

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

«ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ»

«Φυλογεωγραφική ανάλυση του γονιδίου της μεθανιογένεσης *mcrA*»

ΘΕΡΜΟΓΙΑΝΝΗ ΕΙΡΗΝΗ

ΒΟΛΟΣ, 2016

Σελίδα 1 από 40

«Φυλογεωγραφική ανάλυση του γονιδίου της μεθανιογένεσης *mcrA*»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1. Κορμάς Κωνσταντίνος**, Καθηγητής- Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**
- 2. Μποζιάρης Ιωάννης**, Αναπληρωτής Καθηγητής- Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**
- 3. Καρπούζας Δημήτριος**, Αναπληρωτής Καθηγητής- Περιβαλλοντική Μικροβιολογία & Βιοτεχνολογία, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μεθάνιο στα βαθιά ιζήματα της θάλασσας – Ροή και Μεθανιογένεση

1.1.1 Διήθηση σε ένα ρεύμα νερού

1.1.2 Διήθηση σε αέρια φάση

1.1.3 Διάχυση

1.2 Μεθανιοπαραγωγοί - Μεθανιογόνοι μικροοργανισμοί θάλασσας

1.3 Βιοχημικό μονοπάτι μεθανιογένεσης

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία μελετά τη φυλογενετική ανάλυση του γονιδίου της μεθανιογένεσης *mcrA*, το οποίο απαντάται μόνο στα Archaea. Αρχικά διερευνώνται οι λόγοι και οι αιτίες της μεθανιογένεσης από το εν λόγω γονίδιο, η έννοια του μεθανίου, της μεθανιογένεσης και των θαλάσσιων μεθανιογόνων μικροοργανισμών. Με τη βοήθεια των ιστοσελίδων Genbank και ClustalW συλλέχθηκαν 4606 γενετικές αλληλουχίες του γονιδίου *mcrA* και συγκρίθηκαν αντίστοιχα όλες οι αλληλουχίες μεταξύ τους με σκοπό την ομαδοποίηση τους. Με ποσοστό ομοιότητας 80-100% καταλήξαμε σε 16 τελικές ομάδες. Τέλος διαχωρίστηκαν ανάλογα με το ενδιαίτημα και τον τόπο που βρέθηκαν. Από τις 16 ομάδες 11 εμφανίστηκαν μόνο σε φυσικά ενδιαίτηματα, 2 σε τεχνητά ενδιαίτηματα και 3 ομάδες βρέθηκαν και σε φυσικά και σε τεχνητά. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι διαφορετικοί μικροοργανισμοί που επιτελούν μεθανιογένεση είναι δυνατό να απαντώνται στα διαφορετικά ενδιαίτηματα όπου συμβαίνει η διεργασία αυτή.

Phylogeographic analysis of the methanogenesis *mcrA* gene

ABSTRACT

The current dissertation studies the phylogenetic analysis of the gene of methane genesis *mcrA*, which exists only in Archaea. At first, literature review is presented on the reasons and the causes that explain how the aforementioned gene is involved methane production. Furthermore, terms such as methane, methanogenesis and anaerobic methanogenic Archaea are presented and defined. Websites Genbank and ClustalW were used as resources from which 4606 genes of *mcrA* were collected. Subsequently, the aforementioned genes were compared and categorized using a similarity percentage of 80-100%. By this way created 16 final categories were created. Finally, these groups were further divided into sub-groups according to their occurrence or isolation source. In total, 11 out from 16 groups occurred only in natural habitats, 2 in artificial ones and 3 in both, suggesting that different methanogens occur in the various habitats where methanogenesis takes place.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το μεθάνιο ως μια ανηγμένη μορφή του άνθρακα, παίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο σε πολλές βιογεωχημικές διεργασίες στο φλοιό της Γης. Αν και το ποσοστό του, στην σύσταση της ατμόσφαιρας είναι πολύ μικρό, έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της παγκόσμιας ερευνητικής κοινότητας κυρίως εξαιτίας του ρόλου του να ενεργεί ως «αέριο του θερμοκηπίου» συμβάλλοντας κατά προσέγγιση σε ποσοστό 15% επί του παρόντος φαινομένου του θερμοκηπίου (Kotelnikova 2002). Φωτοχημικές αντιδράσεις οξειδώνουν το μεθάνιο στην ατμόσφαιρα και μέσω αυτών των αντιδράσεων, το μεθάνιο ασκεί σημαντική επιρροή στη χημεία της τροπόσφαιρας αλλά και της στρατόσφαιρας.

Η σημασία του ως αέριο θερμοκηπίου ενισχύεται από το γεγονός ότι το μεθάνιο αποτελεί το πιο άφθονο οργανικό χημικό στην ατμόσφαιρα κι ότι η συγκέντρωσή του αυξάνεται με το χρόνο, όπως έχουν δείξει ποικίλες ανεξάρτητες μετρήσεις παγκοσμίως (Cicerone 1988). Η συνεχώς αυξανόμενη συγκέντρωση του μεθανίου στην ατμόσφαιρα έχει επηρεάσει σημαντικά το χρόνο ζωής του, από 6.2 χρόνια το 1850 σε 7.9 χρόνια στα τέλη του προηγούμενου αιώνα (Lelieveld et al 1998) και κατέστησε αναγκαία και επιτακτική πλέον την κατανόηση τόσο των βιολογικών όσο και των φυσικών διεργασιών που ελέγχουν τη ροή και δημιουργία του μεθανίου, καθώς και τον προσδιορισμό των ανθρωπίνων δραστηριοτήτων που εμπλέκονται (Cicerone 1988). Ωστόσο, αν και το μεθάνιο αποτελεί σημαντικό κομμάτι του φυσικού κύκλου του άνθρακα, πολλά παραμένουν άγνωστα σχετικά με τις διεργασίες που οδηγούν στην παραγωγή του, τη μεταφορά και τους μετασχηματισμούς του μέσα στα ιζήματα (Torres et al 2004). Οι υδρίτες αερίων που περιέχονται στα θαλάσσια ιζήματα είναι μεγάλες δεξαμενές μεθανίου. Επειδή, μάλιστα, το μεθάνιο αυτό είναι δυνητικά κινητό, οι υδρίτες αερίων φαίνεται να μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο στις παγκόσμιες

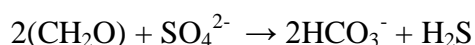
κλιματικές αλλαγές και στον κύκλο του άνθρακα, παρέχοντας ένα δραστικό αέριο του θερμοκηπίου στην ατμόσφαιρα (Borowski et al 1999). Προκειμένου, ωστόσο, το μεθάνιο να ενεργήσει ως αέριο θερμοκηπίου θα πρέπει να εισαχθεί στους ωκεανούς και την ατμόσφαιρα αφήνοντας τα θαλάσσια ιζήματα στα οποία περιέχεται (Borowski 2004). Ένας τρόπος για την απελευθέρωση του μεθανίου από το ίζημα στον ωκεανό είναι μέσω της υποθαλάσσιας λάσπης προερχομένης από ηφαιστειακή δραστηριότητα (Sauter et al 2006). Η διαφυγή του μεθανίου από αναερόβια περιβάλλοντα προς την ατμόσφαιρα, όταν αυτό δεν οξειδώνεται, γίνεται μέσω μικροοργανισμών που καλούνται μεθανιοπαραγωγοί. Η απελευθέρωση του μεθανίου στην ατμόσφαιρα συμβάλλει, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στην αύξηση του ρυθμού υπερθέρμανσης του πλανήτη και προκαλεί αλλαγές στη χημική σύνθεση της ατμόσφαιρας (Hanson et al 1996).

1.1 Μεθάνιο στα βαθιά ιζήματα της θάλασσας – Ροή και Μεθανιογένεση

Ιζήματα πλούσια σε οργανική ύλη, σε θαλάσσια βάθη άνω των 500 μέτρων, πολύ συχνά εσωκλείουν μεθάνιο ως μια ένωση εγκλεισμού, μια «παγωμένη» ένωση στην οποία το μεθάνιο αλλά και άλλα χαμηλού μοριακού βάρους αέρια βρίσκονται παγιδευμένα σ' ένα πλέγμα νερού (Torres et al 2004). Το αέριο μόριο του μεθανίου σταθεροποιείται μέσα στο πλέγμα των μορίων του νερού μέσω δεσμών υδρογόνου σχηματίζοντας έτσι μια «παγωμένη» μορφή στερεού που εσωκλείει ένα μόριο αερίου, με ιδανική στοιχειομετρία $\text{CH}_4 - 5.9 \text{ H}_2\text{O}$, γνωστή ως υδρίτης μεθανίου ή μεθανιοϋδρίτης (Borowski 2004).

Ο ωκεανός περιέχει ένα τεράστιο ποσό διαλυμένων θεικών ιόντων (SO_4^-), ένα συστατικό του ενδοπορικού νερού που σχετίζεται με τα πρώιμα στάδια διαγένεσης των θαλασσίων ιζημάτων. Μέσα στα ιζήματα, απουσία οξυγόνου, τα θειικά συμμετέχουν σε

δύο χημικές αντιδράσεις που προκαλούνται από μικροβιακή δραστηριότητα και έχουν ως αποτέλεσμα τη καταστροφή των θεικών στη λεγόμενη ζώνη αναγωγής των θεικών. Ως αποτέλεσμα, η συγκέντρωση των θεικών μειώνεται με την αύξηση του βάθους των ιζημάτων. Στην πρώτη αντίδραση, τα θειικά χρησιμοποιούνται ως οξειδωτικό από μια ομάδα μικροβίων με σκοπό τη καθίζηση ιζηματογενούς οργανικής ύλης:

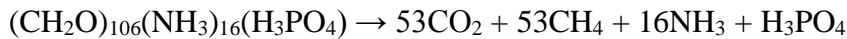


Η δεύτερη αντίδραση που συμμετέχουν τα θειικά λαμβάνει χώρα σε ένα τμήμα ακριβώς κάτω από τη ζώνη αναγωγής των θεικών που καλείται διεπιφάνεια θεικών – μεθανίου (SMI sulfate-methane interface). Εκεί, τόσο τα θειικά όσο και το μεθάνιο καταναλώνονται σύμφωνα με την αντίδραση:

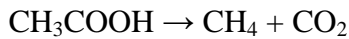


σε μια διαδικασία που ονομάζεται αναερόβια οξείδωση του μεθανίου (Borowski et al 1999).

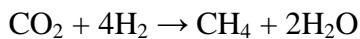
Κάτω από το θαλάσσιο πυθμένα, ακριβώς κάτω από τη ζώνη αναγωγής των θεικών και την διεπιφάνεια θεικών – μεθανίου, το μεθάνιο παράγεται εντός των ιζημάτων κυρίως μέσω μικροβιακών ή θερμογενών διεργασιών (Borowski 2004, Hanson & Hanson 1996). Κατά τη μικροβιακή διεργασία οργανικά υπολείμματα αποσυντίθενται κατά τη διάρκεια μιας πολύπλοκης αλληλουχίας (μεθανιογένεση) σε μεθάνιο, από προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, μέσα σε ένα ιζηματογενές τμήμα που καλείται ζώνη μεθανιογένεσης (Dermibas 2010), σε αναερόβιο περιβάλλον. Οργανική ύλη αποτελούμενη από άνθρακα, υδρογόνο και φώσφορο σε αναλογία 106:16:1 μέσω της διαδικασίας της αποσύνθεσης έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεθανίου.



