

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ –
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

**ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΗΣ
ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑ ΞΥΛΟΥ ΠΟΥ ΕΜΦΑΝΙΖΕΙ
ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΛΛΟΙΩΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΑΠΟΛΙΘΩΜΕΝΟ ΔΑΣΟΣ
Bükkabrány**

ΝΙΚΟΛΟΥΛΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2012

**Προκαταρκτική μελέτη της προκαρυωτικής ποικιλότητας σε
δείγμα ξύλου που εμφανίζει μικροβιακή αλλοίωση από το
απολιθωμένο δάσος Bükkarány**

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

- ❖ **Μόσιαλος Δημήτρης (επιβλέπων):** Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- ❖ **Καρπούζας Δημήτρης:** Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- ❖ **Μαρκουλάτος Παναγιώτης:** Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του επίκουρου καθηγητή κ. Μόσιαλου Δημήτρη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Μόσιαλο Δημήτρη για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας μου. Η επιστημονική του κατάρτιση, οι συμβουλές του και η υπομονή του με βοήθησαν να ολοκληρώσω όλες τις πειραματικές διαδικασίες. Θα ήθελα επίσης να τον ευχαριστήσω για όλες τις ευκαιρίες που μου έδωσε, καθώς και για την αδιάκοπη καθοδήγησή του, που υπήρξαν καταλυτικοί παράγοντες για την άψογη συνεργασία μας και μου έδωσαν όλα τα απαραίτητα εφόδια για να συνεχίσω.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη και τον κ. Καρπούζα Δημήτρη για την συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή, καθώς και την κ. Πούρνου Αναστασία για τα δείγματα που προσέφερε και για την χρήση αποτελεσμάτων της βιοαλλοίωσης του ξύλου στην εισαγωγή.

Τέλος οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους συναδέλφους και την εργαστηριακή ομάδα για την πολύτιμη βοήθειά τους και την άψογη συνεργασία μας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 Μικροβιακή αλλοίωση ξύλου.....	10
1.1.1 Κατηγορίες βακτηρίων που αλλοιώνουν το ξύλο.....	11
1.1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την αλλοίωση του ξύλου.....	17
1.1.3 Διαδικασίες συντήρησης αρχαιολογικών ή ιστορικών ξύλινων ευρημάτων.....	18
1.2 Μελέτη ποικιλότητας μικροβιακών κοινοτήτων.....	19
1.3 Μελέτη του απολιθωμένου δάσους στο Bückabrány (Ουγγαρία).....	21
1.4 Μικροβιακή αλλοίωση σε δείγμα ξύλου από το απολιθωμένο δάσος στο Bückabrány.....	27
2. ΣΚΟΠΟΣ	31
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	32
3.1 Κονιορτοποίηση ξύλου.....	32
3.2 Απομόνωση DNA.....	32
3.3 Ενίσχυση του <i>16S rRNA</i> γονιδίου Βακτηρίων με PCR.....	32
3.4 Ενίσχυση του <i>16S rRNA</i> γονιδίου Αρχαίων με PCR.....	35
3.5 Ενίσχυση του <i>16S rRNA</i> γονιδίου Βακτηρίων και Αρχαίων με διαβαθμισμένες θερμοκρασίες υβριδισμού (Gradient PCR).....	37
3.6 Κλωνοποίηση των PCR προϊόντων Βακτηρίων και Αρχαίων.....	38

3.7	Επιβεβαίωση θετικών κλώνων μετά την κλωνοποίηση.....	41
3.7.1	Επιβεβαίωση με PCR.....	41
3.7.2	Επιβεβαίωση με πέψη με ένζυμο περιορισμού.....	43
3.8	Κλωνοποίηση των προϊόντων της Gradient PCR Βακτηρίων και Αρχαίων.....	44
3.8.1	Παρασκευή δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> JM109.....	44
3.8.2	Κλωνοποίηση των προϊόντων στα κύτταρα <i>E. coli</i> JM109 με pGEM-T easy vector.....	46
3.8.2.1	Αντίδραση λιγάσης με τον pGEM-T easy vector.....	46
3.8.2.2	Μετασχηματισμός κυττάρων <i>E. coli</i> JM109 με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια.....	49
3.9	Επιβεβαίωση θετικών κλώνων με πέψη με ένζυμο περιορισμού.....	50
3.10	Κατασκευή 16S rRNA βιβλιοθηκών.....	50
3.11	Αλληλούχηση κλώνων 16S rRNA βιβλιοθηκών.....	51
3.12	Φυλογενετική ανάλυση κλώνων με εργαλεία βιοπληροφορικής.....	51
3.12.1	Επεξεργασία αλληλουχιών.....	51
3.12.2	Bellerophon.....	52
3.12.3	Ribosomal Database Project (RDP).....	53
3.12.4	Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).....	54
3.12.5	Mothur.....	54
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	57
4.1	Ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου Βακτηρίων και Αρχαίων με PCR.....	57
4.2	Ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου Βακτηρίων και Αρχαίων με διαβαθμισμένες θερμοκρασίες υβριδισμού (Gradient PCR).....	58

4.3 Κλωνοποίηση των PCR προϊόντων Βακτηρίων και Αρχαίων.....	60
4.4 Φυλογενετική ανάλυση κλώνων με εργαλεία βιοπληροφορικής.....	62
4.4.1 Επεξεργασία αλληλουχιών.....	62
4.4.2 Bellerophon.....	63
4.4.3 Ribosomal Database Project (RDP) και BLAST.....	64
4.4.4 Φυλογενετική ανάλυση BAC βιβλιοθήκης.....	73
4.4.5 Φυλογενετική ανάλυση AR βιβλιοθήκης.....	79
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	84
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	89
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	95

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το αρχαιότερο παλαιοντολογικό δάσος του κόσμου βρίσκεται στο Bükkábrány της Ουγγαρίας. Πριν από περίπου 7 εκατομμύρια χρόνια έλαβε χώρα μια ξαφνική και γρήγορη ιζηματοπόθεση άμμου μέσω των δέλτα παρακείμενων ποταμών με αποτέλεσμα το επίπεδο της λίμνης Pannon να ανέβει και να υπερκαλύψει το δάσος του Bükkábrány. Δημιουργήθηκε έτσι ένα ανοξικό περιβάλλον που βοήθησε στη διατήρηση του οργανικού τμήματος των κορμών των δέντρων ως τις μέρες μας. Δείγμα ξύλου προερχόμενο από τέτοιους κορμούς εξετάστηκε με οπτική και ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης και διαπιστώθηκαν σημάδια βιοαλλοίωσης. Στη συνέχεια απομονώθηκε από το δείγμα ολικό DNA, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή 16S rRNA βιβλιοθηκών κλώνων, τόσο για Βακτήρια όσο και για Αρχαία. Η φυλογενετική ανάλυση της βιβλιοθήκης Βακτηρίων έδειξε σημαντική ποικιλότητα, στην οποία περιλαμβάνονται μεθυλότροφα και ενδοφυτικά βακτήρια. Τα υπόλοιπα γένη που ανιχνεύθηκαν εντοπίζονται σε πηγές γλυκού νερού και πιθανόν να αντανakλούν την μεταβολή της βακτηριακής χλωρίδας του ξύλου και του περιβάλλοντός του μετά την άνοδο της λίμνης Pannon. Επιπλέον για πρώτη φορά ανιχνεύθηκαν Αρχαία σε δείγμα ξύλου. Τα Αρχαία που εντοπίστηκαν ανήκουν στα φύλα *Crenarchaeota*, που τα μέλη τους είναι θερμόφιλα ή υπερθερμόφιλα και *Euryarchaeota*, που περιλαμβάνουν μεθανειογόνους οργανισμούς. Το ερώτημα που εγείρεται για πρώτη φορά είναι εάν τα Αρχαία συμβάλλουν στην βιοαλλοίωση του ξύλου και ποια είναι η αλληλεπίδρασή τους με τις βακτηριακές κοινότητες που αποικίζουν το ξύλο.

ABSTRACT

The oldest standing paleo-forest in the world is located at **Bükkábrány**, Hungary. Some 7 million years ago a sudden and rapid sedimentation of sands from a prograding delta resulted in the rise of Lake Pannon that covered the landscape. The produced anoxic burial environment preserved the unmineralised trunks to the present day. Examination of wood coming from such trunks using optical and scanning electron microscopy revealed extended wood biodeterioration. Total wood DNA derived from the biodeteriorated sample was extracted and it was used for the construction of 16S rRNA clone libraries both for Bacteria and Archaea. Phylogenetic analysis of the bacterial clone library has shown significant diversity, including methylotrophic bacteria and bacteria of the normal flora that could be found in the tree. The rest of bacteria which have been detected are commonly isolated from freshwater habitats, possibly reflecting the shift of bacterial flora that occurred in the wood and its close environment after the rise of Lake Pannon. Moreover Archaea were detected in wood for the first time. Detected Archaea belong to *Crenarchaeota*, represented by thermophilic or hyperthermophilic members and *Euryarchaeota* which include methanogens. These findings raise for the first time the question of possible contribution of Archaea in wood biodeterioration as well as possible interactions of Archaea with bacterial communities which colonize wood.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μικροβιακή αλλοίωση ξύλου

Η αλλοίωση του ξύλου αποτελεί μια από τις βασικότερες περιβαλλοντικές διεργασίες που συμβάλλουν στην ανακύκλωση της σύνθετης οργανικής ύλης. Το ξύλο συντίθεται από κύτταρα που τα τοιχώματά τους αποτελούνται από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη (Blanchette 2000). Η μεγάλη ποικιλότητα των ξυλωδών φυτών που παρατηρούμε γύρω μας οφείλεται κατά κύριο λόγο στη διαφορετική μορφολογία, καθώς και στη διαφορετική χημική σύνθεση του ξύλου τους. Με βάση τα δύο παραπάνω χαρακτηριστικά τα ξυλώδη φυτά μπορούν εύκολα να χωριστούν σε δύο βασικές κατηγορίες: τα φυτά σκληρού ξύλου που προέρχονται από αγγειόσπερμα και τα φυτά μαλακού ξύλου, που προέρχονται από γυμνόσπερμα. Τα φυτά σκληρού ξύλου έχουν μια ιδιαίτερως περίπλοκη δομή, καθώς αποτελούνται από δομές που μοιάζουν με πόρους και που διαφέρουν σε μέγεθος από είδος σε είδος. Η περιεκτικότητά τους σε κυτταρίνη κυμαίνεται από 40% έως 50%, ενώ σε λιγνίνη και ημικυτταρίνη είναι από 15% έως 25%. Στον αντίποδα, τα φυτά μαλακού ξύλου αποτελούνται από αλληλεπικαλυπτόμενα σωληνοειδή κύτταρα, ενώ βασικό χαρακτηριστικό τους είναι η μεγαλύτερη περιεκτικότητά τους σε λιγνίνη (περίπου 5-10% περισσότερο σε σχέση με τα φυτά σκληρού ξύλου). Το ποσοστό της κυτταρίνης τους κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα (40-50%), ενώ η ημικυτταρίνη τους είναι πολλές φορές λιγότερη σε σχέση με τα φυτά σκληρού ξύλου (Blanchette 2000).

Όπως συμβαίνει με κάθε οργανική ύλη, το ξύλο αποσυντίθεται μέσα από διάφορες βιολογικές διεργασίες που συμβαίνουν στη φύση. Τα χαρακτηριστικά αυτών των διαδικασιών, καθώς και ο τρόπος με τον οποίο επηρεάζουν το ξύλο είναι από τα βασικότερα θέματα που λαμβάνονται υπόψη, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις που πρόκειται για

αρχαιολογικά ή ιστορικά δείγματα ξύλου. Το ξύλο αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα για τα ένζυμα που απελευθερώνονται από τους μικροοργανισμούς που το αποικίζουν. Τα κυτταρικά του τοιχώματα έχουν ένα εξωτερικό και ένα δευτερογενές εσωτερικό τοίχωμα. Το δευτερογενές τοίχωμα αποτελείται από τρία επίπεδα: τα S1, S2 και S3 (Jurgens et al. 2003). Στις περιπτώσεις που τα δείγματα ξύλου βρίσκονται σε άμεση επαφή με το έδαφος αλλά σε υπέργειο επίπεδο, η αποικοδόμησή τους λαμβάνει χώρα κυρίως από μύκητες. Σε αυτό συμβάλλει το γεγονός ότι τα επίπεδα οξυγόνου και υγρασίας είναι τα βέλτιστα και ευνοούν την ανάπτυξη των μυκήτων. Αντιθέτως, στις περιπτώσεις που το ξύλο βρίσκεται σε υγρά περιβάλλοντα και μάλιστα πλήρως καλυμμένο από νερό αποσυντίθεται κυρίως από τη δράση βακτηρίων. Έχει παρατηρηθεί με τη βοήθεια της οπτικής και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, ότι τα βακτήρια παίζουν βασικό ρόλο στην αποδόμηση του ξύλου που βρίσκεται πλήρως καλυμμένο από νερό, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στην περιορισμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου που επικρατεί σε αυτές τις συνθήκες (Blanchette 2000).

1.1.1 Κατηγορίες βακτηρίων που αλλοιώνουν το ξύλο

Τα βακτήρια που μέχρι στιγμής έχουν βρεθεί να αλλοιώνουν το ξύλο μπορούν να χωριστούν σε τρεις βασικές κατηγορίες, σύμφωνα με συγκεκριμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά που παρατηρούνται στο ξύλο μετά τη δράση τους (Blanchette 2000; Gelbrich et al. 2008; Bjordal et al. 1999). Αυτές οι κατηγορίες είναι οι εξής:

- βακτήρια διάβρωσης (erosion bacteria)
- βακτήρια που δημιουργούν στοές (tunneling bacteria)
- βακτήρια που δημιουργούν κοιλότητες (cavitation bacteria)
- σαπροφυτικά βακτήρια (scavenging bacteria)

Όλα τα παραπάνω βακτήρια έχουν ραβδοειδές σχήμα, αλλά διαφέρουν σε μέγεθος και σε αντίθεση με τους μύκητες, διαβρώνουν το ξύλο με αργούς ρυθμούς.

Τα βακτήρια διάβρωσης (erosion bacteria) είναι εκείνα που έχουν παρατηρηθεί συχνότερα σε δείγματα αρχαίου ξύλου που ήταν θαμμένα κάτω από νερό, ενώ μύκητες και βακτήρια που προκαλούν στοές ή κοιλότητες στο ξύλο παρατηρήθηκαν με χαμηλότερη συχνότητα. Η αλλοίωση του ξύλου από τα βακτήρια διάβρωσης σε περιβάλλοντα όπου οι συνθήκες που επικρατούν είναι σχεδόν αναερόβιες υποδεικνύουν πως οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να εκδηλώσουν τη δράση τους σε εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα οξυγόνου. Τα βακτήρια διάβρωσης μετακινούνται μέσω του μηχανισμού ολίσθησης και αποικοδομούν τα δευτερογενή κυτταρικά τοιχώματα, καταστρέφοντας την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη του ξύλου (Gelbrich et al. 2008) [**Εικ. 1.α**]. Καθώς η διάβρωση προχωρά και οι υδατάνθρακες καταστρέφονται, παραμένουν τμήματα του κυτταρικού τοιχώματος που δεν έχουν αποσυντεθεί και που αποτελούνται κυρίως από λιγνίνη. Η λιγνίνη είναι επίσης πιθανό να αποδομηθεί ή να τροποποιηθεί χημικά σε περιορισμένο βαθμό, αν και ελάχιστα είναι μέχρι στιγμής γνωστά για τη συγκεκριμένη διαδικασία (Colombini et al. 2009). Μορφολογικά τα τοιχώματα αποκτούν μια χαρακτηριστική πορώδη όψη και χάνουν έτσι την δομική τους ακεραιότητα. Καθώς το ξύλο περιβάλλεται από υδατικό περιβάλλον, οι πόροι που δημιουργούνται γεμίζουν με νερό. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στη δράση φυσικών ή χημικών αλλαγών (π.χ. συσσώρευση αλάτων), αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο να κατακερματιστεί ή ακόμα και να καταστραφεί εντελώς (Colombini et al. 2009). Αξίζει να σημειωθεί πως τα βακτήρια διάβρωσης αποδομούν το ξύλο σε βάθος, φτάνοντας μέχρι τα εσωτερικά στρώματα, όπου η διαθεσιμότητα του οξυγόνου είναι ακόμα χαμηλότερη.

