

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Ανάλυση της φυλογενετικής ποικιλότητας των κυανοβακτηρίων
σε ιζήματα της λίμνης της Καστοριάς»**

ΠΕΤΡΙΔΟΥ ΕΥΔΟΞΙΑ

ΒΟΛΟΣ 2010

**«Ανάλυση της φυλογενετικής ποικιλότητας των κυανοβακτηρίων σε ιζήματα της
λίμνης της Καστοριάς»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

1) Κωνσταντίνος Αρ. Κορμάς, Αναπληρωτής Καθηγητής, Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπων*,

2) Δημήτριος Βαφείδης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Βιοποικιλότητα των Θαλάσσιων Βενθικών Ασπονδύλων και άμεση - έμμεση χρησιμότητά τους, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*,

3) Ιωάννης Μποζιάρης, Επίκουρος Καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*.

Στην οικογένεια μου

«Ο βέβαιος και οριστικός καθορισμός των
ειδών των βακτηρίων απαιτεί τόσο πολύ
χρόνο, τόση παρατηρητικότητα και κρίση,
τόση επιμονή και υπομονή, που δύσκολα
μπορεί να βρει κανείς κάτι πιο δύσκολο
από αυτό»

Otto F. Müller

International Journal of Systematic
Bacteriology (Cover), (1979), volume 29.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου σε όλους αυτούς τους ανθρώπους που συνέβαλλαν στο να φέρω εις πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, τον κ. Κορμά Κωνσταντίνο για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους κ. Βαφείδη και κ. Μποζιάρη, για τις χρήσιμες συμβουλές τους.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Παχιαδάκη Μαρία για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά της, καθώς επίσης τον Δρ. Γκέλη Σπύρο για την αμέριστη συμπαράστασή του κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η φυλογενετική ποικιλότητα των κυανοβακτηρίων σε ιζήματα της λίμνης της Καστοριάς, που είναι γνωστή για την ύπαρξη κυανοβακτηρίων από παλαιότερες έρευνες. Πραγματοποιήθηκε συλλογή ιζήματος από τρεις σταθμούς, της λίμνης της Καστοριάς, τον μήνα Οκτώβριο του 2005. Απομονώθηκε DNA από το ίζημα και ακολούθησε ενίσχυση του γονιδίου 16s rRNA με ειδικούς εκκινητές με την τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης, PCR (Polymerase Chain Reaction). Έπειτα πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR, επεξεργασία των αποικιών και αλληλούχιση. Έγινε ανάλυση των αλληλουχιών που προέκυψαν και συγκρίθηκαν με γνωστές αλληλουχίες της βάσης δεδομένων της GenBank μέσω του προγράμματος BLAST με σκοπό να βρεθούν οι κοντινότεροι συγγενείς φυλότυποι. Τέλος, κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο των 16s RNA γονιδίων με το λογισμικό MEGA5. Προσδιορίστηκαν, πέντε είδη κυανοβακτηρίων εκ των οποίων τα τέσσερα ανήκαν στην τάξη Nostocales ενώ, το πέμπτο φαίνεται να είναι πλαστίδιο μικροφύκους. Βρέθηκαν επίσης, και αντιπρόσωποι από τα φύλλα των Verrucomicrobia, Acidobacteria, Chloroflexi και Firmicutes. Το γεγονός ότι, δεν ανακτήθηκαν κυανοβακτήρια σε μεγάλη αφθονία, δύο χρόνια μετά την άνθιση του νερού, υποδηλώνει ότι είτε δεν μπορούν να διατηρηθούν στο ίζημα, είτε βρίσκονται σε κυτταρικές μορφές που δεν μπορούν να ανιχνευθούν με τις μεθόδους που εφαρμόζονται.

Λέξεις κλειδιά: Cyanobacteria, 16S rRNA, ίζημα, λίμνη, Καστοριά

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

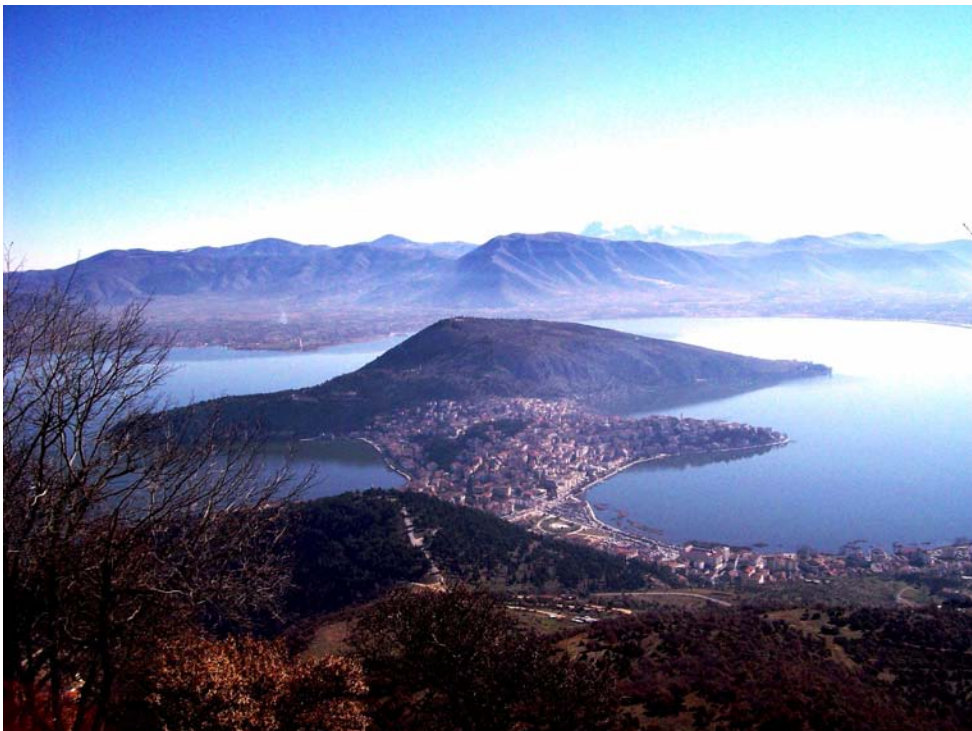
1.	Εισαγωγή	σελ: 8
1.1.	Γενικά	σελ: 8
1.2.	Περιβαλλοντικά προβλήματα της λίμνης	σελ: 11
1.3.	Φυτοπλαγκτό των λιμνών	σελ: 13
1.4.	Κυανοβακτήρια	σελ: 14
1.5.	Μέθοδοι προσδιορισμού μικροοργανισμών (PCR)	σελ: 17
1.6.	Σκοπός και αντικείμενο της έρευνας	σελ: 18
2.	Υλικά και μέθοδοι	σελ: 19
2.1.	Δειγματοληψία	σελ: 19
2.2.	Απομόνωση DNA από το ίζημα	σελ: 20
2.3.	PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης) ενίσχυση του γονιδίου 16s rRNA	σελ: 20
2.4.	Κλωνοποίηση	σελ: 23
2.5.	Επεξεργασία αποικιών μετά την κλωνοποίηση	σελ: 24
2.6.	Υγρές καλλιέργειες	σελ: 26
2.7.	Αλληλούχιση DNA (sequencing)	σελ: 26
2.8.	Φυλογενετική ανάλυση	σελ: 27
3.	Αποτελέσματα	σελ: 28
4.	Συζήτηση	σελ: 34
5.	Βιβλιογραφία	σελ: 40
6.	Abstract	σελ: 45

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Στη δυτική Μακεδονία, στο Νομό Καστοριάς γύρω από την ομώνυμη πόλη, απλώνεται η λίμνη της Καστοριάς, σε υψόμετρο 630 m, με νεφροειδές σχήμα που οφείλεται στην εισχώρηση της λοφώδους χερσονήσου.

Η πόλη της Καστοριάς είναι κτισμένη στον ισθμό της λίμνης (Εικ. 1.1), η οποία αποτελεί κατάλοιπο παλιάς εκτεταμένης λίμνης που είχε έκταση 164 km² και μέγιστο βάθος μεγαλύτερο από 50 m. Η λίμνη της Καστοριάς είναι καρστική τεκτονικής προέλευσης και υπολογίζεται ότι σχηματίστηκε πριν από 10.000.000 έτη. Οι γεωγραφικές της συντεταγμένες στο κέντρο είναι, γεωγραφικό πλάτος 40° 31' Β και γεωγραφικό μήκος 21° 18' Α. (Stankovic 1931).



Εικόνα 1.1 : Η λίμνη της Καστοριάς και η πόλη.

Η αρχική λίμνη έχει μειωθεί αρκετά και η σημερινή της έκταση είναι 26 με 28 km², ενώ το μέγιστο βάθος υπολογίζεται περίπου στα 9,5 m, το μέσο βάθος της είναι γύρω στα 4 m και ο όγκος του νερού 100 Km³. Το υψόμετρο της μέσης στάθμης της βρίσκεται στα 629,50 m και η περίμετρος της πλησιάζει τα 31 km. (Mourkides and Tsiouris 1984).

Η λεκάνη απορροής της λίμνης (Εικ. 1.2), έκτασης 278 Km² οριοθετείται ως εξής: Βόρεια, από το όρος Βέρνο με ψηλότερη κορυφή το Βίτσι (2128 m) και τα υψώματα Σπυριδάκη, κορυφή Συκαβίτσας και Αγία Παρασκευή. Νότια, από τα υψώματα Πετρώδες, Μικρό Βουνό και Κορησός. Ανατολικά, από τα υψώματα Φαλακρό, Στενά Κλεισούρας και Πύργος. Δυτικά από τα υψώματα Κορυφή, Αγία Τριάδα, Καζάνι και Περτσέλη.

Στην περιοχή υπάρχουν εννέα ρέματα που καταλήγουν στην λίμνη της Καστοριάς. Το μεγαλύτερο είναι το ρέμα του Ξηροπόταμου, που καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του ανατολικού τμήματος της λεκάνης απορροής και εκβάλλει στη λίμνη ανάμεσα στις κοινότητες Μαυροχωρίου και Πολυκάρπης του Δήμου Μακεδνών. Εκτός αυτού, στο ανατολικό τμήμα υπάρχουν τα ρέματα Ίστακου και Φωτεινής. Στο δυτικό τμήμα υπάρχουν τα ρέματα Αποσκέπου και Φουντουκλή, ενώ στο βόρειο τμήμα τα ρέματα Μεταμόρφωσης, Τοιχιού, Αγίου Αθανασίου και Βυσσινιάς. Η λίμνη τροφοδοτείται εκτός από τα ρέματα και το νερό της βροχής και από πολλές υπολίμνιες πηγές. Στο νότιο τμήμα μια διώρυγα (ρέμα Γκιόλι) συνδέει τη λίμνη με τον ποταμό Αλιάκμονα, στον οποίον παροχετεύεται η πλεονάζουσα ποσότητα των νερών της με χρήση ηλεκτρικού θυροφράγματος, που τον χειμώνα 2009-2010 αποδείχτηκε ανεπαρκές, αφού δεν μπόρεσε να απομακρύνει την πλεονάζουσα ποσότητα των νερών που συγκεντρώθηκαν από τις υπερβολικές βροχοπτώσεις και χιονοπτώσεις, με συνέπεια να πλημμυρίσει η πόλη.