Η ζύμωση του οξικού οξέος αποτελεί μια διαδικασία αποσύνθεσης κατά την οποία επίσης παράγεται μεθάνιο.



Το διοξείδιο του άνθρακα που παράγεται ως παραπροϊόν μπορεί μέσω περαιτέρω αναγωγής να οδηγήσει επίσης στην παραγωγή μεθανίου.



Το μεθάνιο θερμικής προέλευσης προκύπτει από την θερμική αποσύνθεση της οργανικής ύλης σε μεγάλο βάθος. Κατά τη θερμογενή διαδικασία, η θερμική πυρόλυση οργανικής ύλης, σχηματίζει υδρογονάνθρακες πετρελαίου (συμπεριλαμβανομένου του μεθανίου). Αυτό συνήθως συμβαίνει σε μεγάλο βάθος (>2Km) σε ιζηματογενείς λεκάνες όπου οι θερμοκρασίες ξεπερνούν τους 273 K. Θερμογενές μεθάνιο μπορεί ακόμα να παραχθεί από τη θερμική αποικοδόμηση του πετρελαίου σε ακόμη μεγαλύτερα βάθη (Demirbas 2010, Kvenvolden 1993).

Μετά την παραγωγή του, το μεθάνιο στα ιζήματα μπορεί να μεταφερθεί μέσω της κίνησης του νερού που περιέχει διαλυμένο το αέριο, μέσω ελεύθερης ροής αερίου, ή και μέσω μοριακής διάχυσης. Καθώς αυξάνουν τα μόρια του μεθανίου, συναντούν ευνοϊκές συνθήκες κατά τις οποίες θα σχηματιστούν υδρίτες μέσα στους πόρους των ιζημάτων με την ταυτόχρονη παρουσία μορίων νερού. Έτσι, ο σχηματισμός βιογενούς μεθανίου μπορεί να λάβει χώρα τόσο στη ζώνη σταθερότητας των υδριτών (HSZ hydrate stability zone) ή και κάτω από αυτή, ενώ το θερμογόνο μεθάνιο πρέπει να σχηματίζεται κάτω από τη ζώνη σταθερότητας (HSZ) και να μετακινείται σ' αυτή.

Οι υδρίτες που περιέχουν μεθάνιο σχηματίζονται στα βάθη της βιόσφαιρας από βακτηριολογική αποσύνθεση της οργανικής ύλης κατά κύριο λόγο, καθώς τα όρια των πλακών και οι ζώνες καταβύθισης δεν αποτελούν ευνοϊκό περιβάλλον για τη δημιουργία μονοπατιών για το βαθιάς προέλευσης θερμογενές μεθάνιο. Αέριο μεθάνιο μεταναστεύει προς τα επάνω και συγκεντρώνεται στο εσωτερικό ακριβώς κάτω από τη ζώνη στην οποία ο υδρίτης είναι θερμοδυναμικά σταθερός. Αυτή είναι η ζώνη σταθερότητας του υδρίτη (HSZ) που εκτείνεται προς τα κάτω από την κρύα επιφάνεια της θάλασσας, σε βάθη νερού μεγαλύτερα των 500 μέτρων (Demirbas 2010).

Προκειμένου να κατανοήσουμε τη ροή του μεθανίου μέσα στα ιζήματα, μπορούμε να διακρίνουμε τρεις κύριους μηχανισμούς μετανάστευσης του μεθανίου: α) διήθηση σε ένα ρεύμα νερού μετά από διάλυση, β) διήθηση σε αέρια φάση και γ) διάχυση (Ginsburg & Soloviev 1997).

1.1.1 Διήθηση σε ένα ρεύμα νερού

Η καθίζηση του υδρίτη από διήθηση του μεθανίου σε κορεσμένο νερό φαίνεται να είναι ο πιο άμεσος τρόπος. Ο υδρίτης καθιζάνει δεδομένου ότι η διαλυτότητα του μεθανίου στο νερό ελαττώνεται καθώς πέφτει η θερμοκρασία (Ginsburg et al 1997, Yamamoto et al 1976). Εξαιτίας αυτού, η ζώνη των υδριτών σχηματίζει ένα γεωχημικό φράγμα αερίου για την καθίζηση του μεθανίου στο κορεσμένο νερό. Τα νερά κρυώνουν και οι υδρίτες πρέπει να καθιζάνουν μέσω διήθησης. Το ποσό του καταβυθισμένου υδρίτη, προφανώς, αντιστοιχεί στο πλεόνασμα του διαλυμένου μεθανίου. Είναι σαφές ότι η αποτελεσματικότητα αυτής της διαδικασίας εξαρτάται, μεταξύ άλλων, από το βαθμό διήθησης, τη θερμοκρασία του νερού και από την έκταση τη εστίασης της ροής του νερού. Στην περίπτωση που υπάρχει εστιασμένη ροή θερμού νερού, το πάχος της ζώνης

του υδρίτη μπορεί να μειωθεί έως και να μηδενιστεί. Η διακλαδισμένη ροή έχει πλεονέκτημα για τη συσσώρευση υδριτών έναντι της εστιασμένης. Οι υδρίτες αερίων που κατακρημνίζονται, σταδιακά γεμίζουν τα κενά των πόρων των ιζημάτων ή/και φράσουν το πορώδες δίκτυο και τελικά παράγουν δευτερογενείς δομές ιζημάτων υδριτών.

1.1.2 Διήθηση σε αέρια φάση

Υδρίτες αερίων που σχετίζονται με εναπόθεση στο βυθό της θάλασσας μέσω ελεύθερης ροής αερίου παρατηρήθηκαν στον κόλπο του Μεξικού. Το γεγονός και μόνο ότι ανοδικό αέριο μπορεί να διεισδύσει μέσα από τη ζώνη υδριτών χωρίς να μετατρεπεται σε υδρίτη, φαίνεται να είναι εκπληκτικό. Προφανώς τα ιζήματα που φέρουν υδρίτες, σε καμία περίπτωση δεν σχηματίζουν αδιαπέραστο φράγμα για το αέριο που διηθείται. Καθώς προκύπτει για ένα στρώμα υδρίτη στη διεπιφάνεια αερίου – ύδατος, το ελεύθερο αέριο θα πρέπει να διαχυθεί μέσω του στρώματος αυτού πριν την ενυδάτωση. Έτσι, ο ρυθμός σχηματισμού των υδριτών περιορίζεται από τον ρυθμό διάχυσης και οι υδρίτες σχηματίζονται από το αέριο που διαλύεται στο νερό δηλ. μια στερεή φάση προκύπτει πάραυτα εντός μιας υγρής φάσης σε απόσταση από το ελεύθερο αέριο.

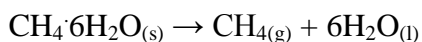
1.1.3 Διάχυση

Η διάχυση είναι μια διεργασία ευρέως γνωστή που αφορά τα αέρια. Από τη στιγμή που το μεθάνιο το οποίο περιέχεται σ' έναν υδρίτη, οποιασδήποτε προελεύσεως, υπόκειται σε διάχυση, πιστεύεται ότι η ροή του μεθανίου μέσω διάχυσης είναι πιο κοινή απ' όση αυτή που λαμβάνει χώρα μέσω καθίζησης των υδριτών από διήθηση στο νερό. Καθώς η συσσώρευση υδριτών συνεπάγεται και τη μεταφορά του μεθανίου, η ροή αυτή μπορεί να λάβει χώρα μόνον μέσω της διαβάθμισης του χημικού δυναμικού του μεθανίου. Η

διαβάθμιση αυτή προέρχεται από την ανομοιογένεια του γεωλογικού μέσου διαφορετικής φύσεως: τη γεωθερμική, την υδροχημική και τη λιθολογική ανομοιογένεια.

Συμπερασματικά, μπορούμε να αναφέρουμε ότι υποθαλάσσιοι υδρίτες αερίων συσσωρεύονται από κορεσμένο σε μεθάνιο νερό, κατά τη διάρκεια της διήθησης στο νερό ή της διάχυσης του μεθανίου, κάτω από μια διαβάθμιση του χημικού δυναμικού του διαλυμένου μεθανίου. Η διαβάθμιση αυτή δημιουργείται λόγω της ανομοιογένειας του γεωλογικού μέσου, όπως της διαβάθμισης στη θερμοκρασία, της διαβάθμισης στην αλατότητα του νερού ή της λιθολογικής μεταβλητότητας. Γενικά οι υδρίτες καθιζάνουν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες και σε λιγότερο αλμυρό νερό, ενώ τα χονδρόκοκκα ιζήματα αποτελούν καλύτερες δεξαμενές υδριτών συγκριτικά με τα λεπτόκοκκα (Ginsburg & Soloviev 1997).

Οι υδρίτες μεθανίου θεωρούνται ως μια δυνητικά πολύ σημαντική πηγή ενέργειας υδρογονάνθρακα που θα μπορούσε να καλύψει ένα σημαντικό κομμάτι της ζήτησης σε φυσικό αέριο στο μέλλον. Ωστόσο, δεν υπάρχουν ακόμη μελέτες για την ασφαλή παραγωγή μεθανίου από κοιτάσματα υδριτών αερίου. Η χαμηλού κόστους παραγωγή μεθανίου από υδρίτες αερίου θα πρέπει να περιορίζεται από το ρυθμό διάσπασης του αερίου σύμφωνα με την αντίδραση διάσπασης του υδρίτη αερίου:



Η παραγωγή φυσικού αερίου από θαλάσσια ιζήματα αναπτύσσεται επί του παρόντος χρησιμοποιώντας μεθόδους όπως την αποσυμπίεση, τη θερμική διέγερση και την έγχυση αναστολέων των υδριτών (Demirbas 2010, Lee et al 2001).

1.2 Θαλάσσιοι μεθανιογόνοι μικροοργανισμοί

Οι μεθανιοπαραγωγοί (μεθανιογόνα Archaea) συνιστούν μια ξεχωριστή ομάδα μικροοργανισμών η οποία μαζί με τα αλόφιλα και τους θερμοοξύφιλους οργανισμούς, αποτελούν ένα ξεχωριστό βιολογικό βασίλειο γνωστό ως Archaea (πρώην Αρχαιοβακτήρια). Μαζί με τα βασίλεια των Ευκαρυωτών και των Ευβακτηρίων περιλαμβάνουν όλες τις μορφές ζωής που υπάρχουν στη Γη.