Ωστόσο, πρότυπα αλλοίωσης έχουν παρατηρηθεί και στα εξωτερικά στρώματα του ξύλου, που φαίνεται να οφείλονται στη δράση βακτηρίων που δημιουργούν χαρακτηριστικές στοές (tunneling bacteria). Η ύπαρξη αυτών των προτύπων καταδεικνύει

πως τα επίπεδα οξυγόνου ήταν υψηλότερα σε κάποια χρονική στιγμή στο παρελθόν για να μπορέσουν τα συγκεκριμένα είδη να δράσουν. Για αυτό το λόγο εντοπίζονται κυρίως στα επιφανειακά στρώματα των ξύλων που βρίσκονται καλυμμένα από νερό και όχι στο εσωτερικό τους (Bjordal et al. 1999; Bjordal & Nilsson 2008). Σε αντίθεση με τα βακτήρια διάβρωσης, τα βακτήρια που δημιουργούν σήραγγες φαίνεται πως έχουν την ικανότητα να αποδομούν όλα τα μέρη του κυτταρικού τοιχώματος, συμπεριλαμβανομένης της λιγνίνης [**Εικ. 1.α**]. Μόλις διαπεράσουν το κυτταρικό τοίχωμα αρχίζει η αποδόμηση όλων των στρωμάτων του δευτερογενούς τοιχώματος. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας τα βακτήρια δημιουργούν μικρές «σήραγγες» που έχουν την ίδια διάμετρο με τα βακτήρια. Καθώς η αποδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος προχωρά, δημιουργούνται κοκκώδη υπολείμματα που γεμίζουν τις σήραγγες (Blanchette 2000). Αν οι συνθήκες παραμείνουν ευνοϊκές, τότε η διαδικασία της αλλοίωσης συνεχίζεται, οδηγώντας τελικά σε μεγαλύτερες αποδομημένες περιοχές του ξύλου (Jurgens et al. 2003).

Η τρίτη κατηγορία βακτηρίων που έχουν εντοπιστεί σε αρχαία δείγματα ξύλου, που βρίσκονταν για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε υδάτινα περιβάλλοντα είναι τα βακτήρια που δημιουργούν χαρακτηριστικές κοιλότητες στο ξύλο (cavitation bacteria) [**Εικ. 1.β**]. Αυτού του είδους οι μικροοργανισμοί αποδομούν την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη του S2 στρώματος του κυτταρικού τοιχώματος δημιουργώντας κοιλότητες, οι οποίες έχουν χαρακτηριστικό γωνιώδες σχήμα. Καθώς ο βακτηριακός πληθυσμός μιας κοιλότητας αυξάνεται, αυξάνεται παράλληλα και το μέγεθός της και είναι δυνατόν να υπάρξει συνένωση γειτονικών κοιλοτήτων (Jurgens et al. 2003). Μέχρι στιγμής δεν είναι γνωστές οι ακριβείς απαιτήσεις αυτών των βακτηρίων σε οξυγόνο, αν και δεν έχουν εντοπιστεί σε ακραία αναερόβια περιβάλλοντα.

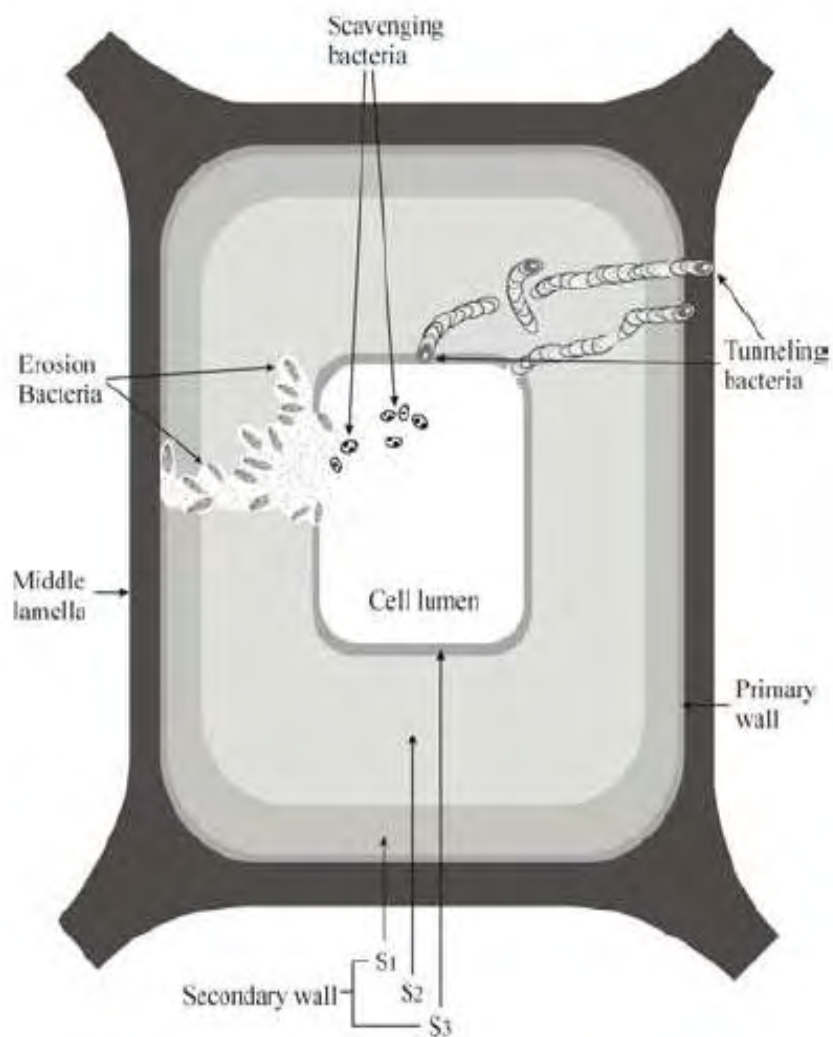
Η τέταρτη και τελευταία κατηγορία βακτηρίων που έχουν εντοπιστεί σε αλλοιωμένα δείγματα ξύλου είναι τα σαπροφυτικά (αποικοδομητικά) βακτήρια (scavenging bacteria) [Εικ. 1.α]. Αυτοί οι μικροοργανισμοί αποικοδομούν τα κατάλοιπα που αφήνουν πίσω τους μετά τη διαδικασία αποσύνθεσης τα βακτήρια διάβρωσης και τα βακτήρια που δημιουργούν σήραγγες. Αυτά τα δευτερογενούς τύπου βακτήρια δεν εντοπίζονται σε περιοχές όπου λαμβάνει χώρα η πρωταρχική αλλοίωση του ξύλου, ενώ φαίνεται πως είναι ανθεκτικά σε αναερόβιες συνθήκες, σχεδόν στον ίδιο βαθμό που είναι και τα βακτήρια διάβρωσης (Jurgens et al. 2003).

Τα είδη των βακτηρίων που έχουν βρεθεί σε δείγματα ξύλου και που συναντούμε συχνότερα στην παγκόσμια βιβλιογραφία ανήκουν κατά κύριο λόγο στα α- και β-πρωτεοβακτήρια, ενώ λιγότερα είναι εκείνα που ανήκουν στα γ-πρωτεοβακτήρια. Ως χαρακτηριστικότεροι αντιπρόσωποι των α-πρωτεοβακτηρίων έχουν αναφερθεί τα γένη *Devosia* sp. και *Rhizobium* sp. (Zhang et al. 2008). Το 2004 οι Helms et al. απομόνωσαν β-πρωτεοβακτήρια από ένα ιστορικό δείγμα ξύλου 1700 ετών, που αντιπροσωπεύονταν από την οικογένεια *Rhodocyclaceae*. Τα μέλη αυτής της οικογένειας είναι Gram αρνητικά βακτήρια, που συναντώνται σε υδάτινα περιβάλλοντα, ενώ κάποια από αυτά είναι αυστηρώς αναερόβια (Helms et al. 2004).

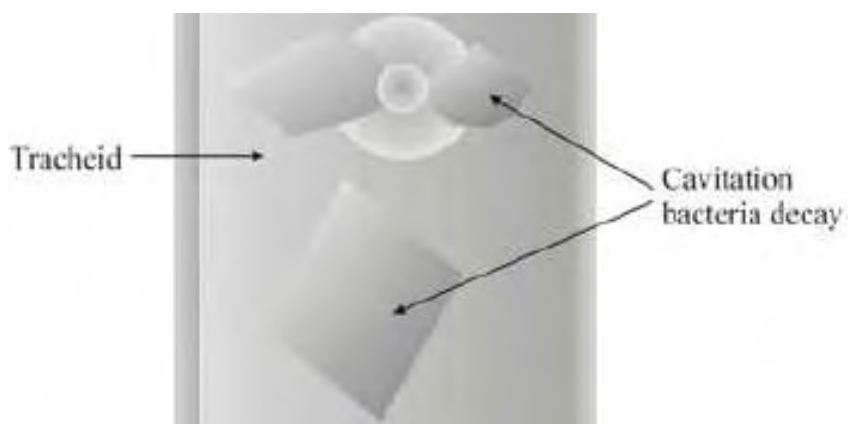
Το ευρωπαϊκό ερευνητικό πρόγραμμα BACPOLES μελέτησε τις διαδικασίες αποικοδόμησης του ξύλου από βακτήρια σε ιστορικά ξύλινα κατασκευάσματα που βρίσκονταν κάτω από το νερό σε 19 διαφορετικές τοποθεσίες σε όλη την Ευρώπη (Klaassen 2005). Αναλύσεις της βακτηριακής ποικιλότητας που έγιναν σε αυτά τα δείγματα έδειξαν πως υπήρχε μεγάλη αντιπροσωπευτικότητα από βακτήρια της ομάδας *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB), καθώς και από το γένος *Pseudomonas* (Landy et al. 2008). Οι οργανισμοί που ανήκουν στις δύο παραπάνω ομάδες παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές, ιδιαίτερα σε μεταβολικό επίπεδο. Για παράδειγμα, μέλη της ομάδας *Pseudomonas* είναι αυστηρώς αερόβια, ενώ άλλα

εμπλέκονται στον μεταβολισμό σιδήρου και θείου. Στην ομάδα CFB ανήκουν μικροοργανισμοί που συναντώνται σε υδάτινα περιβάλλοντα και είναι γνωστό πως μπορούν να αποικοδομούν περίπλοκους πολυσακχαρίτες (π.χ. κυτταρίνη). Επιπλέον ταυτοποιήθηκαν, με τη χρήση μοριακών τεχνικών, και κάποια βακτήρια σε επίπεδο γένους. Ενδεικτικά αναφέρουμε τα παρακάτω: *Herbaspirillum* sp., *Sphingomonas* sp., *Rhodobacter* sp., *Novosphingobium* sp., *Acidovorax* sp., *Algoriphagus* sp. και *Rhizobium* sp.

A.



B.



Εικόνα 1: A. Διαγραμματική παρουσίαση των κυτταρικών τοιχωμάτων του ξύλου και των διαφόρων τύπων βακτηρίων που το αλλοιώνουν.

B. Απεικόνιση χαρακτηριστικών γωνιωδών κοιλοτήτων σε αλλοιωμένο ξύλο.

1.1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την αλλοίωση του ξύλου

Το μέγεθος της αλλοίωσης που εμφανίζει ένα αρχαίο δείγμα ξύλου ποικίλλει εξαιρετικά και εξαρτάται από τις συνθήκες στις οποίες ήταν εκτεθειμένο (Singh et al. 2003). Πέρα από τη δομή και τη χημική σύνθεση του ξύλου, σημαντικό ρόλο στην έκταση της καταστροφής του παίζουν και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επικρατούσαν το χρονικό διάστημα που ήταν θαμμένο στο υδάτινο ενδιαίτημα. Οι βασικότεροι από αυτούς τους παράγοντες είναι η θερμοκρασία, το pH, τα επίπεδα οξυγόνου, η αλατότητα, η ωσμωτικότητα, καθώς και τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά (Blanchette et al. 1991). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως η ηλικία του προς εξέταση δείγματος δε φαίνεται να παίζει ρόλο στην διατήρησή του (Bugani et al. 2009). Αντιθέτως η αποικοδόμησή του επηρεάζεται από τις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες, καθώς και από τα είδη των μικροοργανισμών που το αποικίζουν (Bjordal et al. 1999; Huisman et al. 2008).

Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό πως το ξύλο μπορεί να διατηρηθεί καλύτερα όταν βρίσκεται μόνιμα και εξ' ολοκλήρου στο κατώτερο επίπεδο των υπόγειων υδάτων (Salanti et al. 2010). Το γεγονός αυτό αντανakλά τις σοβαρές επιπτώσεις που μπορεί να έχει το οξυγόνο στην αλλοίωση του ξύλου. Σε αυτές τις περιπτώσεις η αλλοίωση της οργανικής ύλης του ξύλου οφείλεται καθαρά σε μικροοργανισμούς βακτηριακής προέλευσης (Blanchette 2000; Bugani et al. 2009).

Η αλλοίωση του ξύλου από τα είδη βακτηρίων που προαναφέρθηκαν εξαρτάται επίσης από το βάθος του νερού στο οποίο είναι θαμμένο το προς εξέταση δείγμα, καθώς και το χρονικό διάστημα που έχει παραμείνει σε αυτή την κατάσταση (Huisman et al. 2008). Οι δύο αυτοί παράγοντες επηρεάζουν την διαθεσιμότητα του οξυγόνου, η οποία μειώνεται όσο το βάθος αυξάνεται, συντελώντας έτσι στην φθορά του ξύλου από διαφορετικού τύπου βακτήρια (Singh et al. 2003).

1.1.3 Διαδικασίες συντήρησης αρχαιολογικών ή ιστορικών ξύλινων ευρημάτων

Τις τελευταίες δεκαετίες οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί γύρω από την κατανόηση των μηχανισμών που συμβάλλουν στην αλλοίωση του ξύλου, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις που πρόκειται για αρχαιολογικά ή ιστορικά ευρήματα (π.χ. ναυάγια, αγάλματα, κλπ.). Η γνώση αυτών των μηχανισμών θα συνδράμει στον καλύτερο δυνατό χειρισμό, καθώς και στην διατήρηση αυτών των ευρημάτων, προκειμένου να αποφευχθεί περαιτέρω καταστροφή τους. Σημαντικό ωστόσο είναι το γεγονός πως στα ξύλινα ευρήματα που βρίσκονται σε κατάσταση πλήρους ύδατος η αλλοίωση προχωρά με πολύ αργούς ρυθμούς, λόγω των ακραίων περιβαλλοντικών συνθηκών που επικρατούν. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα ευρήματα να είναι ακέραια ή σχεδόν ακέραια και απαιτούν έτσι ιδιαίτερους χειρισμούς συντήρησης, προκειμένου να αποφευχθεί ολική καταστροφή τους. Οι διαδικασίες που συνήθως ακολουθούνται περιλαμβάνουν την αντικατάσταση του νερού με υλικά που γεμίζουν τις κοιλότητες και εμποδίζουν έτσι την καταστροφή του ξύλου κατά τη διάρκεια της μεταφοράς του (Bugani et al. 2009; Klaassen et al. 2005). Αυτές οι διαδικασίες συντήρησης είναι τις περισσότερες φορές ακριβές και ιδιαίτερες δύσκολες στην εφαρμογή τους και η αποτελεσματικότητά τους εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα χημικά και φυσικά χαρακτηριστικά των υλικών που χρησιμοποιούνται. Επιπλέον σημαντικό ρόλο παίζει και το ποσοστό στο οποίο καλύπτονται οι κοιλότητες, καθώς και το βάθος στο οποίο διεισδύουν τα υλικά αντικατάστασης. Οι παραπάνω παράμετροι ελέγχονται συνήθως με την εξέταση τομών του ξύλου σε διαφορετικά επίπεδα από την επιφάνειά του με τη χρήση οπτικής και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας.