Σχεδόν κάθε χειμώνα για μια εβδομάδα ως και 15-20 μέρες η λίμνη παγώνει (Παυλόπουλος και συν. 2009)



Εικόνα 1.2 : Όρια λεκάνης απορροής της λίμνης της Καστοριάς.

1.2 Περιβαλλοντικά προβλήματα της λίμνης

Τα αστικά και περιαστικά λύματα, τα οποία μέχρι το 1990 κατέληγαν αυτούσια στη λίμνη, μαζί με τα λιπάσματα που πιθανώς ρίχνονται ακόμη και σήμερα στις παραλίμνιες καλλιέργειες, προκάλεσαν σοβαρό πρόβλημα ρύπανσης με συνέπεια, την υπέρμετρη ανάπτυξη της υδρόβιας βλάστησης και του φυτοπλαγκτού (πρασίνισμα της λίμνης), ειδικά την περίοδο του καλοκαιριού και του φθινοπώρου, με αποτέλεσμα τη μείωση της διαύγειας του νερού, αλλά και του διαλυμένου οξυγόνου.

Από το 1990 λειτουργεί μονάδα δευτεροβάθμιου βιολογικού καθαρισμού των λυμάτων της πόλης και των παραλίμνιων χωριών (Εικ. 1.3), με αποτέλεσμα την σταδιακή αναβάθμιση της ποιότητας του νερού αλλά και της ζωής του υγρότοπου.

Σύμφωνα με τη μελέτη ευτροφισμού και ποιότητας νερού που εκπονήθηκε από το Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης το Φεβρουάριο του 1994, στα πλαίσια του προγράμματος "Εξυγίανση και Αξιοποίηση της Λίμνης Καστοριάς", με βάση 15 δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν από το Δεκέμβριο του 1992 έως το Δεκέμβριο του 1993 (δύο χρόνια μετά την έναρξη λειτουργίας του βιολογικού καθαρισμού), η λίμνη της Καστοριάς πρέπει να χαρακτηριστεί εύτροφη με βάση τη διαφάνεια ενώ με βάση τον ολικό φωσφόρο και τη χλωροφύλλη α το ανώτατο όριο των τιμών που παρατηρήθηκαν υπερβαίνουν την εύτροφη κατηγορία και εμπίπτουν στην υπερέυτροφη (Οικονομόπουλος 1994). Κατά τη δεκαετία 1995-2005, η βιομάζα των κυανοβακτηρίων παρουσίασε διακριτές αλλαγές, καθώς, ελαττώθηκαν σταδιακά με τη πάροδο του χρόνου ως απόκριση στη μείωση των εξωτερικών φορτίων θρεπτικών, χωρίς όμως την απουσία ανθίσεων νερού κατά τη θερινή περίοδο του έτους (Κατσιάπη 2007).



Εικόνα 1.3 : Μονάδα δευτεροβάθμιου βιολογικού καθαρισμού των λυμάτων της Καστοριάς.

Τα λιπάσματα και φυτοφάρμακα που χρησιμοποιούνται ακόμη σε μεγάλη κλίμακα στις γεωργικές καλλιέργειες στην παραλίμνια ζώνη, ρυπαίνουν το έδαφος και τον υπόγειο υδροφόρο ορίζοντα έχοντας σαν τελικό αποδέκτη τη λίμνη. Αυτά μαζί με ένα μέρος των λυμάτων της πόλης της Καστοριάς και των λοιπών παραλίμνιων οικισμών που δεν καταλήγουν στο βιολογικό καθαρισμό αλλά πέφτουν χωρίς καμία επεξεργασία στη λίμνη, έχουν ως αποτέλεσμα την παράταση του φαινομένου του ευτροφισμού της λίμνης Καστοριάς και την εμφάνιση της άνθισης των φυκών (Εικ. 1.4) (Οικονομόπουλος 1994).



Εικόνα 1.4 : Άνθιση φυτοπλαγκτού στη λίμνη της Καστοριάς (Αύγουστος 2010).

1.3 Φυτοπλαγκτό των λιμνών

Η πρωτογενής παραγωγή των λιμνών στηρίζεται στα φύκη, στα μακρόφυτα και στα φωτοσυνθετικά βακτήρια. Η κοινωνία του φυτοπλαγκτού αποτελεί τη σημαντικότερη ομάδα φωτοσυνθετικών οργανισμών στην πελαγική ζώνη των λιμνών και αποδίδει το 70% περίπου του παραγόμενου στην ατμόσφαιρα της γης οξυγόνου (Reynolds 1984).

Το φυτοπλαγκτό συνίσταται από μικροσκοπικά φύκη με παθητική μετακίνηση μέσω του ανέμου ή των ρευμάτων, προσαρμοσμένα να ζουν σε αιώρηση ή επίπλευση στα υδάτινα συστήματα. Το φυτοπλαγκτό των λιμνών αποτελείται από κυανοβακτήρια και από φύκη (Εικ. 1.5) σχεδόν κάθε κύριας ομάδας (χλωροφύκη, διάτομα, απτοφύκη, κρυπτοφύκη, ξανθοφύκη, δινοφύκη, ευγληνοφύκη και χρυσοφύκη) (Wetzel 1983).



Εικόνα 1.5 : Φυτοπλαγκτό στη λίμνη της Καστοριάς (Αύγουστος 2010).

1.4 Κυανοβακτήρια

Τα κυανοβακτήρια ή κυανοφύκη ή κυανοπράσινα φύκη ή κυανόφυτα αποτελούν τη μεγαλύτερη, την πιο ποικιλόμορφη και την πιο ευρύτερα εξαπλωμένη ομάδα φωτοσυνθετικών προκαρυωτικών οργανισμών. Είναι οι μοναδικοί προκαρυωτικοί οργανισμοί, που διεξάγουν οξυγενή φωτοσύνθεση παρόμοια με αυτή των ανώτερων φυτών στα περισσότερα εσωτερικά νερά και που μπορούν να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην ποιότητα του νερού και τη λειτουργία των υδρόβιων οικοσυστημάτων.

Περιλαμβάνουν περίπου 2000 είδη σε πάνω από 150 γένη, με ένα ευρύ φάσμα μορφών και μεγεθών (Chorus and Bartram 1999). Τα κυανοβακτήρια διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα βασισμένο σε ένα στρώμα πεπτιδογλυκάνης, που τα κατατάσσει στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Castenholz 2001).

Θεωρούνται οι πρώτοι οργανισμοί στη Γη που μπόρεσαν να εξελιχθούν παρουσία O_2 . Σ' αυτά τα βακτήρια αποδίδεται η οξυγόνωση της ατμόσφαιρας. Υπάρχουν παντού στη φύση σε ενδιαιτήματα χερσαία, θαλάσσια, και του γλυκού νερού. Γενικά, είναι πιο ανθεκτικά σε ακραία περιβάλλοντα απ' ό,τι τα φύκη και συχνά είναι οι μόνοι ή οι κύριοι φωτότροφοι οργανισμοί που παράγουν οξυγόνο στις θερμές πηγές, σε αλατούχες λίμνες, και σε άλλα ακραία περιβάλλοντα.

Τα κυανοβακτήρια αναπτύσσονται επίσης σε λίμνες με γλυκό νερό, ιδιαίτερα σε εκείνες που είναι πλούσιες σε θρεπτικά συστατικά. Τις περισσότερες φορές, είναι τα πρώτα φυτά που εποικίζουν γυμνές περιοχές βράχων και εδάφους επειδή διαθέτουν προσαρμογές που τους επιτρέπουν να εποικίζουν άγονα υποστρώματα όπως ηφαιστειακή στάχτη, αμμώδεις εκτάσεις στην έρημο και βράχια (Pentecost and Whitton 2000, Wynn-Williams 2000). Έχει παρατηρηθεί σε όλη σχεδόν την ηπειρωτική Ελλάδα

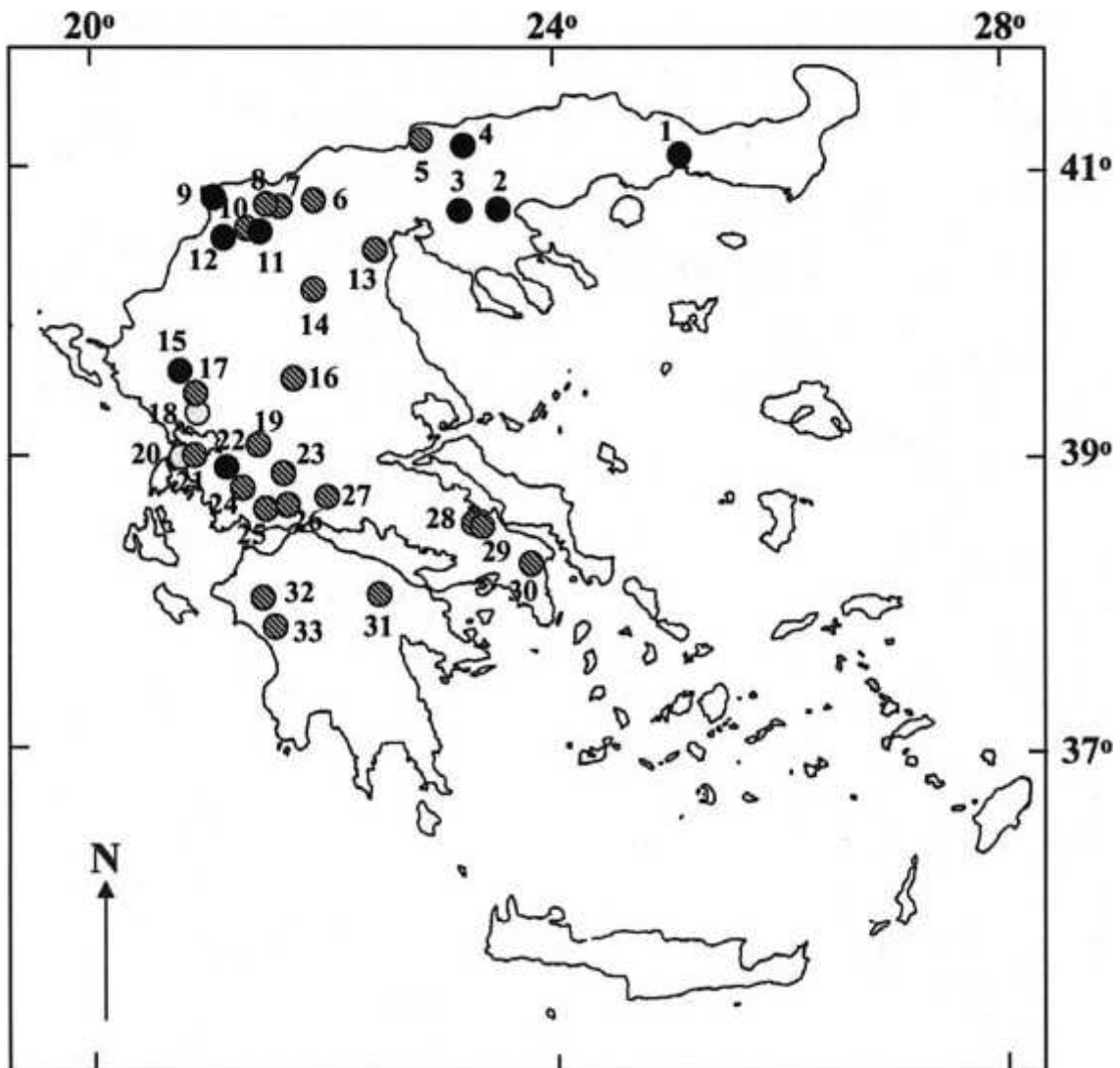
η ανάπτυξη τοξικών, δυνητικά τοξικών και μη τοξικών ειδών κυανοβακτηρίων (Εικ. 1.6).