Οι μεθανιογόνοι μικροοργανισμοί είναι αυστηρά αναερόβιοι μικροοργανισμοί και απαιτούν σχεδόν πλήρη απουσία οξυγόνου, λιγότερο από 2 ppm, και άκρως αναγωγικές συνθήκες ($E_h = < -300$ mV) για την αύξησή τους. Κατά συνέπεια, πολλαπλασιάζονται σε υδατικά ιζήματα, σε πλημμυρισμένα εδάφη και αποχετεύσεις. Επίσης, παρατηρούνται σε περιβάλλοντα με ακραίες συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας, όπως ιαματικές πηγές ή ζεστούς αεραγωγούς στο θαλάσσιο πυθμένα. Τα γνωστά μεθανιογόνα μεταβολίζουν καλύτερα σε ουδέτερο pH σε ένα εύρος 6,7 έως και 8 (Williams et al 1985). Ωστόσο, ορισμένα μεθανιογόνα βακτήρια μπορούν είτε να προσαρμοστούν ή να ανεχθούν, περιβάλλοντα με άλλες ακραίες συνθήκες, εκτός της υψηλής θερμοκρασίας που αναφέρθηκε παραπάνω, που περιλαμβάνουν υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων και ακραίες τιμές pH. Έτσι, θα μπορούσαμε να πούμε πως αυτοί οι μικροοργανισμοί μπορούν να απομονωθούν και να είναι δραστικοί σχεδόν σε κάθε αναερόβιο οικοσύστημα.

Οι μεθανιοπαραγωγοί παρουσιάζουν δομική ποικιλομορφία και δεν έχουν μοναδικά χαρακτηριστικά σύμφωνα με τα οποία να μπορούν να χαρακτηρισθούν όπως άλλα είδη. Υπάρχουν, γενικά, τέσσερις διακριτοί μορφολογικοί τύποι μεθανιογόνων βακτηρίων που μπορούν να χαρακτηρισθούν από δομικής άποψης ως: συστάδες κυττάρων, ράβδοι, σφαίρες και σπείρες. Ωστόσο, για τα μεμονωμένα είδη έχουν παρατηρηθεί σημαντικές

διακυμάνσεις στην διάσταση και οργάνωση των κυττάρων, καθώς επίσης και στην κανονικότητα του σχήματός τους.

Τα κύτταρα τύπου πακέτου (*Sarcina*-type) πολλαπλασιάζονται σαν κύτταρα ακανόνιστου μεγέθους που έχουν την τάση να δημιουργούν συστάδες και να σχηματίζουν συσσωματώματα σε μορφή άμμου. Τα είδη αυτά, *Methanosarcina* spp., εμφανίζονται περισσότερο σαν κοκκοειδή κύτταρα και μπορούν να διαφέρουν σημαντικά σε μέγεθος. Τα ραβδόμορφα κύτταρα (rod – shaped cells) τις περισσότερες φορές είναι παραμορφωμένα και μπορούν να εμφανίζονται σε αλυσίδες ή μακριά νήματα. Τα κύτταρα σφαιρικού σχήματος (coccal – shaped cells) ποικίλουν σε μορφολογία από κανονικές μέχρι ελλειψοειδής σφαίρες και είναι διατεταγμένα σε ζεύγη ή αλυσίδες. Τέλος, τα κύτταρα τύπου σπείρας (*spirillum* – type cells) αναπτύσσονται σαν κανονικές καμπυλωτές ράβδοι που σχηματίζουν συνεχή ελικοειδή νήματα. Γενικά, τα κυτταρικά τοιχώματα των περισσότερων ειδών των μεθανιοπαραγωγών είναι ανθεκτικά σε διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για να διαταράξουν τα κύτταρα όπως οσμωτικές, μηχανικές, ενζυματικές και διαδικασίες με υπερήχους.

Το κυτταρικό σχήμα χρησιμοποιείται ως πρωταρχική ιδιότητα για την ταξινόμηση των διαφόρων γενών. Επιπλέον, φυσιολογικές και θρεπτικές ιδιότητες των κυττάρων αποτελούν τη βάση για το χαρακτηρισμό των διαφόρων ειδών των μεθανιοπαραγωγών.

Το χαρακτηριστικό του μεταβολισμού που ενώνει τα ποικίλα είδη των μεθανιογόνων βακτηρίων είναι η ικανότητα να δεσμεύουν υδρογόνο με ταυτόχρονη αναγωγή του διοξειδίου του άνθρακα. Επιπλέον, η ικανότητα πολλών ειδών να αναπτύσσονται αυτοτροφικά, δείχνει τις τεράστιες βιοσυνθετικές ικανότητες αυτών των μικροβίων. Οι μεθανιογόνοι μικροοργανισμοί διαφέρουν από τα άλλα αυτότροφα (οργανισμούς που

πολλαπλασιάζονται με διοξείδιο του άνθρακα ως τη μοναδική πηγή άνθρακα), στο ότι ο μεταβολισμός του διοξειδίου του άνθρακα εμπλέκει, αμφότερα, την καθήλωση του κινητού άνθρακα σε κυτταρικό ενδιάμεσο και την αναγωγή του σε μεθάνιο (Zeikus 1977).

Πολυάριθμοι φυσικοί, χημικοί και βιολογικοί παράγοντες επηρεάζουν τη φυσιολογία των μεθανιογόνων μικροοργανισμών και την οικολογία των αναερόβιων οικοσυστημάτων. Ως εκ τούτου, το ποσοστό της παραγωγής μεθανίου από έναν δεδομένο βιότοπο είναι συνάρτηση όλων αυτών των παραγόντων. Ένας από αυτούς τους παράγοντες είναι η θερμοκρασία και πολλές μελέτες έχουν δείξει πως η απελευθέρωση του μεθανίου αυξάνει με την αύξηση της θερμοκρασίας υπό την προϋπόθεση ότι και άλλες παράμετροι (όπως π.χ. το φορτίο του άνθρακα) παραμένουν σταθερές.

Τα μεθανιογόνα Archaea μπορούν να μεταβολίσουν μόνον ένα περιορισμένο σύνολο ενώσεων οι οποίες παρέχουν ενέργεια για την αύξησή τους. Αναγνωρισμένα υποστρώματα μεθανιογόνων μικροοργανισμών περιλαμβάνουν αναγωγή με υδρογόνο του διοξειδίου του άνθρακα, του οξικού οξέος, του μυρμηκικού οξέος, της μεθανόλης, των μεθυλιωμένων αμινών και του μονοξειδίου του άνθρακα. Επίσης, το διμέθυλοσουλφίδιο έχει βρεθεί ότι μπορεί να χρησιμεύσει ως υπόστρωμα αύξησης. Τα περισσότερα μεθανιογόνα μπορούν να αναπτυχθούν με αναγωγή του διοξειδίου του άνθρακα και κάποια μπορούν να αναπτυχθούν εξίσου και σε φορμικό οξύ. Μερικά μεθανιογόνα όπως *Methanosarcina barkeri* μπορούν να αναπτυχθούν σχεδόν σε όλες τις παραπάνω ενώσεις, ενώ μεθυλοτροφικά μεθανιογόνα όπως το *Methanococcioides methylutens* μπορούν να αναπτυχθούν μόνο σε μεθανόλη και μεθυλιωμένες αμίνες. Η ανάπτυξη σε οξικό οξύ ή σε άλλα μεθυλιωμένα υποστρώματα, λαμβάνει χώρα με

οξείδωση ενός μέρος του υποστρώματος σε διοξείδιο του άνθρακα σε συνδυασμό με αναγωγή του υπολοίπου σε μεθάνιο. Έτσι, στο μεθανιογόνο μεταβολισμό του οξικού, το μεθάνιο προέρχεται από την ομάδα μεθυλίου.

Οι μεθανιοπαραγωγοί εξαρτώνται από άλλους μικροοργανισμούς προκειμένου να τους προσφέρουν τα απαιτούμενα υποστρώματα. Η κατανομή της οργανικής ύλης σε αναερόβια οικοσυστήματα είναι μια πολύπλοκη διεργασία που καλείται γενικά αναερόβιο τροφικό πλέγμα κι όχι ως μια απλή τροφική αλυσίδα. Ποικίλα μη μεθανιογόνα αναερόβια Archaea επιτίθενται σε πολύπλοκες οργανικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων των βιοπολυμερών, με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό αυτών των μεθανιογόνων υποστρωμάτων. Αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ μεθανιογόνων βακτηρίων και άλλων μικροβίων είναι είτε συνεργιστικής ή ανταγωνιστικής φύσης. Στις συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις, οργανισμοί ζυμώσεως μεταβολίζουν μια συγκεκριμένη ένωση και τα προϊόντα του μεταβολισμού αυτού, καταναλώνονται από μεθανιογόνους μικροοργανισμούς, με τελικό προϊόν το σχηματισμό του μεθανίου. Στις ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις, βακτήρια αναγωγήςθεικών ανταγωνίζονται με μεθανιογόνα Archaea για το υδρογόνο και το οξικό οξύ. Επειδή αυτά τα δύο υποστρώματα είναι οι σημαντικότερες πρόδρομες ουσίες μεθανίου σε πολλά αναερόβια περιβάλλοντα, η απομάκρυνσή τους από τα βακτήρια αναγωγήςθεικών περιορίζει τη διαθεσιμότητά τους για τα μεθανιογόνα (Cicerone & Oremland 1988).

Στα θαλάσσια ιζήματα τα μεθανιογόνα Archaea χρησιμοποιούν ως υποστρώματα κυρίως μεθανόλη και μεθυλαμίνες, επειδή τα υποστρώματα αυτά δεν μπορούν να καταναλωθούν από τα βακτήρια αναγωγήςθεικών (Williams & Crawford 1985). Έτσι, σε περιβάλλοντα πλούσια σε θειικά, όπως είναι τα θαλάσσια ιζήματα, η μεθανιογένεση

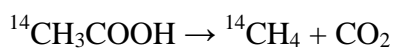
λαμβάνει χώρα, συνήθως, κάτω από τη ζώνη αναγωγής των θεικών (Demirbas 2010, Borowski 2004). Ωστόσο, αυτό δεν αποτελεί πάντα τον κανόνα και σε συγκεκριμένα περιβάλλοντα το μεθάνιο και τα θεικά, όπως επίσης, η μεθανιογένεση και η αναγωγή των θεικών μπορούν να συνυπάρχουν. Υπάρχουν πολλές ενώσεις (μεθανόλη, μεθυλιωμένες αμίνες, διμεθυλοσουλφίδιο) οι οποίες καλούνται «μη ανταγωνιστικά» υποστρώματα, με τις οποίες οι αναγωγείς των θεικών δεν έχουν τόσο ισχυρή συγγένεια όσο με το υδρογόνο και το οξικό. Μη ανταγωνιστικά υποστρώματα μπορούν να προέρχονται από διαλυμένες ουσίες που προκύπτουν μετά από ωσμωρύθμιση και είναι σημαντικοί πρόδρομοι του μεθανίου σε αλατούχα περιβάλλοντα που περιέχουν άφθονα φυτικά υλικά, όπως οι αλυκές. Οι μεθανιογόνοι μικροοργανισμοί σε τέτοιου τύπου ιζήματα, προσαρμόζονται στο μεταβολισμό των μη ανταγωνιστικών υποστρωμάτων όπως η μεθανόλη και η τριμεθυλαμίνη (Cicerone & Oremland 1988).

