμπεράνουμε ότι κάποιος από τους οργανισμούς που παράγουν την μικροκυστίνη υπάρχει στην καλλιέργεια. Αν πρόκειται για κυανοβακτήρια, αυτά ανήκουν στο γένος *Microcystis*.



Κεφάλαιο 5
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη παρούσα εργασία μελετήσαμε στον Αμβρακικό Κόλπο, έναν μοναδικό βιότοπο με εξαιρετική σημασία για την διατήρηση της βιοποικιλότητας κάθε μορφής υδατικής ζωής, την ύπαρξη θαλασσιών βιοτοξινών και με τη χρήση μοριακών τεχνικών προσπαθήσαμε να ταυτοποιήσουμε τους μικροοργανισμούς που πιθανά τις παράγουν. Η συγκεκριμένη μελέτη χωρίστηκε σε τρία μέρη: α) ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος της ύπαρξης θαλασσιών βιοτοξινών σε ιστούς μυδιών, β) μοριακός χαρακτηρισμός των βιοκοινοτήτων κυανοβακτηρίων και πρωτίστων και γ) καλλιέργειες κυανοβακτηρίων από το νερό του Αμβρακικού Κόλπου με σκοπό την απομόνωση τοξικών ειδών.

Στο πρώτο μέρος, ελέγξαμε την ύπαρξη και την συγκέντρωση πέντε θαλασσιών βιοτοξινών (μπρεβετοξίνες, σαξιτοξίνες, μικροκυστίνες, οκαδαϊκό οξύ και δομοϊκό οξύ) σε ιστούς μυδιών με την μέθοδο της ELISA. Πιο συγκεκριμένα:

- Στα μύδια από τον Αμβρακικό Κόλπο, σε όλες τις θέσεις δειγματοληψίας, όλες τις εποχές επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη τεσσάρων από τις πέντε τοξίνες που μελετήσαμε (μπρεβετοξίνες, μικροκυστίνες, οκαδαϊκό οξύ και δομοϊκό οξύ). Οι σαξιτοξίνες ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου.
- Οι συγκεντρώσεις των μπρεβετοξινών σε όλα τα δείγματα είναι μικρότερες από το όριο ασφαλείας που έχει θεσπίσει ο FDA. Οι δικές μας μετρήσεις κυμαίνονται μεταξύ 1.65 και 68.25 ng/g ww. Φαίνεται να είναι αυξημένη η συγκέντρωσή τους τον χειμώνα και την άνοιξη σε σχέση με τις άλλες εποχές.
- Σχετικά με το οκαδαϊκό οξύ, οι συγκεντρώσεις του στους ιστούς των μυδιών στην μελέτη μας είναι μετρήσιμες (19,6 - 494,1ng/g) και κάποιες από αυτές είναι υψηλότερες από το όριο ασφαλείας που έχει θεσπίσει η ΕΕ.
- Παρατηρώντας την συγκέντρωση του δομοϊκού οξέος κατά την διάρκεια του έτους, καταλήγουμε στο συμπέρασμα το φθινόπωρο, σε σχέση με τις άλλες εποχές, εμφανίζονται υψηλότερες συγκεντρώσεις δομοϊκού οξέος. Σε όλα όμως τα δείγματα, οι συγκεντρώσεις που προσδιορίσαμε είναι κατά πολύ μικρότερες από αυτές του ορίου ασφαλείας της ΕΕ.
- Σε αντίθεση με τις προηγούμενες τοξίνες που αναφέρθηκαν, η παρουσία της μικροκυστίνης στα μύδια από τον Αμβρακικό Κόλπο είναι έντονη (18,6 - 117,5ng/g) σε όλη τη διάρκεια του έτους. Η ανεκτή ποσότητα καθημερινής κατανάλωσης μικροκυστίνης από έναν ενήλικα 70kg είναι 18ng/g. Όλα τα δείγματα που είχαμε ήταν πάνω από αυτό το όριο ασφαλείας.

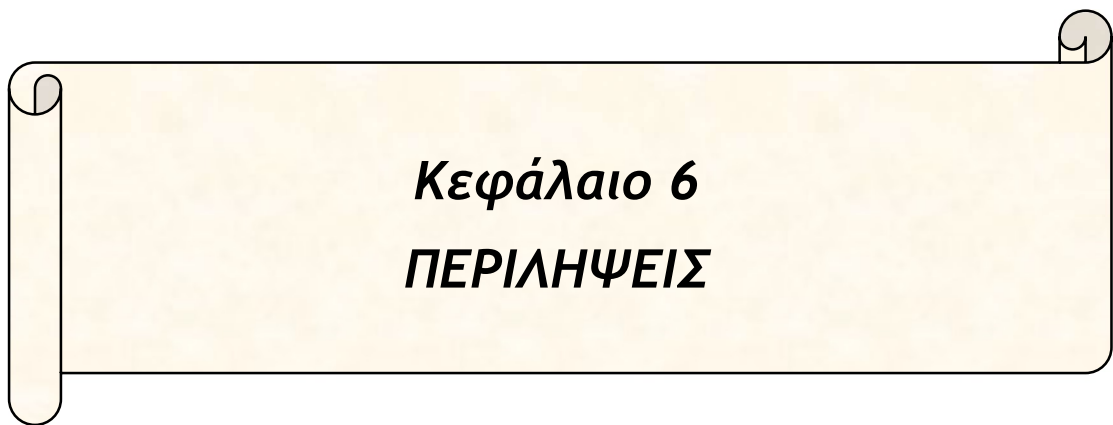
Στο δεύτερο μέρος, ασχοληθήκαμε με τον μοριακό χαρακτηρισμό των βιοκοινοτήτων των κυανοβακτηρίων και πρωτίστων στο επιφανειακό νερό του Αμβρακικού Κόλπου, με έμφαση στα δυνητικά τοξικά είδη αυτών. Πιο συγκεκριμένα:

- Διαπιστώσαμε ότι τα περισσότερα κυανοβακτήρια ανήκουν στο γένος *Synechococcus* και συγκεκριμένα στην ομάδα 5.3.
- Υπάρχουν 7 κοινές OTU κυανοβακτηρίων σε όλα τα δείγματα μας, ενώ 4 από αυτές καλύπτουν >90% του πληθυσμού των κυανοβακτηρίων. Όλες ανήκουν στο γένος *Synechococcus*.
- Αν και στην NGS ανάλυση, η ποικιλία των δειγμάτων ανακτήθηκε ικανοποιητικά, δεν βρέθηκε κάποιο κυανοβακτήριο να ανήκει σε γένος που ξέρουμε πως παράγει μικροκυστίνη (*Microcystis*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Oscillatoria*).
- Στην βιοκοινότητα των πρωτίστων, οι διαφορές μεταξύ των θέσεων δειγματοληψίας (δείκτες βιοποικιλότητας, πλήθος OTU) είναι πιο έντονες σε σχέση με τις διαφορές ανάμεσα στις εποχές.
- Τα περισσότερα πρώτιστα ανήκουν στην υπερσυνομοταξία των *Κυψελιδωτών* (*Alveolata*) και στην συνομοταξία των *Δινομαστιγωτών* (*Dinoflagellata*).
- Μεταξύ των δειγμάτων, υπάρχουν 23 OTU πρωτίστων, παρούσες σε όλα τα δείγματά μας, με 11 από αυτές να είναι άφθονες (>1% του δείγματος). Η ποσοστιαία σύστασή τους ανάμεσα στα δείγματα μεταβάλλεται και ως προς τη θέση δειγματοληψίας και ως προς την εποχή, χωρίς να ακολουθείται κάποιο πρότυπο.
- Στο σύνολο των OTU των πρωτίστων από τα γνωστά δυνητικά τοξικά γένη υπάρχουν τα *Alexandrium* και *Gymnodinium* (ASP) και *Prorocentrum* και *Dinophysis* (DSP).
- Ο αριθμός των αναγνώσεων των OTU των δυνητικά τοξικών γενών πρωτίστων είναι πολύ μικρός για να δικαιολογεί την παραγωγή τοξινών σε μετρήσιμες ποσότητες. Επιπλέον, δεν βρέθηκαν αναγνώσεις OTU δυνητικά τοξικών κυανοβακτηρίων. Βέβαια, τα μύδια συγκεντρώνουν τις τοξικές αυτές ουσίες στους ιστούς τους, ενώ το δείγμα από το οποίο έγινε η απομόνωση γενετικού υλικού είναι επιφανειακό νερό.

Στο τρίτο και τελευταίο μέρος της εργασίας μας, προσπαθήσαμε να καλλιεργήσουμε κυανοβακτήρια που παράγουν μικροκυστίνη. Ξεκινώντας από 20 διαφορετικές εμπλουτισμένες καλλιέργειες, μόνο μια βρέθηκε να παράγει μικροκυστίνη μετά από διαδοχικές ανακαλλιέργειες. Μοριακός χαρακτηρισμός της συγκεκριμένης καλλιέργειας έδειξε την ύπαρξη OTU που αντιστοιχούν σε κυανοβακτήρια του γένους *Microcystis*. Στη συνέχεια, διερευνήσαμε την ύπαρξη δύο περιοχών του οπερονίου παραγωγής μικροκυστίνης (*mcyA-NMT* και *mcyA-Cd*) και πήραμε θετικό αποτέλεσμα μόνο για το γονίδιο *mcyA-NMT*. Η αδυναμία πολλαπλασιασμού μέσω PCR του γονιδίου *mcyA-Cd* μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το γονίδιο αυτό: είναι σε μικρή ποσότητα ή απουσιάζει ή έχει μεταλλαχθεί και δεν αναγνωρίζεται από τους εκκινητές. Μέχρι σήμερα είναι γνωστό πως για την παραγωγή της μικροκυστίνης είναι απαραίτητα όλα τα γονίδια του οπερονίου και ότι αυτά βρίσκονται μια φορά σε κάθε οπερόνιο. Δεδομένου ότι η PCR για το γονίδιο

msyA-NMT ήταν θετική, το γονίδιο mcyA-Cd δεν μπορεί ούτε να είναι σε μικρή ποσότητα, ούτε να απουσιάζει.

Πιθανόν τα κυανοβακτήρια του γένους Microcystis που υπάρχουν στην καλλιέργεια αυτή και αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό υψηλής αλατότητας (32‰) να είναι οι παραγωγοί μικροκυστίνης.



Κεφάλαιο 6
ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

“Μοριακός χαρακτηρισμός δυνητικώς τοξικών στελεχών βακτηρίων και πρωτίστων από υδάτινα οικοσυστήματα: το παράδειγμα του Αμβρακικού Κόλπου”

Η ραγδαία αύξηση ή συσσώρευση πληθυσμού φυκών σε υδάτινα οικοσυστήματα με ταυτόχρονη παραγωγή βιοτοξινών είναι ένα φαινόμενο γνωστό ως επιβλαβής άνθιση φυκών (HAB - Harmful Algal Bloom). Οι βιοτοξίνες αυτές παράγονται από πλαγκτονικούς οργανισμούς (κυανοβακτήρια και πρώτιστα) και συσσωρεύονται στα οστρακοειδή. Κατανάλωση οστρακοειδών που περιέχουν βιοτοξίνες απειλεί την ανθρώπινη υγεία μέσω δηλητηριάσεων. Αναλόγως των συμπτωμάτων που προκαλούν, οι δηλητηριάσεις αυτές διακρίνονται σε: Αμνησιακή δηλητηρίαση (ASP) (τοξίνη: δομοϊκό οξύ), Παραλυτική δηλητηρίαση (PSP) (σαξιτοξίνες), Ηπατική δηλητηρίαση (HSP) (μικροκυστίνες), Διαρροϊκή δηλητηρίαση (DSP) (οκαδαϊκό οξύ και δινοφουσιοτοξίνες) και Νευροτοξική δηλητηρίαση (NSP) (μπρεβετοξίνες).

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει παρατηρηθεί αύξηση των HAB σε παγκόσμια κλίμακα. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της κλιματικής αλλαγής όσο και της ανάπτυξης νέων μεθόδων παρακολούθησης των HAB. Λόγω της επικινδυνότητας των βιοτοξινών που παράγονται κατά τη διάρκεια ενός HAB, ο FDA (FAO 2004) και η ΕΕ (ΕΚ853/2004) έχουν θεσπίσει οδηγίες και κανονισμούς για την συγκέντρωση των θαλασσιών βιοτοξινών στα δίθυρα μαλάκια, χωρίς να απειλείται η ανθρώπινη υγεία. Η Ελλάδα ακολουθεί τις οδηγίες αυτές με ένα πρόγραμμα παρακολούθησης της συγκέντρωσης των θαλάσσιων βιοτοξινών σε δίθυρα μαλάκια. Στην Ελλάδα, απαγόρευση συγκομιδής μυδιών από μυδοκαλλιέργειες συμβαίνει σχεδόν σε ετήσια βάση, αλλά για μικρό χρονικό διάστημα. Μεταξύ των περιοχών που συμβαίνει αυτό είναι και ο Αμβρακικός Κόλπος, ένας βιότοπος εξαιρετικής οικολογικής σημασίας. Από προηγούμενα ερευνητικά δεδομένα, έχει αναφερθεί η ύπαρξη τοξινών αμνησιακής, παραλυτικής, ηπατικής, διαρροϊκής και νευροτοξικής δηλητηρίασης. Οι οργανισμοί που έχουν ενοχοποιηθεί για την παραγωγή των τοξινών αυτών έχουν προσδιοριστεί μόνο με μικροσκοπική παρατήρηση.

Στη παρούσα εργασία μελετήσαμε την ύπαρξη θαλασσιών βιοτοξινών σε ιστούς μυδιών που συλλέχθηκαν εποχικά από έξι θέσεις δειγματοληψίας περιμετρικά του Αμβρακικού Κόλπου. Ο προσδιορισμός των βιοτοξινών έγινε με εξειδικευμένα για κάθε τοξίνη δοκιμασία, με την μέθοδο της ELISA. Επιβεβαιώσαμε την ύπαρξη τεσσάρων από τις πέντε τοξίνες που μελετήσαμε (μπρεβετοξίνες, μικροκυστίνες, οκαδαϊκό οξύ και δομοϊκό οξύ). Οι σαξιτοξίνες ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου.