Τα κυρίαρχα περιβάλλοντα που απαντούν τα κυανοβακτήρια είναι τα λιμναία και θαλάσσια οικοσυστήματα. Η ικανότητα τους να εποικίζουν ακραία περιβάλλοντα γενικά είναι εντυπωσιακή. Επιβιώνουν σε ακραίες υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες (Wynn-Williams 2000), σε θερμές πηγές (Ward and Castenholz 2000), υπεράλυρα περιβάλλοντα όπως η Νεκρά Θάλασσα (Oren 2000), αρκτικές και ανταρκτικές λίμνες, χιόνι και πάγο (Vincent 2000).

Ο σχηματισμός κυανοβακτηριακής άνθισης οφείλεται σε έναν συνδυασμό αβιοτικών και βιοτικών παραγόντων. Στους αβιοτικούς παράγοντες ανήκουν η υψηλή θερμοκρασία του νερού, τα αυξημένα φορτία θρεπτικών αλάτων, η στρωμάτωση της στήλης του νερού, ο χαμηλός λόγος αζώτου/φωσφόρου καθώς και το υψηλό pH, ενώ στους βιοτικούς παράγοντες ανήκουν οι ιδιότητες των ίδιων των κυανοβακτηρίων, όπως η επιλεκτική θήρευση που ασκεί το ζωοπλαγκτό και η παραγωγή τοξινών (Reynolds and Walsby 1975).

Οι κυανοβακτηριακές ανθίσεις του νερού μειώνουν την αξία του οικοσυστήματος στο οποίο εμφανίζονται και δημιουργούν προβλήματα οικολογικά, δημόσιας υγείας και οικονομικά (Carmichael 1994). Ένας μεγάλος αριθμός κυανοβακτηρίων που συμμετέχουν σε αυτές τις ανθίσεις έχει την ικανότητα να παράγει τοξίνες ως προϊόντα του μεταβολισμού του (Sivonen and Jones 1999).

Τα είδη από τα οποία έχουν απομονωθεί τοξίνες ανήκουν στα γένη: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Hapthalophon*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Shcizothrix*, *Umezakia* (Carmichael 1992, Sivonen and Jones 1999), *Anabaenopsis* (Lanaras and Cook 1994) και *Aphanocapsa* (Domingos et al. 1999).



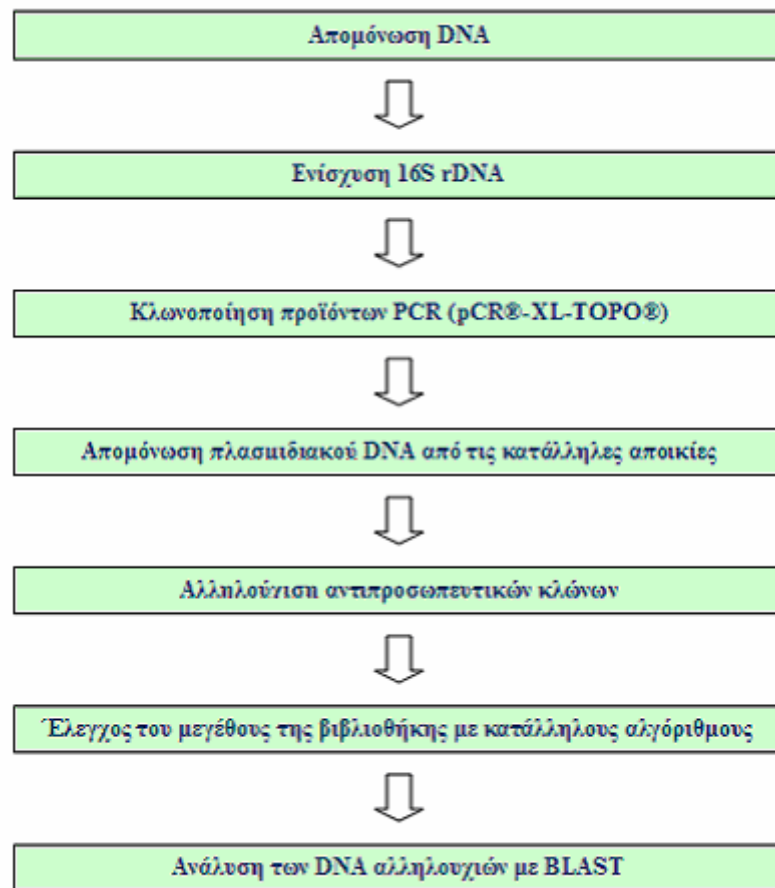
Εικόνα 1.6 : Χάρτης της Ελλάδας ο οποίος δείχνει τη θέση των γλυκών υδάτων στις οποίες έχουν παρατηρηθεί: α) τοξικά γένη κυανοβακτηρίων (μαύρους κύκλους), β) δυνητικά γένη τοξικών κυανοβακτηρίων (Γραμμωτοί κύκλοι), γ) μη τοξικά γένη κυανοβακτηρίων (λευκοί κύκλοι) (Cook et al. 2004).

1.5 Μέθοδοι προσδιορισμού μικροοργανισμών - PCR

Ο προσδιορισμός των μικροοργανισμών μέχρι πρόσφατα πραγματοποιούνταν μέσω της ανάπτυξης τους σε καλλιέργειες. Η τεχνική αυτή έχει διαπιστωθεί πως είναι αρκετά χρονοβόρα και ανεπαρκής για την αποκάλυψη της πλειονότητας των μικροοργανισμών του περιβάλλοντος, καθώς ορισμένοι μικροοργανισμοί απαιτούν ιδιαίτερες συνθήκες για την ανάπτυξη τους (Amann et al. 1995). Εξαιτίας περιβαλλοντικού stress (UV, θερμοκρασία, αλατότητα) καλλιεργούμενα βακτήρια εισέρχονται σε φάση όπου δεν μπορούν να σχηματίσουν αποικίες σε τρυβλία.

Σήμερα η ανίχνευση των μικροοργανισμών γίνεται μέσω της εύρεσης της αλληλουχίας του 16s rRNA γονιδίου τους και σύγκρισή τους με ήδη γνωστές αλληλουχίες (Εικ. 1.7). Κάποιες περιοχές από το μόριο αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν για φυλογενετική ανάλυση, εφόσον δεν είναι συντηρητικές (Olsen et al. 1986).

Η αλληλούχιση του 16S rDNA γονιδίου μπορεί να αποτελέσει μία καλή βάση για την αποτίμηση των γενών των κυανοβακτηρίων, καθώς μπορεί να είναι σύμφωνη με τους φαινοτυπικούς χαρακτήρες και τους χαρακτήρες υπερδομής των γενών (Komarek 2003).



Σχήμα 1.7 : Απεικόνιση της μεθοδολογίας ανάλυσης της φυλογενετικής ποικιλότητας των κυανοβακτηρίων (Amann et al. 1995).

1.6 Σκοπός και αντικείμενο της έρευνας

Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο την ανάλυση της φυλογενετικής ποικιλότητας των κυανοβακτηρίων σε ιζήματα της λίμνης της Καστοριάς, με τη χρήση μοριακών μεθόδων. Στο ίζημα αναμένεται η συγκέντρωση κυανοβακτηρίων που διαβιούν στη λίμνη και ειδικότερα από ανθίσεις κυανοβακτηρίων παλαιότερων ετών, καθώς το ίζημα θεωρείται δεξαμενή κυτταρικού υλικού που καθιζάνει.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δειγματοληψία

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή του πειράματος συλλέχθηκαν τον Οκτώβριο του 2005 (Kormas et al. 2010) από τρεις σταθμούς στη λίμνη της Καστοριάς. Οι δύο δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν στη παραλιακή ζώνη ενώ η τρίτη στην πελαγική ζώνη σε βάθος 3 m. Για τις αναλύσεις της παρούσας διατριβής τα τρία δείγματα αναμείχθηκαν μεταξύ τους. Η συλλογή του ιζήματος από την παραλιακή ζώνη πραγματοποιήθηκε σε βάθος 10 cm με σύριγγα, ενώ για τη συλλογή του ιζήματος στην πελαγική ζώνη χρησιμοποιήθηκε πυρηνολήπτης Ekman. Κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας καταγράφηκε στο πεδίο η θερμοκρασία του περιβάλλοντος και του ιζήματος, με τη βοήθεια φορητού ψηφιακού θερμομέτρου. Οι μετρήσεις των φυσικοχημικών παραμέτρων που αφορούσαν τη θερμοκρασία, διαλυμένο οξυγόνο, νιτρικά, αμμωνιακά και φώσφορικά ιόντα παραχωρήθηκαν από το Δήμο Καστοριάς (Πίν. 1) (Κοντογιάννη 2006).

Πίνακας 1: Φυσικοχημικές μετρήσεις του περιβάλλοντος (Κοντογιάννη 2006)

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΣΤΑ 3m	14,2 °C
ΔΙΑΛΥΜΕΝΟ ΟΞΥΓΟΝΟ ΣΤΗΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ	5,200 mg/l
ΔΙΑΛΥΜΕΝΟ ΟΞΥΓΟΝΟ ΣΕ ΒΑΘΟΣ 3m	5,230 mg/l
NO ₃ - N	0,017 mg/l
NH ₃ - N	0,010 mg/l
ΦΩΣΦΟΡΟΣ	0,220 mg/l

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φορητό ψυγείο και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο για ομογενοποίηση και κατόπιν αποθήκευση στους -20°C .

2.2 Απομόνωση DNA από το ίζημα

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε το Ultra Clean Mega Soil DNA Kit (MoBio, USA) σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή, με τη μόνη διαφορά ότι στο τελευταίο βήμα αντί για 8 ml Solution S5 χρησιμοποιήθηκαν 6 ml, τα οποία προστέθηκαν σταδιακά σε 3 δόσεις (2 ml τη φορά) και ακολούθησε φυγοκέντρηση 3 min μετά την κάθε προσθήκη. Μετά τη διαδικασία έγινε έλεγχος της ποσότητας του DNA που υπάρχει στο δείγμα με τη βοήθεια του μηχανήματος nanodrop και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C .

2.3 PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης) ενίσχυση του γονιδίου 16s rRNA

Το μίγμα που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR είχε την παρακάτω αναλογία αντιδραστηρίων (Πίν. 2) :

Πίνακας 2: Μίγμα για την πραγματοποίηση της PCR

Template	1μl
dNTPs	1μl
Buffer 5x	10μl
MgCl ₂	3μl
CyA106F	0,5μl
CyA781Rmix*	0,5μl
Taq	0,25μl
PCR-H ₂ O	33,75μl

*CYA781Rmix(0,25μl CyA781R(a) and 0,25μl CyA781R(b))

Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την ειδική ενίσχυση του γονιδίου ήταν (Nübel et al. 1997) :

CYA106F 5'-CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA-3'

CYA781R(a) 5'-GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT-3'

CYA781R(b) 5'-GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT-3'

Πραγματοποιήθηκε PCR για 35 κύκλους με τις παρακάτω συνθήκες (Πίν. 3).