1.3 Βιοχημικό μονοπάτι μεθανιογένεσης

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, αμέσως κάτω από τη ζώνη αναγωγής των θεικών και τη διεπιφάνεια θεικών – μεθανίου, βρίσκεται η ζώνη μεθανιογένεσης όπου το μεθάνιο παράγεται διαμέσου μικροβίων και η συγκέντρωσή του, τουλάχιστον αρχικά, αυξάνει με το βάθος. Μέσα στα θαλάσσια ιζήματα, η βιογενής παραγωγή του μεθανίου, συνήθως, συμβαίνει μέσω δύο διακριτών μεταβολικών μονοπατιών από τη βιολογική ομάδα των μεθανιογόνων μικροοργανισμών και συγκεκριμένα μέσω αναγωγής του διοξειδίου του άνθρακα και οξικής ζύμωσης (Borowski et al 1999). Διάφορες μελέτες αναφέρουν πως και άλλα υποστρώματα όπως μεθανόλη, αιθανόλη, μεθυλιωμένες αμίνες, μονοξειδίο του άνθρακα, βενζοϊκό και μυρμηγκικό οξύ, μπορούν να είναι σημαντικά για τη μεθανιογένεση. Για απλότητα, παρακάτω, η οξική ζύμωση

αναφέρεται συλλογικά στη μεθανιογένεση με τη συμμετοχή της μεταφοράς μιας μεθυλοομάδας από οποιοδήποτε υπόστρωμα.

Η οξική ζύμωση έχει ήδη περιγραφεί από το 1887 από τους Hoppe-Seyler και αργότερα από τους Barker (1936), Buswell και Solo (1948), και Stadman και Barker (1949), χρησιμοποιώντας πειράματα επισήμανσης ^{14}C με βάση την παρακάτω αντίδραση:



Εδώ το μεθάνιο προέρχεται από την ομάδα μεθυλίου του οξικού οξέος. Εναλλακτικά το οξικό οξύ μπορεί να οξειδώνεται προς CO_2 και H_2O και ακολούθως, το CO_2 να ανάγεται μεταβολικά σε μεθάνιο με το υδρογόνο να δρα ως πηγή ηλεκτρονίων. Η οξική ζύμωση θεωρείται από πολλούς ερευνητές ως η μείζονα πηγή παραγωγής μεθανίου σε ιζήματα γλυκών υδάτων. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως όμως, υπάρχουν αποδεικτικά στοιχεία, ότι και άλλα υποστρώματα μπορεί να είναι σημαντικά και ότι η αναγωγή του διοξειδίου του άνθρακα μπορεί, εν τέλει, να είναι η κύρια πηγή μεθανίου σε ορισμένα περιβάλλοντα με χαμηλές συγκεντρώσεις θεικών.

Αν και η παρουσία του μεθανίου είναι συνήθης σε αναερόβια υδατικά περιβάλλοντα, σημαντικές διαφορές διανομής έχουν παρατηρηθεί μεταξύ θαλασσίων ιζημάτων και ιζημάτων του γλυκού νερού. Η συγκέντρωση του μεθανίου, μεταξύ των πιο άφθονων αερίων που δημιουργούνται σε λίμνες γλυκού νερού και βάλτους, συχνά αυξάνεται ραγδαία, φθάνοντας σε επίπεδα κορεσμού εντός μερικών εκατοστών βάθους του ιζήματος. Ενδοπορικό κορεσμένο σε μεθάνιο νερό, μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία φυσαλίδων που παρατηρείται κυρίως σε λίμνες και βάλτους ως «αναβρασμός».

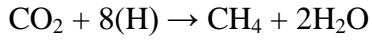
Σε ορισμένα περιβάλλοντα γλυκού νερού η βακτηριακή παραγωγή του μεθανίου είναι περιορισμένη και οι συγκεντρώσεις του μεθανίου δεν αυξάνουν μέχρι κορεσμού,

πιθανώς λόγω εξάντλησης του υποστρώματος ή αναστολής της μεθανιογένεσης. Η συγκέντρωση του μεθανίου τείνει μερικές φορές να σταθεροποιηθεί ή ακόμη και να μειωθεί σε μεγαλύτερο βάθος. Αυτό το φαινόμενο είναι είτε μια συνέπεια της κατανάλωσης του μεθανίου ή μπορεί να αντιπροσωπεύει μια μη σταθερή κατάσταση διαγένεσης σε αυτά τα ιζήματα.

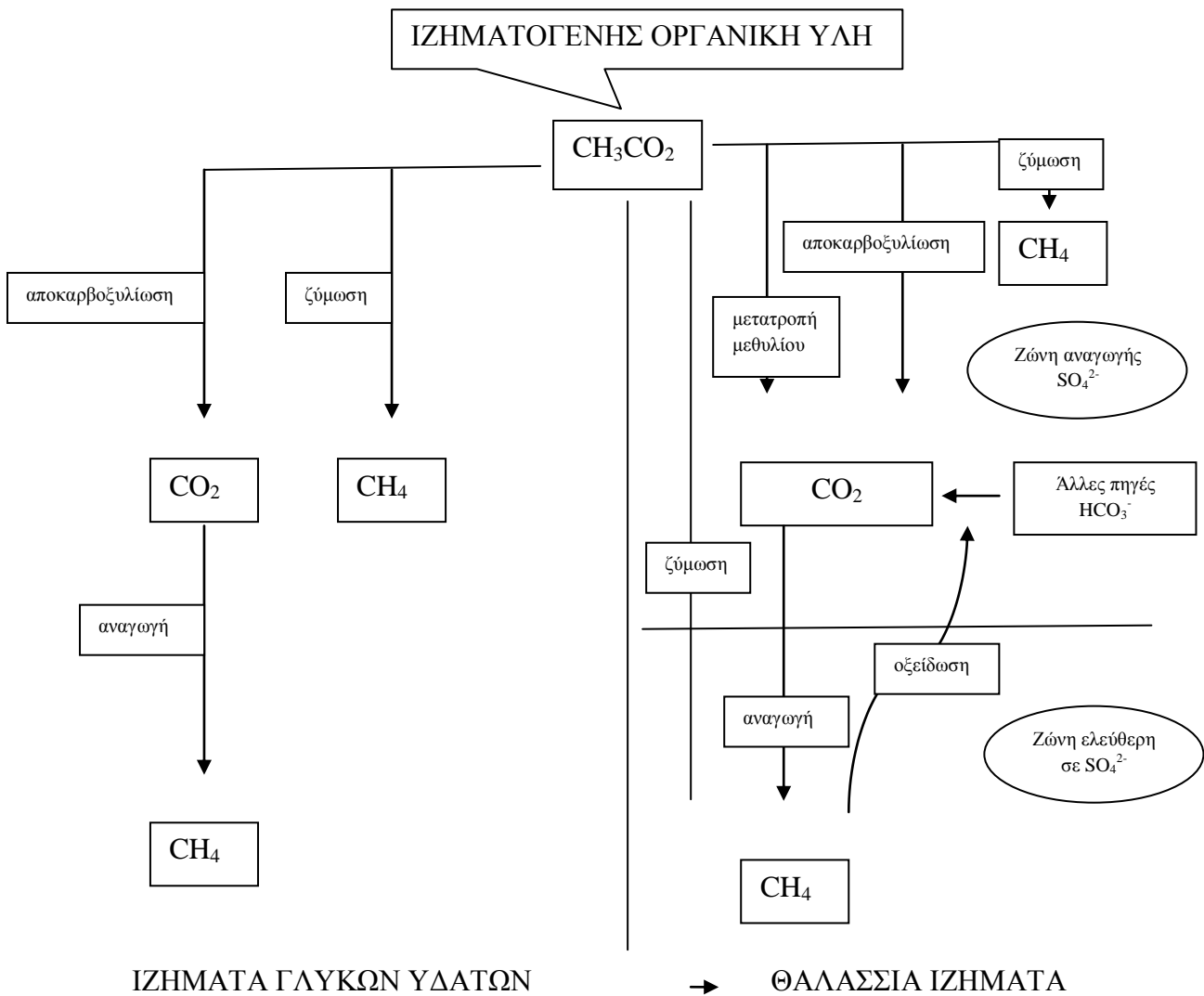
Στα θαλάσσια ιζήματα που είναι πλούσια σε οργανική ύλη, η συγκέντρωση των διαλυμένων θεικών μπορεί να μειωθεί γρήγορα με το βάθος και συχνά να εξαντλείται σε βάθος ιζήματος μέχρι 2 μέτρα, κάτω από το οποίο συναντάται η έναρξη της συσσώρευσης του μεθανίου. Ανάλογα με τα ιζήματα γλυκών υδάτων, η μεθανιογένεση στα θαλάσσια ιζήματα μπορεί να προκαλέσει σταθερή αύξηση της συγκέντρωσης μεθανίου και να οδηγήσει, σε ρηχά ιζήματα, στη δημιουργία φυσαλίδων. Το φαινόμενο αυτό αποτρέπει σε μεγαλύτερα βάθη, λόγω της υψηλότερης υδραστατικής πίεσης αλλά και του σχηματισμού των υδριτών αερίων εντός των ιζημάτων. Η μεθανιογένεση περιορίζεται σε ορισμένα θαλάσσια ιζήματα όπου η συγκέντρωση του μεθανίου δε φτάνει σε επίπεδα κορεσμού και η εξήγηση είναι παρόμοια με τις δυνατότητες που δόθηκαν παραπάνω για τα ιζήματα των γλυκών υδάτων.

Η θέση του μεθυλίου του οξικού, σε ιζήματα γλυκών υδάτων απουσία οξυγόνου, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1, υφίσταται ζύμωση προς μεθάνιο. Το διοξείδιο του άνθρακα που απελευθερώνεται από τη ζύμωση, μπορεί, επίσης, να αναχθεί σε μεθάνιο, αν και ενδεχομένως σε μειωμένη κλίμακα. Αυτή η αναγωγή του διοξειδίου του άνθρακα θα μπορούσε να συνεχιστεί ακόμη και μετά την εξάντληση του οξικού και την παύση του μονοπατιού της οξικής ζύμωσης. Ο τρόπος λειτουργίας της παραγωγής μεθανίου είναι κάπως διαφορετικός στα υφάλμυρα περιβάλλοντα όπως αλυκές και θαλάσσια ιζήματα. Βάσει μελετών που στηρίζονται σε καλλιέργειες, η αναγωγή του διοξειδίου του

άνθρακα από υδρογόνο, θεωρείται εδώ να είναι το κυρίαρχο μονοπάτι για την παραγωγή βακτηριακού μεθανίου.