Μια δεύτερη προσέγγιση περιλαμβάνει τη χρήση βακτηριοφάγων (Klaassen et al. 2005). Οι φάγοι έχουν αποδειχθεί αρκετά ανθεκτικοί στην αλλοίωση και ικανοί να επιβιώσουν τόσο ενδοκυτταρικά, όσο και εξωκυτταρικά. Ωστόσο η παραγωγή ενός

συντηρητικού που θα περιέχει βακτηριοφάγους χρίζει ιδιαίτερης προσοχής για τους εξής λόγους:

- Σε διαφορετικά περιβάλλοντα εντοπίζονται και διαφορετικού τύπου βακτηριακοί πληθυσμοί που αποδομούν το ξύλο. Αυτό συνεπάγεται πως απαιτούνται και διαφορετικού τύπου φάγοι.
- Θα πρέπει να δοθεί προσοχή στην επίδραση που θα έχουν αυτά τα συντηρητικά στο γύρω περιβάλλον, καθώς και στη χρονική διάρκεια δράσης τους.
- Τα βακτήρια είναι δυνατόν να μεταλλαχθούν και να παραχθούν στελέχη ανθεκτικά στη δράση των φάγων. Ωστόσο τα βακτήρια που σχετίζονται με την αλλοίωση του ξύλου εξελίχθηκαν πρόσφατα και εμφανίζουν έτσι χαμηλούς ρυθμούς μετάλλαξης.

1.2 Μελέτη ποικιλότητας μικροβιακών κοινοτήτων

Η ταυτοποίηση των βακτηρίων που βρίσκονται σε αρχαία ή ιστορικά δείγματα ξύλου, διατηρημένα σε υδάτινα ενδιαιτήματα, γίνεται συνήθως με τη χρήση μοριακών τεχνικών και τεχνικών απομόνωσης. Οι μοριακές τεχνικές δίνουν τη δυνατότητα να ανιχνευθούν βακτηριακά είδη που δεν είναι καλλιεργήσιμα, να αναλυθεί μεγάλος όγκος αλληλουχιών, καθώς επίσης και να γίνουν φυλογενετικές αναλύσεις (Landy et al. 2008; Zhang et al. 2008). Σε αυτές τις περιπτώσεις το DNA απομονώνεται απευθείας από τα δείγματα ξύλου και προσδιορίζεται η ποικιλότητα των βακτηριακών ειδών (Landy et al. 2008; Helms et al. 2004). Οι βιβλιοθήκες κλώνων κατασκευάζονται με βάση το βακτηριακό 16S rDNA γονίδιο. Το 16S rRNA μόριο αποτελεί μέρος της 30S μικρής υπομονάδας των προκαρυωτικών ριβοσωμάτων, ενώ η αλληλουχία του είναι εξελικτικά συντηρημένη, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα να μελετηθούν φυλογενετικές και εξελικτικές σχέσεις μεταξύ προκαρυωτών (Weisburg et al. 1991).

Για την μελέτη και την ανάλυση των 16S rRNA βιβλιοθηκών έχουν αναπτυχθεί προγράμματα και βάσεις δεδομένων, που αναλύουν τις αλληλουχίες της βιβλιοθήκης και βοηθούν στην εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τα επίπεδα κάλυψης της, την αντιπροσωπευτικότητά της, καθώς και με τις φυλογενετικές σχέσεις των κλώνων της (Garcia-Armisen et al. 2011; Kavroulakis & Ntougias 2011; Kormas et al. 2010). Μία από αυτές τις βάσεις δεδομένων είναι η "Ribosomal Database Project - RDP" (<http://rdp.cme.msu.edu/>) που περιέχει 16S rRNA αλληλουχίες Βακτηρίων και Αρχαίων και δίνει τη δυνατότητα μεταξύ άλλων, να βρεθούν οι κοντινότεροι συγγενείς των κλώνων της βιβλιοθήκης, αλλά και να ταξινομηθούν ιεραρχικά (Cole et al. 2009). Το πρόγραμμα "Bellerophon" χρησιμοποιείται για την ανίχνευση χιμαιρικών αλληλουχιών (χίμαιρες) σε μια βιβλιοθήκη κλώνων, που έχει δημιουργηθεί με βάση το 16S rRNA (Huber et al. 2004). Οι χίμαιρες δημιουργούνται από δύο φυλογενετικά απομακρυσμένες πατρικές αλληλουχίες και αντιπροσωπεύουν μη υπάρχοντες μικροοργανισμούς (Hugenholtz & Huber 2003). Τέλος, το λογισμικό πρόγραμμα "Mothur" συγκεντρώνει εργαλεία που επιτρέπουν στον χρήστη να επεξεργαστεί τις αλληλουχίες του, να κάνει ομοπαράθεση με βάση πρότυπες αλληλουχίες 16S rRNA, να υπολογίσει τις μεταξύ τους φυλογενετικές αποστάσεις, αλλά και να τις κατηγοριοποιήσει σε Λειτουργικές Ταξινομικές Μονάδες (Operational Taxonomic Units-OTUs) (Schloss et al. 2009). Από τις παραπάνω αναλύσεις μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με το πόση ποικιλότητα παρουσιάζει μια βιβλιοθήκη κλώνων, το ποσοστό κάλυψης της από τους κλώνους καθώς και τις φυλογενετικές αποστάσεις μεταξύ τους.

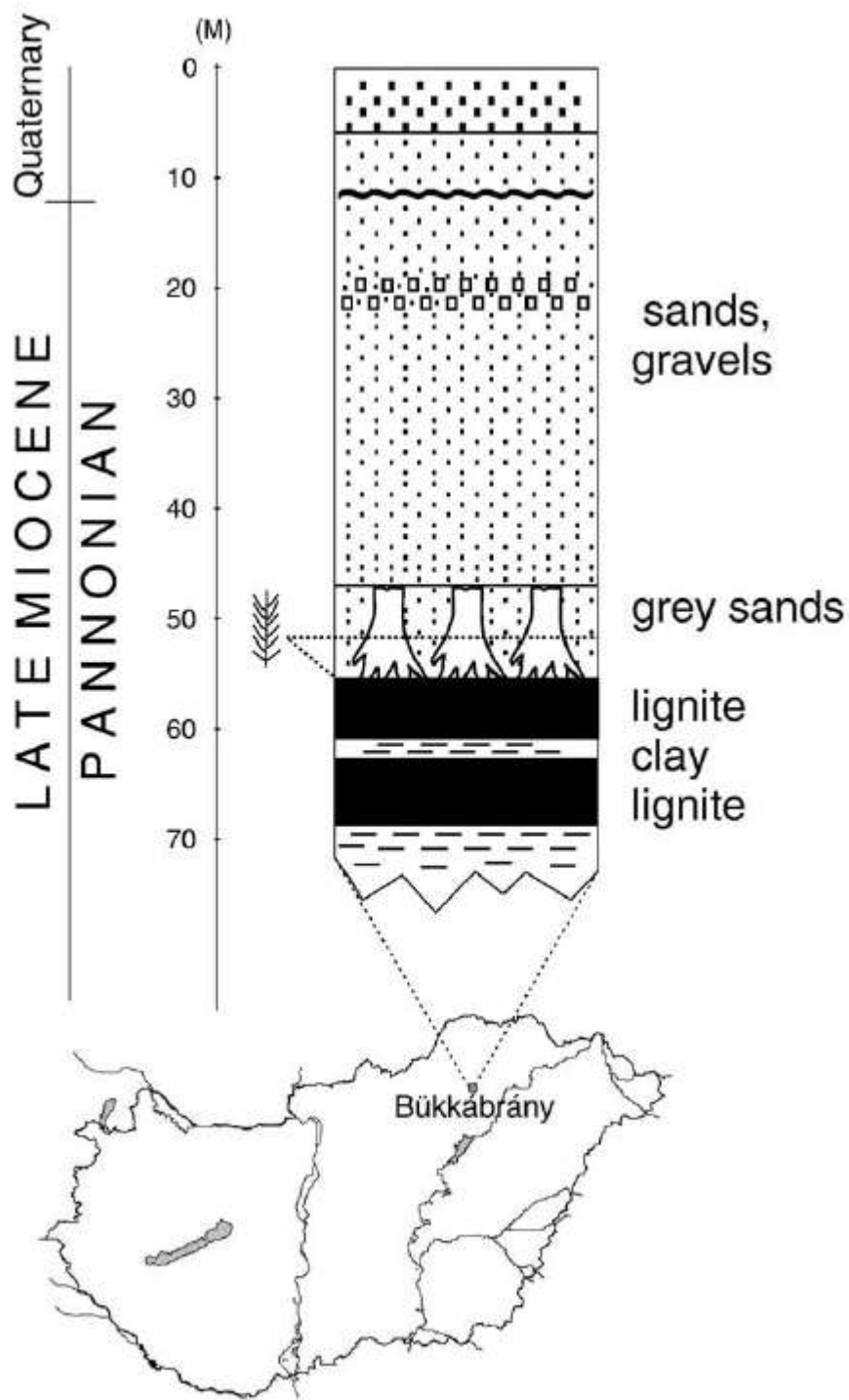
1.3 Μελέτη του απολιθωμένου δάσους στο Bükkábrány (Ουγγαρία)

Τα απολιθωμένα δάση ορίζονται ως εκείνα που οι κορμοί τους βρίσκονται σε όρθια στάση και έχει διατηρηθεί η αρχική τους δομή (Kazmer 2008). Ένα τέτοιο απολιθωμένο δάσος βρέθηκε τον Ιούλιο του 2007 σε ένα ανθρακωρυχείο λιγνίτη στην περιοχή Bükkábrány της Ουγγαρίας. Οι μεταλλωρύχοι στην προσπάθειά τους να απομακρύνουν την υπερκείμενη άμμο σε βάθος 60 μέτρων, έφεραν στην επιφάνεια κορμούς δέντρων. Στη συνέχεια αφαιρώντας προσεκτικά όλα τα στρώματα άμμου, αποκαλύφθηκαν 16 κορμοί (Kazmer 2008).

Το Bükkábrány είναι ένα μικρό χωριό στους πρόποδες της οροσειράς Bükk στην βορειοανατολική Ουγγαρία. Η υφάλμυρη λίμνη Pannon, που εντοπίζεται στο λεκανοπέδιο του Pannon, απομονώθηκε από τη θάλασσα περίπου 12 εκατομμύρια χρόνια πριν και άρχισε να ιζηματοποιείται σταδιακά μέχρι την αρχή του Πλειόκαινου. Πριν από 9,5 εκατομμύρια χρόνια η λίμνη είχε το μεγαλύτερο μέγεθός της, όσον αφορά την περιοχή έκτασής της, και καταλάμβανε το μεγαλύτερο μέρος του καρπάθιου λεκανοπεδίου. Συγκεκριμένα, στο τέλος του Μειόκαινου, δηλαδή περίπου 9 εκατομμύρια χρόνια πριν, τα όρια της λίμνης έφταναν μέχρι τη βάση της οροσειράς Bükk. Η συσσώρευση και εναπόθεση του λιγνίτη άρχισε εκείνη την περίοδο κατά μήκος της βόρειας και βορειοανατολικής ακτής της λίμνης. Εκτιμώντας τα στρωματογραφικά δεδομένα της περιοχής, υπολογίζεται πως η εναπόθεση του λιγνίτη έγινε περίπου πριν από 6,3-7,7 εκατομμύρια χρόνια (Erdei et al. 2009; Császár et al. 2009). Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2, τα στρώματα λιγνίτη διακόπτονται περιοδικά από εναποθέσεις λάσπης, που ποικίλλουν από 0,2 έως 1,5 μέτρα. Ο λιγνίτης καλύπτεται από 5-6 μέτρα άμμου, ενώ στα ανώτερα επίπεδα συναντάμε άμμο και χαλίκια της εποχής του Πλειστόκαινου.

Οι κορμοί των δέντρων βρίσκονται ακριβώς πάνω από τα επίπεδα του λιγνίτη [**Εικ. 2**]. Πριν από 7 εκατομμύρια χρόνια, έλαβε χώρα μια ξαφνική και γρήγορη ιζηματοπόθεση άμμου μέσω των δέλτα παρακείμενων ποταμών με αποτέλεσμα το επίπεδο της λίμνης Pannon να ανέβει κατά 20 μέτρα και να υπερκαλύψει το δάσος του Bückabrány. Η άμμος που μεταφέρθηκε από τους ποταμούς κάλυψε τους κορμούς και γέμισε τις κοιλοτήτες τους [**Εικ. 3**] (Kazmer 2008). Για 7 εκατομμύρια χρόνια δημιουργήθηκε ένα ανοξικό περιβάλλον που βοήθησε στη διατήρηση του οργανικού τμήματος των κορμών ως τις μέρες μας.

Το δάσος του Bückabrány θεωρείται απολιθωμένο, παρόλο που η μακροσκοπική του εικόνα δεν καταδεικνύει σημάδια απολίθωσης. Απολιθωμένα δάση όλων των χρονικών περιόδων έχουν βρεθεί σε όλες τις ηπείρους και το ξύλο τους έχει μετατραπεί σε πυρόλιθο, ανθρακικό άλας ή πιο σπάνια σε σιδηροπυρίτη. Το δάσος όμως του Bückabrány είναι το μοναδικό μέχρι στιγμής ανά τον κόσμο, που το οργανικό τμήμα των κορμών του έχει διατηρηθεί και μάλιστα οι κορμοί βρίσκονται σε όρθια θέση, διατηρώντας την αρχική δομή του δάσους [**Εικ. 4**] (Kazmer 2011).



Εικόνα 2: Διάγραμμα στρωματογραφικής τομής της περιοχής που βρέθηκε το απολιθωμένο δάσος (Erdei et al. 2009)



Εικόνα 3: Χαρακτηριστική εικόνα ενός απολιθωμένου δέντρου στο Bükkábrány. Η κοιλότητά του είναι γεμάτη με την άμμο που είχε μεταφερθεί στην περιοχή από τα δέλτα των παρακείμενων ποταμών (Kazmer 2008).

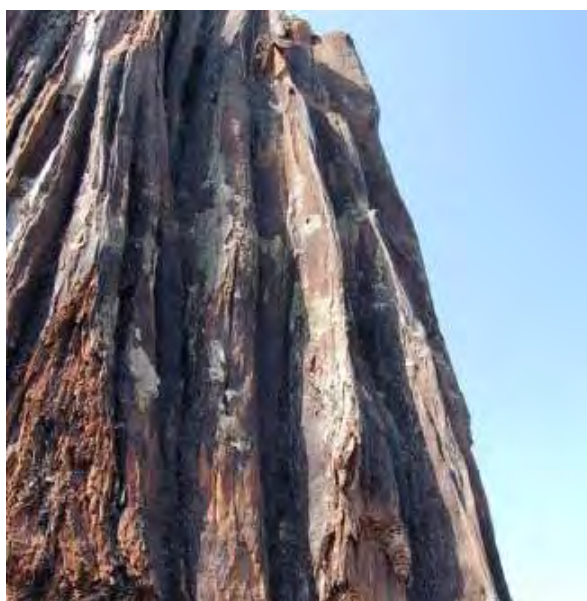
Προκειμένου να μελετηθεί εφαρμόστηκαν παλαιοβοτανικές μελέτες τόσο στους κορμούς, όσο και στην απολιθωμένη χλωρίδα (π.χ. καρποί, φύλλα) που βρέθηκε γύρω τους (Császár et al. 2009). Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν λεπτές τομές οι οποίες εξετάστηκαν μικροσκοπικά και κατέταξαν το δάσος στα «κωνοφόρα».

Εξετάζοντας την ανατομία των δέντρων, βρέθηκε πως εμφανίζουν μεγάλη συγγένεια με τις τάξεις *Taxodioxylon germanicum* (Greguss) Van der Burgh και *Glyptostroboxylon* sp. (Kazmer 2008). Το *Taxodioxylon germanicum* εμφανίζει πολλές ομοιότητες με την σημερινή *Sequoia* Endlicher (π.χ. έντονες ραβδώσεις στον κορμό) και είναι από τα βασικότερα είδη που συναντούμε ως μέρος της βλάστησης της εποχής του Νεογενούς [Εικ. 5] (Erdei et al. 2009). Οι κορμοί που αποκαλύφθηκαν έχουν διάμετρο 2-3 μέτρα, ύψος 4-6 μέτρα και απέχουν μεταξύ τους από 5 έως 15 μέτρα (Erdei et al. 2009). Αρχικά έδιναν την εντύπωση πως είναι άθικτοι. Ωστόσο μετά από μια λεπτομερή παρατήρησή τους, οι ερευνητές κατέληξαν πως είναι αποφλοιωμένοι και αλλοιωμένοι από διάφορους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες, όπως μύκητες, ζώα, κλιματικές συνθήκες, κλπ. Η κοιλότητα στο εσωτερικό τους ήταν γεμάτη με την άμμο που είχε καλύψει ολόκληρο το δάσος, ενώ η βάση τους ήταν ενσωματωμένη στα στρώματα του λιγνίτη (Kazmer 2008; Kazmer 2011). Επιπλέον, ο ξύλινος ιστός ήταν υγρός και σχετικά μαλακός στην υφή. Όταν κάποια κομμάτια των κορμών εξετέθησαν στην ηλιακή ακτινοβολία, προκλήθηκε συστολή και κύρτωσή τους, λόγω της μεγάλης επιφανειακής τάσης που προκλήθηκε από το νερό που εξατμίστηκε (Kazmer 2008).