Οι συγκεντρώσεις των μπρεβετοξινών σε όλα τα δείγματα (1,65 - 68,25ng/g ww) είναι μικρότερες από το όριο ασφαλείας που έχει θεσπίσει ο FDA. Σχετικά με το οκαδαϊκό οξύ, οι συγκεντρώσεις του στους ιστούς των μυδιών στην

μελέτη μας είναι μετρήσιμες (19,6 - 494,1ng/g) και τρεις από αυτές είναι υψηλότερες από το όριο ασφαλείας που έχει θεσπίσει η ΕΕ.

Η συγκέντρωση του δομοϊκού οξέος κατά την διάρκεια του έτους, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις εμφανίζονται το φθινόπωρο. Σε όλα όμως τα δείγματα, οι συγκεντρώσεις που προσδιορίσαμε είναι κατά πολύ μικρότερες από αυτές του ορίου ασφαλείας της ΕΕ.

Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες τοξίνες που αναφέρθηκαν, η παρουσία της μικροκυστίνης στα μύδια από τον Αμβρακικό Κόλπο είναι έντονη (18,6 - 117,5ng/g) σε όλη τη διάρκεια του έτους. Η ανεκτή ποσότητα καθημερινής κατανάλωσης μικροκυστίνης από έναν ενήλικα 70kg είναι 18ng/g. Όλα τα δείγματα που είχαμε ήταν πάνω από αυτό το όριο ασφαλείας.

Από δείγματα επιφανειακού νερού, προσπαθήσαμε να ταυτοποιήσουμε τους μικροοργανισμούς που πιθανά παράγουν τις τοξίνες αυτές, χρησιμοποιώντας μοριακές τεχνικές. Πιο συγκεκριμένα κατασκευάσαμε μια γονιδιακή βιβλιοθήκη για την περιοχή 16S-ITS-23S rDNA των κυανοβακτηρίων. Τα περισσότερα κυανοβακτήρια ανήκουν στο γένος *Synechococcus* και συγκεκριμένα στην ομάδα 5.3. Κυανοβακτήρια της ομάδας αυτής εμφανίζονται κυρίως στην Μεσόγειο, στη Θάλασσα των Σαργασσών και στην Ανατολική Θάλασσα.

Για λεπτομερέστερη ανάλυση της βιοποικιλότητας των κυανοβακτηρίων και των πρωτίστων, συνεχίσαμε με αλληλούχιση νέας γενιάς (NGS).

Τα αποτελέσματα της NGS ανάλυσης δείχνουν την ύπαρξη 7 κοινών OTU κυανοβακτηρίων σε όλα τα δείγματα μας, ενώ 4 από αυτές καλύπτουν >90% του πληθυσμού των κυανοβακτηρίων. Όλες ανήκουν στο γένος *Synechococcus*. Δεν βρέθηκε κάποιο κυανοβακτήριο να ανήκει σε γένος που ξέρουμε πως παράγει μικροκυστίνη (*Microcystis*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Oscillatoria*).

Στην βιοκοινότητα των πρωτίστων, οι διαφορές μεταξύ των θέσεων δειγματοληψίας είναι πιο έντονες σε σχέση με τις διαφορές ανάμεσα στις εποχές. Τα περισσότερα πρώτιστα ανήκουν στην υπερσυνομοταξία των *Κυψελιδωτών* (*Alveolata*) και στην συνομοταξία των *Δινομαστιγωτών* (*Dinoflagellata*). Μεταξύ των δειγμάτων, υπάρχουν 23 OTU πρωτίστων, παρούσες σε όλα τα δείγματά μας, με 11 από αυτές να είναι άφθονες (>1% του δείγματος). Η ποσοστιαία σύστασή τους ανάμεσα στα δείγματα μεταβάλλεται και ως προς τη θέση δειγματοληψίας και ως προς την εποχή, χωρίς να ακολουθείται κάποιο πρότυπο. Στο σύνολο των OTU των πρωτίστων από τα γνωστά δυνητικά τοξικά γένη υπάρχουν τα *Alexandrium* και *Gymnodinium* - υπεύθυνα για την παραγωγή τοξινών παραλυτικής δηλητηρίασης - και *Prorocentrum* και *Dinophysis* - υπεύθυνα για την παραγωγή τοξινών διαρροϊκής δηλητηρίασης.

Ο αριθμός των αναγνώσεων των OTU των δυνητικά τοξικών γενών πρωτίστων είναι πολύ μικρός για να δικαιολογεί την παραγωγή τοξινών σε μετρήσιμες ποσότητες. Επιπλέον, δεν βρέθηκαν αναγνώσεις OTU δυνητικά

τοξικών κυανοβακτηρίων. Βέβαια, τα μύδια συγκεντρώνουν τις τοξικές αυτές ουσίες στους ιστούς τους, ενώ το δείγμα από το οποίο έγινε η απομόνωση γενετικού υλικού είναι επιφανειακό νερό

Στο τρίτο και τελευταίο μέρος της εργασίας μας, προσπαθήσαμε να καλλιεργήσουμε κυανοβακτήρια που παράγουν μικροκυστίνη. Ξεκινώντας από 20 διαφορετικές εμπλουτισμένες καλλιέργειες, μόνο μια βρέθηκε να παράγει μικροκυστίνη μετά από διαδοχικές ανακαλλιέργειες. Μοριακός χαρακτηρισμός της συγκεκριμένης καλλιέργειας έδειξε την ύπαρξη OTU που αντιστοιχούν σε κυανοβακτήρια του γένους *Microcystis*. Στη συνέχεια, διερευνήσαμε την ύπαρξη δύο γονιδίων του οπερονίου παραγωγής μικροκυστίνης (*mcyA-NMT* και *mcyA-Cd*) και πήραμε θετικό αποτέλεσμα μόνο για το γονίδιο *mcyA-NMT*.

Η παρούσα διατριβή αποκαλύπτει ότι ο Αμβρακικός Κόλπος είναι ένα οικοσύστημα, με μεγάλη βιοποικιλότητα και ετερογένεια ακόμη κυρίως στα πρώτιστα. Από τις τοξίνες που μελετήθηκαν, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μικροκυστίνη. Επόμενες μελέτες μπορούν να επικεντρωθούν στην απομόνωση εκείνων των κυανοβακτηρίων που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή μικροκυστίνης.

“Molecular characterization of potentially toxic strains of bacteria and protists from aquatic ecosystems: the example of the Amvrakikos Gulf”

Harmful algal blooms, or HABs, occur when colonies of algae – simple plants that live in the sea and freshwater – grow out of control and produce toxic or harmful effects on people, fish, shellfish, marine mammals and birds. The human illnesses caused by HABs, though rare, can be debilitating or even fatal. Consumption of shellfish containing biotoxins threatens human’s health through poisoning. Depending on the symptoms they cause, these poisonings are classified as: Amnesic Poisoning (ASP) (toxin: Domoic Acid), Paralytic Poisoning (PSP) (Saxitoxins), Hepatic Poisoning (HSP) (Microcystins), Diarrhea Poisoning (DSP)(Okadaic acid and dinophysotoxins) and Neurotoxic Poisoning (NSP) (Brevetoxins).

There has been an increase in HABs globally in recent decades. This is because of climate change and the development of new methods for HAB monitoring. Due to the risk of biotoxins produced during an HAB, the FDA (FAO 2004) and the EU (EC853 / 2004) have established guidelines and regulations for the concentration of marine biotoxins in bivalve molluscs, without endangering human health. Greece follows these guidelines with a monitoring program for the concentration of marine biotoxins in bivalve molluscs. In Greece, the ban on harvesting from mussel cultivation occurs almost annually, but for a short time. Among the areas that occur is the Amvrakikos Gulf, a habitat of exceptional ecological importance. From previous research data, toxins of amnesic, paralytic, hepatic, diarrheal and neurotoxic poisoning have been reported. The organisms that have been implicated in the production of these toxins have only been identified by microscopic observation.

In the present work, we investigated the presence of marine biotoxins in mussel tissues collected seasonally from six sampling sites around the Gulf of Amvrakikos. The biotoxins were determined by a specific toxin assay using the ELISA method. We confirmed the presence of four of the five toxins we studied (brevetoxins, microcystins, okadaic acid and domoic acid). Saxitoxins were below the detection limit of the method.

The brevetoxins concentrations in all samples (1.65 - 68.25 ng/g ww) are lower than the FDA-approved safety limit. Concerning okadaic acid, its concentrations in mussel tissues in our study are measurable (19.6 - 494.1 ng/g ww) and three of them are higher than the EU safety limit. The highest concentration of domoic acid during the year appear in the autumn. In all samples, however, the concentrations we have determined are below those of the EU safety threshold.

In contrast to the other toxins reported, the presence of microcystin in the mussels from the Amvrakikos Gulf is strong (18.6 - 117.5 ng/g ww) throughout

the year. The daily intake of microcystin consumed by an adult 70kg is 18ng/g. All the samples we had were above this safety limit.

From surface water samples, we attempted to identify the microorganisms that are likely to produce these toxins, using molecular techniques. We constructed a gene library for the 16S-ITS-23S rDNA region of cyanobacteria. Most cyanobacteria belong to the genus *Synechococcus*, to subcluster 5.3. Cyanobacteria of this subcluster occur mainly in the Mediterranean, in the Sargasso Sea and in the East Sea.

For a more detailed analysis of the biodiversity of cyanobacteria and protists, we continued with new generation sequencing (NGS).

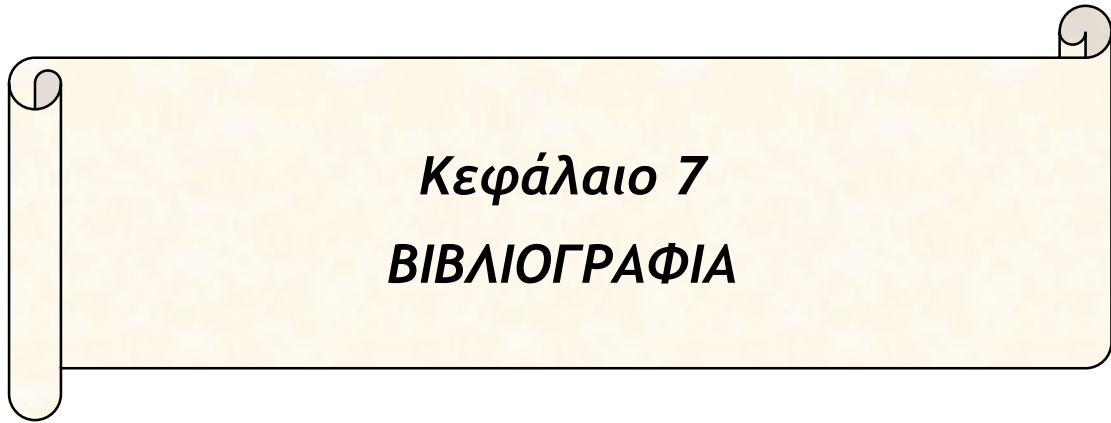
The results of NGS analysis indicate the existence of 7 cyanobacterial OTUs, common in all our samples, with 4 of them covering >90% of the cyanobacterial population. All belong to the genus *Synechococcus*. No cyanobacteria were found to belong to a genus known for microcystin production (*Microcystis*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Oscillatoria*).

As far as protists are concerned, the differences between the sampling sites are more pronounced than the differences between seasons. Most of them belong to the Superphylum: *Alveolata* and the Phylum: *Dinoflagellata*. Among the samples, there are 23 OTU prototypes present in all samples, with 11 of them abundant (>1% of the sample). Their percentage composition among the samples varies both in the sampling location and in the season, without following any standard. Among the OTUs of the protista of the known potentially toxic genera are *Alexandrium* and *Gymnodinium* - responsible for PSP - and *Prorocentrum* and *Dinophysis* - responsible for DSP.

The readings of OTUs of potentially toxic primary genus is too small to justify the production of toxins in measurable quantities. In addition, no readings of potentially toxic cyanobacterial OTUs were found. Of course, mussels concentrate these toxins in their tissues, and the sample from which the genetic material was isolated is surface water.

In the third and final part of our work, we tried to cultivate microcystin-producing cyanobacteria. Starting from 20 different enriched cultures, only one was found to produce microcystin after successive passages. Molecular characterization of this culture showed the presence of OTUs corresponding to cyanobacteria of the genus *Microcystis*. We then investigated the existence of two genes in the microcystin-producing operon (*mcyA-NMT* and *mcyA-Cd*) and obtained a positive result only for the *mcyA-NMT* gene.

The present thesis reveals that the Amvrakikos Gulf is an ecosystem, with great biodiversity and heterogeneity still in the protists bio-community. Of the toxins studied, microcystin is of particular interest. Subsequent studies may focus on the isolation of those cyanobacteria responsible for microcystin production.