Η προσθήκη υδρογόνου, όπως έχει αποδειχθεί από τα τέλη της δεκαετίας του 1970, συμβάλλει στην τόνωση της μεθανιογένεσης, με την αύξηση της παραγωγής μεθανίου μέσω της αναγωγής του διοξειδίου του άνθρακα. Ωστόσο, η προσθήκη αυτή δεν έχει καμία επίδραση στο ρυθμό ζύμωσης.



Σχήμα 1. Διάγραμμα ροής που συγκρίνει τα μονοπάτια μεθανιογένεσης από οξική ζύμωση και αναγωγή διοξειδίου του άνθρακα σε ιζήματα γλυκών υδάτων και θαλάσσια ιζήματα. (Whiticar et al 1986)

Σε θαλάσσια ιζήματα που υπάρχει παρουσία οξυγόνου ή νιτρικών αλλά και σε περιβάλλοντα όπου το περιεχόμενο σε θειικά είναι μεγαλύτερο από 1.0 mM, δεν παρατηρούνται σημαντικές συσσωρεύσεις μεθανίου. Το γεγονός αυτό οφείλεται στις ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βακτηρίων αναγωγής των θεικών με τα μεθανιογόνα Archaea. Σε ορισμένα περιβάλλοντα γλυκού νερού έχει αναφερθεί η αναστολή της μεθανιογένεσης από τη σχετικά χαμηλή δραστηριότητα θειούχων. Ωστόσο, άλλες μελέτες έχουν δείξει πως μεθάνιο και θειούχα μπορούν να συνυπάρχουν και μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις η παρουσία των θεικών μπορεί να τονώσει τη μεθανιογένεση.

Στα θαλάσσια ιζήματα η συχνά υψηλότερη συγκέντρωση θεικών ιόντων δεν φαίνεται να αναστέλλει τη μεθανιογένεση. Βέβαια, αν και οι μεθανιοπαραγωγοί μπορούν να συνυπάρχουν με τα βακτήρια αναγωγής θεικών στη ζώνη αναγωγής θεικών, έχει αποδειχθεί πως η μεθανιογένεση μέσω ζύμωσης περιορίζεται σημαντικά λόγω των ανταγωνιστικών αλληλεπιδράσεων (π.χ. ανταγωνισμός για την οξική ρίζα). Επιπλέον, ο επιτυχής ανταγωνισμός για το υδρογόνο από τα βακτήρια αναγωγής των θεικών έναντι των μεθανιογόνων μικροοργανισμών, περιορίζει τη μεθανιογένεση μέσω του μονοπατιού αναγωγής του διοξειδίου του άνθρακα.

Μια ακόμα σημαντική μεταβολική διαφορά μεταξύ των θαλασσιών ιζημάτων έναντι των ιζημάτων γλυκού νερού είναι ότι με την παρουσία μεγαλύτερων ποσοτήτων θεικών, η θέση του μεθυλίου στο οξικό οξειδώνεται σε διοξείδιο του άνθρακα αντί να υφίσταται ζύμωση σε μεθάνιο. Αυτή η μετατροπή του οξικού σε διοξείδιο του άνθρακα φέρεται να προκαλείται από βακτήρια αναγωγής θεικών ικανά να οξειδώσουν το οξικό.

Παρά το γεγονός ότι και τα δύο μονοπάτια παραγωγής μεθανίου μπορούν να λειτουργούν τόσο σε θαλάσσια ιζήματα όσο και σε ιζήματα γλυκού νερού, η σχετική αναλογία του κάθε μονοπατιού διαφέρει κατά περίπτωση και ελέγχεται από τη διαθεσιμότητα των υποστρωμάτων και του υδρογόνου στους μεθανιοπαραγωγούς οι οποίοι με τη σειρά τους μπορεί να περιορίζονται λόγω του ανταγωνισμού από τα βακτήρια αναγωγής θεικών. Η αναγωγή του διοξειδίου του άνθρακα, ωστόσο, κατέχει δεσπόζουσα θέση στη ζώνη μεθανιογένεσης όπου δεν υπάρχει παρουσία θεικών, για την παραγωγή μεθανίου στα θαλάσσια ιζήματα, ενώ στα ιζήματα του γλυκού νερού η οξική ζύμωση αποτελεί το κύριο μονοπάτι (Whiticar et al 1986).

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να προσδιοριστεί κατά κύριο μέρος η πηγή απ' όπου προέρχεται η παραγωγή μεθανίου. Προσδιορίστηκαν οι πηγές, οι συνθήκες και τα ενδιατήματα όπου εμφανίζονται ολοένα και περισσότερο τα γονίδια των μεθανουδριτών, και ομαδοποιήθηκαν σύμφωνα με αυτά. Η φυλογεωγραφική κατανομή του γονιδίου *mcrA* έχει σημασία για την ταυτοποίηση του κοσμοπολίτικου έναντι του απομονωμένου χαρακτήρα της μεθανιογένεσης.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για την εκπόνηση της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ιστοσελίδες: η Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) και η ClustalW (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=mcrA>). Η Genbank είναι μια βάση δεδομένων με ανοιχτή πρόσβαση. Αυτή η βάση δεδομένων είναι μέρος του International Nucleotide Sequence Database Collaboration και στην ουσία είναι ένας οργανισμός που συγκεντρώνει πληροφορίες για γενετικές αλληλουχίες οι οποίες έχουν δημοσιευτεί. Η ClustalW είναι ένα πρόγραμμα που χρησιμοποιείται παγκοσμίως που

αποσκοπεί στην κατανομή των αλληλουχιών του DNA ή των πρωτεϊνών. Είναι μια “μηχανή” που υπολογίζει την αντιστοιχία, τις ομοιότητες και τις διαφορές των αλληλουχιών. Έχει την ικανότητα να εμφανίζει τη σχέση μεταξύ των αλληλουχιών με διάφορα γραφήματα με αποτέλεσμα στην καλύτερη μελέτη τους.

Οι παραπάνω ιστοσελίδες ήταν απαραίτητες για την ταξινόμηση των αλληλουχιών των βακτηριών και τη σύγκρισή της ομοιότητας τους από 80-100%. Για την εύρεση των συγκεκριμένων αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε αρχικά η Genbank με συγκεκριμένη αναζήτηση *mcrA* (methyl coenzyme M reductase alpha, uncultured archaeon). Το αποτέλεσμα της αναζήτησης ήταν συνολικά 4606 αλληλουχίες γονιδίων *mcrA* ακαλλιέργητων Archaea. Από κάθε αποτέλεσμα που παροσιάστηκε καταχωρήθηκε σε αρχείο Excel η ονομασία (LOCUS), το μήκος της αλληλουχίας, η δημοσίευση (JOURNAL), η πηγή που απομονώθηκε το γονίδιο (ISOLATION_SOURCE) και τέλος η χώρα που βρέθηκε (COUNTRY). Στη συνέχεια το σύνολο κάθε αλληλουχίας καταχωρήθηκε σε αρχείο Word.

Στο τέλος με τη βοήθεια της ιστοσελίδας ClustalW συγκρίθηκε όλο το σύνολο των γονιδίων σύμφωνα με τις αλληλουχίες. Καταγράφηκαν τα γονίδια με ομοιότητα από 80-100%, μέχρι που κατέληξαν σε 16 ομάδες.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι τελικές ομάδες των γονιδίων με τους ανάλογους αντιπροσώπους αλφάριθμους οι οποίοι αντιστοιχούν στον κωδικό πρόσβασης στην Genbank είναι οι εξής:

- 1) AAQ 63145, ACJ 74351, BAI 44554, ACJ 74268, CBW 47423, ACX 48954, ADG 08060, ACJ 11598, BAF 96818

- 2) CAE 46369, CBH 37407, ADO 60824, BAE 80217
- 3) ACL 80582, ACL 80579, ACI 48626
- 4) ABN 69020, ABN 68956, AFA 53829
- 5) BAK 69265, AEN 93139, ABJ 97468, ABM 73445
- 6) ABJ 97471, ABM 73439, ACY 40767
- 7) CAE 55186, AEF 58407, ACN 56603, ACV 50385, ACI 48619, ABJ 97467,
ADM 13735, ABK 91984, AFA 53737, ACI 48686, ACI 48748, CAQ 03780,
CAI 30319
- 8) AAQ 63146, ACJ 11615, AFE 61641, ACJ 74257, ADW 65672, ABG 27031,
BAI 44548, CBW 47424
- 9) BAE 80641, CAQ 03782, ACJ 11576, ABG 27029
- 10) CAE 55184, AEF 58383, AEF 58379, AAV 64156, AAT 37612
- 11) ABK 91991, ACY 40767
- 12) ABK 97987, CAQ 03782
- 13) AEQ 26049, AEQ 26041
- 14) ABB 04501, ACX 47029, ACI 48618, ABJ 97482
- 15) ACX 48960, BAJ 05277, BAF 36947
- 16) AFA 25748, ADB 03765

Οι παραπάνω τελικές ομάδες των γονιδίων με τους ανάλογους αντιπροσώπους έχουν συγκριθεί με τα υπόλοιπα γονίδια που ανήκουν στην ίδια κατηγορία και αντιπροσωπεύονται από τα εξής σε αριθμό γονίδια:

Πρώτη ομάδα: 79

Δεύτερη ομάδα: 3

Τρίτη ομάδα: 6

Τέταρτη ομάδα: 65

Πέμπτη ομάδα: 19

Έκτη ομάδα: 12

Έβδομη ομάδα: 298

Όγδοη ομάδα: 37

Ένατη ομάδα: 23

Δέκατη ομάδα: 13

Ενδέκατη ομάδα: 3

Δωδέκατη ομάδα: 10

Δέκατητρίτη ομάδα: 2

Δέκατητέταρτη ομάδα: 40

Δέκατηπεμπτη ομάδα: 7

Δέκατηέκτη ομάδα: 30

Σύμφωνα με την τελική κατάταξή τους και διαχωρισμό των γονιδίων καταλήξαμε σε δυο πίνακες για την καλύτερη αντίληψη της προέλευσης των γονιδίων.

Ακολουθεί η ανάλυση του πρώτου πίνακα που όπου παρατηρούμε το διαχωρισμό των τελικών ομάδων ανάλογα με τις πηγές προέλευσης, οι οποίες είναι: τα φυσικά ενδιαιτήματα και τα τεχνητά ενδιαιτήματα.

Ειδικότερα ως φυσικά ενδιαιτήματα ορίζονται η θάλασσα, οι υγρότοποι/γλυκά νερά, η χέρσος/υπόγεια νερά και τέλος τα έντερα των ζώων. Ακολούθως τα τεχνητά ορίζονται ως τα λύματα/κοπριά και οι ζυμωτήρες. Ο διαχωρισμός των ενδιαιτημάτων προήλθε από το σύνολο των πηγών όπου εμφανίστηκαν τα γονίδια. Από τον πίνακα που

ακολουθεί ξεχωρίζουμε κάποιες ομάδες γονιδίων που εμφανίστηκαν μόνο σε κάποιο φυσικό ενδιαίτημα ή μόνο σε κάποιο τεχνητό ή και στα δύο.