Το δάσος του Bückabrány αποτελεί μεγάλη πρόκληση για τους ερευνητές, καθώς θα πρέπει να μελετηθούν όλα τα δεδομένα σχετικά με την γεωλογία του, την στρωματογραφία του, την υδρογεωλογία του και την γεωγραφική του θέση. Όλα τα παραπάνω δεδομένα θα πρέπει να συνδυαστούν με τον καλύτερο δυνατό τρόπο έτσι ώστε να βρεθούν οι κατάλληλες προσεγγίσεις για την διατήρηση και συντήρηση του ιστορικού αυτού δάσους.



Εικόνα 4: Στο δάσος του Bückabrány οι κορμοί βρίσκονται σε όρθια θέση και έχουν διατηρήσει το οργανικό τους τμήμα, λόγω των ανοξικών συνθηκών που δημιουργήθηκαν (Erdei et al. 2009)

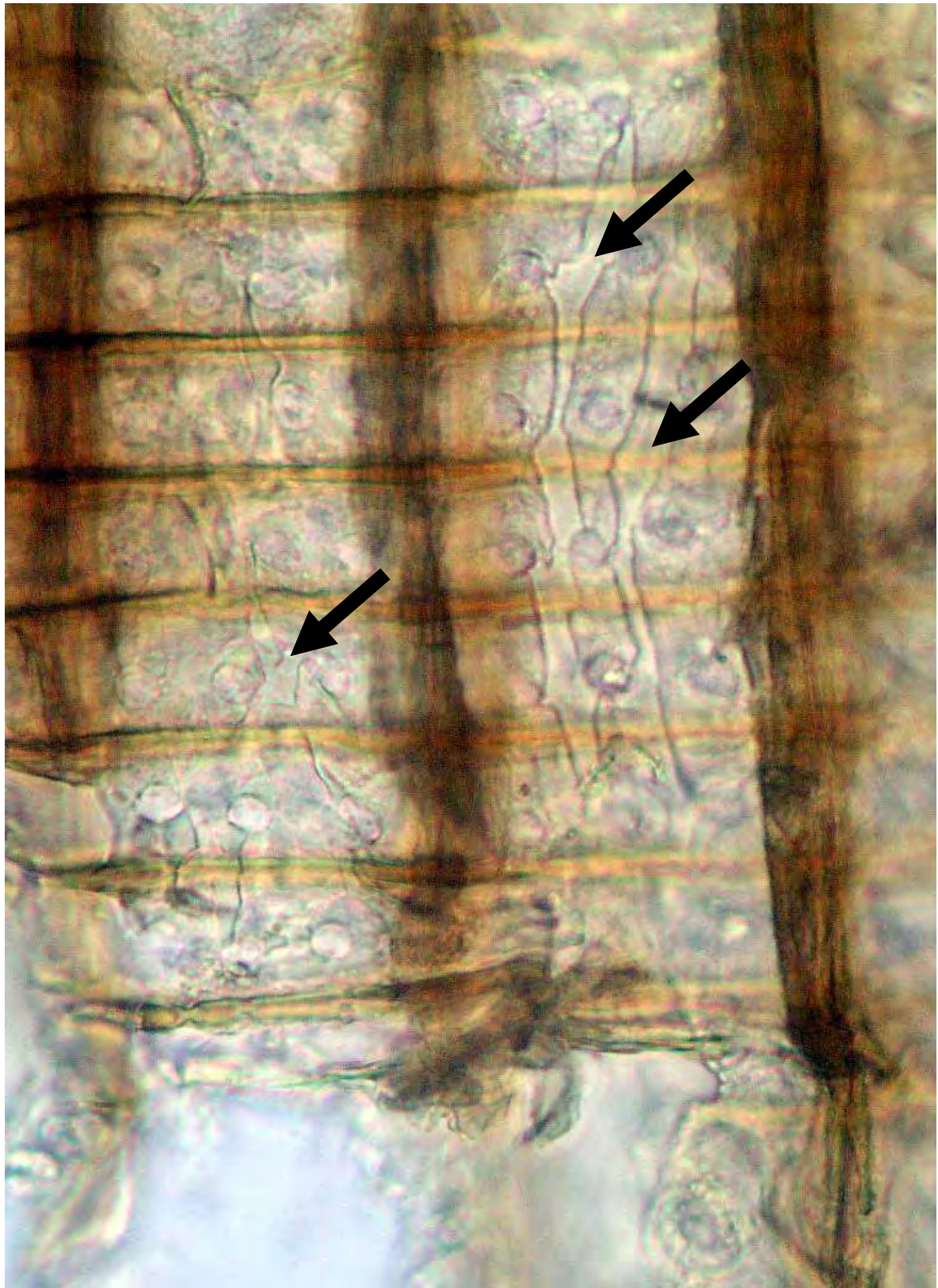


Εικόνα 5: Έντονες ραβδώσεις στον κορμό του απολιθωμένου δέντρου που μοιάζουν με την σημερινή *Sequoia* (Kazmer 2008)

1.4 Μικροβιακή αλλοίωση σε δείγμα ξύλου από το απολιθωμένο δάσος στο Bückabrány

Για την μελέτη του απολιθωμένου δάσους στο Bückabrány παραχωρήθηκαν 9 δείγματα από το μουσείο Hermann Otto (Ουγγαρία). Τα δείγματα αυτά αντιπροσώπευαν τρία διαφορετικά επίπεδα του κορμού (κορυφή, μέση και βάση) και προέρχονταν από τους κορμούς 10, 12 και 13. Εγκάρσιες και διαμήκεις τομές χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση με οπτική και ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (προσωπική επικοινωνία με κ. Πούρνου Αναστασία). Τα αποτελέσματα της οπτικής μικροσκοπίας έδειξαν εκτεταμένη αλλοίωση και στα 9 δείγματα που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα, η παρουσία στενών ζωνών διάβρωσης που εκτείνονται σε όλο το πεδίο διασταύρωσης των ημιαλωφόρων βοθρίων αποδίδεται σε προσβολή από βακτήρια διάβρωσης [**Εικ. 6**]. Επιπλέον ανιχνεύθηκαν σήραγγες αλλοίωσης προς όλες τις κατευθύνσεις, γεγονός που υποδηλώνει διάβρωση από βακτήρια σηράγγων [**Εικ. 7**].

Με τη χρήση της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης επιβεβαιώθηκαν τα αποτελέσματα της οπτικής μικροσκοπίας όσον αφορά το μεγάλο βαθμό αλλοίωσης του ιστού. Όπως γίνεται φανερό και στην Εικόνα 8, υπάρχει εκτεταμένη βιοπροσβολή του ξύλου με τη μορφή κοιλοτήτων διάβρωσης [**Εικ. 8.α**] και εγκοπών σχήματος X ή V στα κυτταρικά τοιχώματα που αποδίδονται σε βακτήρια [**Εικ. 8.β**].

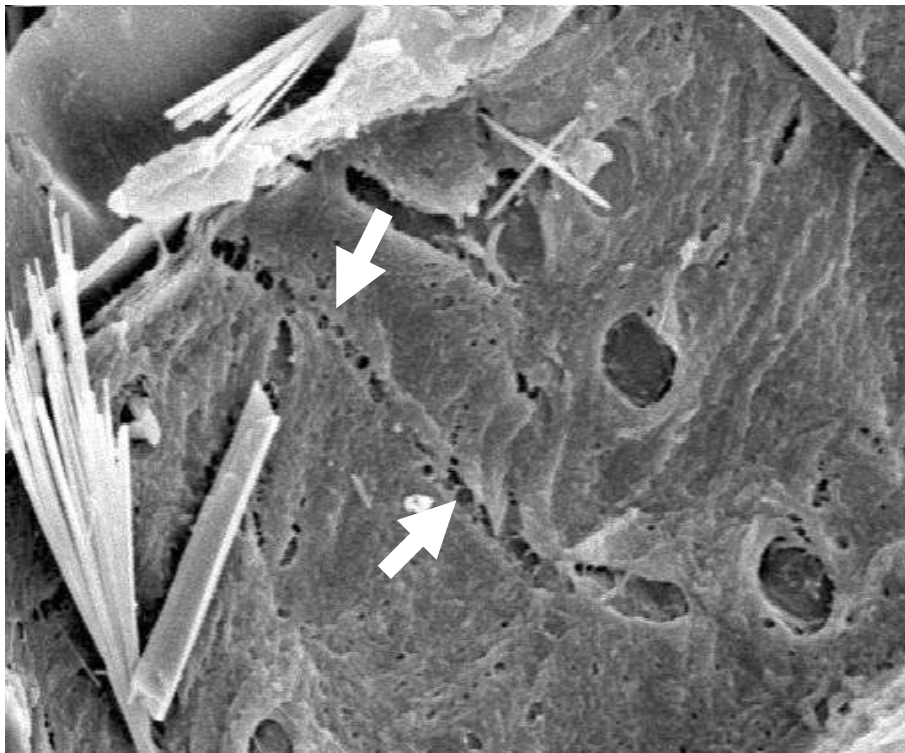


Εικόνα 6: Ακτινική τομή. Ζώνες διάβρωσης που εκτείνονται σε όλο το πεδίο διασταύρωσης των ημιαλωφόρων βοθρίων και αποδίδονται σε προσβολή από βακτήρια διάβρωσης (erosion bacteria)

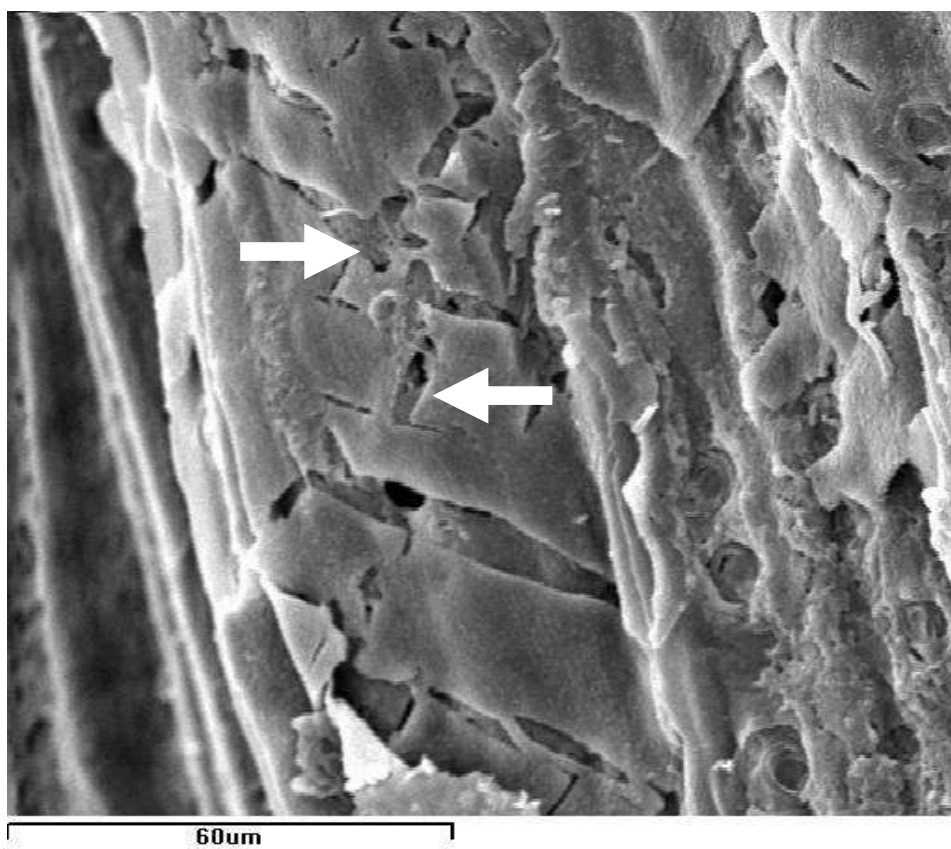


Εικόνα 7: Ακτινική τομή. Σήραγγες αλλοίωσης που αποδίδονται σε προσβολή από βακτήρια σηράγγων (tunneling bacteria)

A.



B.



Εικόνα 8: **A.** Ζώνη διάβρωσης που εμφανίζεται να έχει δημιουργηθεί από την συνένωση μικρών οπών βακτηριακής προσβολής, **B.** Εγκοπές σχήματος X ή V στα κυτταρικά τοιχώματα που αποδίδονται σε βακτηριακή προσβολή

2. ΣΚΟΠΟΣ

Στηριζόμενοι στις παρατηρήσεις που προέκυψαν από την οπτική και την ηλεκτρονική μικροσκοπία και έχοντας πλέον σοβαρές ενδείξεις πως το ξύλο παρουσιάζει εκτεταμένη αλλοίωση που πιθανόν οφείλεται σε προκαρυώτες, προχωρήσαμε σε χαρακτηρισμό της προκαρυωτικής ποικιλότητας με τη χρήση μοριακών τεχνικών. Σκοπός της εργασίας ήταν να κατασκευαστούν 16S rRNA βιβλιοθήκες προκαρυωτών και στη συνέχεια να ακολουθήσει ανάλυση των κλώνων με σύγχρονα εργαλεία βιοπληροφορικής. Επιπλέον θελήσαμε να διερευνήσουμε την ύπαρξη Αρχαίων στα δείγματα που είχαμε και να διαπιστώσουμε (στην περίπτωση που υπήρχαν) ποιος μπορεί να ήταν ο πιθανός ρόλος τους στην αλλοίωση του ξύλου.

Τα αποτελέσματα των παραπάνω αναλύσεων θα μας επιτρέψουν να βγάλουμε συμπεράσματα σχετικά με την ποικιλότητα των προκαρυωτών που είχαν αποικίσει το ξύλο, τον ρόλο τους στη διάβρωση του ιστού, την αλληλεπίδραση των βακτηριακών κοινοτήτων μεταξύ τους και τέλος την εξελικτική τους πορεία.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Κονιορτοποίηση ξύλου

Για τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν δείγματα απολιθωμένου ξύλου που προσφέρθηκαν από το μουσείο Hermann Otto (Ουγγαρία). Με τη χρήση ενός αποστειρωμένου εμβόλου αφαιρέθηκαν δύο τμήματα από το εσωτερικό του ξύλου. Στη συνέχεια τα δύο κομμάτια εμβαπτίστηκαν στιγμιαία σε υγρό άζωτο (N₂) και κονιορτοποιήθηκαν σε πλήρως αποστειρωμένες συνθήκες. Η σκόνη που προέκυψε μοιράστηκε σε eppendorf των 300mg το καθένα και αποθηκεύτηκε στους -80°C μέχρι τη χρήση της.

3.2 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA από τα κονιορτοποιημένα δείγματα έγινε με τη χρήση των kit Nucleospin Soil και Nucleospin Plant II (Macherey-Nagel, Germany).

Πριν από την εφαρμογή των kit, τα δείγματα που είχαν αποθηκευθεί στους -80°C, αφέθηκαν να ξεπαγώσουν για 3 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια επαναδιαλύθηκαν σε 300μl διαλύματος πρωτεΐνάσης K, αναμείχθηκαν πολύ καλά με vortex και επώαστηκαν για 15 ώρες στους 37°C με ανάδευση. Το διάλυμα της πρωτεΐνάσης K αποτελείται από 12.5mg/ml πρωτεΐνάση K (HT Biotechnology Ltd.), EDTA σε συγκέντρωση 0.01M και 5% SDS. Μετά την επώαση, αφαιρέσαμε όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα του διαλύματος πρωτεΐνάσης K και ακολούθησε η απομόνωση του DNA με βάση τις οδηγίες των δύο kit.