Πίνακας 3: Συνθήκες PCR

Hot Start	5min	94 °C
Αποδιάταξη	30sec	94 °C
Ισχυροποίηση	30sec	57 °C
Επιμήκυνση	30sec	72 °C
	5min	72 °C

Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1,2% σε διάλυμα TAE 1X σε συνθήκες 80V, 45 min. Για την χρώση χρησιμοποιήθηκε EtBr (βρωμιούχο αιθίδιο).

Βασικός σκοπός ήταν με όσο το δυνατό λιγότερους κύκλους να γίνει ανίχνευση του επιθυμητού προϊόντος, προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι εγγενείς περιορισμοί της PCR (Spiegelman et al. 2005) και η διαφορετική εκπροσώπηση των γονιδίων του 16S rRNA με χαμηλό και υψηλό αριθμό αντιγράφων. Αυτό πραγματοποιήθηκε με τη διαδικασία της βελτιστοποίησης των κύκλων σύμφωνα με την οποία ακολουθούνται οι ίδιες συνθήκες για διαφορετικό αριθμό κύκλων.

2.4 Κλωνοποίηση

Πριν τη διαδικασία της κλωνοποίησης, έγινε καθαρισμός των προϊόντων PCR, με kit Montage PCR (Millipore, USA) , σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Από το μείγμα των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκαν 250 μl και συμπληρώθηκαν 200 μl PCR-H₂O. Η τελική επαναδιάλυση του καθαρισμένου DNA έγινε στα 25 μl.

Για την πραγματοποίηση της κλωνοποίησης των γονιδίων που προέκυψαν από την PCR ακολουθήθηκαν πιστά οι οδηγίες του κατασκευαστή από το TOPO XL PCR Cloning Kit (Invitrogen, Η.Π.Α). Μετά τον καθαρισμό χρησιμοποιήθηκαν 2 μL από το προϊόν που προέκυψε και προστέθηκαν σε αυτά 0,5 μL πλασμιδίου και το μίγμα επώαστηκε 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά τη διάρκεια της επώασης γίνεται ενσωμάτωση του γονιδίου στα πλασμίδια. Έτσι, ο χρόνος επώασης είναι πολύ σημαντικός, γιατί εάν ξεπεράσει τα 5 min, μειώνεται η απόδοση της ενσωμάτωσης του γονιδίου.

Η αντίδραση τερματίστηκε με τη προσθήκη 0,5 μl 6X TOPO Cloning Stop Solution και ανάμιξη για μερικά δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια ακολούθησε το στάδιο του μετασχηματισμού των βακτηριακών κυττάρων του είδους *Escherichia coli*. Για την πραγματοποίηση του μετασχηματισμού χρησιμοποιήθηκαν 2 μL από τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια, τα οποία τοποθετήθηκαν σε κύτταρα *E. coli* και αφού έγινε η ανάμιξη τους τοποθετήθηκαν σε κυψελίδα. Μέσα σε ηλεκτροεκκενωτή (electroporator 2510, Eppendorf, Η.Π.Α) πραγματοποιήθηκε ηλεκτροεκκένωση με τάση 1800 Volt κατά την οποία τα πλασμίδια εισέρχονται στα κύτταρα του *E. coli*. Αφού βγήκε η κυψελίδα από τον ηλεκτροεκκενωτή προστέθηκαν σε αυτή 450 μl θρεπτικού μέσου S. O. C., αναμίχθηκαν καλά, τοποθετήθηκαν σε σωλήνα τύπου eppendorf 1,7 ml και μεταφέρθηκαν για 1 ώρα στους 37 °C με σκοπό να προσαρμοστούν τα κύτταρα στις

νέες συνθήκες, αλλά και για να εκφραστεί το γονίδιο της ανθεκτικότητας στη καναμυκίνη, για να μπορέσει να γίνει η επίστρωση.

Η επίστρωση πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό Luria-Bertani και μέσο επιλογής καναμυκίνη, προκειμένου να αναπτυχθούν μόνο τα μετασηματισμένα κύτταρα εφόσον αυτά περιέχουν το γονίδιο ανθεκτικότητας στη καναμυκίνη. Η επίστρωση σε τρυβλία στην παρούσα μελέτη έγινε σε τρία τρυβλία με διαφορετικούς όγκους αρχικού εμβολίου (το πρώτο είχε 30 μl κυττάρων, το δεύτερο 60 μl και το τρίτο 90 μl), σε ασηπτικές συνθήκες και ακολούθησε επώαση για 18 h στους 37 °C.

2.5 Επεξεργασία αποικιών μετά την κλωνοποίηση

Μετά την ανάπτυξη των μετασηματισμένων κυττάρων *E.coli* έγινε επιλογή των κλώνων και μεταφέρθηκαν σε τρυβλίο, όπου αναπτύχθηκαν, ώστε να χρησιμοποιηθούν αργότερα ως εμβόλιο σε υγρές καλλιέργειες. Αφού ελεγχθούν για την ύπαρξη του σωστού ενθέματος, μετά για τον έλεγχο αυτού πραγματοποιήθηκε PCR (Πίν. 4, Πίν. 5) και χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα DNA υλικό απευθείας από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν.

Πίνακας 4: Μίγμα για PCR για τον έλεγχο των κλώνων

dNTPs	2μl
Buffer 5x	4μl
MgCl ₂	1,2μl
M13F	0,2μl
M13R	0,2μl
Taq	0,08μl
PCR-H ₂ O	12,32μl

Οι κύκλοι της αντίδρασης ήταν 25 και το ζεύγος των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε M13F (5'-GTAAAACGACGCCAG-3') - M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') οι οποίοι είναι ειδικοί για το συγκεκριμένο πλασμίδιο.

Πίνακας 5: Συνθήκες για την PCR των κλώνων

Hot Start	5min	94°C
Αποδιάταξη	45sec	94°C
Ισχυροποίηση	45sec	52,5°C
Επιμήκυνση	2min	72°C
	10min	72°C

Μετά την PCR ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αραρόζης 1,2% σε διάλυμα TAE 1X σε συνθήκες 80V και μετά χρώση σε EtBr και έλεγχος του αποτελέσματος σε λάμπα υπεριώδους φωτός (UV).

2.6 Υγρές καλλιέργειες

Κάθε κλώνος που είχε το σωστό σε μέγεθος ένθεμα εμβολιάστηκε σε υγρή καλλιέργεια (θρεπτικό υλικό Luria-Bertani και μέσο επιλογής канаμυκίνη 50 µg/ml). Οι υγρές καλλιέργειες τοποθετήθηκαν για 20 h στον επωαστήρα ανάδευσης στους 37 °C ώστε να οξυγονώνονται. Με την ολοκλήρωση των 20 ωρών, ακολούθησε, η διαδικασία για την απομόνωση του πλασμιδίου με Plasmid DNA Purification, Nucleospin Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Germany), ώστε να ληφθούν καθαρά πλασμίδια, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.7 Αλληλούχιση DNA (sequencing)

Η αλληλούχιση είναι η τεχνική που χρησιμοποιείται για να καθοριστεί η νουκλεοτιδική αλληλουχία ενός τμήματος DNA. Η αλληλούχιση των γονιδίων έγινε με ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς αγγείου σε συσκευή αλληλούχισης ABI 3700 (Applied Biosystems Inc., Η.Π.Α) από την εταιρεία Macrogen (Korea). Για την αλληλούχιση χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές του πλασμιδίου οι οποίοι βρίσκονται εκατέρωθεν της θέσης εισαγωγής του γονιδίου στο πλασμίδιο. Για κάθε γονίδιο προέκυψαν δύο αλληλουχίες οι οποίες με κατάλληλη επεξεργασία έδωσαν την τελική αλληλουχία του γονιδίου που είχε εισαχθεί.

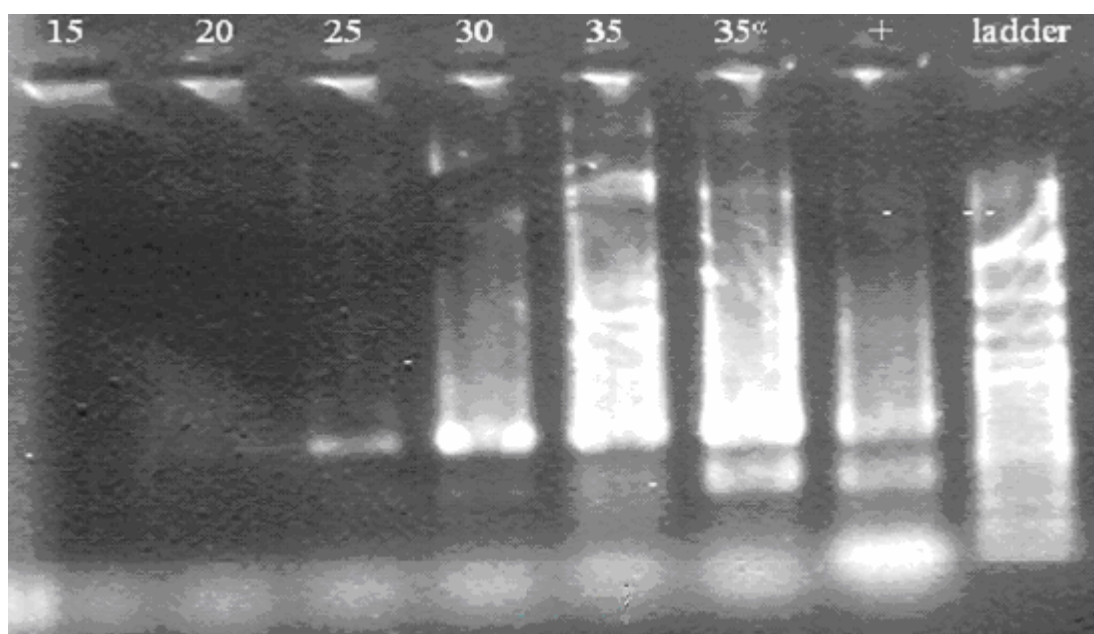
2.8 Φυλογενετική ανάλυση

Από την αλληλούχιση που προηγήθηκε προέκυψαν οι αλληλουχίες για κάθε γονίδιο, οι οποίες συγκρίθηκαν με άλλες γνωστές αλληλουχίες της GENBANK με τη βοήθεια του προγράμματος BLAST, με σκοπό να βρεθούν οι κοντινότεροι συγγενείς σύμφωνα με τη πρωτογενή δομή των γονιδίων. Δημιουργήθηκαν ομάδες, βάσει ομοιότητας 98% και οι μοναδικοί φυλότυποι τοποθετήθηκαν στο πρόγραμμα MEGA5, όπου ακολούθησε η ευθυγράμμιση τους, με τους ήδη γνωστούς συγγενείς, σύμφωνα με το λογισμικό ClustalW, επεξεργασία με τη μέθοδο αποστάσεων Neighbour-Joining και διόρθωση με τη μέθοδο Jukes Cantor και στη συνέχεια τοποθέτηση των αλληλουχιών σε φυλογενετικό δέντρο.