Κεφάλαιο 7
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gerssen, A., et al., *Marine toxins: chemistry, toxicity, occurrence and detection, with special reference to the Dutch situation*. 2010(2072-6651 (Electronic)).
2. Havens, K.E., *Complex analyses of plankton structure and function*. The Scientific World Journal, 2001. **1**: p. 119-132.
3. Zanchett, G. and E.C. Oliveira-Filho, *Cyanobacteria and cyanotoxins: from impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects*. 2013(2072-6651 (Electronic)).
4. Berdalet, E., et al., *Marine harmful algal blooms, human health and wellbeing: challenges and opportunities in the 21st century*. LID - 10.1017/S0025315415001733 [doi]. 2015(0025-3154 (Print)).
5. Wormer, L., et al., *First detection of cyanobacterial PSP (paralytic shellfish poisoning) toxins in Spanish freshwaters*. (1879-3150 (Electronic)).
6. Batoreu, M.C., et al., *Risk of human exposure to paralytic toxins of algal origin*. (1382-6689 (Print)).
7. Lefebvre, K.A. and A. Robertson, *Domoic acid and human exposure risks: a review*. 2010(1879-3150 (Electronic)).
8. Wiese, M., et al., *Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs*. 2010(1660-3397 (Electronic)).
9. Vareli, K., et al., *Hepatotoxic seafood poisoning (HSP) due to microcystins: a threat from the ocean?* Marine drugs, 2013. **11**(8): p. 2751-2768.
10. Valdiglesias, V., et al., *Okadaic acid: more than a diarrhetic toxin*. 2013(1660-3397 (Electronic)).
11. Turner, A.D., et al., *Potential threats posed by new or emerging marine biotoxins in UK waters and examination of detection methodology used in their control: brevetoxins*. (1660-3397 (Electronic)).
12. Lewitus, A.J., et al., *Harmful algal blooms along the North American west coast region: History, trends, causes, and impacts*. Harmful Algae, 2012. **19**: p. 133-159.
13. Dursun, F., T. Yurdun, and S. Unlu, *The First Observation of Domoic Acid in Plankton Net Samples from the Sea of Marmara, Turkey*. (1432-0800 (Electronic)).
14. James, K.J., et al., *First evidence of an extensive northern European distribution of azaspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish*. 2002(0041-0101 (Print)).
15. Kilcoyne, J., et al., *Structure Elucidation, Relative LC-MS Response and In Vitro Toxicity of Azaspiracids 7-10 Isolated from Mussels (Mytilus edulis)*. (1520-5118 (Electronic)).
16. Burrell, S., et al., *First detection of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in Icelandic mussels (Mytilus edulis): Links to causative phytoplankton species*. Food Control, 2013. **31**(2): p. 295-301.
17. Deeds, J.R., et al., *First U.S. report of shellfish harvesting closures due to confirmed okadaic acid in Texas Gulf coast oysters*. (1879-3150 (Electronic)).
18. Malhi, N., et al., *A national survey of marine biotoxins in wild-caught abalone in Australia*. (1944-9097 (Electronic)).
19. Theodorou, J.A. and I. Tzovenis, *Managing the risks of the Greek crisis in aquaculture: a SWOT analysis of the Mediterranean mussel farming*. Agricultural Economics Review, 2017. **18**(2): p. 18-29.
20. A., B., *Δυνατότητες βελτιστοποίησης της διαχείρισης της παραγωγής και της διάθεσης των μυδιών των Ελληνικών μυδοκαλλιεργειών σε συνάρτηση με τις χρονικές περιόδους εμφάνισης τοξικών επεισοδίων από λιτόφιλες βιοτοξίνες, in ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «Υδατοκαλλιέργειες» - «Παθολογικά Προβλήματα Εκτρεφόμενων Υδρόβιων*

Οργανισμών» ΣΕ ΣΥΜΠΡΑΞΗ ΜΕ ΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΧΘΥΟΚΟΜΙΑΣ-ΑΛΙΕΙΑΣ ΤΟΥ Τ.Ε.Ι. ΗΠΕΙΡΟΥ. 2010, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ: ΗΓΟΥΜΕΝΙΤΣΑ.

21. Anderson, D.M., A.D. Cembella, and G.M. Hallegraeff, *Progress in understanding harmful algal blooms: paradigm shifts and new technologies for research, monitoring, and management*. Annual review of marine science, 2012. **4**: p. 143-176.
22. Bolch, C.J.S. and M.F. de Salas, *A review of the molecular evidence for ballast water introduction of the toxic dinoflagellates *Gymnodinium catenatum* and the *Alexandrium "tamarensis complex"* to Australasia*. Harmful Algae, 2007. **6**(4): p. 465-485.
23. Smayda, T.J., *Reflections on the ballast water dispersal—harmful algal bloom paradigm*. Harmful Algae, 2007. **6**(4): p. 601-622.
24. Silva, M., et al., *Emergent toxins in North Atlantic temperate waters: a challenge for monitoring programs and legislation*. (2072-6651 (Electronic)).
25. Edwards, M., et al., *Regional Climate Change and Harmful Algal Blooms in the Northeast Atlantic*. Limnology and Oceanography, 2006. **51**(2): p. 820-829.
26. van der Fels-Klerx, H.J., et al., *Climate change impacts on natural toxins in food production systems, exemplified by deoxynivalenol in wheat and diarrhetic shellfish toxins*. (1944-0057 (Electronic)).
27. Moore, S.K., N.J. Mantua, and E.P. Salathé, *Past trends and future scenarios for environmental conditions favoring the accumulation of paralytic shellfish toxins in Puget Sound shellfish*. Harmful Algae, 2011. **10**(5): p. 521-529.
28. Etheridge, S.M. and C.S. Roesler, *Effects of temperature, irradiance, and salinity on photosynthesis, growth rates, total toxicity, and toxin composition for *Alexandrium fundyense* isolates from the Gulf of Maine and Bay of Fundy*. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 2005. **52**(19): p. 2491-2500.
29. He, H., et al., *Effect of iron on growth, biochemical composition and paralytic shellfish poisoning toxins production of *Alexandrium tamarensis**. Harmful Algae, 2010. **9**(1): p. 98-104.
30. Laabir, M., et al., *Influence of environmental factors on the paralytic shellfish toxin content and profile of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) isolated from the Mediterranean Sea*. 2013(1660-3397 (Electronic)).
31. Poulton, N.J., B.A. Keafer, and D.M. Anderson, *Toxin variability in natural populations of *Alexandrium fundyense* in Casco Bay, Maine—evidence of nitrogen limitation*. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 2005. **52**(19): p. 2501-2521.
32. Selander, E., et al., *Predator lipids induce paralytic shellfish toxins in bloom-forming algae*. 2015(1091-6490 (Electronic)).
33. Holland, A. and S. Kinnear, *Interpreting the possible ecological role(s) of cyanotoxins: compounds for competitive advantage and/or physiological aide?* 2013(1660-3397 (Electronic)).
34. Verma, A., et al., *The Genetic Basis of Toxin Biosynthesis in Dinoflagellates*. Microorganisms, 2019. **7**(8).
35. Costa, P.R., T. Moita, and S.M. Rodrigues, *Estimating the contribution of N-sulfocarbamoyl paralytic shellfish toxin analogs GTX6 and C3+4 to the toxicity of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) over a bloom of *Gymnodinium catenatum**. 2014(1878-1470 (Electronic)).
36. James, K.J., et al., *Shellfish toxicity: human health implications of marine algal toxins*. Epidemiology and Infection, 2010. **138**(7): p. 927-940.
37. Weirich, C.A. and T.R. Miller, *Freshwater Harmful Algal Blooms: Toxins and Children's Health*. Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care, 2014. **44**(1): p. 2-24.

38. Backer, L.C., et al., *Recreational exposure to aerosolized brevetoxins during Florida red tide events*. Harmful Algae, 2003. **2**(1): p. 19-28.
39. Fleming Lora, E., et al., *Exposure and Effect Assessment of Aerosolized Red Tide Toxins (Brevetoxins) and Asthma*. Environmental Health Perspectives, 2009. **117**(7): p. 1095-1100.
40. Pierce, R.H., et al., *Brevetoxin concentrations in marine aerosol: human exposure levels during a Karenia brevis harmful algal bloom*. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 2003. **70**(1): p. 161-165.
41. Bean, J.A., et al., *Florida Red Tide Toxins (Brevetoxins) and Longitudinal Respiratory Effects in Asthmatics*. Harmful algae, 2011. **10**(6): p. 744-748.
42. Kirkpatrick, B., et al., *Aerosolized Red Tide Toxins (Brevetoxins) and Asthma: Continued health effects after 1 hour beach exposure*. Harmful algae, 2011. **10**(2): p. 138-143.
43. Berdalet, E., et al., *Marine harmful algal blooms, human health and wellbeing: challenges and opportunities in the 21st century*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. Marine Biological Association of the United Kingdom, 2015. **2015**: p. 10.1017/S0025315415001733.
44. Sephton, D.H., et al., *Paralytic shellfish toxins in zooplankton, mussels, lobsters and caged Atlantic salmon, Salmo salar, during a bloom of Alexandrium fundyense off Grand Manan Island, in the Bay of Fundy*. Harmful Algae, 2007. **6**(5): p. 745-758.
45. Fire, S.E., et al., *Co-occurrence of multiple classes of harmful algal toxins in bottlenose dolphins (Tursiops truncatus) stranding during an unusual mortality event in Texas, USA*. Harmful Algae, 2011. **10**(3): p. 330-336.
46. Jensen, S.-K., et al., *Detection and effects of harmful algal toxins in Scottish harbour seals and potential links to population decline*. Toxicon, 2015. **97**: p. 1-14.
47. Brodie, E.C., et al., *DOMOIC ACID CAUSES REPRODUCTIVE FAILURE IN CALIFORNIA SEA LIONS (ZALOPHUS CALIFORNIANUS)*. Marine Mammal Science, 2006. **22**(3): p. 700-707.
48. Shumway, S.E., S.M. Allen, and P. Dee Boersma, *Marine birds and harmful algal blooms: sporadic victims or under-reported events?* Harmful Algae, 2003. **2**(1): p. 1-17.
49. Jen, H.-C., et al., *Tetrodotoxin and paralytic shellfish poisons in gastropod species from Vietnam analyzed by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Journal of Food and Drug Analysis, 2014. **22**(2): p. 178-188.
50. Lefebvre, K.A., et al., *Characterization of intracellular and extracellular saxitoxin levels in both field and cultured Alexandrium spp. samples from Sequim Bay, Washington*. Marine drugs, 2008. **6**(2): p. 103-116.
51. Rue, E. and K. Bruland, *Domoic acid binds iron and copper: a possible role for the toxin produced by the marine diatom Pseudo-nitzschia*. Marine Chemistry, 2001. **76**(1): p. 127-134.
52. Chalermwat, K., B.W. Szuster, and M. Flaherty, *Shellfish aquaculture in Thailand*. Aquaculture Economics & Management, 2003. **7**(3-4): p. 249-261.
53. Rhodes, L., K. Smith, and C. Moisan, *Shifts and stasis in marine HAB monitoring in New Zealand*. Environmental Science and Pollution Research, 2013. **20**(10): p. 6872-6877.
54. Li, Z., et al., *Investigation of pectenotoxin profiles in the Yellow Sea (China) using a passive sampling technique*. Marine drugs, 2010. **8**(4): p. 1263-1272.
55. Campbell, K., et al., *A European perspective on progress in moving away from the mouse bioassay for marine-toxin analysis*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2011. **30**(2): p. 239-253.

56. Ajani, P., et al., *The risk of harmful algal blooms (HABs) in the oyster-growing estuaries of New South Wales, Australia*. Environ Monit Assess, 2013. **185**(6): p. 5295-316.
57. Moreira, C., et al., *Methods to detect cyanobacteria and their toxins in the environment*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014. **98**(19): p. 8073-8082.
58. Bean, L.L., J.D. McGowan, and J.W. Hurst, *Annual variations of paralytic shellfish poisoning in Maine, USA 1997–2001*. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 2005. **52**(19): p. 2834-2842.
59. McCarthy, M., et al., *Application of passive (SPATT) and active sampling methods in the profiling and monitoring of marine biotoxins*. Toxicon, 2014. **89**: p. 77-86.
60. Zendong, Z., et al., *Extended evaluation of polymeric and lipophilic sorbents for passive sampling of marine toxins*. Toxicon, 2014. **91**: p. 57-68.
61. Lu, G., et al., *Environmental effects of modified clay flocculation on Alexandrium tamarense and paralytic shellfish poisoning toxins (PSTs)*. Chemosphere, 2015. **127**: p. 188-194.
62. Pan, G., J. Chen, and D.M. Anderson, *Modified local sands for the mitigation of harmful algal blooms*. Harmful Algae, 2011. **10**(4): p. 381-387.
63. Vasama, M., et al., *Removal of paralytic shellfish toxins by probiotic lactic acid bacteria*. Toxins, 2014. **6**(7): p. 2127-2136.
64. Silva, M., et al., *Emergent toxins in North Atlantic temperate waters: a challenge for monitoring programs and legislation*. Toxins, 2015. **7**(3): p. 859-885.
65. Toyofuku, H., *Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report)*. Marine Pollution Bulletin, 2006. **52**(12): p. 1735-1745.
66. Ajani, P., et al., *The risk of harmful algal blooms (HABs) in the oyster-growing estuaries of New South Wales, Australia*. Environmental Monitoring and Assessment, 2013. **185**(6): p. 5295-5316.
67. Authority), E.E.F.S., *Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish—okadaic acid and analogues*. EFSA J. , 2008(589): p. 1-62.
68. Vilariño, N., et al., *Biological methods for marine toxin detection*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. **397**(5): p. 1673-1681.
69. Campbell, K., et al., *Comparison of ELISA and SPR biosensor technology for the detection of paralytic shellfish poisoning toxins*. Journal of Chromatography B, 2009. **877**(32): p. 4079-4089.
70. Sato, S., et al. *Novel Polyclonal Antibody Raised against Tetrodotoxin Using Its Haptenic Antigen Prepared from 4,9-anhydrotetrodotoxin Reacted with 1,2-Ethanedithiol and Further Reacted with Keyhole Limpet Hemocyanin*. Toxins, 2019. **11**, DOI: 10.3390/toxins11100551.
71. Kogure, K., et al., *A tissue culture assay for tetrodotoxin, saxitoxin and related toxins*. Toxicon, 1988. **26**(2): p. 191-197.
72. Humpage, A.R., V.F. Magalhaes, and S.M. Frosco, *Comparison of analytical tools and biological assays for detection of paralytic shellfish poisoning toxins*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. **397**(5): p. 1655-1671.
73. Munday, R., et al., *Acute toxicities of saxitoxin, neosaxitoxin, decarbamoyl saxitoxin and gonyautoxins 1&4 and 2&3 to mice by various routes of administration*. Toxicon, 2013. **76**: p. 77-83.
74. Ignatiades, L. and O. Gotsis-Skretas, *A review on toxic and harmful algae in Greek coastal waters (E. Mediterranean Sea)*. Toxins, 2010. **2**(5): p. 1019-1037.