3.3 Ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου Βακτηρίων με PCR

Για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των Βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν οι παγκόσμιοι εκκινητές 27F με αλληλουχία (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') (Lane et al. 1991) και 1492R με

αλληλουχία (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Turner et al. 1999). Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση *ExTaq* (TAKARA Bio Inc.). Η συγκεκριμένη πολυμεράση προσφέρει υψηλή πιστότητα, σε σχέση με τις συμβατικές *Taq* DNA πολυμεράσες, καθώς επίσης και καλύτερη απόδοση όσον αφορά την ενίσχυση του DNA-στόχου. Επιπλέον έχει την ικανότητα να προσθέτει μια "αδενίνη" στα 3' άκρα των PCR προϊόντων, καθιστώντας τα κατάλληλα για απευθείας κλωνοποίηση σε T-vector. Οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν, φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα 1:

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της PCR με την *ExTaq* DNA πολυμεράση (TAKARA) για την ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου των Βακτηρίων.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (TAKARA)	ΑΡΧΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ	ΤΕΛΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ
PCR buffer	10X	1X
dNTPS	2.5mM	250μM
27F primer	26.9μM	0.5μM
1492R primer	32.6μM	0.5μM
<i>ExTaq</i> DNA polymerase	5u/μl	2units

Η αντίδραση της PCR έγινε σε τελικό όγκο 25μl και χρησιμοποιήθηκε DNA-μήτρα και από τις δύο απομονώσεις που κάναμε με τα kit Nucleospin Plant II και Nucleospin Soil (Macherey-Nagel, Germany). Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και οι συνθήκες στις οποίες έγινε η PCR φαίνονται στους ακόλουθους δύο πίνακες (Πίνακας 2 & Πίνακας 3).

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου των Βακτηρίων.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (ΤΑΚΑΡΑ)	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ (μ l)
H ₂ O	12.76
PCR buffer	2.5
dNTPS	2.5
27F primer	0.46
1492R primer	0.38
<i>ExTaq</i> DNA polymerase	0.4
DNA template	6

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Θερμοκρασίες αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου των Βακτηρίων.

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ	ΧΡΟΝΟΣ
94°C	5min
94°C	1min
57°C	30sec
72°C	1.5min
72°C	10min

} **30 cycles**

Όλα τα PCR προϊόντα ελέχθησαν μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. Η συγκέντρωση της αγαρόζης ήταν 0.8% και ο μάρτυρας μοριακού βάρους ήταν ο 2-Log DNA Ladder (0.1-10kb) (New England Biolabs Inc.). Στη συνέχεια τα προϊόντα καθαρίστηκαν από το πήκτωμα αγαρόζης με τη χρήση του kit Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel, Germany).

3.4 Ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου Αρχαίων με PCR

Για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των Αρχαίων χρησιμοποιήθηκαν οι παγκόσμιοι εκκινητές 4Fa και rP1. Ο 4Fa εκκινητής είναι ειδικός για Αρχαία και έχει αλληλουχία (5'-TCCGGTTGATCCTGCCRG-3') (Hershberger et al. 1996), ενώ ο rP1 εκκινητής είναι ειδικός για Βακτήρια και έχει αλληλουχία (5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Weisburg et al. 1991). Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση *ExTaq* (TAKARA Bio Inc.) και οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων φαίνονται στον Πίνακα 4:

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της PCR με την *ExTaq* DNA πολυμεράση (TAKARA) για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των Αρχαίων.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (TAKARA)	ΑΡΧΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ	ΤΕΛΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ
PCR buffer	10X	1X
dNTPS	2.5mM	250μM
4FA primer	37.5μM	0.5μM
rP1 primer	29.6μM	0.5μM
<i>ExTaq</i> DNA polymerase	5u/μl	2units

Η αντίδραση της PCR έγινε σε τελικό όγκο 25μl και χρησιμοποιήθηκε DNA-μήτρα μόνο από την απομόνωση που κάναμε με το kit Nucleospin Soil (Macherey-Nagel, Germany). Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και οι συνθήκες στις οποίες έγινε η PCR φαίνονται στους ακόλουθους δύο πίνακες (Πίνακας 5 & 6).

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου των Αρχαίων.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (ΤΑΚΑΡΑ)	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ (μl)
H ₂ O	12.85
PCR buffer	2.5
dNTPS	2.5
4FA primer	0.33
rP1 primer	0.42
<i>ExTaq</i> DNA polymerase	0.4
DNA template	6

ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Θερμοκρασίες αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου των Αρχαίων.

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ	ΧΡΟΝΟΣ	
94°C	5min	} 35 cycles
94°C	1min	
57°C	30sec	
72°C	1.5min	
72°C	10min	

Όλα τα PCR προϊόντα ελέχθησαν μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα 0.8% αγαρόζης και στη συνέχεια καθαρίστηκαν από το πήκτωμα με τη χρήση του kit Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel, Germany).

3.5 Ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου Βακτηρίων και Αρχαίων με διαβαθμισμένες θερμοκρασίες υβριδισμού (Gradient PCR)

Στην διαδικασία της Gradient PCR χρησιμοποιούνται διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού των εκκινητών, προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη δυνατή. Επίσης όταν οι θερμοκρασίες υβριδισμού είναι χαμηλότερες είναι δυνατόν να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές στο *16S rRNA* γονίδιο κάποιων ειδών, παρά σε πιο αυστηρές συνθήκες, προσφέροντας έτσι μεγαλύτερη ποικιλότητα. Για την Gradient PCR το πρωτόκολλο για τα Βακτήρια και τα Αρχαία ήταν το ίδιο όπως αυτά που προαναφέραμε στους Πίνακες 2 & 5. Ωστόσο οι συνθήκες της PCR ήταν όπως φαίνονται στους Πίνακες 7 & 8.

ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Θερμοκρασίες αντίδρασης Gradient PCR για την ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου των Βακτηρίων.

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ			ΧΡΟΝΟΣ
94°C			5min
94°C			1min
54°C	55 °C	56 °C	30sec
72°C			1.5min
72°C			10min

} **30 cycles**

ΠΙΝΑΚΑΣ 8: Θερμοκρασίες αντίδρασης Gradient PCR για την ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου των Αρχαίων.

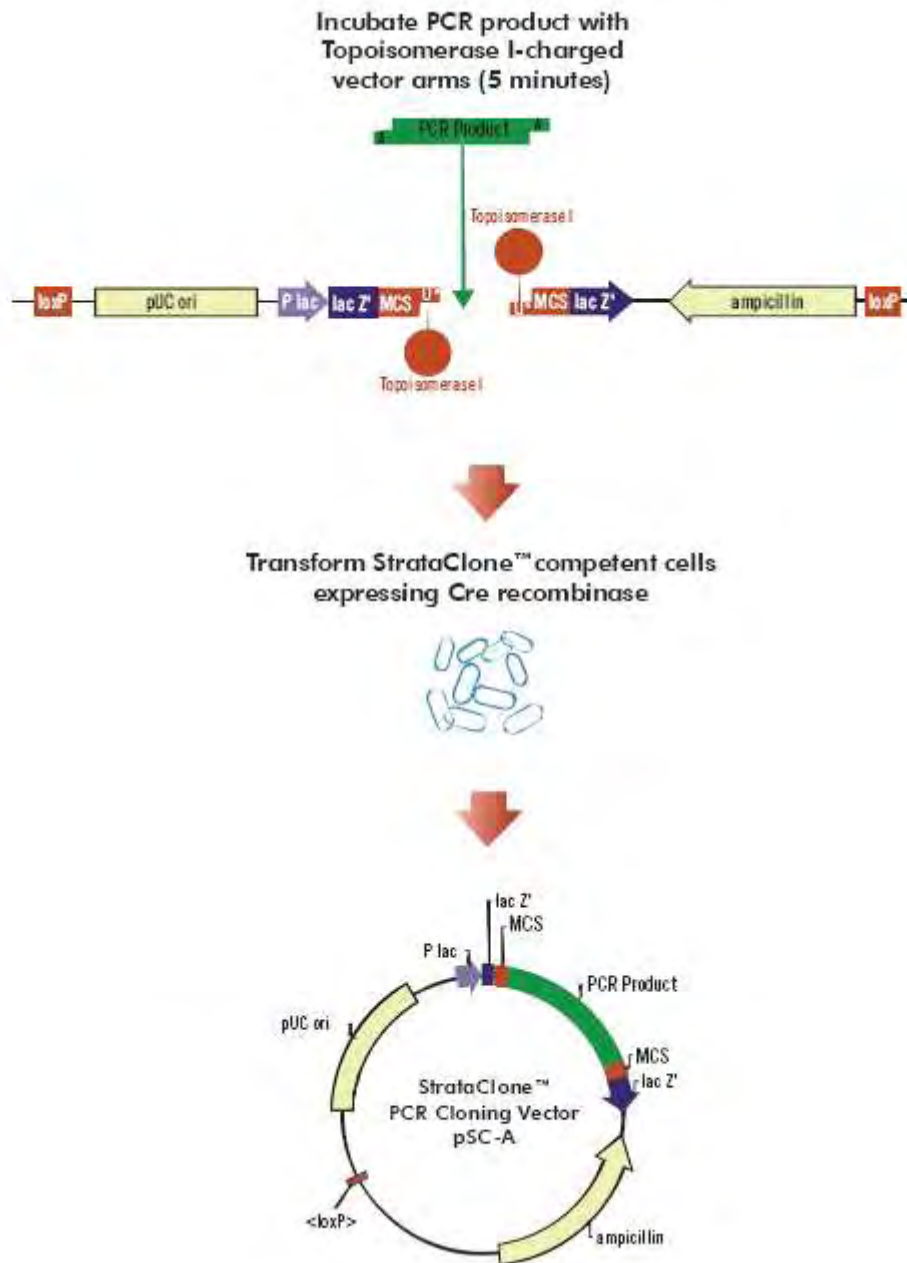
ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ			ΧΡΟΝΟΣ
94°C			5min
94°C			1min
54°C	55 °C	56 °C	30sec
72°C			1.5min
72°C			10min

} **35 cycles**

Όλα τα PCR προϊόντα ελέχθησαν μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα 0.8% αγαρόζης και στη συνέχεια καθαρίστηκαν από το πήκτωμα με τη χρήση του kit Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel, Germany). Τα καθαρισμένα προϊόντα των τριών θερμοκρασιών υβριδισμού ενώθηκαν σε ένα, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν αργότερα για κλωνοποίηση.

3.6 Κλωνοποίηση των PCR προϊόντων Βακτηρίων και Αρχαίων

Η κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR, τόσο των Βακτηρίων όσο και των Αρχαίων, έγινε με τη χρήση του “Strataclone PCR Cloning” kit (Stratagene). Το kit βασίζεται στη συνδυασμένη δράση τοποϊσομεράσης I από τον ιό *Vaccinia* και στη δράση Cre ρεκομπινάσης του βακτηριοφάγου P1. Το Strataclone PCR Cloning vector mix περιέχει δύο τμήματα DNA που το καθένα φέρει στο ένα άκρο του την τοποϊσομεράση I και στο άλλο μια θέση αναγνώρισης *loxP*. Τα άκρα που φέρουν την τοποϊσομεράση I έχουν μια τροποποιημένη ουρά ουριδίνης (U*). Τα PCR προϊόντα που φέρουν μια αδενίνη στα 3' άκρα τους μπορούν να συνδεθούν ανάμεσα στα τμήματα του DNA, δίνοντας ένα γραμμικό μόριο που αποτελείται από τον vector και το PCR προϊόν. Κατόπιν το γραμμικό μόριο μετασχηματίζεται στα δεκτικά κύτταρα του kit, που είναι τροποποιημένα για να εκφράζουν την Cre ρεκομπινάση. Η Cre ρεκομπινάση καταλύει τον ανασυνδυασμό μεταξύ των θέσεων *loxP*, δημιουργώντας ένα κυκλικό μόριο DNA (pSC-A), το οποίο πλέον μπορεί να αντιγραφεί μέσα σε κύτταρα που μεγαλώνουν σε θρεπτικό μέσο με αμπικιλίνη. Επίσης ο pSC-A vector περιέχει μια γονιδιακή κασέτα *lacZ'* για την επιλογή μπλε-άσπρων αποικιών [**Εικ. 9**].

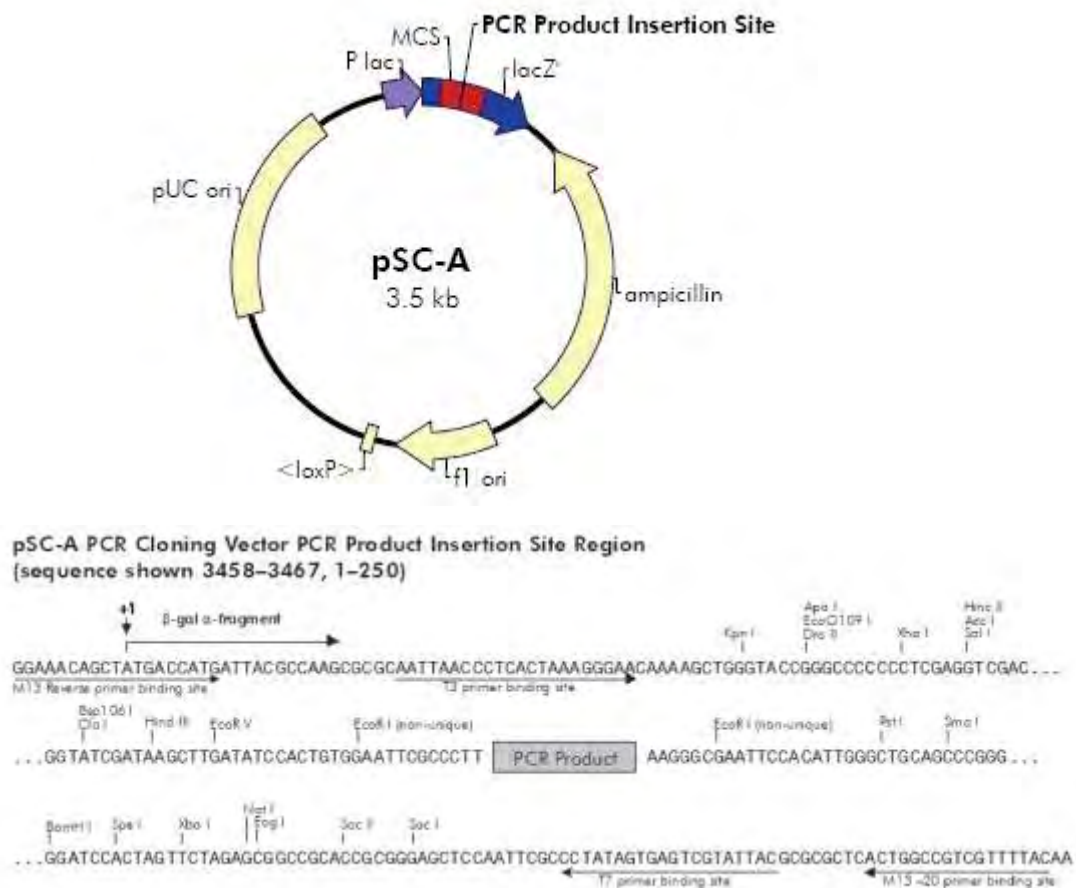


Εικόνα 9: Διαδικασία κλωνοποίησης με το “Strataclone PCR Cloning” kit (Stratagene).

Η διαδικασία έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του kit και κλωνοποιήθηκαν τα PCR προϊόντα των Βακτηρίων και των Αρχαίων, που προέκυψαν από την PCR με θερμοκρασία υβριδισμού 57°C. Μετά τον μετασχηματισμό των δεκτικών κυττάρων, ακολούθησε η μέθοδος επιλογής μπλε-άσπρων αποικιών με επίστρωση των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο LB agar με αμπικιλίνη και X-gal. Οι

τελικές συγκεντρώσεις της αμπικιλίνης και του X-gal ήταν 100μg/ml και 40μg/ml, αντίστοιχα. Τα τρυβλία επώαστηκαν για 16 ώρες στους 37°C.

Οι μπλε και άσπρες αποικίες που εμφανίστηκαν στο τρυβλίο την επόμενη μέρα οφείλονται στο *lacZ'* γονίδιο που έχει pSC-A vector. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 10, η ένθεση του PCR προϊόντος στη θέση του πολυσυνδέτη οδηγεί σε διάσπαση του *lacZ'* γονιδίου και καταργείται έτσι η δράση της β-γαλακτοσιδάσης που έχει την ικανότητα να μεταβολίζει το X-gal. Αντίθετα, στην περίπτωση των μπλε αποικιών, ο pSC-A vector δεν έχει πάρει το προϊόν κι έτσι το *lacZ'* γονίδιο είναι άθικτο και η β-γαλακτοσιδάση μπορεί να μεταβολίσει το X-gal, δίνοντας το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα στις αποικίες.



Εικόνα 10: Περιοχή ένθεσης του PCR προϊόντος στον pSC-A vector.