Η μέθοδος Neighbour Joining αποτελεί μία μέθοδο αποστάσεων. Με αυτή τη μέθοδο, οι αποστάσεις εκφράζονται ως το ποσοστό των περιοχών που διαφέρουν ανάμεσα σε δύο αλληλουχίες σε μία πολλαπλή ευθυγράμμιση. Αποτελεί μία αλγοριθμική μέθοδο στην οποία χρησιμοποιούνται υπολογισμοί που περιλαμβάνουν τον χειρισμό μίας μήτρας αποστάσεων που προκύπτει από τις πολλαπλές ευθυγραμμίσεις. Όταν ξεκινάει μία ευθυγράμμιση, υπολογίζεται για κάθε ζεύγος αλληλουχιών η απόσταση ή το ποσοστό των διαφορών και καταγράφονται τα στοιχεία στη μήτρα των αποστάσεων (Hall 2001).

3. Αποτελέσματα

Στην εικόνα 3.1, στους 7 πρώτους διαδρόμους παρατίθενται τα αποτελέσματα από τους κύκλους 15, 20, 25, 30, 35, θετικός μάρτυρας 35^a αντίστοιχα, της PCR που πραγματοποιήθηκε για την βελτιστοποίηση των κύκλων. Στον τελευταίο διάδρομο βρίσκεται ο μοριακός δείκτης.

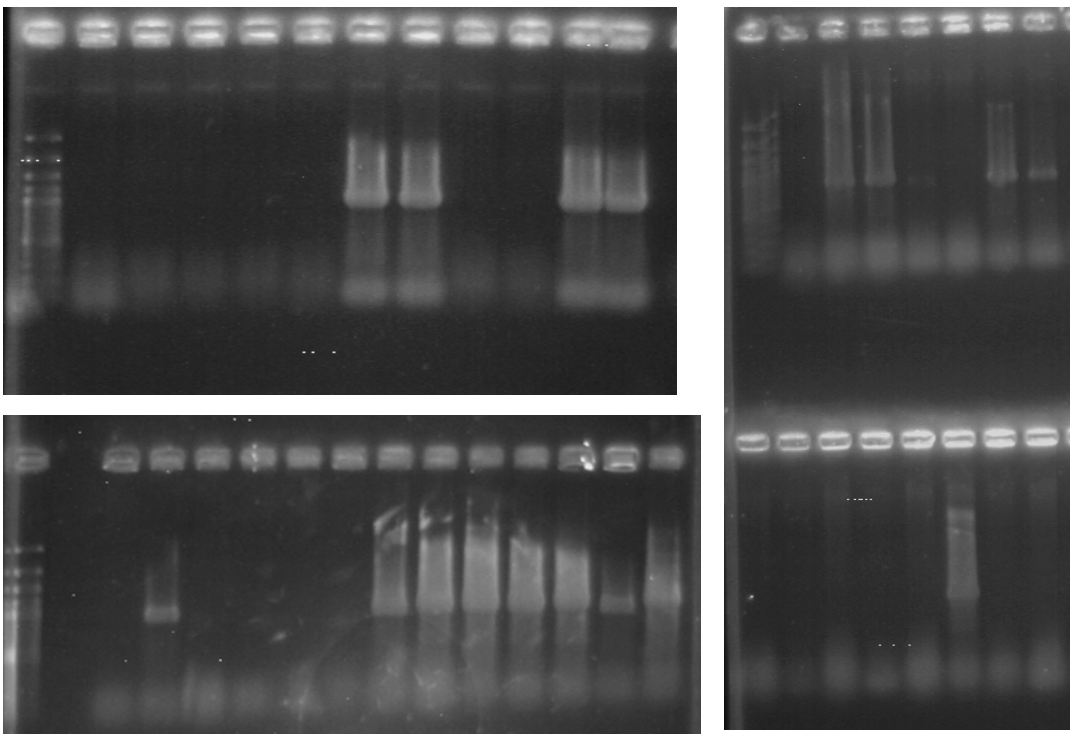


Εικόνα 3.1 : Βελτιστοποίηση κύκλων από 35 σε 15 κύκλους, παρουσιάζεται η πορεία μείωσης των κύκλων. Ladder είναι ο μοριακός δείκτης που χρησιμοποιήθηκε.

Το συμπέρασμα που προέκυψε από τη βελτιστοποίηση των κύκλων από 35 σε 15 είναι ότι το βακτηριακό DNA εντοπίζεται στους 25 κύκλους, το οποίο και χρησιμοποιήθηκε για τη διαδικασία της κλωνοποίησης.

Αφού εντοπίστηκε ο ελάχιστος αριθμός των κύκλων PCR, στους οποίους υπήρχε το επιθυμητό προϊόν, προχωρήσαμε στον καθαρισμό των προϊόντων, ώστε να πραγ-

ματοποιηθεί με επιτυχία η κλωνοποίηση, όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο «μεθοδολογία». Η ποσότητα του DNA που πήραμε από το καθαρό προϊόν της PCR ελέγχθηκε με τη χρήση του Nanodrop και ήταν 51,1 ng/μl. Με την επώαση των τρυβλίων, έγινε έλεγχος των αποικιών των κλώνων με την πραγματοποίηση PCR, και χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές το ζεύγος M13F και M13R. Αυτοί οι εκκινητές είναι ειδικοί για τη σωστή ενσωμάτωση του γονιδίου (Εικ. 3.2).



Εικόνα 3.2 : Έλεγχος των αποικιών των κλώνων με την πραγματοποίηση PCR

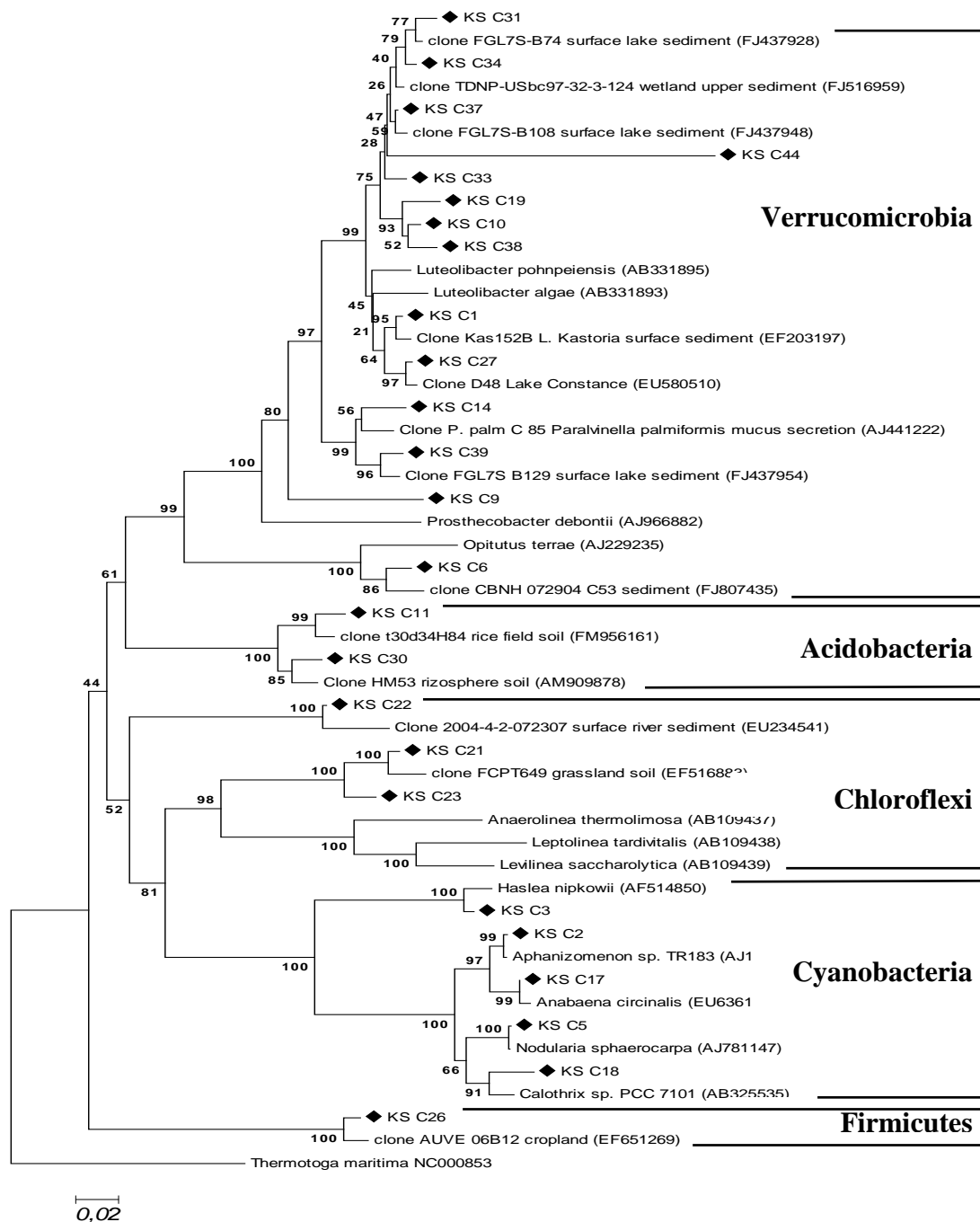
Οι αποικίες που προέκυψαν αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες και ακολούθησε καθαρισμός πλασμιδίου. Μετά την αλληλούχιση που πραγματοποιήθηκε οι φυλότυποι των βακτηρίων που προέκυψαν ταξινομήθηκαν σε ένα συγκεντρωτικό πίνακα (Πίν. 6). Από τις αλληλουχίες που προέκυψαν και με τη διαδικασία που αναφέρεται στη μεθοδολογία κατασκευάστηκε το δέντρο των φυλοτύπων (Εικ. 3.3).

Πίνακας 6 : Απεικόνιση των ταξινομικών ομάδων που παρατηρήθηκαν.