75. Tan, B., et al., *Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: current progress, challenges, and future opportunities*. *Frontiers in microbiology*, 2015. **6**: p. 1027-1027.
76. Boderó, M., et al., *A Strategy to Replace the Mouse Bioassay for Detecting and Identifying Lipophilic Marine Biotoxins by Combining the Neuro-2a Bioassay and LC-MS/MS Analysis*. *Marine drugs*, 2018. **16**(12): p. 501.
77. Vareli, K., et al., *Microcystin producing cyanobacterial communities in Amvrakikos Gulf (Mediterranean Sea, NW Greece) and toxin accumulation in mussels (*Mytilus galloprovincialis*)*. *Harmful Algae*, 2012. **15**: p. 109-118.
78. Rowland-Pilgrim, S., et al., *Variability of Amnesic Shellfish Toxin and Pseudo-nitzschia occurrence in bivalve molluscs and water samples—Analysis of ten years of the official control monitoring programme*. *Harmful Algae*, 2019. **87**: p. 101623.
79. Meneely, J.P., et al., *Development and validation of an ultrasensitive fluorescence planar waveguide biosensor for the detection of paralytic shellfish toxins in marine algae*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013. **41**: p. 691-697.
80. Sivonen, K.J., G. J., *Cyanobacterial toxins*, in *Toxic Cyanobacteria in Water (ed. I. Chorus & J. Bartram)*. 1999, E & FN Spon: London. p. 41-111.
81. Bouaicha, N., et al., *Structural Diversity, Characterization and Toxicology of Microcystins*. *Toxins*, 2019. **11**(12).
82. Christophoridis, C., et al., *Occurrence and diversity of cyanotoxins in Greek lakes*. *Scientific Reports*, 2018. **8**(1): p. 17877.
83. Carmichael, W.W. and R. Li, *Cyanobacteria toxins in the Salton Sea*. *Saline systems*, 2006. **2**: p. 5-5.
84. J.-M., L.B.S.a.K., *Outstanding Marine Molecules*. 2014, Germany: Wiley-Blackwell. 189–216.
85. FAO, *4. Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)*, in *Marine biotoxins*. 2004, Food and Agriculture Organization: Food and Nutrition Paper 80. p. 1-39.
86. Umhau, B.P., et al., *A Time Series of Water Column Distributions and Sinking Particle Flux of Pseudo-Nitzschia and Domoic Acid in the Santa Barbara Basin, California*. *Toxins*, 2018. **10**(11): p. 480.
87. Romero, M.L.J., et al., *Unique amnesic shellfish toxin composition found in the South East Asian diatom *Nitzschia navis-varingica**. *Harmful Algae*, 2011. **10**(5): p. 456-462.
88. Bates, S.S., et al., *Pseudo-nitzschia, Nitzschia, and domoic acid: New research since 2011*. *Harmful Algae*, 2018. **79**: p. 3-43.
89. Lefebvre, K.A. and A. Robertson, *Domoic acid and human exposure risks: A review*. *Toxicon*, 2010. **56**(2): p. 218-230.
90. Munday, R., et al., *Comparative toxicity to mice of domoic acid and isodomoic acids A, B and C*. *Toxicon*, 2008. **52**(8): p. 954-956.
91. García-Altres, M., *Chapter Two - Structural Diversity of Microalgal Marine Toxins*, in *Comprehensive Analytical Chemistry*, J. Diogène and M. Campàs, Editors. 2017, Elsevier. p. 35-88.
92. EFSA, *Marine biotoxins in shellfish – Summary on regulated marine biotoxins*. *The EFSA Journal*, 2009. **1306**: p. 1-23.
93. Orr, R.J.S., et al., *Evolution and distribution of saxitoxin biosynthesis in dinoflagellates*. *Marine drugs*, 2013. **11**(8): p. 2814-2828.
94. Moustafa, A., et al., *Origin of Saxitoxin Biosynthetic Genes in Cyanobacteria*. *PLOS ONE*, 2009. **4**(6): p. e5758.
95. Álvarez, G., et al., *Paralytic shellfish toxins in *Argopecten purpuratus* and *Semimytilus algosus* from northern Chile*. *Aquat. Living Resour.*, 2009. **22**(3): p. 341-347.
96. Amade, P., Mehiri, M. and Lewis, R.J., *Outstanding Marine Biotoxins: STX, TTX, and CTX*, in *Outstanding Marine Molecules*. Wiley Blackwell. p. 22-45.

97. Wiese, M., et al., *Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs*. *Marine drugs*, 2010. **8**(7): p. 2185-2211.
98. Mattei, C. and C. Legros, *The voltage-gated sodium channel: A major target of marine neurotoxins*. *Toxicon*, 2014. **91**: p. 84-95.
99. Cusick, K.D. and G.S. Saylor, *An overview on the marine neurotoxin, saxitoxin: genetics, molecular targets, methods of detection and ecological functions*. *Marine drugs*, 2013. **11**(4): p. 991-1018.
100. Turner, A.D., et al., *Refinement and extension of AOAC Method 2005.06 to include additional toxins in mussels: single-laboratory validation*. *J AOAC Int*, 2009. **92**(1060-3271 (Print)): p. 190-207.
101. Murray, S.A., T.K. Mihali, and B.A. Neilan, *Extraordinary Conservation, Gene Loss, and Positive Selection in the Evolution of an Ancient Neurotoxin*. *Molecular Biology and Evolution*, 2010. **28**(3): p. 1173-1182.
102. Sivonen, K., et al., *Isolation and structures of five microcystins from a Russian Microcystis aeruginosa strain CALU 972*. *Toxicon*, 1992. **30**(11): p. 1481-1485.
103. Humbert, J.F., *CHAPTER 27 - Toxins of Cyanobacteria*, in *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, R.C. Gupta, Editor. 2009, Academic Press: San Diego. p. 371-379.
104. Sainis, I., et al., *Cyanobacterial cyclopeptides as lead compounds to novel targeted cancer drugs*. *Marine drugs*, 2010. **8**(3): p. 629-657.
105. de Figueiredo, D.R., et al., *Microcystin-producing blooms—a serious global public health issue*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2004. **59**(2): p. 151-163.
106. Hotto, A.M., M.F. Satchwell, and G.L. Boyer, *Molecular Characterization of Potential Microcystin-Producing Cyanobacteria in Lake Ontario Embayments and Nearshore Waters*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007. **73**(14): p. 4570.
107. Kaebernick, M. and B.A. Neilan, *Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production*. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001. **35**(1): p. 1-9.
108. Welker, M., Steinberg, C. & Jones, G. J. , *Release and persistence of microcystins in natural waters.*, in *Cyanotoxins: Occurrence, Causes, Consequences (ed. I. Chorus)*. 2001, Springer Verlag: Berlin. p. 85-103.
109. Tsuji, K., et al., *Stability of Microcystins from cyanobacteria—iv. effect of chlorination on decomposition*. *Toxicon*, 1997. **35**(7): p. 1033-1041.
110. Chorus, I. and J. Bartram, *Toxic cyanobacteria in water : a guide to their public health consequences, monitoring and management / edited by Ingrid Chorus and Jamie Bertram*. 1999, World Health Organization: Geneva.
111. Rantala, A., 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): p. 568-573.
112. Schatz, D., et al., *Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins*. *Environmental Microbiology*, 2007. **9**(4): p. 965-970.
113. Kotut, K., et al., *Toxic cyanobacteria at Nakuru sewage oxidation ponds – A potential threat to wildlife*. *Limnologica*, 2010. **40**(1): p. 47-53.
114. Jochimsen, E.M., et al., *Liver Failure and Death after Exposure to Microcystins at a Hemodialysis Center in Brazil*. *New England Journal of Medicine*, 1998. **338**(13): p. 873-878.
115. Hauser-Davis, R.A., et al., *Accumulation and toxic effects of microcystin in tilapia (Oreochromis niloticus) from an eutrophic Brazilian lagoon*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015. **112**: p. 132-136.
116. Martins, J., L. Peixe, and V. Vasconcelos, *Cyanobacteria and bacteria co-occurrence in a wastewater treatment plant: absence of allelopathic effects*. *Water Science and Technology*, 2010. **62**(8): p. 1954-1962.

117. Taş, S., E. Okuş, and A. Aslan-Yılmaz, *The blooms of a cyanobacterium, Microcystis cf. aeruginosa in a severely polluted estuary, the Golden Horn, Turkey*. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2006. **68**(3): p. 593-599.
118. Nishizawa, T., et al., *Genetic Analysis of the Peptide Synthetase Genes for a Cyclic Heptapeptide Microcystin in Microcystis spp.1*. The Journal of Biochemistry, 1999. **126**(3): p. 520-529.
119. Tillett, D., et al., *Structural organization of microcystin biosynthesis in Microcystis aeruginosa PCC7806: an integrated peptide–polyketide synthetase system*. Chemistry & Biology, 2000. **7**(10): p. 753-764.
120. Kaebernick, M., et al., *A spontaneous mutant of microcystin biosynthesis: genetic characterization and effect on Daphnia*. Environmental Microbiology, 2001. **3**(11): p. 669-679.
121. Tillett, D., D.L. Parker, and B.A. Neilan, *Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (mcyA) of the cyanobacterial genus Microcystis: comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (Phycocyanin Intergenic Spacer) phylogenies*. Applied and environmental microbiology, 2001. **67**(6): p. 2810-2818.
122. Pan, H., et al., *Detection of hepatotoxic Microcystis strains by PCR with intact cells from both culture and environmental samples*. Archives of Microbiology, 2002. **178**(6): p. 421-427.
123. Dittmann, E., et al., *Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium Microcystis aeruginosa PCC 7806*. Molecular Microbiology, 1997. **26**(4): p. 779-787.
124. Kleinkauf, H. and H. Von Döhren, *A Nonribosomal System of Peptide Biosynthesis*. European Journal of Biochemistry, 1996. **236**(2): p. 335-351.
125. Harke, M.J., et al., *A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, Microcystis spp.* Harmful Algae, 2016. **54**: p. 4-20.
126. Trainer, V., et al., *Diarrhetic Shellfish Toxins and Other Lipophilic Toxins of Human Health Concern in Washington State*. Marine Drugs, 2013. **11**(6): p. 1815.
127. Van Wagoner, R.M., J.L.C. Satake M Fau - Wright, and J.L. Wright, *Polyketide biosynthesis in dinoflagellates: what makes it different?* (1460-4752 (Electronic)).
128. Larsen, K., et al., *Clarification of the C-35 Stereochemistries of Dinophysistoxin-1 and Dinophysistoxin-2 and Its Consequences for Binding to Protein Phosphatase*. Chemical Research in Toxicology, 2007. **20**(6): p. 868-875.
129. Schmitz, F.J., et al., *Acanthifolicin, a new episulfide-containing polyether carboxylic acid from extracts of the marine sponge Pandaros acanthifolium*. Journal of the American Chemical Society, 1981. **103**(9): p. 2467-2469.
130. Valdiglesias, V., et al., *Okadaic Acid: More than a Diarrhetic Toxin*. Marine Drugs, 2013. **11**(11): p. 4328-4349.
131. Paredes, I., et al., *Update of risk assessments of main marine biotoxins in the European Union*. Toxicon, 2011. **58**(4): p. 336-354.
132. Council, E.P.a.o.t., *specific hygiene rules for food of animal origin*. . 29 April 2004, Off. J. Eur. Union 2004, L226, 22. .
133. Turner, A.D., et al., *Potential threats posed by new or emerging marine biotoxins in UK waters and examination of detection methodology used in their control: brevetoxins*. Marine drugs, 2015. **13**(3): p. 1224-1254.
134. Chain, E.P.o.C.i.t.F., *Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Emerging toxins: Brevetoxin group*. EFSA Journal, 2010. **8**(7).
135. THOMPSON, N.J., *BREVE TOXIN: HOW IS IT MADE AND WHY?* August 2011, Texas A&M University. p. 88.

136. Watkins, S.M., et al., *Neurotoxic shellfish poisoning*. Marine drugs, 2008. **6**(3): p. 431-455.
137. Plakas, S.M. and R.W. Dickey, *Advances in monitoring and toxicity assessment of brevetoxins in molluscan shellfish*. Toxicon, 2010. **56**(2): p. 137-149.
138. Zaias, J., et al., *Repeated exposure to aerosolized brevetoxin-3 induces prolonged airway hyperresponsiveness and lung inflammation in sheep*. Inhalation Toxicology, 2011. **23**(4): p. 205-211.
139. Dickey, R., et al., *Monitoring brevetoxins during a *Gymnodinium breve* red tide: comparison of sodium channel specific cytotoxicity assay and mouse bioassay for determination of neurotoxic shellfish toxins in shellfish extracts*. Natural Toxins, 1999. **7**(4): p. 157-165.
140. Holland, P.T., et al., *Novel toxins produced by the dinoflagellate *Karenia brevisulcata**. Harmful Algae, 2012. **13**: p. 47-57.
141. Watkins, S.M., et al., *Neurotoxic shellfish poisoning*. (1660-3397 (Electronic)).
142. Naar, J.P., et al., *Brevetoxins, like ciguatoxins, are potent ichthyotoxic neurotoxins that accumulate in fish*. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology, 2007. **50**(5): p. 707-723.
143. Haywood, A.J.S., K.A.; Truby, E.W.; Bergquist, P.R.; Bergquist, P.L.; Adamson, J.; Mackenzie, L., *Comparative morphology and molecular phylogenetic analysis of three new species of the genus *Karenia* (Dinophyceae) from New Zealand*. J. Phycol, 2004. **40**: p. 165-179.
144. Shotton, R., *Global review of alfoncino (*Beryx spp.*), their fisheries, biology and management*. 2016, Rome, Italy: FAO. 151.
145. Στάικου, Α., *Καλλιέργεια δίθυρων μαλακίων*, in *Υδατοκαλλιέργειες*. 2015, Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών: Αθήνα.
146. E., S.B., *Molluscan Shellfish Farming*. Fishing News Books: An imprint of Blackwell Science. 2002.
147. Bar-On, Y.M., R. Phillips, and R. Milo, *The biomass distribution on Earth*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018. **115**(25): p. 6506.
148. Madigan MT, M.J., Parker J., *Brock biology of microorganisms*. 10th ed. 2003: Pearson Education Inc.
149. Jardillier, L., et al., *Effects of Viruses and Predators on Prokaryotic Community Composition*. Microbial Ecology, 2005. **50**(4): p. 557-569.
150. Tarran, G.A., J.L. Heywood, and M.V. Zubkov, *Latitudinal changes in the standing stocks of nano- and picoeukaryotic phytoplankton in the Atlantic Ocean*. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 2006. **53**(14): p. 1516-1529.
151. Tarran, G.A., et al., *Microbial community structure and standing stocks in the NE Atlantic in June and July of 1996*. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 2001. **48**(4): p. 963-985.
152. Yokokawa, T. and T. Nagata, *Growth and Grazing Mortality Rates of Phylogenetic Groups of Bacterioplankton in Coastal Marine Environments*. Applied and Environmental Microbiology, 2005. **71**(11): p. 6799.
153. Jeong, H.J., et al., *Feeding and Grazing Impact by Small Marine Heterotrophic Dinoflagellates on Heterotrophic Bacteria*. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2008. **55**(4): p. 271-288.
154. Jeong, H.J., et al., *Growth, feeding and ecological roles of the mixotrophic and heterotrophic dinoflagellates in marine planktonic food webs*. Ocean Science Journal, 2010. **45**(2): p. 65-91.
155. Zubkov, M.V. and G.A. Tarran, *High bacterivory by the smallest phytoplankton in the North Atlantic Ocean*. Nature, 2008. **455**(7210): p. 224-226.