3.7 Επιβεβαίωση θετικών κλώνων μετά την κλωνοποίηση

3.7.1 Επιβεβαίωση με PCR

Για να επιβεβαιώσουμε πως το γονίδιο-στόχος μπήκε στον pSC-A vector, επιλέξαμε 8 τυχαίες λευκές αποικίες και κάναμε "Colony PCR". Για την συγκεκριμένη διαδικασία χρησιμοποιήθηκε η *Taq* DNA polymerase, Recombinant (HyTest Ltd.) και η αντίδραση έγινε και πάλι σε τελικό όγκο 25μl. Οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις για την Colony PCR που κάναμε για το βακτηριακό *16S rRNA* γονίδιο φαίνονται στον Πίνακα 9.

ΠΙΝΑΚΑΣ 9: Οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της Colony PCR (HyTest Ltd.) για την ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου των Βακτηρίων.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (HYTEST LTD)	ΑΡΧΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ	ΤΕΛΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ
PCR buffer	10X	1X
dNTPS	25mM	250μM
27F primer	26.9μM	0.5μM
1492R primer	32.6μM	0.5μM
MgCl ₂	50mM	2mM
<i>Taq</i> DNA polymerase	5u/μl	1unit

Για την Colony PCR, αρχικά παρασκευάζουμε το Master mix και το μοιράζουμε στα tubes. Στη συνέχεια παίρνουμε με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα μια λευκή αποικία, την σώζουμε σε ένα τρυβλίο με LB/αμπικιλίνη/X-gal και έπειτα ενοφθαλμίζουμε στο PCR tube. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία και για τις 8 αποικίες, επωάζουμε το τρυβλίο στους 37°C. Το πρωτόκολλο, καθώς και οι συνθήκες της αντίδρασης φαίνονται παρακάτω (Πίνακας 10 & 11).

Πίνακας 10: Ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την επιβεβαίωση των λευκών αποικιών που έφεραν το βακτηριακό *16S rRNA* γονίδιο.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (HYTEST LTD.)	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ (μl)
H ₂ O	20.21
PCR buffer	2.5
dNTPS	0.25
27F primer	0.46
1492R primer	0.38
MgCl ₂	1
<i>Taq</i> DNA polymerase	0.2

Πίνακας 11: Θερμοκρασίες αντίδρασης Colony PCR για την επιβεβαίωση του βακτηριακού *16S rRNA* γονιδίου.

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ	ΧΡΟΝΟΣ	
94°C	5min	} 30 cycles
94°C	1min	
57°C	30sec	
72°C	1.5min	
72°C	10min	

Όσον αφορά την επιβεβαίωση των λευκών αποικιών στις οποίες είχαμε κλωνοποιήσει το *16S rRNA* γονίδιο των Αρχαίων, ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο όπως και στη περίπτωση του βακτηριακού, με τις μόνες διαφορές να εντοπίζονται στους εκκινήτες (4FA & rP1) και στους κύκλους της αντίδρασης (35 κύκλοι).

3.7.2 Επιβεβαίωση με πέψη με ένζυμο περιορισμού

Από τις αποικίες που επιβεβαιώθηκαν σαν θετικές από την Colony PCR, κάναμε υγρές καλλιέργειες σε LB broth/αμπικιλίνη/X-gal και τις επώασαμε στους 37°C. Από αυτές τις καλλιέργειες απομονώσαμε τα πλασμίδια με το kit Nucleospin Plasmid (Macherey-Nagel, Germany). Όπως φαίνεται και από τον πλασμιδιακό χάρτη του pSC-A υπάρχουν, ένθεν κι ένθεν του ενθέματος, θέσεις αναγνώρισης για το ένζυμο περιορισμού EcoRI. Βασιζόμενοι σε αυτό, πραγματοποιήσαμε μια αντίδραση πέψης για να επιβεβαιώσουμε πως τα πλασμίδια είχαν όντως ένθεμα. Για την πέψη χρησιμοποιήσαμε το ένζυμο EcoRI (TAKARA BIO Inc.) με συγκέντρωση 15u/μl. Η αντίδραση πέψης έγινε σε τελικό όγκο 20μl και το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12: Ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη με το ένζυμο EcoRI

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (TAKARA)	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ (μl)
H ₂ O	7
Buffer H	2
plasmid DNA	10
EcoRI	1

Η αντίδραση επώαστηκε για 3 ώρες στους 37°C. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, η πέψη ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8%.

3.8 Κλωνοποίηση των προϊόντων της Gradient PCR Βακτηρίων και Αρχαίων

3.8.1 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων *E. coli* JM109

Προκειμένου να γίνουν δεκτικά τα κύτταρα *E. coli* JM109 τα επεξεργαστήκαμε με χλωριούχο ρουβίδιο (RbCl). Αρχικά ανακαλλιεργήσαμε μια αποικία κυττάρων *E. coli* JM109 σε 5ml LB broth και την επώασαμε για 16 ώρες στους 37°C με ανάδευση. Τα κύτταρα *E. coli* JM109 που χρησιμοποιήσαμε ήταν της εταιρείας Promega (JM109 Competent Cells, High Efficiency).

- Με την υγρή καλλιέργεια ενοφθαλμίσαμε 200ml LB broth (αραίωση 1:100) και επώασαμε στους 37°C με ανάδευση μέχρι η οπτική πυκνότητα στα 600nm να φτάσει 0.5
- Βάλαμε την καλλιέργεια σε πάγο για 15 λεπτά
- Μοιράσαμε από 50ml καλλιέργειας σε 2 falcon και φυγοκεντρήσαμε για 10 λεπτά στις 4500rpm στους 4°C
- Απορρίψαμε το υπερκείμενο και μοιράσαμε άλλα 50ml στα ίδια falcon και φυγοκεντρήσαμε για 10 λεπτά στις 4500rpm στους 4°C
- Απορρίψαμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύσαμε το ίζημα σε 12ml διαλύματος Tfb I με πιπετάρισμα
- Επώασαμε στον πάγο για 15 λεπτά
- Φυγοκεντρήσαμε για 5 λεπτά στις 4000rpm στους 4°C
- Απορρίψαμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύσαμε το ίζημα σε 2.4ml διαλύματος Tfb II με πιπετάρισμα
- Μοιράσαμε 200μl σε παγωμένα eppendorfs και τα αποθηκεύσαμε στους -80°C

Τα διαλύματα Tfb I και Tfb II παρασκευάστηκαν όπως φαίνεται στους Πίνακες 13 & 14. Στις παρενθέσεις επισημαίνονται οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων. Ο τελικός όγκος του Tfb I ήταν 200ml και του Tfb II ήταν 50ml.

Πίνακας 13: Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων του διαλύματος Tfb I. Το Tfb I είχε τελικό όγκο 200ml.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ Tfb I	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ
H ₂ O	170ml
RbCl (100mM)	2.99gr
MnCl ₂ -4H ₂ O (50mM)	2gr
Potassium Acetate (30mM)	5.88gr
CaCl ₂ -2H ₂ O (10mM)	0.3gr
Glycerol (15% final)	30ml

Πίνακας 14: Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων του διαλύματος Tfb II. Το Tfb II είχε τελικό όγκο 50ml.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ Tfb II	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ
H ₂ O	40ml
RbCl (10mM)	0.06gr
0.2M MOPS (10mM final)	2.5ml
CaCl ₂ -2H ₂ O (10mM)	0.55gr
Glycerol (15% final)	7.5ml

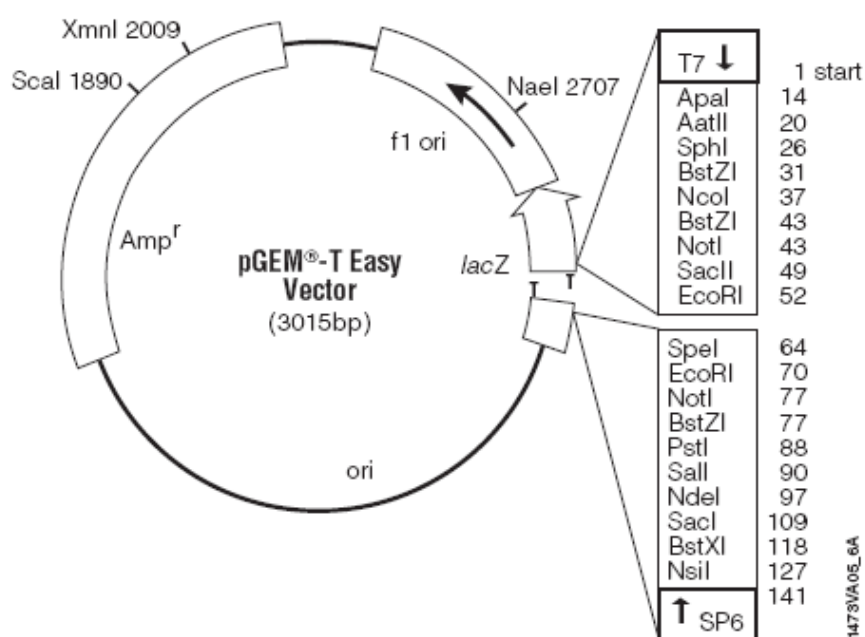
Μετά την παρασκευή τους τα διαλύματα αποστειρώθηκαν με φίλτρο και αποθηκεύτηκαν στους 4°C, προστατευμένα από το φως. Επίσης για το MOPS χρησιμοποιήθηκαν 0.837gr που διαλύθηκαν σε 20ml H₂O για να έχει τελικά συγκέντρωση 0.2M.

Χρησιμοποιώντας HCl ρυθμίσαμε το pH του στο 6.5 και στη συνέχεια το αποστειρώσαμε με φίλτρο και το αποθηκεύσαμε στους 4°C.

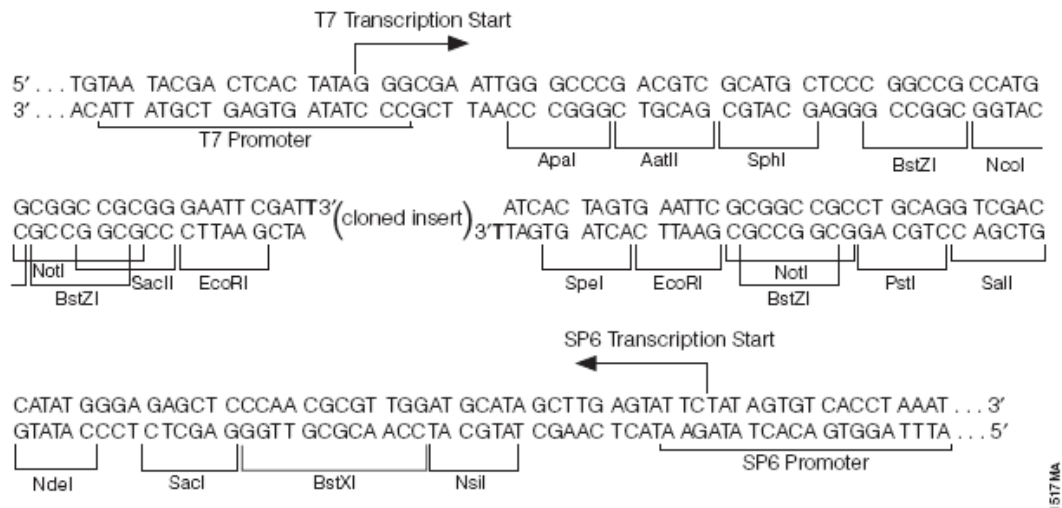
3.8.2 Κλωνοποίηση των προϊόντων στα κύτταρα *E. coli* JM109 με pGEM-T easy vector

3.8.2.1 Αντίδραση λιγάσης με τον pGEM-T easy vector

Η κλωνοποίηση των προϊόντων της Gradient PCR, τόσο των Βακτηρίων όσο και των Αρχαίων, έγινε με τη χρήση του “pGEM-T easy Vector System” (Promega). Ο pGEM-T easy vector είναι γραμμικό μόριο, που στα 3’ άκρα του φέρει μια ελεύθερη θυμιδίνη (T). Οι ελεύθερες θυμιδίνες αυξάνουν σε μεγάλο βαθμό την αποτελεσματικότητα της σύνδεσης του PCR ενθέματος, γιατί αποτρέπουν την επανακυκλοποίηση του πλασμιδίου. Ο pGEM-T easy vector δίνει τη δυνατότητα επιλογής ανασυνδυασμένων κλώνων μέσω μπλε-άσπρων αποικιών, αφού φέρει το *lacZ'* γονίδιο στην περιοχή του πολυσυνδέτη [Εικ. 11]. Επιπλέον φέρει πολλαπλές θέσεις αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού για να μπορέσει να γίνει σε δεύτερο χρόνο η εξαγωγή του ενθέματος από το πλασμίδιο. Τέλος, ένθεν κι ένθεν της περιοχής του πολυσυνδέτη φέρει τις αλληλουχίες των εκκινητών T7 και SP6 της RNA πολυμεράσης προκειμένου να γίνει η αλληλούχηση του ενθέματος [Εικ. 12].



Εικόνα 11: Ο πλασμιδιακός χάρτης του pGEM-T easy, όπου διακρίνονται οι θέσεις αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού.



Εικόνα 12: Η περιοχή του πολυσυνδέτη του pGEM-T easy vector και οι αλληλουχίες των εκκινήτων T7 και SP6 της RNA πολυμεράσης.

Η αντίδραση λιγάσης με τον pGEM-T easy vector απαιτεί να χρησιμοποιηθεί ο βέλτιστος μοριακός λόγος “ενθέματος:πλασμιδίου” (insert:vector). Η αναλογία που χρησιμοποιείται συνήθως είναι 3:1. Στη συνέχεια θα πρέπει να υπολογιστεί η ποσότητα (ng) του ενθέματος που απαιτείται για να είναι επιτυχημένη η αντίδραση λιγάσης. Αυτό γίνεται με βάση τον τύπο:

$$\{ \text{ng φορέα} \times \text{μέγεθος ενθέματος (kb)} \} / \text{μέγεθος φορέα(kb)} \times \text{λόγος ενθέματος/φορέα} = \text{ng ενθέματος}$$

Ο pGEM-T easy vector έχει μέγεθος 3,015kb και παρέχεται από τον παρασκευαστή σε ποσότητα 50ng/μl. Αφού υπολογίσουμε την ποσότητα του ενθέματος, μπορούμε να προχωρήσουμε στην αντίδραση λιγάσης σύμφωνα με το πρωτόκολλο που φαίνεται στον Πίνακα 15. Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα προέκυψε πως τόσο για τα Βακτήρια όσο και για τα Αρχαία πρέπει να προστεθούν στην αντίδραση 2μl από τα προϊόντα της Gradient PCR. Επιπλέον, πραγματοποιήσαμε και μια αντίδραση ελέγχου (*Positive control*). Στο *Positive control* χρησιμοποιήσαμε το Control Insert του προμηθευτή για να ελέγξουμε την απόδοση της αντίδρασης λιγάσης, αλλά και το

κατά πόσο η διαδικασία έγινε σωστά. Το Control Insert είναι ένα τμήμα DNA 542bp που έχει μεταλλαχθεί ώστε να περιέχει πολλαπλά κωδικόνια τερματισμού στα έξι αναγνωστικά πλαίσια ανάγνωσης, εξασφαλίζοντας χαμηλό ποσοστό μπλε αποικιών.

Πίνακας 15: Ποσότητες αντιδραστηρίων για την αντίδραση λιγάσης με τον pGEM-T vector για τα Βακτήρια και τα Αρχαία

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (PROMEGA)	STANDARD REACTION	POSITIVE CONTROL
2X Rapid Ligation Buffer	5μl	5μl
pGEM-T vector (50ng)	1μl	1μl
PCR product	2μl	-
Control Insert DNA	-	2μl
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/μl)	1μl	1μl
H ₂ O to a final volume of	10μl	10μl

- Πριν από την αντίδραση το 2X Rapid Ligation Buffer αναμιγνύεται πολύ καλά με vortex
- Στήνουμε τις αντιδράσεις, όπως φαίνεται στον Πίνακα 15
- Αναμειγνύουμε πολύ καλά με πιπετάρισμα
- Επιάζουμε στους 4°C για 24 ώρες, για να επιτύχουμε τον μέγιστο αριθμό ανασυνδυασμένων πλασμιδίων

3.8.2.2 Μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* JM109 με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια

Για τον μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα *E. coli* JM109 που είχαμε επεξεργαστεί με χλωριούχο ρουβίδιο και είχαμε αποθηκεύσει στους -80°C (βλ. παράγραφο **3.8.1**).