Κλώνος	Ταξινομική ομάδα	Πλησιέστερη συγγενική αλληλουχία	Ομοιότητα%	Συχνότητα	Περιγραφή/ Ενδιαίτημα
KS-C3	Cyanobacteria	TDNP_USbc97_2_47_65 (FJ516953)	98%	28,94%	Ανώτερο ίζημα υγρότοπου
KS-C17	Cyanobacteria	<i>Anabaena circinalis</i> ACMB13 (EU636199)	99%	5,26%	
KS-C2	Cyanobacteria	<i>Aphanizomenon gracile</i> UA-DFA16 (FJ895128)	99%	2,63%	Λίμνη Vela
KS-C5	Cyanobacteria	<i>Nodularia sphaerocarpa</i> BECID36 (AJ781147)	99%	2,63%	
KS-C18	Cyanobacteria	2G4-44 (EU160341) <i>Tolypothrix</i> sp. PCC 7415 (AM230668)	96%	2,63%	χώμα ριζόσφαιρων

KS-C10	Verrucomicrobia	FGL7S_B67 (FJ437926)	96%	5,26%	Επιφανειακά ιζήματα λιμνών
KS-C19	Verrucomicrobia	TDNP_USbc97_32_3_124 (FJ516959)	95%	5,26%	Ανώτερο ιζημα υγρότοπου
KS-C1	Verrucomicrobia	Kas152B (EF203172)	98%	2,63%	Ίζημα από τη λίμνη της Καστοριάς
KS-C6	Verrucomicrobia	CBNH_072904_C53 (FJ807402)	96%	2,63%	Ίζημα
KS-C9	Verrucomicrobia	IC-31 (AB255059)	97%	2,63%	διαβρωμένο σκυρόδεμα
KS-C14	Verrucomicrobia	P. palm C 85 (AJ441222)	95%	2,63%	Εκκρίσεις βλέννας <i>Paralvinella palmiformis</i>
KS-C27	Verrucomicrobia	D48 (EU580470)	98%	2,63%	Λίμνη Constance
KS-C31	Verrucomicrobia	FGL7S_B74 (FJ437926)	97%	2,63%	Ίζήματα από την επιφάνεια λιμνών
KS-C33	Verrucomicrobia	FGL7S_B5 (FJ437926)	98%	2,63%	Ίζήματα από την επιφάνεια λιμνών
KS-C34	Verrucomicrobia	TDNP_USbc97_32_3_124 (FJ516959)	97%	2,63%	Ανώτερο ιζημα υγροτόπου

KS-C37	Verrucomicrobia	FGL7S_B108 (FJ437926)	98%	2,63%	Ίζηματα από την επιφάνεια λιμνών
KS-C38	Verrucomicrobia	m43 (AY444967)	97%	2,63%	Βιοφίλμ σε μεμβράνη μεταφοράς οξυγόνου
KS-C39	Verrucomicrobia	FGL7S_B129 (FJ437926)	97%	2,63%	Ίζηματα από την επιφάνεια λιμνών
KS-C44	Verrucomicrobia	TDNP_Bbc97_32_3_94 (FJ516798)	86%	2,63%	Ανώτερο ίζημα υγρότοπου
KS-C21	Chloroflexi	FCPT649 (EF516877)	97%	2,63%	Χώμα λιβαδιών
KS-C22	Chloroflexi	2004-4-2-072307 (EU234541)	95%	2,63%	Ίζημα επιφάνειας ποταμών
KS-C23	Chloroflexi	UH-10 (AB265904)	98%	2,63%	Ανοξικό έδαφος ρυζιού
KS-C11	Acidobacteria	t30d34H84 (FM956161)	97%	2,63%	Έδαφος ρυζιού
KS-C30	Acidobacteria	HM53 (AM909878)	96%	2,63%	Ριζόσφαιρα εδάφους
KS-C26	Firmicutes	AUVE_06B12 (EF651269)	97%	2,63%	Καλλιεργήσιμο έδαφος



Εικόνα 3.3 : Φυλογενετικό δέντρο των σχέσεων των 16s rRNA γονιδίων των μοναδικών κυανοβακτηριακών φυλοτύπων που ανιχνεύθηκαν σε ίζημα της λίμνη της Καστοριάς, βασισμένο στη μέθοδο neighbour-joining όπως καθορίζεται από την ανάλυση αποστάσεων Jukes-Cantor. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις είναι αριθμοί καταχώρησης της GenBank. Οι φυλότυποι που βρέθηκαν επισημαίνονται με μαύρο ρόμβο. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει 2% φυλογενετική απόσταση.

4. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η μοριακή ποικιλότητα κυανοβακτηρίων σε δείγματα ιζήματος από τη λίμνη της Καστοριάς, η οποία είναι γνωστό ότι φιλοξενεί ανθίσεις τοξικών κυανοβακτηρίων εδώ και πολλά χρόνια (Lanaras et al. 1989, Cook et al. 2004, Moustaka-Gouni et al. 2006, Gkelis et al. 2005). Πληροφορίες σχετικά με τη σύνθεση και τη δυναμική των κοινοτήτων των κυανοβακτηρίων στη λίμνη της Καστοριάς υπάρχουν από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα (Stancovic 1931, Vardaka et al. 2000, Cook et al. 2004, Vardaka et al. 2005, Moustaka-Gouni et al. 2007, Κατσιάπη 2007) μέχρι σήμερα. Τα κυανοβακτήρια απαντώνται κυρίως σε υδάτινα οικοσυστήματα κάθε τύπου, αρκετά όμως συναντώνται στο έδαφος και σε άλλα χερσαία περιβάλλοντα, όπου παίζουν σημαντικό ρόλο στις κύριες λειτουργίες των οικοσυστημάτων και στην ανακύκλωση των θρεπτικών στοιχείων (Mur et al. 1999).

Τα κυανοβακτήρια είναι παρόντα στη στήλη του νερού τόσο κατά την περίοδο καλοκαίρι-φθινόπωρο, η οποία χαρακτηρίζεται από την επικράτηση των κυανοβακτηρίων στο λιμναίο φυτοπλαγκτό (Reynolds 1993, Reynolds 2002), όσο και την περίοδο του χειμώνα (Βαρδάκα 2001).

Τέσσερις από τους φυλότυπους που βρέθηκαν (Πίν. 6) ανήκουν στο φύλο των Cyanobacteria. Δύο φυλότυποι συνδέονται με τα βενθικά γένη, *Tolypothrix* και το εν δυνάμει τοξικό, *Nodularia sphaerocarpa* (Komárek et al. 1993) και οι άλλοι δύο σχετίζονται με τα πλαγκτικά και τοξικά είδη *Aphanizomenon gracile* και *Anabaena circinalis*, τα οποία αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως εν δυνάμει τοξικά κυανοβακτήρια (Sivonen and Jones 1999, Ostuca et al. 1999).

Ο φυλότυπος **KS-C5** ανήκει στο φύλο Cyanobacteria και έχει ως κοντινότερο γνωστό το είδος *Nodularia sphaerocarpa*. Τα είδη *Nodularia* εμφανίζονται κυρίως σε θάλασσες και υφάλμυρους βιοτόπους, αλατούχα παράκτια και εσωτερικά ύδατα, και βάλτους που κυμαίνονται από εύκρατες σε υποτροπικές περιοχές. Το βενθικό *N. sphaerocarpa* είναι ένα είδος γλυκού νερού και εμφανίζεται κυρίως στις εύκρατες ζώνες (Ευρώπη), στα παράλια των λιμνών και σε ασβεστολιθικά υποστρώματα (Lopes et al. 2009).

Ο φυλότυπος **KS-C18** ανήκει στο φύλο Cyanobacteria και έχει ως κοντινότερο γνωστό το βενθικό είδος *Tolypothrix*. Τα είδη *Tolypothrix* εμφανίζονται κυρίως στα παράλια μη μολυσμένων δεξαμενών, σε λίμνες, ρεύματα ή ακόμα και μεταξύ άλλων αλγών (Prasad and Srivastava 2004).

Ο φυλότυπος **KS-C2** ανήκει στο φύλο Cyanobacteria και έχει ως κοντινότερο γνωστό το είδος *Aphanizomenon gracile*. Το είδος αυτό είναι επιβλαβές και εντοπίζεται στην Ευρώπη: Βέλγιο (Willame et al. 2006), Γαλλία (Willame et al. 2006), Λουξεμβούργο (Willame et al. 2006), Ρουμανία (Caraus 2002) και στην Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία (Day et al. 1995). Συναντάται κυρίως, στην παραλιακή ζώνη και σε μέσο βάθος από την επιφάνεια του νερού 4 m. Παράγει τρεις τοξίνες, την συλινδροσπερμοψίνη, η οποία μπορεί να προκαλέσει όγκους στο ήπαρ, την ανατοξίνη και τη σαξιτοξίνη οι οποίες επηρεάζουν το νευρικό σύστημα (Ballot et al. 2010). Τα είδη του γένους *Aphanizomenon* είναι ευαίσθητα σε συνθήκες ανάμειξης και χαμηλού φωτός και ευνοούνται σε υψηλές θερμοκρασίες (Reynolds et al. 2002).

Ο φυλότυπος **KS-C17** ανήκει στο φύλο Cyanobacteria και έχει ομοιότητα με το είδος *Anabaena circinalis*. Το είδος *Anabaena circinalis* παράγει νευροτοξίνες, ανατοξίνες, παραλυτικό δηλητήριο οστρακοειδών, αλλοιώνει τη γεύση και την οσμή του πό-

σιμου νερού και ανθίζει επιφανειακά. Το παραλυτικό δηλητήριο οστρακοειδών, συμπεριλαμβάνοντας τη σαξιτοξίνη και τη νεοσαξιτοξίνη, ανήκει στα αλκαλοειδή που είναι ισχυρός αναστολέας των διαύλων νατρίου στους νευρικούς άξονες που προκαλεί σταδιακή παράλυση και το θάνατο από αναπνευστική ανεπάρκεια (Fergusson and Saint 2000). Το *Anabaena circinalis* είναι αρκετά ανθεκτικό και μπορεί να παραμείνει για μεγάλα χρονικά διαστήματα (Bobbi 1997).

Από τα εν δυνάμει τοξικά κυανοβακτήρια ένα είδος ήταν κυρίαρχο (*Nodularia sphaerocarpa*) και υπολειπόμενα τα άλλα δύο (*Aphanizomenon gracile*, *Anabaena circinalis*). Τα είδη αυτά σχετίζονται με τον πλαγκτικό και τοξικό τύπο της ομάδας *Nostoc*, είδη από τα οποία έχουν απομονωθεί τοξίνες. Τα είδη αυτά έχουν αναφερθεί στο φυτοπλαγκτόν της λίμνης στο παρελθόν, κατά τη περίοδο 1996 -1997 (Βαρδάκα 2001), 1999 (Moustaka et al. 2007), 2005 (Κατσιάπη 2007) και το 2008 (Πετροπούλου 2008). Ωστόσο, όμως, στο ίζημα που μελετήθηκε στη παρούσα εργασία δεν ταυτοποιήθηκαν γένη όπως *Microcystis* και *Cylinodrospermopsis*, γένη τα οποία βρέθηκαν σε παλαιότερες μελέτες. Το γεγονός ότι δεν ανιχνεύθηκαν αυτά τα γένη μπορεί να οφείλεται στην έλλειψη αυτών των κυανοβακτηρίων στη λίμνη της Καστοριάς το 2005 (έτος λήψης του ιζήματος) και επίσης ενδέχεται τα νημάτια τους να μην ήταν ανιχνεύσιμα δύο χρόνια μετά από την άνθιση τους. Το 2004, τα είδη άνθισης σε αυτή τη λίμνη φαίνεται να παράγουν σπάνια ακινέτες (Moustaka-Gouni et al. 2009) και αυτό μπορεί να οδήγησε σε ένα μικρό εμβόλιο στο ίζημα για την αύξηση του επόμενου έτους. Επιπλέον η κατανομή ακινετών στο ίζημα μπορεί να είναι ετερόκλητη δεδομένου ότι μπορούν να συσσωρευτούν σε ζώνες απόθεσης (Padisk 2003).