156. de Castro, F., U. Gaedke, and J. Boenigk, *Reverse Evolution: Driving Forces Behind the Loss of Acquired Photosynthetic Traits*. PLOS ONE, 2010. **4**(12): p. e8465.
157. Not, F., et al., *Picobiliphytes: A Marine Picoplanktonic Algal Group with Unknown Affinities to Other Eukaryotes*. Science, 2007. **315**(5809): p. 253.
158. Edgcomb, V., et al., *Protistan microbial observatory in the Cariaco Basin, Caribbean. I. Pyrosequencing vs Sanger insights into species richness*. The ISME journal, 2011. **5**(8): p. 1344-1356.
159. Harada, A., S. Ohtsuka, and T. Horiguchi, *Species of the Parasitic Genus Duboscquella are Members of the Enigmatic Marine Alveolate Group I*. Protist, 2007. **158**(3): p. 337-347.
160. Caron, D.A. and P.D. Countway, *Hypotheses on the role of the protistan rare biosphere in a changing world*. Aquatic Microbial Ecology, 2009. **57**(3): p. 227-238.
161. Massana, R., et al., *Picoeukaryotic diversity in an oligotrophic coastal site studied by molecular and culturing approaches*. FEMS Microbiology Ecology, 2004. **50**(3): p. 231-243.
162. Vaultot, D., et al., *The diversity of small eukaryotic phytoplankton ($\leq 3 \mu\text{m}$) in marine ecosystems*. FEMS Microbiology Reviews, 2008. **32**(5): p. 795-820.
163. Stoeck, T. and S. Epstein, *Novel eukaryotic lineages inferred from small-subunit rRNA analyses of oxygen-depleted marine environments*. Applied and environmental microbiology, 2003. **69**(5): p. 2657-2663.
164. Gast, R.J., et al., *ABUNDANCE OF A NOVEL DINOFLAGELLATE PHYLOTYPE IN THE ROSS SEA, ANTARCTICA1*. Journal of Phycology, 2006. **42**(1): p. 233-242.
165. Guillou, L., et al., *Widespread occurrence and genetic diversity of marine parasitoids belonging to Syndiniales (Alveolata)*. Environmental Microbiology, 2008. **10**(12): p. 3349-3365.
166. Countway, P.D., et al., *Protistan Diversity Estimates Based on 18S rDNA from Seawater Incubations in the Western North Atlantic1*. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2005. **52**(2): p. 95-106.
167. Steele, J.A., et al., *Marine bacterial, archaeal and protistan association networks reveal ecological linkages*. The ISME Journal, 2011. **5**(9): p. 1414-1425.
168. Orsi, W., et al., *Effect of oxygen minimum zone formation on communities of marine protists*. The ISME journal, 2012. **6**(8): p. 1586-1601.
169. Bernhard, J.M., et al., *Denitrification likely catalyzed by endobionts in an allogromiid foraminifer*. The ISME Journal, 2012. **6**(5): p. 951-960.
170. Fokin, S.I., *Frequency and biodiversity of symbionts in representatives of the main classes of Ciliophora*. European Journal of Protistology, 2012. **48**(2): p. 138-148.
171. Armstrong, R.A., et al., *A new, mechanistic model for organic carbon fluxes in the ocean based on the quantitative association of POC with ballast minerals*. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 2001. **49**(1): p. 219-236.
172. Burja, A.M., et al., *Identification of the green alga, Chlorella vulgaris (SDC1) using cyanobacteria derived 16S rDNA primers: targeting the chloroplast*. FEMS Microbiology Letters, 2001. **202**(2): p. 195-203.
173. Gupta, V., et al., *New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae)—Prospects and challenges*. Algal Research, 2013. **2**(2): p. 79-97.
174. Rippka, R., et al., *Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria*. Microbiology, 1979. **111**(1): p. 1-61.
175. Berman-Frank, I., P. Lundgren, and P. Falkowski, *Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria*. Research in Microbiology, 2003. **154**(3): p. 157-164.
176. Tiwari, A. and A. Pandey, *Cyanobacterial hydrogen production – A step towards clean environment*. International Journal of Hydrogen Energy, 2012. **37**(1): p. 139-150.

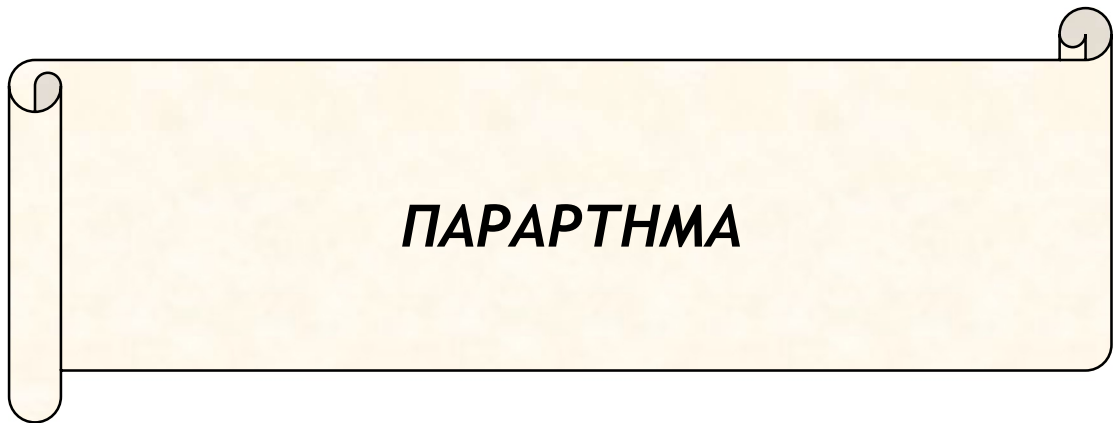
177. Prasanna, R., P. Jaiswal, and B.D. Kaushik, *Cyanobacteria as potential options for environmental sustainability - promises and challenges*. Indian journal of microbiology, 2008. **48**(1): p. 89-94.
178. Henson, B.J., L.E. Watson, and S.R. Barnum, *Molecular Differentiation of the Heterocystous Cyanobacteria, Nostoc and Anabaena, Based on Complete nifD Sequences*. Current Microbiology, 2002. **45**(3): p. 161-164.
179. Castenholz, R.W., et al., *Phylum BX. Cyanobacteria*, in *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume One : The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*, D.R. Boone, R.W. Castenholz, and G.M. Garrity, Editors. 2001, Springer New York: New York, NY. p. 473-599.
180. Henson, B.J., et al., *Molecular phylogeny of the heterocystous cyanobacteria (subsections IV and V) based on nifD*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004. **54**(2): p. 493-497.
181. Komárek, J., *Modern taxonomic revision of planktic nostocacean cyanobacteria: a short review of genera*. Hydrobiologia, 2010. **639**(1): p. 231-243.
182. Komárek, J. and J. Mareš, *An update to modern taxonomy (2011) of freshwater planktic heterocystous cyanobacteria*. Hydrobiologia, 2012. **698**(1): p. 327-351.
183. Moreira, C., V. Vasconcelos, and A. Antunes, *Phylogeny and biogeography of cyanobacteria and their produced toxins*. Marine drugs, 2013. **11**(11): p. 4350-4369.
184. Tringe, S.G., et al., *Comparative Metagenomics of Microbial Communities*. Science, 2005. **308**(5721): p. 554.
185. Premanandh J, P.B., Teneva I, Dzhabazov B, Prabakaran D, Uma L., *Molecular characterization of marine Cyanobacteria from the Indian subcontinent deduced from sequence analysis of the phycocyanin operon (cpcb-IGS-cpcA) and 16S-23S ITS region*. J Microbiol. , 2006. **44**(6): p. 607-606.
186. Długosz E, W.M., *[Molecular diagnostic of parasites using rRNA gene sequence*. Wiad Parazytol., 2006. **52**(4): p. 263-269.
187. Tanabe, Y., F. Kasai, and M.M. Watanabe, *Multilocus sequence typing (MLST) reveals high genetic diversity and clonal population structure of the toxic cyanobacterium Microcystis aeruginosa*. Microbiology, 2007. **153**(11): p. 3695-3703.
188. Wu, Z., et al., *Phylogenetic analysis of two cyanobacterial genera Cyndrospermopsis and Raphidiopsis based on multi-gene sequences*. Harmful Algae, 2011. **10**(5): p. 419-425.
189. Dyble, J., H.W. Paerl, and B.A. Neilan, *Genetic Characterization of Cylindrospermopsis raciborskii (Cyanobacteria) Isolates from Diverse Geographic Origins Based on nifH and cpcBA-IGS Nucleotide Sequence Analysis*. Applied and Environmental Microbiology, 2002. **68**(5): p. 2567.
190. Ballot, A., et al., *Morphological and Phylogenetic Analysis of Anabaenopsis abijatae and Anabaenopsis elenkinii (Nostocales, Cyanobacteria) from Tropical Inland Water Bodies*. Microbial Ecology, 2008. **55**(4): p. 608-618.
191. Gugger, M., et al., *Phylogenetic comparison of the cyanobacterial genera Anabaena and Aphanizomenon*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002. **52**(5): p. 1867-1880 %@ 1466-5026.
192. Haande, S., et al., *Diversity of Microcystis aeruginosa isolates (Chroococcales, Cyanobacteria) from East-African water bodies*. Archives of Microbiology, 2007. **188**(1): p. 15-25.
193. Gadagkar, S.R., M.S. Rosenberg, and S. Kumar, *Inferring species phylogenies from multiple genes: Concatenated sequence tree versus consensus gene tree*. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution, 2005. **304B**(1): p. 64-74.

194. ΕΤ.ΑΝ.ΑΜ., *Conservation Management of Amvrakikos Wetlands. B4 – 3200 / 99 / 006475. Finally activity report with payment request.* 2003.
195. Βαβίζος, Γ., Ζαννάκης, Κ, Ζαφειρόπουλος, Δ. και ΣΙΑ ΑΕ, Παπαναστασίου, Γ., Ηλίας, Ι. & Συμπράττοντα γραφεία, *Ειδική Περιβαλλοντική Μελέτη (Ε.Π.Μ.) Αμβρακικού κόλπου.* 1997.
196. ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ, Ο.Κ.Ν., *Στρατηγική Μελέτη Περιβαλλοντικών Επιπτώσεων ΕΑΠ περιοχής Αμβρακικού «ΑΝΑΣΑ»* Μαρτίος 2010.
197. ΙΟΝΑ, Α., Α. ΤΗΟΔΟΡΟΥ, and Ε. ΒΑΛΟΠΟΥΛΟΣ, *Managing oceanographic data collated from on-line Information Systems.* Mediterranean Marine Science, 2011: p. 7.
198. Kormas, Konstantinos A., A. Nicolaidou, and S. Reizopoulou, *Temporal Variations of Nutrients, -Chlorophyll a and Particulate Matter in Three Coastal Lagoons of Amvrakikos Gulf (Ionian Sea, Greece).* Marine Ecology, 2001. **22**(3): p. 201-213.
199. Albanis, T.A., T.G. Danis, and D.G. Hela, *Transportation of pesticides in estuaries of Louros and Arachthos rivers (Amvrakikos Gulf, N. W. Greece).* Science of The Total Environment, 1995. **171**(1): p. 85-93.
200. AOAC, *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists.* 15th ed. 1990: Aoac Intl.
201. American Public Health Association, E.A., *Standard methods for the examination of water and wastewater* 21st ed. ed. 2005.
202. BIOTOXINS, E.U.R.L.F.M., *EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS.* 2015.
203. Schloss, P.D., et al., *Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities.* Applied and Environmental Microbiology, 2009. **75**(23): p. 7537.
204. Schloss, P.D., D. Gevers, and S.L. Westcott, *Reducing the Effects of PCR Amplification and Sequencing Artifacts on 16S rRNA-Based Studies.* PLOS ONE, 2011. **6**(12): p. e27310.
205. Quast, C., et al., *The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools.* Nucleic acids research, 2013. **41**(Database issue): p. D590-D596.
206. Edgar, R.C., *Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST.* (1367-4811 (Electronic)).
207. Richards, T.A., et al., *Molecular diversity and distribution of marine fungi across 130 European environmental samples.* Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2015. **282**(1819): p. 20152243.
208. Pruesse, E., F.O. Peplies J Fau - Glockner, and F.O. Glockner, *SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes.* (1367-4811 (Electronic)).
209. Adl, S.M., et al., *Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes.* Journal of Eukaryotic Microbiology, 2019. **66**(1): p. 4-119.
210. Hammer, O., D. Harper, and P. Ryan, *PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis.* Palaeontologia Electronica, 2001. **4**: p. 1-9.
211. Loujost. *The new synthesis of diversity indices and similarity measures.*
212. Vokou, D., et al., *Exploring Biodiversity in the Bacterial Community of the Mediterranean Phyllosphere and its Relationship with Airborne Bacteria.* Microbial Ecology, 2012. **64**(3): p. 714-724.
213. Vareli, K., 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, 2009. **11**(8): p. 1506-1512.
214. Bellerophon. <http://comp-bio.anu.edu.au/bellerophon/bellerophon.pl>.