Πρωτίστως από τις 16 τελικές ομάδες οι 11 εμφανίστηκαν αποκλειστικά σε φυσικά ενδιαίτηματα: 3 από αυτές μόνο στη θάλασσα (2^η, 9^η, 15^η ομάδα με αντιστοιχία αλληλουχιών 3, 23, 7), 2 από αυτές μόνο στη χέρσο/υπόγεια νερά (10^η, 13^η ομάδα με αντιστοιχία αλληλουχιών 13, 2), 2 από αυτές μόνο στη θάλασσα και στους υγροτόπους/γλυκά νερά (1^η, 8^η ομάδα με αντιστοιχία αλληλουχιών 79, 37), 1 από αυτές στη θάλασσα και χέρσο/υπόγεια νερά (12^η ομάδα με αντιστοιχία αλληλουχιών 10) και τέλος 2 από αυτές μόνο στη χέρσο/υπόγεια νερά και τους υγροτόπους/γλυκά νερά (4^η, 11^η ομάδα με αντιστοιχία αλληλουχιών 65, 3) (Yanagaw K. et al 2011, Lazar C. et al 2011, Milferstedt K. et al 2010, Dang H. et al 2009, Miyazaki J. et al 2009, Meyerdierks A. et al 2009, Roussel E. G. et al 2009, Beal E. et al 2009, Nunoura T. et al 2006, Lloyd K. G. et al 2006, Inagaki F. et al 2006, Moser D. P. et al 2005, Kemnitz D. et al 2004, Hallam S. et al 2003, Kruger M. et al 2003).

Δευτερευόντως από τις 16 τελικές ομάδες οι 2 εμφανίστηκαν αποκλειστικά σε τεχνητά ενδιαίτηματα: 1 από αυτές μόνο στα λύματα/κοπριά (3^η ομάδα με αντιστοιχία αλληλουχιών 6), 1 από αυτές στα λύματα/κοπριά και ζυμωτήρες (16^η ομάδα με αντιστοιχία αλληλουχιών 30). Για τις παραπάνω ομάδες δεν υπάρχουν δημοσιευμένες εργασίες.

Και τέλος από τις 16 τελικές ομάδες οι 3 εμφανίστηκαν και στα φυσικά και στα τεχνητά ενδιαίτηματα: 1 από αυτές στη χέρσο/υπόγεια νερά και στα λύματα/κοπριά (5^η ομάδα με αντιστοιχία αλληλουχιών 19), 1 από αυτές στη χέρσο/υπόγεια νερά, στα έντερα και στα λύματα/κοπριά (14^η ομάδα με αντιστοιχία αλληλουχιών 40) και 1 από αυτές στη

θάλασσα, στους υγροτόπους/γλυκά νερά, στη χέρσο/υπόγεια νερά και στους ζυμωτήρες (7^η ομάδα με αντιστοιχία αλληλουχιών 298) (Rastogi G. et al 2011, Zhu C. et al 2011, Pereyna L. P. et al 2010, Roussel E. G. et al 2009, Denman S. E. et al 2007, Parkes R. J. et al 2005, Kemnitz D. et al 2004).

Ο πίνακας 1 αναφέρει το διαχωρισμό των φυσικών και τεχνητών πηγών ανά ομάδα.

Πίνακας 1. Διαχωρισμός των φυσικών και τεχνητών πηγών ανά ομάδα του *mcrA*.

ΟΜΑΔΕΣ	ΦΥΣΙΚΑ ΕΝΔΙΑΤΗΜΑΤΑ				ΤΕΧΝΗΤΑ	
	ΘΑΛΑΣΣΑ	ΥΓΡΟΤΟΠΟΙ/ΓΛΥΚΑ ΝΕΡΑ	ΧΕΡΣΟΣ/ΥΠΟΓΕΙΑ ΝΕΡΑ	ΕΝΤΕΡΑ	ΛΥΜΑΤΑ/ΚΟΠΗΡΙΑ	ΖΥΜΩΤΗΡΕΣ
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						

Στη συνέχεια ακολουθεί η ανάλυση του δεύτερου πίνακα. Ο πίνακας 2 αναφέρει το διαχωρισμό των περιοχών-τόπων ανά ομάδα.

Πίνακας 2. Διαχωρισμός των περιοχών ανά ομάδα του mcgA.

		ΠΕΡΙΟΧΕΣ																																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32				
ΠΕΛΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΤΟΝΙΑΣΗ	1													■						■	■		■						■	■	■						
	2	■															■	■																			
	3																		■				■														
	4			■					■																												
	5							■							■									■				■									
	6							■																											■		
	7				■	■	■	■		■	■		■						■				■				■		■								
	8													■				■				■							■	■	■	■					
	9									■								■				■	■														
	10												■							■					■												
	11																									■										■	
	12									■																	■										
	13																■																				
	14				■			■				■													■												
	15		■																■						■												
	16			■																																	

1	BLACK SEA	11	GERMANY, NEAR GIESSEN	21	OKINAYA, YONAGUNI
2	CANADA, CASCADIA	12	ISRAEL, NEARAVOLAT	22	OTHER SOURCES
3	CHINA	13	JAPAN SEA, JOESTSU	23	SOUTH AFRICA, JOHANESBURG
4	CHINA, CHONGMING ISLAND	14	JAPAN, NIIGATA	24	SOUTH AFRICA, WEST BRANCH
5	CHINA, LAKE TAIHU	15	MEXICO	25	UK, ABERDEEN
6	CHINA, RIVER YANTZE	16	MEXICO, GULF OF MEXICO	26	USA
7	CZECH REPUBLIC	17	NANKAI TROUGH	27	USA, ALENE RIVER, IDAHO
8	ESTHONIA	18	NETEHRLANDS, RIVER WAAL	28	USA, EEL RIVER, CA
9	FRANCE, MARENNE BAY	19	NORWAY, NYEGGA REGION	29	USA, GUAYMAS BASIN, CA
10	GERMANY, BRANDENBURG	20	OKHOTSK SEA	30	USA, MONTEREY CANYON
				31	USA, OAK RIVER, NORTH CAROLINA
				32	USA, WISCONSIN

Σύμφωνα με τον πίνακα μπορούμε να παρατηρήσουμε τις ακριβείς τοποθεσίες που εμφανίστηκαν τα γονίδια-αντιπρόσωποι της κάθε ομάδας. Η πιο σημαντική παρατήρηση είναι σε κάθε μια περιοχή πόσες κοινές ομάδες έχουν εμφανιστεί.

Οι περισσότερες έχουν παρατηρηθεί στην 22η περιοχή (OTHER SOURCES) με 6 κοινές ομάδες και συνολικά 446 γονίδια , η οποία περιοχή περιλαμβάνει όλες εκείνες τις ομάδες οι οποίες είναι καταγεγραμμένες με τη πηγή στην οποία βρέθηκαν χωρίς όμως κάποια αναφορά στον τόπο προέλευσης (Yanagawa K. et al 2011, Zhu C. et al 2011, Lazar C. S. et al 2011, Rastogi G. et al 2011, Pereyna L. P. et al 2010, Beal E. J. et al 2009, Dang H. et al 2009, Miyazaki J. et al 2009, Roussel E. G. et al 2009, Parkes R. J. et al 2005, Hallam S. J. et al 2003, Kemnitz D. et al 2003). Ακολούθως παρατηρούμε την 7η περιοχή (CHECH REPUBLIC) με 4 κοινές ομάδες και συνολικά

369 γονίδια, η οποία περιοχή συγκεκριμενοποιείται ως Farm in Southern Bohemia (Rastogi G. et al 2011, Zhu C. et al 2011, Pereyna L. P. et al 2010, Milferstedt K. et al 2010, Roussel E. G. et al 2009, Parkes R. J. et al 2005, Kemnitz D. et al 2003). Σε ισοψηφία εμφάνισης κοινών ομάδων παρατηρούμε την 17η (NANKAI TROUGH, JAPAN) (Meyerdierks A. et al 2009, Nunoura T. et al 2006, Kruger M. et al 2003) και 20η περιοχή (OKHOTSK SEA) (Yanagawa K. et al 2011, Lazar C. S. et al 2011, Beal E. J. et al 2009, Dang H. et al 2009, Miyazaki J. et al 2009, Roussel E. G. et al 2009, Lloyd K. G. et al 2006, Inagaki F. et al 2006, Hallam S. J. et al 2003) με 3 κοινές ομάδες και συνολικά 112 και 139 κοινές ομάδες αντίστοιχα. Παρατηρούμε στις δύο τελευταίες περιοχές ότι αναφέρονται αποκλειστικά σε θαλάσσιο οικοσύστημα.

Αντιστρόφως είναι σημαντικό να παρατηρήσουμε ποιες ομάδες γονιδίων εμφανίζονται στις περισσότερες περιοχές. Ειδικότερα το εύρος των περιοχών ανά ομάδα και αντιπροσώπους.

Ειδικότερα οι αντιπρόσωποι της 1ης ομάδας γονιδίων εμφανίζονται σε 7 περιοχές: 17η, 19η, 20η, 22η, 28η, 29η και 30η (NANKAI TROUGH, NYEGGA REGION, OKHOTSK SEA, OTHER SOURCES, EEL RIVER, GUAYMAS BASIN, MONTEREY CANYON) (Yanagawa K. et al 2011, Lazar C. S. et al 2011, Beal E. J. et al 2009, Dang H. et al 2009, Miyazaki J. et al 2009, Hallam S. J. et al 2003). Της 2^{ης} ομάδας γονιδίων εμφανίζονται σε 3 περιοχές: 1^η, 16^η και 17^η (BLACK SEA, GULF OF MEXICO, NANKAI TROUGH) (Meyerdierks A. et al 2009, Nunoura T. et al 2006, Kruger M. et al 2003). Της 3^{ης} ομάδας γονιδίων εμφανίζονται σε 1 περιοχή: 22^η (BLACK SEA) (Για την 3^η ομάδα δεν υπάρχουν δημοσιευμένες εργασίες). Της 4^{ης} ομάδας γονιδίων εμφανίζονται σε 2 περιοχές: 6^η και 8^η (RIVER YANTZE,