Ένας από τους φυλότυπους που παρουσιάζει ενδιαφέρον και έχει βρεθεί σε μεγάλη συχνότητα είναι το ακαλλιέργητο βακτήριο TDNP_USbc97_2_47_65 το οποίο φαί-

νεται να ανήκει στα κυανοβακτήρια. Στην πραγματικότητα όμως συνδέεται με το πλαστίδιο του διατόμου *Haslea nipkowii* (Ohtsuka 2005). Είναι πιο πιθανό αυτός ο φυλότυπος να ανήκει σε διάτομο παρόμοιο με το *H. nipkowii*. Αυτό το διάτομο εντοπίστηκε μικροσκοπικά σε δείγματα ιζήματος από τη λίμνη της Καστοριάς (Kormas et al. 2010).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πείραμα είναι κατάλληλοι για τον εντοπισμό των κυανοβακτηρίων (Nübel et al. 1997). Παρόλα αυτά, οι εκκινητές φαίνεται να εντοπίζουν όχι μόνο τις αλληλουχίες από τα κυανοβακτήρια, αλλά και τις αλληλουχίες και από άλλα φύλα, όπως τα *Verrucomicrobia*.

Τα *Verrucomicrobia* ανακτώνται όχι μόνο σε μέτριες θερμοκρασίες, αλλά και σε ψυχρές θερμοκρασίες στα βαθιά της θάλασσας και στην Ανταρκτική (Schlesner et al. 2006). Το φύλο *Verrucomicrobia* φαίνεται να συνδέεται με τις ανθίσεις των κυανοβακτηρίων όχι μόνο στη μελέτη μας, αλλά έχει βρεθεί και σε άλλες εύτροφες λίμνες (Wu et al. 2007, Ye et al. 2009). Υπάρχει σημαντική ποικιλομορφία και εξηγείται από το γεγονός ότι η λίμνη από την οποία συλλέχθηκε το ίζημα είναι ρηχή και εύτροφη, συνθήκες οι οποίες ευνοούν την ανάπτυξη χιλιάδων ειδών βακτηρίων.

Ο φυλότυπος **KS-C10** παρουσιάζει ομοιότητα με ακαλλιέργητο βακτήριο FGL7S_B67, το οποίο ανήκει στα *Verrucomicrobia* και έχει εντοπιστεί σε επιφανειακά ιζήματα λιμνών, αντίστοιχα και ο φυλότυπος **KS-C19** έχει ομοιότητα με ακαλλιέργητο βακτήριο TDNP_USbc97_32_3_124, το οποίο ανήκει στα *Verrucomicrobia* και έχει βρεθεί σε ανώτερο ίζημα υγρότοπου. Ο φυλότυπος **KS-C1** ανήκει στο φύλο *Verrucomicrobia* και έχει ως πλησιέστερη συγγενική αλληλουχία τον κλώνο Kas152B ο οποίος εντοπίστηκε σε ίζημα της λίμνης της Καστοριάς, με γενικούς βακτηριακούς primers (Κοντογιάννη 2006). Στο ίδιο φύλο με μικρότερα ποσοστά ομοιότητας ανήκει και ο φυλότυπος **KS-C14** ο οποίος έχει συγγενική αλληλουχία με εκκρίσεις βλέννας

Paralvinella palmiformis η οποία εμφανίζει χαμηλά επίπεδα ιστού αποτοξίνωσης γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να προσαρμοστεί σε λιγότερο σοβαρές υδροθερμικές συνθήκες (Copley et al. 2003). Οι παραπάνω φυλότυποι ήταν οι πιο άφθονοι από το σύνολο των φυλοτύπων των Verrucomicrobia, ενώ βρέθηκαν και μοναδικοί φυλότυποι με ομοιότητα με άγνωστων εκπροσώπων του φύλου (Πίν. 6).

Άλλες ταξινομικές ομάδες που βρέθηκαν, ήταν τα Chloroflexi. Ο φυλότυπος **KS-C23** έχει ομοιότητα με αλληλουχία βακτηρίου που ανήκει στο φύλο Chloroflexi και το οποίο έχει εντοπιστεί σε ανοξικό έδαφος ρυζιού (Hori et al. 2006). Τα Chloroflexi παράγουν ενέργεια από το φως και ονομάστηκαν έτσι λόγω της πράσινης χρωστικής τους. Είναι νηματοειδή και απαντώνται συχνά σε μονάδες επεξεργασίας ενεργού ιλύος των λυμάτων σε σχετικά μικρό αριθμό (Kragelund et al. 2007).

Επίσης ανιχνεύθηκαν και δύο φυλότυποι, που ανήκουν στα Acidobacteria. Ο φυλότυπος **KS-C11** έχει ομοιότητα με αλληλουχία βακτηρίου που ανήκει στο φύλο Acidobacteria και το οποίο έχει εντοπιστεί σε έδαφος ρυζιού (Qiu et al. 2009). Τα Acidobacteria είναι από τις πιο άφθονες βακτηριακές ομάδες που διανέμονται στο περιβάλλον. Ανιχνεύονται σε περιβάλλοντα τα οποία διαφέρουν σημαντικά ως προς τα φυσικά και βιογεωχημικά χαρακτηριστικά τους, όπως το έδαφος, τα ιζήματα, γλυκού νερού και θαλασσών.

Τέλος, ο φυλότυπος **KS-C26** έχει ομοιότητα με αλληλουχία βακτηρίου που ανήκει στο φύλο Firmicutes και έχει εντοπιστεί σε καλλιεργήσιμο χωράφι (Coleman et al. 2007). Το φύλο Firmicutes αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες ομάδες των βακτηρίων, καθώς κυριαρχείται από μία σειρά πετυχημένων γενών, όπως *Lactobacillus*, *Mycoplasma*, *Lacillus*, *Clostridium*. Γένη τα οποία μπορούν να προσβάλλουν τον άνθρωπο, τα φυτά και τα ζώα. Η λίμνη της Καστοριάς δέχονταν για πολλά χρόνια λύματα της

πόλης και των παραλίμνιων οικισμών, ενώ αγροτικές καλλιέργειες αναπτύσσονταν στην εγγύς λεκάνη απορροής. Για τους παραπάνω λόγους ίσως αιτιολογείτε, η ανίχνευση του συγκεκριμένου φύλου στο ίζημα της λίμνης της Καστοριάς.

Συμπερασματικά, στο πείραμα που πραγματοποιήθηκε εντοπίστηκαν κυανοβακτήρια, τα οποία είχανε βρεθεί σε παλαιότερες εργασίες στη στήλη νερού και ανιχνεύθηκαν και στο ίζημα, καθώς αποτελεί μακροχρόνια αποθήκη οργανικού υλικού. Κάποια όμως δεν βρέθηκαν και αυτό, μπορεί να οφείλεται πιθανώς στο ότι τα κυανοβακτήρια βρίσκονται σε μικρή σχετική αφθονία ή ότι δεν διατηρούνται για αρκετά χρονικά διαστήματα στο ίζημα.

Άλλος ένας λόγος, είναι ίσως η κατάρρευση του πληθυσμού των κυανοβακτηρίων στο ίζημα. Τα αίτια κατάρρευσης του πληθυσμού των κυανοβακτηρίων, έχουν συσχετιστεί με την παρουσία ιών, γνωστών και ως κυανοφάγοι, οι οποίοι μπορούν να δρουν σε κάθε περίοδο του έτους (Gons et al. 2002). Το αιφνίδιο φαινόμενο της εξαφάνισης κυανοβακτηρίων έχει καταγραφεί σε πολλές κυρίως ρηχές λίμνες (Gons et al. 2002). Θα ήταν πολύ ενδιαφέρον στο μέλλον να γίνουν περαιτέρω πειράματα ώστε να μας δώσουν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την πιθανή παρουσία των κυανοφάγων στο ίζημα της λίμνης της Καστοριάς.

Εν κατακλείδι, αποκαλύψαμε τη κυανοβακτηριακή ποικιλομορφία κατά τη διάρκεια της άνθισης νερού μιας εύτροφης λίμνης, όπως αυτή αποτυπώνεται στο ίζημα, χρησιμοποιώντας κυανοβακτηριακούς εκκινητές PCR. Όταν μελετήσαμε την μοριακή ποικιλότητα των κυανοβακτηρίων στο ίζημα δύο χρόνια μετά την άνθιση του νερού, δεν ανακτήθηκαν κυανοβακτήρια σε μεγάλη αφθονία, γεγονός που υποδηλώνει ότι είτε δεν μπορούν να διατηρηθούν στο ίζημα είτε βρίσκονται σε κυτταρικές μορφές που δεν μπορούν να ανιχνευθούν με τις μεθόδους που εφαρμόζονται.

5. Βιβλιογραφία

Ξενογλώσση βιβλιογραφία

- **Amann R.I., Ludvig W. and Schleifer K.H. (1995).** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59:143-169.
- **Ballot A., Fastner J. and Wiedner C. (2010).** Paralytic shellfish poisoning toxin-producing cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in northeast Germany. *Applied and Environmental Microbiology*, pp 1173–1180.
- **Bobbi C. (1997).** Report on a bloom of the blue-green algae, *Anabaena circinalis* at Craighourne Dam, Colebrook.
- **Carmichael W.W. (1992).** Cyanobacteria secondary metabolites the cyaotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, 72:445-459.
- **Caraus I. (2002).** The algae of Romania. *Studii si Cercetari, Universitatea Bacau, Biology*, 7: 1-694.
- **Carmichael W.W. (1994).** The Toxins of Cyanobacteria. *Scientific American*, 270:64-72.
- **Castenholz R.W. (2001).** General characteristics of the Cyanobacteria. In: Boone DR, Castenholz RW (Ed) *Bergey's. Manual of Systematic Bacteriology*, New York, 1:474-487.
- **Chorus I. and Bartram J. (1999).** Toxic cyanobacteria in water. E & FN Spon, London, New York, pp 416.
- **Coleman D.C., Jangid K. and Whitman W.B. (2007).** The composition of AUV communities from Australian Vertisol. Institute of Ecology, University of Georgia, Ecology Annex.
- **Cook C., Vardaka E. and Lanaras T. (2004).** Toxic Cyanobacteria in Greek Freshwaters 1987_2000: Occurrence, Toxicity, and Impacts National in the Mediterranean Region. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 32:107-124.
- **Copley J. T. P., Tyler P. A., Dover C. L. and Philp S. J. (2003).** Spatial variation in the reproductive biology of *Paralvinella palmiformis* (Polychaeta: Alvinellidae) from a vent field on the Juan de Fuca Ridge. *Marine Ecology Progress Series*, 255: 171-181.
- **Day S.A., Wickham R.P., Entwisle T.J. and Tyler P.A. (1995).** Bibliographic check-list of non-marine algae in Australia. *Flora of Australia Supplementary Series*, 4: vii + 276.
- **Domingos P., Rubim T.K., Molica R.J.R., Azevedo O.M.F.O. and Carmichael W.W. (1999).** First report of microcystin production by picoplanktonic cyanobacteria isolated from Northeast Brazilian drinking water supply. *Environmental Toxicology*, 14:31-35.
- **Fergusson K. and Saint C. (2000).** Molecular phylogeny of *Anabaena circinalis* and its identification in environmental samples by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 4145-4148.
- **Gkelis S., Harjunpää V., Lanaras T., Sivonen K. (2005).** Diversity of hepatotoxic microcystins and bioactive anabaenopeptins in cyanobacterial blooms from Greek freshwaters. *Environmental Toxicology*, 20:249–256.