- Αφήνουμε τα tubes με τα κύτταρα να ξεπαγώσουν για 5 λεπτά μέσα σε πάγο
- Προσθέτουμε στα κύτταρα 5μl από το ligation mix και ανακατεύουμε 2-3 φορές με ελαφρύ πιπετάρισμα
- Επωάζουμε στον πάγο για 20 λεπτά
- Μετασχηματίζουμε τα κύτταρα με heat-shock, επωάζοντάς τα για 50 δευτερόλεπτα σε υδατόλουτρο στους 42°C ακριβώς
- Αμέσως επιστρέφουμε τα κύτταρα στον πάγο και τα επωάζουμε για 2 λεπτά
- Προσθέτουμε 900μl LB broth και επωάζουμε για 1 ώρα στους 37°C με ανάδευση
- Μετά το πέρας της επώασης, επιστρώνουμε 100μl σε πιάτα με LB/αμπικικιλίνη/IPTG/X-gal. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 16. Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 37°C για 18 ώρες.

Πίνακας 16: Αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων για την επιλογή μπλε-άσπρων αποικιών

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΑΡΧΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ	ΤΕΛΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ
Αμπικικιλίνη	100mg/ml	100μg/ml
IPTG	100mM	0.5mM
X-gal	40mg/ml	80μg/ml

3.9 Επιβεβαίωση θετικών κλώνων με πέψη με ένζυμο περιορισμού

Επιλέξαμε 8 τυχαίες λευκές αποικίες και κάναμε υγρές καλλιέργειες σε 5ml LB broth με αμπικικιλίνη (100μg/ml). Οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37°C για 18 ώρες με ανάδευση και στη συνέχεια κάναμε απομόνωση πλασμιδιακού DNA με το kit Nucleospin Plasmid (Macherey-Nagel, Germany). Όπως φαίνεται και από τον πλασμιδιακό χάρτη του pGEM-T easy vector [Εικ. 12], υπάρχουν θέσεις αναγνώρισης για το ένζυμο περιορισμού EcoRI αριστερά και δεξιά από την περιοχή ένθεσης. Έτσι, για να επιβεβαιώσουμε πως τα πλασμίδια είχαν όντως ένθεμα, πραγματοποιήσαμε μια αντίδραση πέψης με το ένζυμο EcoRI (TAKARA BIO Inc.) με συγκέντρωση 15u/μl. Η αντίδραση πέψης έγινε σε τελικό όγκο 20μl και το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι ίδιο με αυτό που παρουσιάζεται στον Πίνακα 12. Η αντίδραση επώαστηκε για 3 ώρες στους 37°C. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, η πέψη ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8%.

3.10 Κατασκευή 16S rRNA βιβλιοθηκών

Σε ένα microtiter plate (96 wells) βάζουμε 200μl LB broth με αμπικικιλίνη (100μg/ml) και γλυκερόλη (25%). Χρησιμοποιώντας αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες, επιλέξαμε τις λευκές αποικίες και ενοφθαλμίσαμε κάθε πηγαδάκι με έναν κλώνο. Τα microtiter plates επώαστηκαν στους 37°C για 24 ώρες (χωρίς ανάδευση) και αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Οι 16S rRNA βιβλιοθήκες που συλλέχθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 17.

Πίνακας 17: Βιβλιοθήκες 16S rRNA Βακτηρίων και Αρχαίων

ΕΙΔΟΣ	MICROTITTER PLATES
Βακτήρια	2
Βακτήρια (Gradient PCR)	1
Αρχαία	1
Αρχαία (Gradient PCR)	1

3.11 Αλληλούχηση κλώνων 16S rRNA βιβλιοθηκών

Από κάθε 16S rRNA βιβλιοθήκη κάναμε 48 υγρές καλλιέργειες σε 3ml LB broth και αμπικιλίνη (100μg/ml) και τις επώασαμε στους 37°C για 16 ώρες με ανάδευση. Στη συνέχεια έγινε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του kit Nucleospin Plasmid (Macherey-Nagel, Germany) και εστάλη για αλληλούχηση στο Τμήμα Ανοσολογίας της Ιατρικής Σχολής Λάρισας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η αλληλούχηση όλων των κλώνων έγινε με τον εκκινητή T7.

3.12 Φυλογενετική ανάλυση κλώνων με εργαλεία βιοπληροφορικής

3.12.1 Επεξεργασία αλληλουχιών

Για να ξεκινήσει η ανάλυση των κλώνων που έχουμε αλληλουχήσει, έπρεπε πρώτα να αφαιρέσουμε τις βάσεις που ανήκουν στο πλασμίδιο κλωνοποίησης και να κρατήσουμε την περιοχή που ανήκει στο 16S rRNA γονίδιο. Η επεξεργασία των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα "Sequence Scanner" (<http://sequence-scanner.software.informer.com/>) και στη συνέχεια

οι αλληλουχίες μετατράπηκαν σε μορφή fasta (προέκταση .fasta) με το πρόγραμμα "DNA baser" (<http://www.dnabaser.com/>). Από την παραπάνω επεξεργασία αποκλείστηκαν οι αλληλουχίες που δεν μπόρεσαν να "διαβαστούν" σωστά, καθώς και εκείνες που είχαν μόνο την αλληλουχία του πλασμιδίου (χωρίς ένθεμα). Τελικά δημιουργήθηκαν 2 αρχεία fasta, το Bacteria.fasta και το Archaea.fasta. Το Bacteria.fasta περιείχε όλες τις αλληλουχίες του 16S rRNA, που είχαν προέλθει από Βακτήρια (θερμοκρασίες υβριδισμού 54-57°C) και το Archaea.fasta περιείχε όλες τις αλληλουχίες του 16S rRNA, που είχαν προέλθει από Αρχαία (θερμοκρασίες υβριδισμού 54-57°C).

3.12.2 Bellerophon

Όλοι οι κλώνοι ελέχθησαν για την παρουσία χιμαιρικών 16S rRNA αλληλουχιών με το πρόγραμμα "Bellerophon" (<http://comp-bio.anu.edu.au/bellerophon/bellerophon.pl>). Το συγκεκριμένο πρόγραμμα απαιτεί την εισαγωγή όλων των αλληλουχιών της βιβλιοθήκης σε ένα ενιαίο αρχείο fasta, έτσι ώστε να εμπεριέχονται και οι πατρικές αλληλουχίες και να μπορέσει να εντοπίσει πιθανές χίμαιρες. Οι παράμετροι που χρησιμοποιούμε στο πρόγραμμα είναι:

- Huber-Hugenholtz correction
- 200 bp window
- Align sequences
- PCR library

Τα αποτελέσματα στέλνονται στο ηλεκτρονικό ταχυδρομείο και έχουν τη μορφή που φαίνεται στο Παράρτημα (Π1). Όταν το preference score είναι >1, τότε υπάρχει πιθανότητα ύπαρξης χιμαιρικής αλληλουχίας. Το πρόγραμμα υποδεικνύει επίσης, εκτός από την πιθανή χιμαιρική αλληλουχία, και τις πατρικές αλληλουχίες, αλλά και τα ποσοστά ομοιότητας της κάθε μίας με την χιμαιρική.

Ωστόσο, οι αλληλουχίες αυτές θα πρέπει να ελεγχθούν για να διαπιστώσουμε αν είναι όντως χιμαιρικές ή αν πρόκειται για απόκλιση του προγράμματος. Κάθε φορά που το πρόγραμμα υποδεικνύει τις πιθανές χίμαιρες, θα πρέπει αυτές να αφαιρούνται και η ανάλυση να επαναλαμβάνεται. Η ανάλυση σταματά όταν δεν εντοπίζεται καμία χιμαιρική αλληλουχία στη βιβλιοθήκη.

3.12.3 Ribosomal Database Project (RDP)

Στη βάση δεδομένων "RDP" χρησιμοποιήθηκαν 2 εργαλεία: το RDP Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) και το Sequence Match (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp).

Η μορφή των αποτελεσμάτων που προκύπτουν φαίνεται στο Παράρτημα (Π2).

Οι παράμετροι που χρησιμοποιούμε στο RDP Classifier είναι:

- Επιλέγω γονίδιο: 16S rRNA
- Εισαγωγή αλληλουχιών σε μορφή fasta
- Το μέγεθος αλληλουχιών πρέπει να είναι πάνω από 250bp

Οι παράμετροι που χρησιμοποιούμε στο Sequence Match είναι:

- Εισαγωγή αλληλουχιών σε μορφή fasta
- Strain: Both
- Source: Both
- Size: Both
- Quality: Good
- Taxonomy: Nomenclatural
- KNN matches: 20

Στα αποτελέσματα που προκύπτουν δίνεται η ταυτότητα της αλληλουχίας, το *similarity score* και το *seqmatch score*. Το *similarity score* δείχνει το ποσοστό ομοιότητας της αλληλουχίας που εξετάζουμε σε σχέση με τις αλληλουχίες που διαθέτει η βάση RDP. Το *seqmatch score* δίνει τον αριθμό των ολιγομερών 7bp που είναι

κοινά μεταξύ της αλληλουχίας μας και μιας RDP αλληλουχίας διαιρεμένου με τον μικρότερο αριθμό μοναδικών ολιγομερών που υπάρχουν σε κάθε μια από τις δύο αλληλουχίες. Όσο η τιμή του τείνει στο 1, τόσο μεγαλύτερη είναι η ομοιότητα της αλληλουχίας με τον κοντινότερο συγγενή που εντόπισε.

3.12.4 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

Με το πρόγραμμα BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) συγκρίναμε τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες με τις αλληλουχίες που είναι καταχωρημένες στη συγκεκριμένη βάση δεδομένων μέσω τοπικής ομοπαράθεσης. Η εισαγωγή των αλληλουχιών στο blastn έγινε και πάλι σε μορφή fasta και οι παράμετροι ορίστηκαν ως εξής:

- Database: Others (nr etc) – Nucleotide collection (nr/nt)
- Optimize for: Highly similar sequences (megablast)

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν αξιολογήθηκαν σύμφωνα με το *MaxScore* (βλ. Παράρτημα Π3).

3.12.5 Mothur

Το πρόγραμμα Mothur χρησιμοποιήθηκε για να κάνουμε ομοπαράθεση των 16S rRNA αλληλουχιών των δύο βιβλιοθηκών, όπως επίσης και για να κατηγοριοποιήσουμε τους κλώνους σε Λειτουργικές Ταξινομικές Μονάδες (Operational Taxonomic Units-OTUs) και να υπολογίσουμε τις φυλογενετικές τους αποστάσεις. Για την ανάλυση με το πρόγραμμα Mothur ακολουθήσαμε το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Κατεβάζουμε και εγκαθιστούμε στον δίσκο C:/ του υπολογιστή το πρόγραμμα από την ηλεκτρονική διεύθυνση http://www.mothur.org/wiki/Download_mothur
- Στον φάκελο του προγράμματος “φορτώνουμε” τα 2 αρχεία που θα επεξεργαστούμε (Bacteria.fasta & Archaea.fasta)

- Πληκτρολογούμε: `summary.seqs(fasta=Bacteria.fasta)` και στο αρχείο που προκύπτει παρατηρούμε πλειοψηφικά πού κυμαίνονται τα ζεύγη βάσεων των αλληλουχιών
- Πληκτρολογούμε: `align.seqs(candidate=Bacteria.fasta, template=silva.bacteria.fasta, align=goth, search=kmer)`

Το αρχείο `silva.bacteria.fasta` θα πρέπει να το κατεβάσουμε από την διεύθυνση http://www.mothur.org/wiki/Silva_reference_files και να το “φορτώσουμε” στον φάκελο του προγράμματος

- Πληκτρολογούμε:

`screen.seqs(fasta=Bacteria.align, minlength=200)`

Με αυτή την εντολή θα αποκλειστούν όλες οι αλληλουχίες που μετά την ομοπαράθεση έχουν λιγότερα από 200 ζεύγη βάσεων.

Προκύπτει έτσι το αρχείο `Bacteria.good.align.fasta`, το οποίο χρησιμοποιούμε στην επόμενη εντολή.

- Για να ελέγξουμε και πάλι τα αποτελέσματα, πληκτρολογούμε:

`summary.seqs(fasta=Bacteria.good.align)`

- Στη συνέχεια επεξεργαζόμαστε περαιτέρω με trimming τις αλληλουχίες, πληκτρολογώντας:

`filter.seqs(fasta=Bacteria.good.align, trump=., vertical=T)`

- Για να υπολογίσουμε τις φυλογενετικές αποστάσεις, πληκτρολογούμε:

`dist.seqs(fasta=Bacteria.good.filter.fasta, calc=eachgap, output=lt)`

- Για να κάνουμε το clustering, πληκτρολογούμε:

`cluster(phylip=Bacteria.good.filter.phylib.dist, cutoff=0.10, precision=100)`

- Για να υπολογίσουμε το ποσοστό κάλυψης της βιβλιοθήκης, αλλά και τους δείκτες Chao 1 και Shannon, πληκτρολογούμε:

```
summary.single(list=Bacteria.good.filter.phylip.an.list,
calc=coverage-chao-shannon)
```

- Για να δημιουργήσουμε ένα συγκεντρωτικό αρχείο με τις αλληλουχίες ταξινομημένες στην κάθε Λειτουργική Ταξινομική Μονάδα, πληκτρολογούμε:

```
get.otulist(list=Bacteria.good.filter.phylip.an.list)
```

- Για να κάνουμε την rarefaction ανάλυση, πληκτρολογούμε:

```
rarefaction.single(list=Bacteria.good.filter.phylip.an.
list,freq=1) και
```

```
rarefaction.single(list=Bacteria.good.filter.phylip.an.lis
t,calc=chao,freq=1)
```

- Τα αρχεία που προκύπτουν από τις 2 τελευταίες εντολές τα χρησιμοποιούμε για να κάνουμε τις καμπύλες Rarefaction και Chao 1.

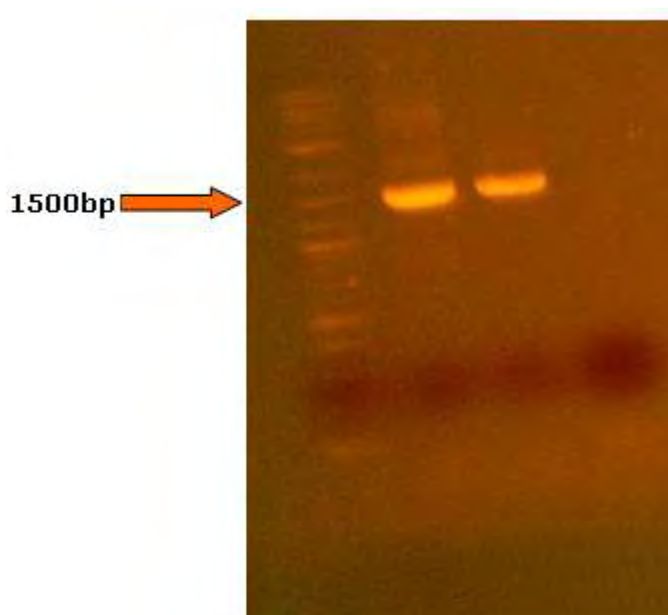
Οι ίδιες εντολές ισχύουν και για το αρχείο Archaea.fasta με τη μόνη διαφορά πως για την ομοπαράθεση χρησιμοποιήθηκε το αρχείο silva.archaea.fasta.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

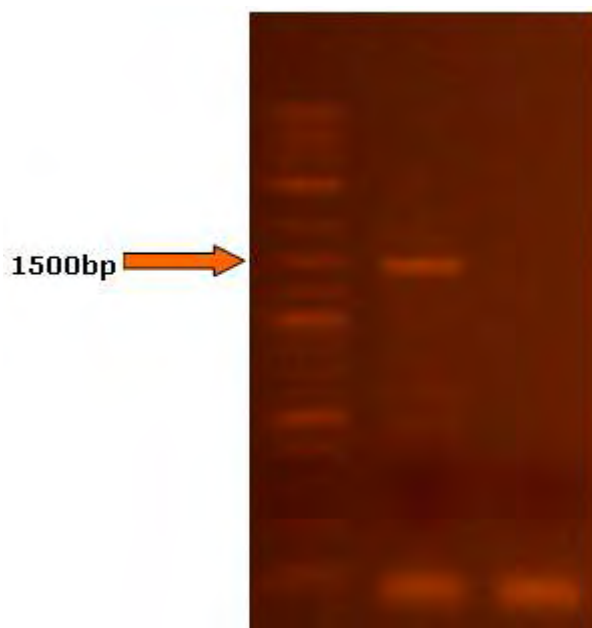
4.1 Ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου Βακτηρίων και Αρχαίων με PCR

Για να μελετήσουμε την προκαρυωτική ποικιλότητα σε δείγμα ξύλου από το απολιθωμένο δάσος του Bückabrány ήταν απαραίτητο να ενισχύσουμε με PCR το γονίδιο του *16S rRNA*. Το *16S rRNA* γονίδιο είναι εξελικτικά συντηρημένο και μας δίνει τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε παγκόσμιους εκκινητές για την ενίσχυσή του. Η ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου των Βακτηρίων με τους εκκινητές 27F και 1492R έδωσε προϊόν 1500bp, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 13.α**. Στην περίπτωση των Βακτηρίων χρησιμοποιήσαμε σαν θετικό control χρωμοσωμικό DNA του βακτηρίου *Pseudomonas entomophila*. Για να ενισχύσουμε το *16S rRNA* γονίδιο των Αρχαίων χρησιμοποιήσαμε τους εκκινητές 4FA και rP1, και όπως φαίνεται στην **Εικόνα 13.β**, πήραμε προϊόν μεγέθους ~1400bp. Και στις δύο περιπτώσεις η θερμοκρασία υβριδισμού ήταν 57°C και χρησιμοποιήθηκε αρνητικό control, για να διασφαλίσουμε πως η αντίδραση έγινε σωστά και πως ενισχύθηκε μόνο το επιθυμητό γονίδιο.