ESTHONIA) (Για την 4^η ομάδα δεν υπάρχουν δημοσιευμένες εργασίες). Της 5^{ης} ομάδας γονιδίων εμφανίζονται σε 4 περιοχές: 7^η, 14^η, 22^η και 26^η (CZECH REPUBLIC, NIIGATA, OTHER SOURCES, USA) (Για την 5^η ομάδα δεν υπάρχουν δημοσιευμένες εργασίες). Της 6^{ης} ομάδας γονιδίων εμφανίζονται σε 2 περιοχές: 7^η, 32^η (CZECH REPUBLIC, WISCONSIN) (Milferstedt K. et al 2010). Της 7^{ης} ομάδας γονιδίων εμφανίζονται σε 11 περιοχές: 5^η, 6^η, 7^η, 9^η, 10^η, 12^η, 18^η, 22^η, 25^η, 27^η, 33^η (LAKE TAIHU, RIVER YANTZE, CZECH REPUBLIC, FRANCE, GERMANY, NEGEV DESERT, RIVER WAAL, OTHER SOURCES, ABERDEEN, ALENE RIVER, PERU) (Rastogi G. et al 2011, Pereyna L. P. et al 2010, Roussel E. G. et al 2009, Parkes R. J. et al 2005, Kemnitz D. et al 2003). Της 8^{ης} ομάδας γονιδίων εμφανίζονται σε 6 περιοχές: 13^η, 20^η, 28^η, 29^η, 30^η, 31^η (JAPAN SEA, OKHOTSK SEA, EEL RIVER, GUAYMAS BASIN, MONTEREY CANYON, OAK RIVER) (Yonagawa K. et al 2011, Beal E. J. et al 2009, Dang Y. et al 2009, Lloyd K. G. et al 2006, Hallam S. J. et al 2003). Της 9^{ης} ομάδας γονιδίων εμφανίζονται σε 4 περιοχές: 9^η, 16^η, 20^η, 21^η (FRANCE, GULF OF MEXICO, OKHOTSK SEA, OKINAYA) (Dang H. et al 2009, Roussel E. G. et al 2009, Lloyd K. G. et al 2006, Inagaki F. et al 2006). Της 10^{ης} ομάδας γονιδίων εμφανίζονται σε 3 περιοχές: 11^η, 18^η, 23^η (GERMANY, RIVER WAAL, JOHANNESBURG) (Moser D. P. et al 2005, Kemnitz D. et al 2004). Της 11^{ης} ομάδας γονιδίων εμφανίζονται σε 2 περιοχές: 24^η, 32^η (SOUTH AFRICA, WISCONSIN) (Milferstedt K. et al 2010). Της 12^{ης} ομάδας γονιδίων εμφανίζονται σε 2 περιοχές: 9^η, 24^η (FRANCE, SOUTH AFRICA) (Roussel E. G. et al 2009). Της 13^{ης} ομάδας γονιδίων εμφανίζονται σε 1 περιοχή: 15^η (MEXICO) (Για την 13^η ομάδα δεν υπάρχουν δημοσιευμένες εργασίες). Της 14^{ης} ομάδας γονιδίων εμφανίζονται σε 4 περιοχές: 4^η, 7^η, 10^η και 22^η (CHINA, CZECH REPUBLIC, GERMANY, OTHER SOURCES) (Zhu C.

et al 2011). Της 15^{ης} ομάδας γονιδίων εμφανίζονται σε 3 περιοχές: 2^η, 17^η και 22^η (CANADIA, NANKAI TROUGH, OTHER SOURCES) (Για την 15^η ομάδα δεν υπάρχουν δημοσιευμένες εργασίες). Της 16^{ης} ομάδας γονιδίων εμφανίζονται σε 1 περιοχή: 1^η (CHINA) (Για την 16^η ομάδα δεν υπάρχουν δημοσιευμένες εργασίες).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με τη τελική κατάταξη και διαχωρισμό των γονιδίων καταλήγουμε στους δύο παραπάνω πίνακες.

Ο πρώτος πίνακας αναφέρεται στο διαχωρισμό των τελικών ομάδων των γονιδίων σε σχέση με τα ενδιαιτήματα που εμφανίστηκαν. Ο δεύτερος πίνακας αναφέρεται στο διαχωρισμό των τελικών ομάδων γονιδίων σε σχέση με το τόπο που βρέθηκαν.

Αρχικά μπορούμε να διαχωρίσουμε τα ενδιαιτήματα σε φυσικά και τεχνητά. Ειδικότερα φυσικά ενδιαιτήματα ορίστηκαν η θάλασσα, οι υγρότοποι/γλυκά νερά, η χέρσο/υπόγεια νερά και έντερα οργανισμών. Τεχνητά ενδιαιτήματα ορίστηκαν τα λύματα/κοπριά και οι ζυμωτήρες. Ο διαχωρισμός των ενδιαιτημάτων έγινε από το σύνολο των πηγών όπου εμφανίστηκαν όλα τα γονίδια στο σύνολό τους.

Από τον πίνακα ξεχωρίζουμε ομάδες γονιδίων όπου μερικές εμφανίστηκαν μόνο σε φυσικά ενδιαιτήματα ή μόνο σε τεχνητά ενδιαιτήματα ή και στα δύο. Παρατηρούμε ότι από τις 16 ομάδες γονιδίων οι έντεκα (11) εμφανίζονται αποκλειστικά στα φυσικά ενδιαιτήματα. Τρεις από αυτές εμφανίζονται μόνο σε θαλάσσια ενδιαιτήματα, δύο από αυτές μόνο στη χέρσο/υπόγεια νερά, δύο από αυτές στο θαλάσσιο ενδιαιτήματα και στους υγρότοπους/γλυκά νερά, τρία από αυτά σε υγροτόπους/γλυκά νερά και χέρσο/υπόγεια νερά.

Στη συνέχεια παρατηρούμε ότι από τις 16 ομάδες οι 2 εμφανίζονται μόνο στα τεχνητά ενδαιτήματα. Η μια από αυτές εμφανίζεται αποκλειστικά μόνο στα λύματα/κοπριά και η άλλη στα λύματα/κοπριά και στους ζυμωτήρες.

Τέλος παρατηρούμε ότι 3 ομάδες εμφανίζονται και σε φυσικά και σε τεχνητά ενδαιτήματα. Μια από αυτές εμφανίζεται στη χέρσο/υπόγεια νερά και στα λύματα, μια στη θάλασσα, υγρότοποι/γλυκά νερά, χέρσο/υπόγεια νερά και ζυμωτήρες και τέλος η τελευταία εμφανίζεται στη χέρσο/γλυκά νερά, έντερα και λύματα/κοπριά.

Σύμφωνα με τους πίνακες που αναφέρονται παραπάνω οι 3 από τις 16 τελικές ομάδες εμφανίζονται σε μεγαλύτερο εύρος ενδαιτημάτων σε σχέση με τις άλλες 13. Είναι αξιόλογη η παρουσία τους στα τεχνητά και στα φυσικά ενδαιτήματα.

Αρχικά η 5^η ομάδα εμφανίζεται στη χέρσο/υπόγεια νερά και στα λύματα/κοπριά με τόπους εμφάνισης Czech Republic, Japan Niigata, Other sources (χωρίς περαιτέρω πληροφόρηση) και USA με αναλυτική αναφορά σε πηγές: unplant pasture soil, UASB reactor treating artificial waste water, subsurface shale pore waters, anaerobic digester biomass (χώμα βοσκοτόπων, τεχνητά λύματα, υπόγεια ύδατα και αναερόβια βιομάζα από διαδικασία χώνευσης) (Για την 5^η ομάδα δεν υπάρχουν δημοσιευμένες εργασίες).

Ακολούθως η 14^η ομάδα παρουσιάζεται στη χέρσο/υπόγεια νερά, στα έντερα και στα λύματα/κοπριά με τόπους εμφάνισης China-Chongming island, Czech Republic, Germany-Brandesburg και Other sources (χωρίς περαιτέρω πληροφόρηση) με αναλυτική αναφορά σε πηγές: unplant pasture soil, cattle rumen, slurry from biogas reactor, biogas plant supplied with pig liquid manure maize silage (χώμα βοσκοτόπων, έντερα, προϊόντα βιοαερίου και προϊόν από κοπριά χοίρων) (Zhu C. et al 2011, Denman S et al 2007).

Τέλος η 7^η ομάδα παρουσιάζεται στη θάλασσα, στους υγροτόπους/γλυκά νερά, στη χέρσο/υπόγεια νερά και στους ζυμωτήρες με τόπους εμφάνισης China-lake Taihu, China-river Yantze, Czech Republic, France-Marennes Bay, Germany-Brandesburg, Israel-near Avdat, Netherlands-river Waal, Other sources (χωρίς περαιτέρω πληροφόρηση), UK-Aberdeen Alene river, Peru-Pacific Ocean side με αναλυτική αναφορά σε πηγές: sediment, soil, biological soil, crust sample from a Limon, unplant pasture soil, microbial consortium enrichment culture, Chinese rice paddy soil incubated anoxic ally with 3,85 methyl fluoride for 14 days, archaea in 35 degrees certigrade fermentation system, lingcellulose-based sulfata reducing bioreactor, leach-bed reactor of a two-phase biogas plant supplied with cattle manure and triticale silage, biogas plant supplied with pig and cattle liquid manure, turkey dung, maize silage, rye silage (ίζημα, έδαφος, δείγμα κρούστας βιολογικού εδάφους, χώμα βοσκοτόπων, μικροβιακός εμπλουτισμός, ρύζι προερχόμενο ανοξικά με 3,85% μεθυλοφθορίου για 14 μέρες, αρχαία σε 35 βαθμούς σύστημα ζύμωσης, βιοαντιδραστήρας με βάση τη κυτταρίνη, στρώματα παραγωγής βιοαερίου από βοοειδή κοπριά, παραγωγή βιοαερίου από λίπασμα χοίρων και βοοειδών, λίπασμα από γαλοπούλα, ζύμωση σίκαλης) (Rastogi G. et al 2011, Pereyra L. P. et al 2010, Roussel E. G. et al 2009, Parkes R.J. et al 2005, Kemnitz D. et al 2004)

Το γεγονός ότι οι συγκεκριμένες ομάδες γονιδίων σχετίζονται με αποτελέσματα που δέχονται ανθρωπογενή επίδραση και ταυτόχρονα απαντώνται και σε φυσικά συστήματα που δέχονται λιγότερη ανθρωπογενή επίδραση πιθανών να σχετίζονται με ανθρώπινη προέλευση.

Σε αντίθεση με τα παραπάνω παρατηρούμε στους παραπάνω πίνακες και κάποιες από τις τελικές ομάδες να εμφανίζονται σε περιορισμένες περιοχές-πηγές σε σχέση με το εύρος των 16 τελικών ομάδων γονιδίων.

Συνολικά παρατηρούμε 5 ομάδες στο σύνολο οι οποίες μπορούν να χαρακτηριστούν στενόοικες.

Αρχικά η 2^η ομάδα παρουσιάζεται αποκλειστικά στη θάλασσα με τόπους εμφάνισης Black Sea, Gulf of Mexico, Nankai Trough-Japan με αναλυτική αναφορά σε πηγές: fosmid library from a methane mat in Black Sea, sediment και Nankai Trough (μικροβιακός τάπητας σε αναβλύσεις μεθανίου στη Μαύρη θάλασσα, ιζήματα στο Κόλπο του Μεξικού) (Meyerdierks A. et al 2009, Nunoura T. et al 2006, Kruger M. et al 2003).