- **Gons H. J., Ebert J., Hoogveld H. L., Hove L., Pel R., Takkenberg W. and Woldringh C. J. (2002).** Observations on cyanobacterial population collapse in eutrophic lake water. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81:319-26.
- **Hall B.G. (2001).** Phylogenetic trees made easy. 1st edition, release, Sinauer associates, Inc-Publishers Sunderland, Massachusetts, USA.
- **Hori T., Noll M., Igarashi Y., Friedrich M. W. and Conrad R. (2006).** Identification of acetate-assimilating microorganisms under methanogenic conditions in anoxic rice field soil by comparative stable isotope probing of RNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:101-109.
- **Komárek J. (2003).** Planktic oscillatorial cyanoprokaryotes (short review according to combined phenotype and molecular aspects). *Hydrobiologia*, 502:367-382.
- **Komárek J., Hubel M., Hubel H. and Smarda J. (1993).** The *Nodularia* studies. Part II: Taxonomy. *Archiv für Hydrobiologie Supplement*, 96:68:1-25.
- **Kormas K., Vardaka E., Moustaka-Gouni M., Kontoyanni V., Petridou E., Gkelis S. and Neofitou C. (2010).** Molecular detection of potentially toxic Cyanobacteria and their associated bacteria in lake water column and sediment. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26:1473-1482.
- **Kragelund C., Levantesi C., Borger A., Thelen K., Eikelboom D., Tandoi V., Kong Y., Waarde J., Krooneman J., Rossetti S., Thomsen T.R. and Nielsen P.H. (2007).** Identity, abundance and ecophysiology of filamentous Chloroflexi species present in activated sludge treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 59:671-82.
- **Lanaras T., Tsitsamis S., Chlichlia C. and Cook C. M. (1989).** Toxic cyanobacteria in Greek freshwaters, *Journal of Applied Phycology*, 1:67-73.
- **Lanaras T. and Cook C. M. (1994).** Toxin extraction from *Anabaenopsis mileridomina* bloom. *Science of the Total Environment*, 142:163-169.
- **Lopes V.R., Antunes A., Welker M., Martins R.F. and Vasconcelos V.M. (2009).** Morphological, toxicological and molecular characterization of a benthic *Nodularia* isolated from Atlantic estuarine environments. *Research in Microbiology*, 161:9-17.
- **Mourkides G. A. and Tsiouris S. (1984).** The lakes of Northern Greece. The trophic status of the lake Kastoria. – *Agricultural Research*, 8:317-334. (In Greek with English summary).
- **Moustaka-Gouni M, Kormas K.A., Vardaka E., Katsiapi M. and Gkelis S. (2009).** *Raphidiopsis mediterranea* SKUJA represents non-heterocystous life-cycle stages of *Cylindrospermopsis raciborskii* (WOLOSZYNSKA) SEENAYYA et SUBBA RAJU in Lake Kastoria (Greece), its type locality: evidence by morphological and phylogenetic analysis. *Harmful Algae*, 8:864–872.
- **Moustaka-Gouni M., Vardaka E., Michaloudi E., Kormas K.A., Tryfon E., Mihalatou H., Gkelis S. and Lanaras T. (2006).** Plankton food web structure in a eutrophic polymictic lake with a history in toxic cyanobacterial blooms. *Limnology and Oceanography*, 51:715-727.

- **Moustaka-Gouni M., Vardaka E. and Tryfon E. (2007).** Phytoplankton species succession in shallow Mediterranean lake (L. Kastoria, Greece): steady-state dominance of *Limnothrix redekei*, *Microcystis aeruginosa* and *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Hydrobiologia*, 575:129-140.
- **Mur L.R., Skulberg O.M. and Utkilen H. (1999).** Cyanobacteria in the environment. In: Chorus I, Bartram J (Eds) *Toxic Cyanobacteria in Water*, World Health Organization, E & FN Spon, London, p 179-209.
- **Nübel U., Garcia-Pichel F. and Muyzer G. (1997)** PCR primers to amplify 16S rRNA genes from Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:3327–3332.
- **Ohtsuka T. (2005).** Epipelagic diatoms blooming in Isahaya Tidal Flat in the Ariake Sea, Japan, before the drainage following the Isahaya-Bay Reclamation Project. *Phycological Research*, 53:138-148.
- **Olsen G.J., Giovannoni S.J., Pace N.R. and Stahl D.A. (1986).** Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual Reviews of Microbiology*, 40:337-365.
- **Oren A. (2000).** Salts and brines. In: Whitton B.A., Potts, M. (Eds). *The ecology of cyanobacteria. Their diversity in time and space*. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, p 281-306.
- **Ostuka S., Suda S., Li R., Watanabe M., Oyaizu H., Matsumoto S. and Watanabe M.M. (1999).** Phylogenetic relationships between toxic and non toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence. *FEMS Microbiology Letters* 172: 15-21.
- **Padisak J. (2003)** Estimation of minimum sedimentary inoculums (akinetes) pool of *Cylindrospermopsis raciborskii*: a morphology and life-cycle based method. *Hydrobiologia*, 502:389–394.
- **Pentecost A. and Whitton B.A. (2000).** Limestones. In: Whitton B.A., Potts, M. (Eds). *The ecology of cyanobacteria. Their diversity in time and space*. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, p 257-279.
- **Prasad R.N. and Srivastava P.N. (2004).** Some interesting morphological features in *Tolypothrix* spp. *Hydrobiologia*, 26:517-520.
- **Qiu Q., Gan Y. and Lu Y. (2009).** Stable isotope probing of DNA reveals syntrophic propionate-oxidizing consortia and the temperature effects. College of Resources and Environmental Science, China Agricultural University.
- **Reynolds C.S. (1984).** *The ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 384.
- **Reynolds C.S. (1993).** Scales of disturbance and their role in plankton ecology. *Hydrobiologia*, 249:157-171.
- **Reynolds C.S. and Walsby A.E. (1975).** Water-blooms. *Biological Reviews*, 50:437–481.
- **Reynolds C.S., Huszar V., Kruk C., Naselli-Flores L., and Melo S. (2002).** Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of Plankton Research*, 24:417-428.
- **Schlesner H., Jenkins C. and Staley J. (2006).** The phylum Verrucomicrobia: A phylogenetically heterogeneous bacterial group. *Journal of Prokaryotes*, 7:881-896.

- **Sivonen K. and Jones G., (1999).** Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds). Toxic Cyanobacteria in Water. World Health Organization, E & FN Spon, London and New York, p 41-110.
- **Spiegelman D., Whissell G. and Greer C.W. (2005).** A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. Canadian Journal of Microbiology, 51:355-386.
- **Stanković S. (1931).** Sur les particularités limnologiques de lacs égéens. Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie, 5:158–196.
- **Vardaka E., Moustaka-Gouni M. and Lanaras T. (2000).** Temporal and spatial distribution of planktic cyanobacteria in Lake Kastoria, Greece, a shallow, urban lake. Nordic Journal of Botany, 20:501-511.
- **Vardaka E., Moustaka-Gouni M., Cook C.M. and Lanaras T. (2005).** Cyanobacterial blooms and water quality in Greek waterbodies. Journal of applied Phycology (in press).
- **Vincent W.F. (2000).** Cyanobacterial dominance in the polar regions. In: Whitton B.A., Potts, M. (Eds). The ecology of cyanobacteria. Their diversity in time and space. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands. p 321-340.
- **Ward D.M., Castenholz R.W. (2000).** Cyanobacteria in geothermal habitats. In: Whitton B.A., Potts, M. (Eds). The ecology of cyanobacteria. Their diversity in time and space. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, p 37-59
- **Wetzel R.G. (1983).** Limnology. 2nd edition, Philadelphia, Pennsylvania, Saunders, pp 743.
- **Willame R., Boutte C., Grubisic S., Wilmotte A., Komarek J. and Hoffmann L. (2006).** Morphological and molecular characterization of planktonic cyanobacteria from Belgium and Luxembourg. Journal of Phycology, 42:1312-1332.
- **Wu X., Xi W., Ye W. and Yang H. (2007)** Bacterial community composition of a shallow hypertrophic freshwater lake in China, revealed by 16S rRNA gene sequences. FEMS Microbiology Ecology, 61:85-96.
- **Wynn-Williams D.D. (2000).** Cyanobacteria in deserts-Life at the limit? In: Whitton B.A., Potts, M. (Eds). The ecology of cyanobacteria. Their diversity in time and space. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, pp 341-366.
- **Ye W., Liu X., Lin S., Tan J., Pan J., Li D. and Yang H. (2009)** The vertical distribution of bacterial and archaeal communities in the water and sediment of Lake Taihu. FEMS Microbiology Ecology, 70:263-276.

Ελληνική βιβλιογραφία

- **Βαρδάκα, Ε. (2001).** Τοξικά κυανοβακτήρια και κυανοβακτηριακές τοξίνες στη λίμνη Καστοριάς και σε υδάτινα οικοσυστήματα της Ελλάδας. Διδακτορική Διατριβή. Επιστημονική Επετηρίδα του Τμήματος Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών. Παράρτημα, Θεσσαλονίκη, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- **Κατσιάπη, Σ. (2007).** Διερεύνηση των μεταβολών της φυτοπλαγκτικής κοινότητας της λίμνης Καστοριάς σε σχέση με το σχεδιασμό αποκατάστασης της λίμνης. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη.
- **Κοντογιάννη, Β. (2006).** Μοριακά αποτυπώματα προκαρυωτικών μικροοργανισμών στη λίμνη της Καστοριάς με τοξικές ανθίσεις κυανοβακτηρίων. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος.
- **Οικονομόπουλος, Α. (1994).** Εξυγίανση και αξιοποίηση της λίμνης της Καστοριάς. Πρόγραμμα από το Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Πολυτεχνική σχολή, Τμήμα Πολιτικών Μηχανικών, Ξάνθη.
- **Παυλόπουλος, Κ., Σκέντος, Α. και Κοταμπάση, Χ. (2009).** Γεωμορφολογική χαρτογράφηση και μελέτη της ευρύτερης περιοχής Δισπηλιού-λίμνης Καστοριάς. Ανάσκαμμα 3: 101-120
- **Πετροπούλου, Κ. (2008).** Χαρακτηρισμός κυανοβακτηρίων στη λίμνη της Καστοριάς. Πτυχιακή Εργασία. Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης, Νέα Μουδανιά.

6. Abstract

The phylogenetic diversity of cyanobacteria in sediments of Lake Kastoria was studied. Lake Kastoria is a place which according to previous studies is known for the persistent occurrence of cyanobacteria. Sediment was collected from three stations in Lake Kastoria in October 2005 two years after a massive cyanobacterial bloom. DNA was isolated from the sediment, followed by cycle-optimised PCR amplification of the 16S rRNA genes with cyanobacteria specific primers. Afterwards, a pooled clone library was constructed after cloning the purified PCR products. Genes were sequenced using capillary electrophoresis and the relative phylotypes were compared with those Genbank database with the use of BLAST. A phylogenetic tree was constructed by using the MEGA5 software. Five phylotypes of cyanobacteria were specified, four of which belong to the Nostocales while one of them was an algal plastid. We also found phylotypes of the phyla Verrucomicrobia, Acidobacteria, Chloroflexi and Firmicutes leaves. The molecular diversity of the cyanobacteria in the sediment two years after the water boom, retrieved relatively cyanobacteria, suggesting that they either cannot be preserved in the sediment or they are found in cellular forms that cannot be detected by the methods applied.

Keywords: Cyanobacteria, 16S rRNA, sediment, lake, Kastoria.