215. Altschul, S.F., et al., *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic acids research, 1997. **25**(17): p. 3389-3402.
216. Tamura, K., et al., *MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods*. (1537-1719 (Electronic)).
217. Tillett, D., et al., *Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system*. (1074-5521 (Print)).
218. Martins, J., et al., *Peptide diversity in strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* isolated from Portuguese water supplies*. Applied microbiology and biotechnology, 2009. **82**: p. 951-61.
219. Choi, D.H. and J.H. Noh, *Phylogenetic diversity of *Synechococcus* strains isolated from the East China Sea and the East Sea*. FEMS Microbiology Ecology, 2009. **69**(3): p. 439-448.
220. Β, Μ., “ΠΑΡΑΚΤΙΑ ΖΩΝΗ ΤΟΥ ΑΜΒΡΑΚΙΚΟΥ ΚΟΛΠΟΥ: ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΟΙΚΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗΣ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ”, in *Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Κτηνιατρικής*. 2010, ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «Υδατοκαλλιέργειες» -«Παθολογικά Προβλήματα Εκτρεφόμενων Υδροβίων Οργανισμών»: Ηγουμενίτσα.
221. Fromme, H., et al., *Occurrence of cyanobacterial toxins—microcystins and anatoxin-a—in Berlin water bodies with implications to human health and regulations*. Environmental Toxicology, 2000. **15**(2): p. 120-130.
222. Panayotides P., P.M.A., Balopoulos E., Gotsis-Skretas O., *Plankton distribution patterns in a Mediterranean dilution basin: Amvrakikos Gulf (Ionian Sea, Greece)*. P.S.Z.N.I. Marine Ecology Progress Series, 1994. **15**(2): p. 93-104.
223. Vassilopoulou, V., C. Papaconstantinou, and E. Caragitsou, *Adaptations of demersal fish species in a nutrient-rich embayment of the Ionian Sea (Greece)*. 2001.
224. Van Apeldoorn, M.E., *Neurotoxic shellfish poisoning: A review*. RIVM report 388802 023. 2001.
225. Douding, L.U.G., J., *A novel bloom of raphidophytes in the German Bight*. Proceedings of the Second International Conference on Harmful Algae Management and Mitigation, 2001.
226. Rademaker, M., Janmaat, L., Zevenboom, W. & De Jong, B. , *Potentially toxic algae along the Dutch coast in 1994*. Harmful Algae News 1995. **10/11**(2).
227. Smith, P.J., Chang, F.H. & MacKenzie, L. , *Toxic phytoplankton and algal blooms, summer 1992/93*. Jasperse, J.A. ed, 1993.
228. Orlova, T., Selina, M.S. & Stonik, I.V., *Distribution of harmful microalgae in the Peter the Great Bay, Sea of Japan, Russia*. Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae, 1998.
229. Alexander, J., et al., *Marine biotoxins in shellfish - Summary on regulated marine biotoxins1 Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain*. EFSA Journal, 2009. **1306**: p. 1-23.
230. La Barre, S., S. Bates, and M. Quilliam, *Domoic Acid*. 2014. p. 189-215.
231. Bazzoni, A.M., et al., *Detection of *Dinophysis* Species and Associated Okadaic Acid in Farmed Shellfish: a Two-year Study from The Western Mediterranean Area*. Journal of veterinary research, 2018. **62**(2): p. 137-144.
232. Ciminiello, P., et al., *Complex toxin profile of *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic sea revealed by LC-MS*. Toxicon, 2010. **55**(2): p. 280-288.
233. Preece, E.P., et al., *A review of microcystin detections in Estuarine and Marine waters: Environmental implications and human health risk*. Harmful Algae, 2017. **61**: p. 31-45.

234. Zuendorf, A., et al., *Diversity estimates of microeukaryotes below the chemocline of the anoxic Mariager Fjord, Denmark*. FEMS Microbiology Ecology, 2006. **58**(3): p. 476-491.
235. Countway, P.D., et al., *Seasonal analysis of protistan community structure and diversity at the USC Microbial Observatory (San Pedro Channel, North Pacific Ocean)*. Limnology and Oceanography, 2010. **55**(6): p. 2381-2396.
236. Jensen, S., et al., *High diversity of microplankton surrounds deep-water coral reef in the Norwegian Sea*. FEMS Microbiology Ecology, 2012. **82**(1): p. 75-89.
237. Cabello-Yeves, P., et al., *Novel Synechococcus Genomes Reconstructed from Freshwater Reservoirs*. Frontiers in Microbiology, 2017. **8**.
238. Touka, A., et al., *Ancient European Lakes: Reservoirs of Hidden Microbial Diversity? The Case of Lake Pamvotis (NW Greece)*. Open Journal of Ecology, 2018. **08**: p. 537-578.
239. Dufresne, A., et al., *Unraveling the genomic mosaic of a ubiquitous genus of marine cyanobacteria*. Genome biology, 2008. **9**(5): p. R90-R90.
240. Scanlan, D.J., et al., *Ecological genomics of marine picocyanobacteria*. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, 2009. **73**(2): p. 249-299.
241. Toledo, G. and B. Palenik, *Synechococcus diversity in the California current as seen by RNA polymerase (rpoC1) gene sequences of isolated strains*. Applied and environmental microbiology, 1997. **63**(11): p. 4298-4303.
242. Rocop, G., et al., *Resolution of Prochlorococcus and Synechococcus ecotypes by using 16S-23S ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences*. Applied and environmental microbiology, 2002. **68**(3): p. 1180-1191.
243. Fuller, N.J., et al., *Clade-specific 16S ribosomal DNA oligonucleotides reveal the predominance of a single marine Synechococcus clade throughout a stratified water column in the Red Sea*. Applied and environmental microbiology, 2003. **69**(5): p. 2430-2443.
244. Ahlgren, N.A. and G. Rocop, *Culture isolation and culture-independent clone libraries reveal new marine Synechococcus ecotypes with distinctive light and N physiologies*. Applied and environmental microbiology, 2006. **72**(11): p. 7193-7204.
245. Penno, S., D. Lindell, and A.F. Post, *Diversity of Synechococcus and Prochlorococcus populations determined from DNA sequences of the N-regulatory gene ntcA*. Environmental Microbiology, 2006. **8**(7): p. 1200-1211.
246. Zwirgmaier, K., et al., *Global phylogeography of marine Synechococcus and Prochlorococcus reveals a distinct partitioning of lineages among oceanic biomes*. Environmental Microbiology, 2008. **10**(1): p. 147-161.
247. Brown, M.V., et al., *Coupling 16S-ITS rDNA clone libraries and automated ribosomal intergenic spacer analysis to show marine microbial diversity: development and application to a time series*. Environmental Microbiology, 2005. **7**(9): p. 1466-1479.
248. Zwirgmaier, K., et al., *Basin-scale distribution patterns of picocyanobacterial lineages in the Atlantic Ocean*. Environmental Microbiology, 2007. **9**(5): p. 1278-1290.
249. Chen, F., et al., *Diverse and unique picocyanobacteria in Chesapeake Bay, revealed by 16S-23S rRNA internal transcribed spacer sequences*. Applied and environmental microbiology, 2006. **72**(3): p. 2239-2243.
250. Saito MA, R.G., Moffett JW. , *Production of cobalt binding ligands in a Synechococcus feature at the Costa Rica upwelling dome*. Limnol Oceanogr, 2005. **50**: p. 279-290.
251. Cai, H., et al., *Distinct patterns of picocyanobacterial communities in winter and summer in the Chesapeake Bay*. Applied and environmental microbiology, 2010. **76**(9): p. 2955-2960.

252. Yilmaz, P., et al., *The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks*. Nucleic Acids Research, 2013. **42**(D1): p. D643-D648.
253. Boone DR, C.R., Garrity GM, Stanley JT,, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume One : The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*. 2001, New York: Springer-Verlag.
254. Brenner DJ, K.N., Garrity GM, Staley JT,, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2: The Proteobacteria*. 2nd edn ed. 2005, US: Springer-Verlag;.
255. Vos PD, G.G., Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB,, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 3: The Firmicutes, 2nd edn*. 2009, New York: Springer-Verlag.
256. Parte, A.C., *LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature*. Nucleic Acids Research, 2013. **42**(D1): p. D613-D616.
257. Adl, S.M., et al., *The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists*. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2005. **52**(5): p. 399-451.
258. Adl, S.M., et al., *The revised classification of eukaryotes*. The Journal of eukaryotic microbiology, 2012. **59**(5): p. 429-493.
259. Federhen, S., *The NCBI Taxonomy database*. Nucleic Acids Research, 2011. **40**(D1): p. D136-D143.
260. Roskov Y, A.L., Orrell T, Nicolson D, Flann C, Bailly N, Kirk P, Bourgoin T, DeWalt RE, Decock W, De Wever A. , *Species 2000 & its catalogue of life. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. 2016. ISSN 2405-8858*.
261. Parr, C.S., et al., *The Encyclopedia of Life v2: Providing Global Access to Knowledge About Life on Earth*. Biodiversity Data Journal, 2014. **2**: p. e1079.
262. <http://www.ebi.ac.uk/miriam/main/collections/MIR:00000338>. Woods Hole, Massachusetts, USA. Accessed 11 Oct 2016.
263. Wikimedia Foundation. Wikispecies. <http://species.wikimedia.org>. Accessed 11 Oct 2016.
264. Balvočiūtė, M. and D.H. Huson, *SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT — how do these taxonomies compare?* BMC Genomics, 2017. **18**(2): p. 114.
265. Sánchez-Baracaldo, P., *Origin of marine planktonic cyanobacteria*. Scientific Reports, 2015. **5**(1): p. 17418.
266. Paerl, H.W. and V.J. Paul, *Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria*. Water Research, 2012. **46**(5): p. 1349-1363.
267. Linda, T., et al., *Salt tolerance of the harmful cyanobacterium Microcystis aeruginosa*. Aquatic Microbial Ecology, 2007. **46**(2): p. 117-123.
268. Martin-Luna, B., et al., *Variation in the synthesis of microcystin in response to saline and osmotic stress in Microcystis ruginosa PCC7806*. Limnetica, 2015. **34**: p. 205-214.
269. Verspagen, J.M.H., et al., *Water Management Strategies Against Toxic Microcystis Blooms In The Dutch Delta*. Ecological Applications, 2006. **16**(1): p. 313-327.
270. Lewitus, A.J., et al., *Lagoonal stormwater detention ponds as promoters of harmful algal blooms and eutrophication along the South Carolina coast*. Harmful Algae, 2008. **8**(1): p. 60-65.
271. Sellner, K.G., R.V. Lacouture, and C.R. Parrish, *Effects of increasing salinity on a cyanobacteria bloom in the Potomac River estuary*. Journal of Plankton Research, 1988. **10**(1): p. 49-61.
272. Miller, M., et al., *Evidence for a Novel Marine Harmful Algal Bloom: Cyanotoxin (Microcystin) Transfer from Land to Sea Otters*. PloS one, 2010. **5**.



Πίνακας 8.1: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού του Αμβρακικού κόλπου. Μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε όλους τους σταθμούς δειγματοληψίας, κατά τις τέσσερις εποχές του έτους, από την επιφάνεια και της θάλασσας. b.d.l : κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου.

Θέση	Θ (°C)				pH				Αλατότητα (‰)			
	S	A	W	Sp	S	A	W	Sp	S	A	W	Sp
<i>Κορωνησία</i>	26	21	12	24	8,4	8,2	8,1	8,2	32,2	32,5	31,9	28,4
<i>Μενίδι</i>	27	22	15	25	8,5	7,9	8	8,4	30,9	27,2	27,6	27,1
<i>Αμφιλοχία</i>	27	22	14	25	8,3	8	8,2	8,3	34,2	32,7	31,6	30,2
<i>Λουτράκι</i>	28	21	15	26	8,5	8,1	8,3	8,4	31,5	30,4	29,5	28,3
<i>Βόνιτσα</i>	26	22	15	24	8,3	8	8,2	8,4	33,5	31,3	29,6	27,1
<i>Πρέβεζα</i>	26	21	18	24	8,1	8,2	8,4	8,5	33,7	32,4	30,6	28,5

Θέση	NH ₄ ⁺ (mg/l)				NO ₃ ⁻ (mg/l)				NO ₂ ⁻ (mg/l)			
	S	A	W	Sp	S	A	W	Sp	S	A	W	Sp
<i>Κορωνησία</i>	1,9	0,2	0,14	0,15	3	2	21	11,7	0,028	0,04	0,004	0,09
<i>Μενίδι</i>	0,2	0,1	0,18	0,27	1,5	1,2	19	15	0,021	0,03	0,008	0,15
<i>Αμφιλοχία</i>	0,4	0,2	0,14	0,22	1,4	0,9	20	18	0,01	0,02	0,006	0,17
<i>Λουτράκι</i>	0,2	0,1	0,12	0,31	2	0,5	18	12,4	0,007	0,02	0,005	0,12
<i>Βόνιτσα</i>	0,1	0,1	0,21	0,18	1	0,8	17	16,4	0,024	0,01	0,005	0,12
<i>Πρέβεζα</i>	0,2	b.d.l	0,17	0,23	2	1,1	21	12,3	0,007	0,02	0,007	0,13

Θέση	Total P (mg/l)			
	S	A	W	Sp
<i>Κορωνησία</i>	0,26	0,1	0,22	0,07
<i>Μενίδι</i>	0,07	0,3	0,17	0,1
<i>Αμφιλοχία</i>	0,16	0,1	0,05	0,18
<i>Λουτράκι</i>	0,04	0,4	b.d.l.	0,3
<i>Βόνιτσα</i>	0,12	0,3	0,2	0,09
<i>Πρέβεζα</i>	0,03	b.d.l.	0,09	0,15

Πίνακας 8.2: Συγκέντρωση τοξινών στην περιοχή μελέτης. Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με ELISA. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ng τοξίνης/ g μυϊκού ιστού μυδίου.