Η 9^η ομάδα παρουσιάζεται αποκλειστικά στη θάλασσα με τόπους εμφάνισης France-Marennes Bay, Okinawa Yonaguni, Okhotsk Sea και Gulf of Mexico με αναλυτική αναφορά σε πηγές: marine sediments from the Yonaguni hydrothermal field southern Okinawa, subsurface marine sediment (θαλάσσιο ίζημα από υδροθερμικά πεδία, υποεπιφανειακό ίζημα και ψυχρές αναβλύσεις σε ιζήματα μεθανουδριτών) (Roussel E. G. et al 2009, Dang H. et al 2009, Inagaki F. et al 2006, Lloyd K. G. et al 2006).

Η 10^η ομάδα παρουσιάζεται αποκλειστικά στη χέρσο/υπόγεια νερά με τόπους εμφάνισης Mexico (όχι περαιτέρω πληροφόριση) με αναλυτική αναφορά σε πηγές: enrichment culture of hypersaline microbial mat (καλλιέργεια εμπλουτισμού από υπεράλμυρο μικροβιακό τάπητα) (Moser D. P. et al 2005, Kemnitz D. et al 2004).

Και τέλος η 15^η ομάδα παρουσιάζεται αποκλειστικά στη θάλασσα με τόπους εμφάνισης Canada-Cascadia, Nankai Trough-Japan και Other sources (χωρίς περαιτέρω πληροφόρηση) με αναλυτική αναφορά σε πηγές: marine sediment, deep sediment και refrigerated marine sediment (θαλάσσιο ίζημα) (Για την 15^η ομάδα δεν υπάρχουν δημοσιευμένες εργασίες).

Σημαντική παρατήρηση είναι ότι οι ομάδες στενόοικων μεθανιογόνων βρέθηκαν αποκλειστικά και μόνο σε φυσικά ενδιαιτήματα (θάλασσα και χέρσο/υπόγεια νερά) χωρίς καμία ανθρώπινη παρέμβαση στις πηγές τους σε σχέση με τις ομάδες που βρέθηκαν σε αρκετές πηγές οι οποίες κατά βάση βασίζονται και υπάρχουν λόγω της ανθρώπινης παρεμβολής ή επεξεργασίας.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1]. Kotelnikova S. (2002) Microbial production and oxidation of methane in deep subsurface. *Earth – Science Reviews*, 58:367-395
- [2]. Cicerone R. J., Oremland R. S. (1988) Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Global Biochem Cycles*, 2:299-327.
- [3]. Lelieveld J., Crutzen P. J., Dentener F.J (1998) Changing concentration, lifetime and climate forcing of atmospheric methane. *Tellus*, 50B:128-150.
- [4]. Torres M. E., Wallmann K., Trehu A. M., Bohrmann G., Borowski W. S., Tomaru H. (2004) Gas hydrate growth, methane transport, and chloride enrichment at the southern summit of Hydrate Ridge, Cascadia margin off Oregon. *Earth and Planetary Science Letters*, 226:225-241
- [5]. Borowski W. S., Paul C. K., Usler III W. (1999) Global and local variations of interstitial sulfate gradients in deep-water, continental margin sediments: Sensitivity to underlying methane and gas hydrates. *Marine Geology*, 159:131-154

- [6]. Borowski W. S. (2004) A review of methane and gas hydrates in the dynamic, stratified system of the Blake Ridge region, offshore southeastern North America. *Chemical Geology*, 205:311-346
- [7]. Sauter E. J., Muyakshin S. I., Charlou J.-L., Schluter M., Boetius A., Jerosch K., Damm E., Foucher J.-P., Klages M. (2006) Methane discharge from a deep-sea submarine mud volcano into the upper water column by gas hydrate-coated methane bubbles. *Earth and Planetary Science Letters*, 243:354-365.
- [8]. Hanson R. S., Hanson T. E. (1996) Methanotrophic Bacteria. *Microbiol. Reviews*, 60:439-471.
- [9]. Demirbas A. (2010) Methane hydrates as potential energy resource: Part1-Importance, resource and recovery facilities. *Energy Conversion and Management*, 51:1547-1561.
- [10]. Kvenvolden K. A. (1993) A review of the geochemistry of methane in natural gas hydrate. *Org. Geochem*, 23: 997-1008.
- [11]. Ginsburg G. D., Soloviev V. A. (1997) Methane migration within the submarine gas-hydrate stability zone under deep-water conditions. *Marine Geology* 137:49-57.
- [12]. Yamamoto S., Alcauskas J. B., Crozier T. E. (1976) Solubility of Methane in Distilled Water and Seawater. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 21: 78-80.
- [13]. Demirbas A. 2010 Methane hydrates as potential energy resource: Part 2- Methane production processes from gas hydrates. *Energy Conversion and Management*, 51: 1562-1571.
- [14]. Lee S. – Y., Holder G. D. (2001) Methane hydrates potential as a future energy source. *Fuel Processing Technology*, 71: 181-186.
- [15]. Williams R. T., Crawford R. L. (1985) Methanogenic Bacteria, including an Acid-Tolerant strain, from peatlands. *Applied And Enviromental Microbiology*, 50:1542-1544.

- [16]. Zeikus J. G. (1977) The biology of methanogenic Bacteria. *Bacteriol. Reviews*, 41:514-541.
- [17]. Whiticar M. J., Faber E., Schoell M. (1986) Biogenic methane in marine and freshwater environments: CO₂ reduction vs. acetate fermentation-Isotope evidence. *Geochemica et Cosmochimica Acta*, 50:693-709.
- [18]. Hallam S. J., Girguis P. R., Preston C. M., Richardson P. M., Delong E. F. (2003) Identification of Methyl Coenzyme M Reductase A (mcrA) genes associated with Methane-Oxidizing Archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 5483-5491.
- [19]. Beal E. J., House C. H., Orphan V. J. (2009) Magnese –and Iron- Dependent Marine Methane Oxidation. *Science*, 325: 184-187.
- [20]. Yanagawa K., Sunamura M., Lever M. A., Morono Y., Hiruta A., Ishizaki O., Matsumoto R., Urabe T., Inagaki F. (2011) Niche separation of methanotrophic Archaea (ANME-1 and -2) in Methane-Seep sediments of the Eastern Japan Sea Offshore Joetsu. *Geomicrobiology Journal*, 28:118-129.
- [21]. Lazar C. S., Dinasquet J., L'Haridon S., Piguet P., Toffin L. (2011) Distribution of anaerobic methane-oxidizing and sulfate-reducing communities in the G11 Nyegga pockmark, Norwegian Sea. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100: 639-653.
- [22]. Dang H., Luan X., Zhao J., Li J. (2009) Diverse and Novel nifH and nifH-Like Gene Sequences in the Deep-Sea Methane Seep Sediments of the Okhotsk Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 75:2238-2245.
- [23]. Miyazaki J., Higa R., Toki T., Ashi J., Tsunogai U., Nunoura T., Imachi H., Takai K. (2009) Molecular characterization of the potential nitrogen fixation by anaerobic methane-oxidizing Archaea in the Methane seep sediments at the number 8 kumano knoll in the Kumano Basin, Offshore of Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 75:7153-7162.

- [24]. Kruger M., Meyerdierks A., Glockner F. O., Amann R., Widdel F., Kube M., Reinhardt R., Kahnt J., Bocher R., Thauer R. K., Shima S. (2003) A conspicuous nickel protein in microbial mats that oxidize methane anaerobically. *Nature*, 426:878-881.
- [25]. Meyerdierks A., Kube M., Kostadinov I., Teeling H., Glocknar F. O., Reinhardt T., Amann R. (2009) Metagenome and mRNA expression analyses of anaerobic methanotrophic Archaea of the ANME-1 group. *Environmental microbiology*, 12:422-439.
- [26]. Nunoura T., Oida H., Toki T., Ashi J., Takai K., Horikoshi K. (2006) Quantification of *mcrA* by quantitative fluorescent PCR in sediments from methane seep of the Nankai Trough. *FEMS Microbiology Ecology*, 57:149-157.
- [27]. Milferstedt K., Youngblut N. D., Whitaker R. J. (2010) Spatial structure and persistence of methanogen populations in humic bog lakes. *The ISME Journal*, 4:764-776.
- [28]. Kemnitz D., Chin K., Bodelier P., Conrad R. (2004) Community analysis of methanogenic Archaea within a riparian flooding gradient. *Environmental Microbiology*, 6:449-461.
- [29]. Rastogi G., Barua S., Sani R. K., Peyton B. M. (2011) Investigation of microbial populations in the extremely metal-contaminated Coeur d' Alene River sediments, *Microbial Ecology*, 62:1-13.
- [30]. Pereyña L. P., Hiibel S. R., Riquelme M. V. P., Reardon K. F., Pruden A. (2010) Detection and qualification of functional genes of cellulose-degrading, fermentative, and sulfate-reducing bacteria and methanogenic Archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 76:2192-2202.
- [31]. Roussel E. G., Sauvadet A., Allard J., Chaduteau C., Richard P., Bonavita M., Chanmillon E. (2009) Archaeal methane cycling communities Associated with gassy subsurface sediments of Marennes-Oleron Bay (France), *Geomicrobiology Journal*, 26:31-43.

- [32]. Parkes R. J., Webster G., Cragg B. A., Weightman A., Newberry C., Ferdelman T., Kallmeyer J., Jorgensen B. B., Aiello I., Fry J. C. (2005) Deep sub-seafloor prokaryotes stimulated at interfaces over geological time,. *Nature*, 436:390-394.
- [33]. Loyd K., Lapham L., Teskke A. (2006) An anaerobic Methane-oxidizing community of ANME-1b Archaea in hypersaline Gulf of Mexico sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:7218-7230.
- [34]. Inagaki F., Kuypers M. M. M., Tsunogai U., Ishibashi J., Nakamura K., Treude T., Ohkubo S., Nakaseama M., Gena K., Chiba H., Hirayama H., Nunoura T., Takai K., Jorgensen B.B, Horikoshi K., Boetius A. (2006) Microbial community ina sediment-hosted CO₂ lak of the Southern Okinawa Trough hydrothermal system. *PNAS*, 103:14164-14169
- [35]. Moser D. P., Gihring T. M., Brockman F. J., Fredrickson J. K., Balkwill D. L., Dollhop M. E., Lollar B. S., Pratt L. M., Boice E., Southam G., Wauger G., Baker B. J., Piffner S. M., Lin Li-H., Onstott T. C. (2005) Desulfotomaculum and Methanobacterium spp. Dominated a 4- to 5- kilometer –deep fault. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:8773-8783.
- [36]. Denman S. E., Tomkins N. W., Sweeney C. S. (2007) Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiology Ecology*, 62:313-322.
- [37]. Zhu C., Zhang J., Tang Y., Zhengkai X., Song R. (2011) Diversity of methanogenic Archaea in a biogas reactor fed with swine feces as the mono-substrate by mcrA analysis. *Elsevier*, 166:27-35.