Θέση	Μπρεβετοξίνη (ng/g ww)				Οκαδαϊκό οξύ (ng/g ww)				Μικροκυστίνη (ng/g ww)				Δομοϊκό οξύ (ng/g ww)			
	S	A	W	Sp	S	A	W	Sp	S	A	W	Sp	S	A	W	Sp
Κορωνησία	2,3	8,7	32,9	38,7	223	51,6	99,9	494,1	18,6	28,8	51,4	46,2	7,9	9,1	2,7	2,6
Μενίδι	5,1	2,4	1,7	32,9	184	42,8	122,4	358,1	49,4	34,2	55,4	42,2	6,4	153,1	31,4	8,7
Αμφιλοχία	4,9	5,1	65,1	34,4	73,8	63,4	105	147,3	47,4	57,8	51,5	38,4	18,5	139,3	24,9	23,5
Λουτράκι	3,9	11,4	37,1	40,5	75,7	68,7	84,3	124,1	40,4	53,5	98,8	49,3	12,4	182,4	17,4	15,2
Βόνιτσα	5,7	17,9	13,8	23,9	66,6	51,2	75,9	110,8	31,6	28,3	87,5	29,4	13,1	15,6	9,1	8,7
Πρέβεζα	5,4	8,8	16,7	68,3	85,8	97,6	115,2	167,1	35,7	61,8	66,3	27,6	4,6	334,1	14,6	5,2

Πίνακας 8.3: Σύγκριση των κυανοβακτηριακών 16S rDNA - ITS - 23S rDNA αλληλουχιών που ανακτήθηκαν από επιφανειακό νερό στην θερινή δειγματοληψία από τη θέση Πρέβεζα, με αντίστοιχες γνωστές 16S rDNA - ITS - 23S rDNA αλληλουχίες που βρίσκονται σε βάσεις δεδομένων. Όλες οι κοντινές αλληλουχίες είναι για την περιοχή 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence

Κλώνος	Κλώνοι με ίδια αλληλουχία	Description	e-value	Identity	Accession Number
Prev44	46, 47, 61, 52, 54	<i>Uncultured Synechococcus sp. isolate DGGE gel band 41</i>	0.0	99.87%	HM244701.1
Prev45	48, 50, 83, 88, 90	<i>Synechococcus sp. KORDI-15</i>	0.0	99.48%	FJ497779.1
Prev57	62, 64, 67, 70	<i>Synechococcus sp. RCC61</i>	0.0	99.10%	JF306807.1
Prev71	80	<i>Synechococcus sp. BL3</i>	0.0	87.74%	JF306768.1
Prev72	89	<i>Synechococcus sp. BL3</i>	0.0	85.21%	JF306768.1
Prev73	93, 106	<i>Synechococcus sp. RCC525</i>	0.0	98.70%	JF306805.1
Prev74	84	<i>Uncultured Synechococcus sp. clone ES-0712-24</i>	0.0	91.88%	HQ336811.1
Prev75	113	<i>Uncultured Synechococcus sp. isolate DGGE gel band 5</i>	0.0	99.03%	HM244687.1
Prev76	118	<i>Synechococcus sp. RCC525</i>	0.0	98.91%	JF306805.1
Prev77	91, 94	<i>Synechococcus sp. BL3</i>	0.0	99.48%	JF306768.1
Prev78	107, 111	<i>Synechococcus sp. BL3</i>	0.0	87.94%	JF306768.1
Prev79	102	<i>Uncultured Synechococcus sp. isolate DGGE gel band 45</i>	0.0	87.69%	HM244703.1
Prev81	97, 106	<i>Uncultured Synechococcus sp. clone I-0806-34</i>	0.0	97.21%	HQ336906.1
Prev82	92, 95	<i>Uncultured Synechococcus sp. clone H6-0804-20</i>	0.0	97.97%	HQ336841.1
Prev85	96	<i>Uncultured Synechococcus sp. clone H6-0804-20</i>	0.0	97.6%	HQ336841.1
Prev86	98, 99	<i>Uncultured Synechococcus sp. clone H6-0804-20</i>	0.0	97.87%	HQ336841.1
Prev87	100	<i>Uncultured Synechococcus sp. clone H6-0804-20</i>	0.0	97.64%	HQ336841.1

Πίνακας 8.4: Σύγκριση των κυανοβακτηριακών 16S rDNA - ITS - 23S rDNA αλληλουχιών που ανακτήθηκαν από επιφανειακό νερό στην θερινή δειγματοληψία από τη θέση Πρέβεζα, με αντίστοιχες γνωστές 16S rDNA - ITS - 23S rDNA αλληλουχίες που βρίσκονται σε βάσεις δεδομένων. * Οι αλληλουχίες είναι για την περιοχή 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence.

Κλώνος	Κλώνοι με ίδια αλληλουχία	Κοντινότερη αλληλουχία στη βάση δεδομένων NCBI	e-value	Ομοιότητα	Accession Number
Prev 2	7, 11, 17, 21, 24	<i>Leptolyngbya sp. PCC 7376, complete genome</i>	0.0	90.28%	CP003946.1
Prev 3	9	<i>Uncultured Synechocystis sp. clone AF10-37-C9 *</i>	2,00E-81	77.34%	JQ410261.1
Prev 4		<i>Uncultured cyanobacterium clone ULR-19 *</i>	3,00E-54	89.56%	JX183675.1
Prev 10	13, 15, 119	<i>Coscinodiscus radiatus chloroplast, complete genome</i>	1,00E-161	89.04%	KC509521.1
Prev 18	19	<i>Uncultured Synechocystis sp. clone 9Jun08_2-1_7 *</i>	6,00E-100	79.60%	JF506242.1
Prev 20	22, 23	<i>Uncultured Synechocystis sp. clone AF10-37-C9 *</i>	4,00E-83	77.52%	JQ410261.1
Prev 25	27, 114	<i>Uncultured cyanobacterium clone P150A_C2-6 *</i>	0.0	97.66%	KX903107.1
Prev 28	30, 31, 34	<i>Leptolyngbya sp. KIOST-1 *</i>	2,00E-154	79.36%	JX401929.1
Prev 29	33, 102, 105	<i>Rhizochromulina marina voucher A13,803 chloroplast, complete genome</i>	2,00E-129	89.04%	MK561360.1
Prev 32	37, 39, 40	<i>Chroococcales cyanobacterium GSE_CHR_MK_11_08E_cl2 *</i>	1,00E-75	75.32%	MG710498.1
Prev 35	36, 38, 42	<i>Leptolyngbya sp. CCM 4 *</i>	1,00E-150	81.64%	KY999936.1
Prev 43		<i>Uncultured Synechocystis sp. clone 30May08_2-1A_6 *</i>	9,00E-77	77.57%	JF506249.1
Prev 63	117	<i>Uncultured Synechocystis sp. clone AF10-37-C9 *</i>	4,00E-83	77.52%	JQ410261.1

Πίνακας 8.5: Φυλογενετικός χαρακτηρισμός των OTU των κυανοβακτηρίων που βρίσκονται σε όλα τα δείγματα (universal OTU). Για τον χαρακτηρισμό χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων Silva και NCBI.

Group	Silva	NCBI nr/nt		NCBI 16S	
	Species	Description	Query cover, e-value, Identity, Accession N.	Description	Query cover, e-value, Identity, Accession N.
Otu001	<i>Synechococcus</i> CC9902	Uncultured <i>Synechococcus</i> sp. clone ST070950.E6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%, 0.0, 99.49%, KM461882.1	<i>Synechococcus rubescens</i> strain SAG 3.81 16S ribosomal RNA, partial sequence	100%, 0.0, 97.46%, NR125481.1
Otu002	<i>Synechococcus</i> CC9902	Uncultured bacterium clone OTU_1662 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%, 0.0, 99.75%, MG489080.1	<i>Synechococcus rubescens</i> strain SAG 3.81 16S ribosomal RNA, partial sequence	100%, 0.0, 97.20%, NR125481.1
Otu003	<i>Cyanobium</i> PCC-6307	Uncultured <i>Synechococcus</i> sp. clone EXA-Snow-D1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%, 0.0, 99.24%, KF928831.1	<i>Synechococcus rubescens</i> strain SAG 3.81 16S ribosomal RNA, partial sequence	100%, 0.0, 97.20%, NR125481.1
Otu004	<i>Synechococcus</i> CC9902	Uncultured bacterium clone Woods-Hole_a6555 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%, 0.0, 99.49%, KF799320.1	<i>Synechococcus rubescens</i> strain SAG 3.81 16S ribosomal RNA, partial sequence	100%, 0.0, 97.71%, NR125481.1
Otu038	<i>Synechococcus</i> CC9902	Uncultured cyanobacterium clone SWB9B1-24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%, 0.0, 100.00%, KF583345.1	<i>Synechococcus rubescens</i> strain SAG 3.81 16S ribosomal RNA, partial sequence	97%, 0.0, 98.45%, NR125481.1
Otu116	<i>Synechococcus</i> CC9902	Uncultured bacterium clone W5-14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%, 0.0, 99.24%, MF498394.1	<i>Synechococcus rubescens</i> strain SAG 3.81 16S ribosomal RNA, partial sequence	100%, 0.0, 96.95%, NR125481.1
Otu256	<i>Cyanobium</i> PCC-6307	Uncultured bacterium clone B8-5-43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%, 0.0, 96.20%, JN117208.1	<i>Crocospaera watsonii</i> strain WH 8501 16S ribosomal RNA, partial sequence	99%, 6,00E-135, 87.06%, NR115288.1

Πίνακας 8.6: Αποτελέσματα από την ανάλυση NGS για τα κυανοβακτήρια. Στον πίνακα φαίνεται ο φυλογενετικός χαρακτηρισμός των OTU και η συχνότητα εμφάνισης τους στα δείγματα. Για τα δείγματα A: Αμφιλοχία, P: Πρέβεζα, 2: Χειμώνας και 7: Καλοκαίρι

Group	Tax1	Tax2	Tax3	Tax4	Tax5	Tax6	A2C	A7C	P2C	P7C
Otu001	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> CC9902	7802	16078	6897	3558
Otu002	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> CC9902	4927	8409	5369	3189
Otu003	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Cyanobium</i> PCC-6307	2900	6051	8907	2677
Otu004	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> CC9902	7421	360	854	219
Otu038	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> CC9902	78	70	72	10
Otu116	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> CC9902	3	25	2	2
Otu181	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> CC9902	2	1	13	0
Otu222	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> CC9902	5	0	5	0
Otu244	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> CC9902	1	5	0	0
Otu251	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> CC9902	0	2	4	0
Otu256	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Cyanobium</i> PCC-6307	2	1	2	3
Otu322	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> CC9902	0	2	0	0
Otu350	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> CC9902	0	6	0	0
Otu356	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> MBIC10613	0	0	0	7
Otu361	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> CC9902	2	0	0	0
Otu374	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> CC9902	4	0	0	0
Otu399	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Cyanobium</i> PCC-6307	0	2	0	0
Otu401	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Nostocales</i>	<i>Xenococcaceae</i>	<i>Pleurocapsa</i> PCC-7319	2	0	0	0
Otu426	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> CC9902	0	2	2	0
Otu427	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Nostocales</i>	<i>Xenococcaceae</i>	<i>Chroococidiopsis</i> PCC- 6712	0	0	3	0

Otu429	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> CC9902	2	0	0	0
Otu444	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> CC9902	0	4	0	0
Otu476	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Cyanobium</i> PCC-6307	0	0	4	0
Otu487	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> CC9902	0	0	2	0
Otu488	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> CC9902	0	1	0	0
Otu489	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> CC9902	2	0	0	0
Otu490	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Prochlorococcus</i> MIT9313	2	0	2	0
Otu501	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Cyanobium</i> PCC-6307	1	0	0	0
Otu510	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Nostocales</i>	<i>Xenococcaceae</i>	<i>Pleurocapsa</i> PCC-7319	0	0	0	3
Otu548	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> CC9902	0	2	0	0
Otu567	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> CC9902	3	0	0	0
Otu571	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> CC9902	0	1	0	0
Otu574	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Cyanobium</i> PCC-6307	0	0	3	0
Otu580	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> CC9902	1	0	0	0
Otu641	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Nostocales</i>	<i>Phormidiaceae</i>	<i>Arthrospira</i> PCC-7345	0	0	2	0
Otu649	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Nostocales</i>	<i>Oscillatoriaceae</i>	<i>Uncultured</i>	0	0	0	2
Otu663	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Nostocales</i>	<i>Chroococciopsa- ceae</i>	<i>Aliterella</i> CENA595	0	0	0	2
Otu691	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Nostocales</i>	<i>Xenococcaceae</i>	<i>Pleurocapsa</i> PCC-7319	1	0	0	0
Otu692	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> CC9902	0	1	0	0
Otu711	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Cyanobium</i> PCC-6307	0	0	1	0
Otu718	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> CC9902	0	0	0	2
Otu721	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> CC9902	0	0	1	0
Otu722	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Cyanobiaceae</i>	<i>Synechococcus</i> CC9902	0	1	0	0

Πίνακας 8.7: Φυλογενετικός χαρακτηρισμός των OTU των πρωτιστων που βρίσκονται σε όλα τα δείγματα (universal OTU). Για τον χαρακτηρισμό χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων PR2 και NCBI. Με έντονα γράμματα εμφανίζονται τα δυνητικά τοξικά γένη.

	PR2			NCBI	
	Τάξη	Είδος	Ομοιότητα	Description	e-value, Ident (%), Accession Number
Otu001	<i>Gymnodiniales</i>	<i>Gymnodiniaceae unclassified</i>	84	<i>Heterocapsa rotundata isolate BH65 129 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	0.0, 99.52, KY980394.1
Otu002	<i>Dino-Group-I</i>	<i>Dino-Group-I-Clade-4 X sp.</i>	100	<i>Uncultured marine Syndiniales clone RA071004T.042 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	0.0, 99.28, FJ431845.1
Otu004	<i>Prorocentrales</i>	<i>Prorocentrumun classified</i>	91	<i>Akashiwo sanguinea isolate SKLMP J008 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	0.0, 99.52, MG890411.1
Otu005	<i>Gymnodiniales</i>	<i>Akashiwo sanguinea</i>	100	<i>Prorocentrum texanum strain CCMP3349 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	0.0, 98.81, MK995624.1
Otu006	<i>Dinophyceae unclassified</i>	<i>Dinophyceae unclassified</i>	100	<i>Uncultured marine eukaryote clone NA1 1G6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	0.0, 99.29, EF526887.1

Otu007	<i>Dinophyceae unclassified</i>	<i>Dinophyceae unclassified</i>	95	<i>Uncultured eukaryote clone denovo 2155 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	0.0, 99.47, MH914506.1
Otu011	<i>Suessiales</i>	<i>Suessiaceae unclassified</i>	99	<i>Biecheleriopsis adriatica genes for 18S rDNA, ITS1, 5.8S rDNA, ITS2, 28S rDNA, partial and complete sequence, strain: trd278-kt</i>	0.0, 99.52, LC068843.1
Otu012	<i>Gymnodiniales</i>	<i>Polykrikos kofoidii</i>	100	<i>Polykrikos kofoidii gene for small subunit ribosomal RNA, complete sequence, strain: 2</i>	0.0, 99.76, AB466294.1
Otu014	<i>Eukaryota unclassified</i>	<i>Eukaryota unclassified</i>	100	<i>Uncultured eukaryote isolate OTU 282 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	0.0, 100.00, MN188363.1
Otu015	<i>Chaunacanthida</i>	<i>Acanthometron sp.</i>	90	<i>Acanthometron sp. C JD-2012 isolate Ant14 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	0.0, 99.51, JQ697713.1
Otu016	<i>Gonyaulacales</i>	<i>Alexandriumun classified</i>	100	<i>Alexandrium margaelefii 18S small subunit ribosomal RNA</i>	0.0, 99.28, U27498.1
Otu018	<i>Gymnodiniales</i>	<i>Gyrodinium dominans</i>	96	<i>Gyrodinium cf. gutrula partial 18S rDNA gene, strain GCGMS0407NS</i>	0.0, 99.76, FN669511.1

Otu019	<i>Gonyaulacales</i>	<i>Gonyaulax cochlea</i>	100	<i>Gonyaulax cochlea</i> strain ccmp1592 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0, 100.00, DQ388465.
Otu020	<i>Dino-Group-I</i>	<i>Dino-Group-I-Clade-1 X sp.</i>	100	Uncultured eukaryote clone SGUH656 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0, 99.28, KJ763243.1
Otu021	<i>Gonyaulacales</i>	<i>Lingulodinium polyedra</i>	100	<i>Gonyaulaxpolyedra</i> isolate CCMP1738 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0, 99.52, EF492507.1
Otu026	<i>Dinophyceae unclassified</i>	<i>Dinophyceae unclassified</i>	100	<i>Wangodinium sinense</i> strain GBH03 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0, 99.29, MH732688.1
Otu030	<i>Dinophyceae unclassified</i>	<i>Dinophyceae unclassified</i>	100	<i>Polykrikos geminatum</i> small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0, 96.66, JX967270.1

Otu036	<i>Stramenopiles XXX</i>	<i>Diplophrys marina</i>	98	<i>Uncultured eukaryote isolate CS E036 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	0.0, 99.23, AY046668.1
Otu044	<i>Dinophyceae unclassified</i>	<i>Dinophyceae unclassified</i>	100	<i>Dinophyceae sp. GD1590bp27 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	0.0, 94.99, EU418970.1
Otu053	<i>Gonyaulacales</i>	<i>Alexandrium andersonii</i>	85	<i>Uncultured eukaryote clone ST8360.128 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	0.0, 100.00, KF130509.1
Otu071	<i>Peridinales</i>	<i>Heterocapsa unclassified</i>	100	<i>Uncultured alveolate clone 3532 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	0.0, 99.28, JF791018.1
Otu073	<i>Dino-Group-II</i>	<i>Dino-Group-II- Clade-10-and-11 X sp.</i>	100	<i>Uncultured marine alveolate Group II DH147- EKD20 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	0.0, 95.7, AF290075.2
Otu125	<i>Dino-Group-II</i>	<i>Dino-Group-II- Clade-1 X sp.</i>	99	<i>Uncultured eukaryote clone SGUH497 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	0.0, 99.76, KJ763136.1

Πίνακας 8.8: Αποτελέσματα από την ανάλυση NGS για τα κυανοβακτήρια της καλλιέργειας A10. Στον πίνακα φαίνεται ο φυλογενετικός χαρακτηρισμός των OTU σύμφωνα με την βάση δεδομένων Silva και η συχνότητα εμφάνισής τους στα δείγματα.

OTU	Silva							Reads
	tax1	tax2	tax3	tax4	tax5	tax6	Identity (%)	
OTU3	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Cyanobacteriia</i>	<i>Cyanobacteriales</i>	<i>Microcystaceae</i>	<i>Microcystis PCC-7914</i>	98,5	2
OTU7	<i>Bacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Cyanobacteriia</i>	<i>Chloroplast</i>			94,2	440
OTU11	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodospirillales</i>	<i>Thalassospiraceae</i>	<i>Thalassospira</i>	98,2	294
OTU25	<i>Bacteria</i>	<i>Actinobacteriota</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium</i>	98,3	1
OTU36	<i>Unclassified</i>						89,2	1
OTU57	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Roseovarius</i>	98,0	3
OTU105	<i>Unclassified</i>						85,4	15
OTU130	<i>Unclassified</i>						85,3	12
OTU131	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Yoonia-Loktanella</i>	97,0	11
OTU159	<i>Unclassified</i>						82,8	8
OTU163	<i>Unclassified</i>						90,0	8
OTU180	<i>Unclassified</i>						87,6	7
OTU183	<i>Unclassified</i>						82,7	6
OTU194	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Marivita</i>	98,2	6
OTU208	<i>Unclassified</i>						87,6	5
OTU215	<i>Unclassified</i>						89,0	5

OTU216	Unclassified						88,6	5
OTU220	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Altererythrobacter</i>	98,5	5
OTU310	Unclassified						87,6	3
OTU321	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Roseovarius</i>	97,0	3
OTU326	Unclassified						88,8	3
OTU359	Unclassified						84,7	3
OTU378	Unclassified						90,3	2
OTU387	Unclassified						86,0	2
OTU403	Unclassified						89,4	2
OTU417	Unclassified						90,2	2
OTU462	Unclassified						85,1	2
OTU522	Unclassified						90,6	2
OTU532	Unclassified						84,9	2
OTU551	Unclassified						84,9	2

Πίνακας 8.9: Φυλογενετικός χαρακτηρισμός των OTU των κυανοβακτηρίων που βρίσκονται στην καλλιέργεια A10. Για τον χαρακτηρισμό χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων Silva και NCBI.

OTU	nr/nt database		16S rDNA – ITS database		Silva	
	Περιγραφή	e-value, Identity (%), Accession number	Περιγραφή	e-value, Identity (%), Accession number	tax6	identity (%)
OTU3	<i>Microcystis aeruginosa</i> LMECYA 136 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0, 100,0%, EU078500.1	<i>Microcystis aeruginosa</i> strain NIES-843 16S ribosomal RNA, complete sequence	0.0, 98.96%, NR_074314.1	Microcystis PCC-7914	98,5
OTU7	<i>Picochlorum</i> sp. CHLO1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	0.0, 99,5%, MN647759.1	<i>Kryptousia macronema</i> strain CENA338 16S ribosomal RNA, partial sequence	4E-137, 88.17%, NR_157980.1		94,2
OTU11	<i>Thalassospira permensis</i> strain Mix10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0, 99,5%, MH384988.1	<i>Thalassospira permensis</i> NBRC 106175 strain SMB34 16S ribosomal RNA, partial sequence	0.0, 99.48%, NR_116841.1	Thalassospira	98,2
OTU25	Uncultured bacterium clone GCSTWT_16S_529 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0, 98,8%, KT769033.1	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> strain P 369/06 16S ribosomal RNA, partial sequence	0.0, 99.51%, NR_025405.1	Microbacterium	98,3
OTU36	Uncultured bacterium clone GCSTWT_16S_3814 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0, 99,0%, KT772149.1	<i>Verrucomicrobium spinosum</i> DSM 4136 = JCM 18804 16S ribosomal RNA, partial sequence	3E-101, 89.79%, NR_026266.1		89,2
OTU57	Uncultured Rhodobacterales bacterium clone OTU271 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0, 99,5%, MK589128.1	<i>Roseovarius litoreus</i> strain GSW-M15 16S ribosomal RNA, partial sequence	0.0, 98.43%, NR_109594.1	Roseovarius	98,0
OTU105	<i>Thalassospira permensis</i> strain Mix10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2,00E-135, 94.34%, MH384988.1	<i>Thalassospira permensis</i> NBRC 106175 strain SMB34 16S ribosomal RNA, partial sequence	3,00E-139, 94.34%, NR_116841.1		85,4
OTU130	Uncultured bacterium clone HXF_2_9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2,00E-136, 4.65%, KJ814113.1	<i>Thalassospira permensis</i> NBRC 106175 strain SMB34 16S ribosomal RNA, partial sequence	3,00E-139, 94.34%, NR_116841.1		85,3

OTU131	<i>Uncultured bacterium clone SINP1102 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	0.0, 98.96%, HM127383.1	<i>Yoonia vestfoldensis strain NBRC 102487 16S ribosomal RNA, partial sequence</i>	0.0, 98.18%, NR_114116.1	Yoonia-Loktanelia	97,0
OTU159	<i>Uncultured SAR11 cluster alpha proteobacterium clone YL213 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	0,0%, 89.06%, HM856573.1	<i>Thalassospira povalilytica strain Zumi 95 16S ribosomal RNA, partial sequence</i>	4,00E-131, 92.97%, NR_125450.1		82,8
OTU163	<i>Uncultured bacterium clone MWLSC95 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	0.0, 97.17%, FJ937853.1	<i>Synechococcus rubescens strain SAG 3.81 16S ribosomal RNA, partial sequence</i>	5,00E-149, 90.49%, NR_125481.1		90,0
OTU180	<i>Uncultured bacterium X131A_Mar15-2_H12 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence</i>	0,0%, 92.95%, LC329532.1	<i>Thalassospira permensis NBRC 106175 strain SMB34 16S ribosomal RNA, partial sequence</i>	6,00E-148, 95.96%, NR_116841.1		87,6
OTU183	<i>Uncultured SAR11 cluster alpha proteobacterium clone YL213 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	0,0%, 88.97%, HM856573.1	<i>Thalassospira povalilytica strain Zumi 95 16S ribosomal RNA, partial sequence</i>	4,00E-131, 92.97%, NR_125450.1		82,7
OTU194	<i>Marivita sp. IMCC25610 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	0.0, 99.48%, KU199727.1	<i>Marivita lacus strain TS-T44 16S ribosomal RNA, partial sequence</i>	0.0, 99.48%, NR_135884.1	Marivita	98,2
OTU208	<i>Uncultured bacterium partial 16S rDNA gene, isolate unamended incubation Desperate fluids (287 ROV 4-7) (2/53), clone Nico-06 E04_E4</i>	2,00E-168, 94.34%, HE580048.1	<i>Thalassospira permensis NBRC 106175 strain SMB34 16S ribosomal RNA, partial sequence</i>	6,00E-148, 95.96%, NR_116841.1		87,6
OTU215	<i>Uncultured bacterium clone MWLSC95 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	7,00E-174, 95.37%, FJ937853.1	<i>Microcystis aeruginosa strain NIES-843 16S ribosomal RNA, complete sequence</i>	1,00E-144, 89.72%, NR_074314.1		89,0
OTU216	<i>Uncultured bacterium partial 16S rDNA gene, isolate unamended incubation Desperate fluids (287 ROV 4-7) (2/53), clone Nico-06 E04_E4</i>	1,00E-169, 94.60%, HE580048.1	<i>Thalassospira permensis NBRC 106175 strain SMB34 16S ribosomal RNA, partial sequence</i>	2,00E-153, 97.20%, NR_116841.1		88,6

OTU220	<i>Erythrobacter</i> sp. strain InAD-095 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0, 98.48%, MF401300.1	<i>Erythrobacter seohaensis</i> strain SW-135 16S ribosomal RNA, partial sequence	0,0, 98.48%, NR_025817.1	Altererythrobacter	98,5
OTU310	Uncultured bacterium X131A_Mar15-2_H12 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	0,0, 92.73%, LC329532.1	<i>Thalassospira permensis</i> NBRC 106175 strain SMB34 16S ribosomal RNA, partial sequence	6,00E-148, 95.96%, NR_116841.1		87,6
OTU321	Uncultured alpha proteobacterium clone XSLLO96 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0, 99.22%, KC246544.1	<i>Roseovarius aestuariivivens</i> strain GHTF-24 16S ribosomal RNA, partial sequence	0,0, 98.69%, NR_156045.1	Roseovarius	97,0
OTU326	Uncultured bacterium clone HXF_1_21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	8,00E-173, 94.46%, KJ814131.1	<i>Thalassospira permensis</i> NBRC 106175 strain SMB34 16S ribosomal RNA, partial sequence	5,00E-155, 96.39%, NR_116841.1		88,8
OTU359	Uncultured bacterium clone HXF_2_9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0, 99.36%, KJ814113.1	<i>Thalassospira permensis</i> NBRC 106175 strain SMB34 16S ribosomal RNA, partial sequence	1,00E-156, 99.04%, NR_116841.1		84,7
OTU378	<i>Picochlorum</i> sp. CHLO1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	1,00E-169, 95.14%, MN647759.1	<i>Cylindrospermum stagnale</i> 16S ribosomal RNA, partial sequence	3,00E-126, 86.12%, NR_102462.1		90,3
OTU387	Uncultured bacterium clone 788_FE_1_35-27F_C11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0, 90.91%, KC294885.1	<i>Roseovarius aestuariivivens</i> strain GHTF-24 16S ribosomal RNA, partial sequence	5,00E-149, 96.26%, NR_156045.1		86,0
OTU403	Uncultured bacterium clone HXF_2_9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2,00E-155, 91.41%, KJ814113.1	<i>Thalassospira permensis</i> NBRC 106175 strain SMB34 16S ribosomal RNA, partial sequence	6,00E-154, 98.40%, NR_116841.1		89,4
OTU417	Uncultured bacterium clone HXF_2_9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	7,00E-155, 92.03%, KJ814113.1	<i>Thalassospira permensis</i> NBRC 106175 strain SMB34 16S ribosomal RNA, partial sequence	2,00E-154, 91.26%, NR_116841.1		90,2
OTU462	<i>Picochlorum</i> sp. CHLO1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	0,0, 92.04%, MN647759.1	<i>Halomicronema excentricum</i> strain TFEP1 16S ribosomal RNA, partial sequence	3,00E-126, 84.83%, NR_114591.1		85,1

OTU522	<i>Uncultured bacterium clone HXF_2_9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2,00E-160, 92.21%, KJ814113.1	<i>Thalassospira permensis NBRC 106175 strain SMB34 16S ribosomal RNA, partial sequence</i>	8,00E-159, 91.21%, NR_116841.1		90,6
OTU532	<i>Picochlorum sp. CHLO1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast</i>	9,00E-166, 92.31%, MN647759.1	<i>Cylindrospermum stagnale PCC 7417 16S ribosomal RNA, partial sequence</i>	9,00E-127, 84.62%, NR_114701.1		84,9
OTU551	<i>Uncultured bacterium clone HXF_2_9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	2,00E-135, 94.34%, KJ814113.1	<i>Thalassospira permensis NBRC 106175 strain SMB34 16S ribosomal RNA, partial sequence</i>	1,00E-137, 94.03%, NR_116841.1		84,9