A.



B.



Εικόνα 13: A. Ενίσχυση του βακτηριακού *16S rRNA* γονιδίου. Από αριστερά προς δεξιά φαίνονται: ο μάρτυρας μοριακού βάρους, το *16S rRNA* γονίδιο (1500bp), το θετικό control, το αρνητικό control

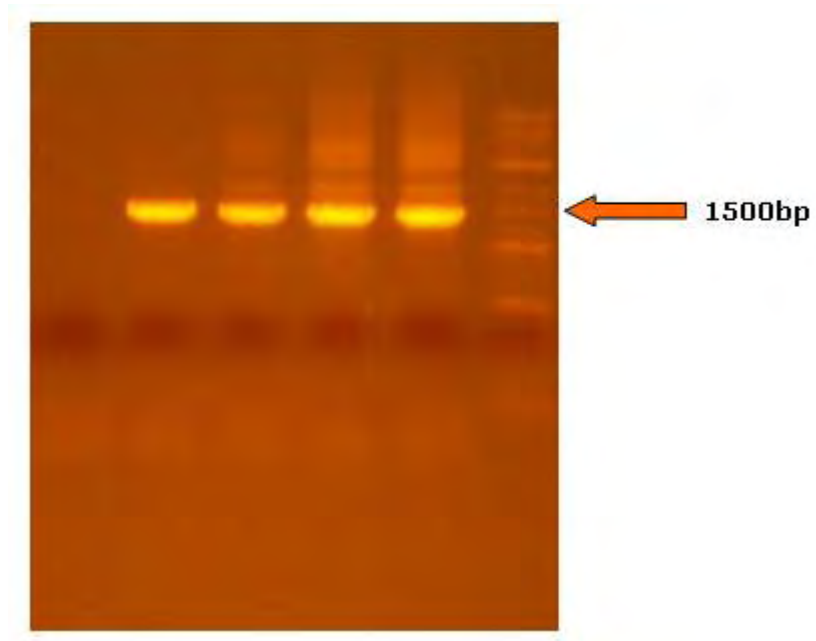
B. Ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου των Αρχαίων. Από αριστερά προς δεξιά φαίνονται: ο μάρτυρας μοριακού βάρους, το *16S rRNA* γονίδιο (1400bp), το αρνητικό control

4.2 Ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου Βακτηρίων και Αρχαίων με διαβαθμισμένες θερμοκρασίες υβριδισμού (Gradient PCR)

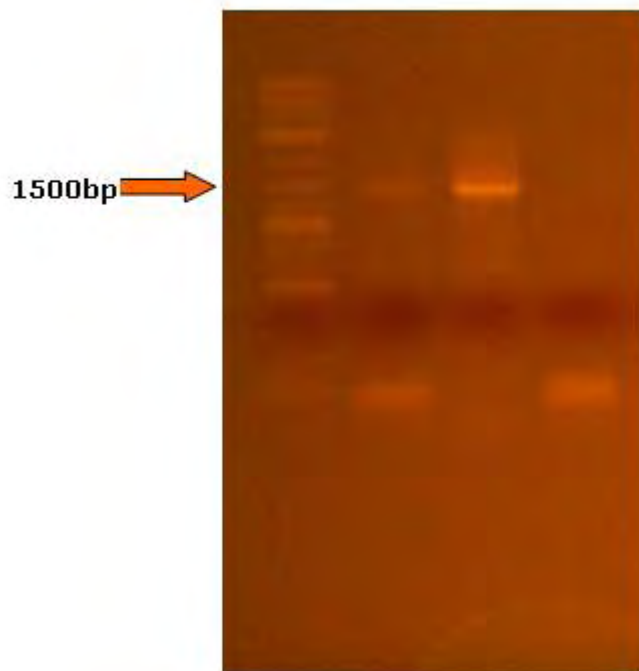
Η Gradient PCR τόσο για τα Βακτήρια, όσο και για τα Αρχαία έγινε στις θερμοκρασίες 54°C, 55°C, 56°C και πήραμε προϊόν και στις τρεις θερμοκρασίες, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 14**.

Παρατηρούμε ότι οι ζώνες των προϊόντων στα Βακτήρια και στις τρεις θερμοκρασίες είναι της ίδιας έντασης τόσο μεταξύ τους, όσο και με τη ζώνη στους 57°C [**Εικ. 14.α**]. Ωστόσο, όσον αφορά τα Αρχαία, παρατηρούμε πως παρόλο που πήραμε προϊόν και στις τρεις θερμοκρασίες, πήραμε και κάποιες ζώνες παραπροϊόντων, που δεν είχαμε στους 57°C [**Εικ. 14.β-γ**]. Να σημειωθεί πως η αντίδραση για τα Αρχαία στους 56°C έγινε ξεχωριστά από τις υπόλοιπες (λόγω μη επαρκούς ποσότητας DNA), γι' αυτό και παρουσιάζεται σε ξεχωριστή φωτογραφία.

A.



B.



Γ.

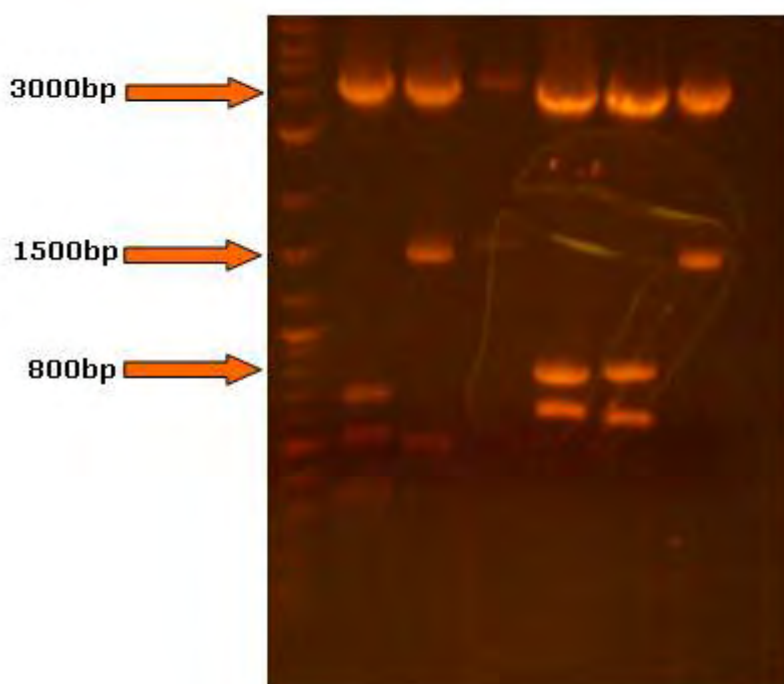


Εικόνα 14: Α. Gradient PCR του *16S rRNA* γονιδίου των Βακτηρίων. Από δεξιά προς αριστερά φαίνονται: ο μάρτυρας μοριακού βάρους, το *16S rRNA* γονίδιο στις θερμοκρασίες 54°C, 55°C, 56°C αντίστοιχα, το θετικό control, το αρνητικό control
Β. Gradient PCR του *16S rRNA* γονιδίου των Αρχαίων. Από αριστερά προς δεξιά φαίνονται: ο μάρτυρας μοριακού βάρους, το *16S rRNA* γονίδιο στις θερμοκρασίες 54°C και 55°C, το αρνητικό control
Γ. PCR του *16S rRNA* γονιδίου των Αρχαίων στους 56°C. Από αριστερά προς δεξιά φαίνονται: ο μάρτυρας μοριακού βάρους, το *16S rRNA* γονίδιο (2 πηγαδάκια) και το αρνητικό control

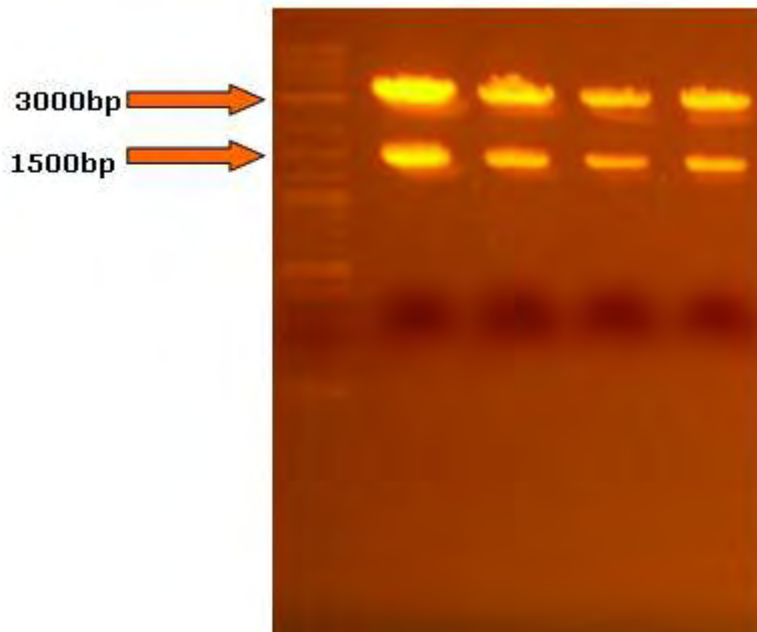
4.3 Κλωνοποίηση των PCR προϊόντων Βακτηρίων και Αρχαίων

Τα PCR προϊόντα που προέκυψαν, τόσο των Βακτηρίων όσο και των Αρχαίων, κλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλους T-vectors, που έδιναν τη δυνατότητα επιλογής μπλε-άσπρων αποικιών. Σε κάθε τρυβλίο μετά την επώαση υπήρχαν περίπου 50 άσπρες και 30 μπλε αποικίες. Ωστόσο πριν προχωρήσουμε στην κατασκευή 16S rRNA βιβλιοθηκών, ήταν απαραίτητο να ελέγξουμε ενδεικτικά κάποιες από τις άσπρες αποικίες για να είμαστε βέβαιοι πως είχαν το ένθεμα. Για να γίνει αυτό χρησιμοποιήσαμε 2 τρόπους. Ο πρώτος ήταν να κάνουμε Colony PCR με τους εκκινητές που είχαμε χρησιμοποιήσει

για την αρχική ενίσχυση. Ο δεύτερος ήταν να απομονώσουμε τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια από τους τυχαίους κλώνους και να κάνουμε πέψη με ένα ένζυμο περιορισμού. Τα αποτελέσματα της πέψης με *EcoRI* ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που περιείχαν βακτηριακό ένθεμα φαίνονται στην **Εικόνα 15**. Αξίζει να σημειωθεί πως το πρότυπο ζωνών διαφέρει από κλώνο σε κλώνο, γεγονός που καταδεικνύει ποικιλότητα. Αντίθετα στην περίπτωση των Αρχαίων οι κλώνοι που ελέγχθηκαν περιείχαν το ένθεμα, αλλά το πρότυπο ζωνών τους μετά την πέψη με *EcoRI* ήταν κοινό [**Εικ. 16**]. Η παραπάνω διαδικασία ακολουθήθηκε και για την Gradient PCR Βακτηρίων και Αρχαίων.



Εικόνα 15: Πέψη 6 τυχαίων ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που έφεραν το βακτηριακό 16S rRNA. Διακρίνουμε το γραμμικό πλασμίδιο (3.5kb) και πιο χαμηλά τα διάφορα πρότυπα ζωνών του ενθέματος.



Εικόνα 16: Πέψη 4 τυχαίων ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που έφεραν το 16S rRNA των Αρχαίων. Διακρίνουμε το γραμμικό πλασμίδιο (3.5kb) και τις ζώνες του ενθέματος (~1400bp).

4.4 Φυλογενετική ανάλυση κλώνων με εργαλεία βιοπληροφορικής

4.4.1 Επεξεργασία αλληλουχιών

Ο αριθμός των κλώνων που εστάλησαν για αλληλούχηση ήταν:

- 144 για τα Βακτήρια (βιβλιοθήκη BAC)
- 104 για τα Αρχαία (βιβλιοθήκη AR)

Η αλληλούχηση έγινε με έναν εκκινητή (T7) και προέκυψαν τμήματα DNA από 550-700bp. Το πρώτο στάδιο της επεξεργασίας των αλληλουχιών ήταν να αφαιρεθεί το πλασμιδιακό κομμάτι και να αξιολογηθεί η ποιότητα της αλληλούχησης. Εξετάζοντας το χρωματογράφημα κάθε αλληλουχίας απορρίφθηκαν 20 κλώνοι από την βακτηριακή βιβλιοθήκη και 13 από την βιβλιοθήκη των Αρχαίων.

4.4.2 Bellerophon

Οι αλληλουχίες που συγκεντρώσαμε μετατράπηκαν σε ένα ενιαίο αρχείο fasta (προέκταση .fasta) για να μπορέσουμε να ελέγξουμε αν κάποιες από αυτές είναι χιμαιρικές. Οι χιμαιρικές αλληλουχίες δημιουργούνται συνήθως από δύο φυλογενετικά απομακρυσμένες πατρικές αλληλουχίες. Κατά τη διαδικασία της PCR είναι δυνατόν ένα πρόωρα τερματισμένο αντίγραφο να επαναυβριδοποιηθεί σε ένα "ξένο" DNA κλώνο και να ολοκληρωθεί η αντιγραφή του στους επόμενους κύκλους, βασιζόμενη στην δεύτερη πατρική αλληλουχία. Το σημείο στο οποίο η χιμαιρική αλληλουχία αλλάζει από τη μια πατρική στην άλλη ονομάζεται "σημείο τομής" (breakpoint). Οι χίμαιρες πρέπει να αφαιρούνται από τις μελέτες μικροβιακών κοινοτήτων γιατί αντιπροσωπεύουν μη-υπάρχοντες οργανισμούς.

Το πρόγραμμα "Bellerophon" υποδεικνύει πιθανές χίμαιρες 16S rDNA αλληλουχιών, οι οποίες όμως είναι απαραίτητο να ελεγχθούν κατόπιν, για να διαπιστωθεί αν πρόκειται όντως για χιμαιρικές αλληλουχίες. Η ανίχνευση των χιμαιρικών αλληλουχιών βασίζεται στον υπολογισμό των φυλογενετικών αποστάσεων των αλληλουχιών. Οι αποστάσεις υπολογίζονται για όλα τα ζεύγη αλληλουχιών και αναφέρονται στα τμήματα που βρίσκονται αριστερά και δεξιά ενός υποθετικού σημείου τομής. Η ολική διακύμανση των μητρών των αποστάσεων (distance matrices) για n αλληλουχίες δίνεται από τον τύπο:

$$dme = \sum_i^n \sum_j^n \left| dm^{\text{left}}[i][j] - dm^{\text{right}}[i][j] \right|$$

όπου η τιμή $dm[i][j]$ υποδηλώνει την απόσταση μεταξύ των αλληλουχιών i και j .

Για να βρούμε την αλληλουχία με την μεγαλύτερη συμβολή στην τιμή dme , υπολογίζουμε τον λόγο της dme τιμής όλων των

αλληλουχιών της βιβλιοθήκης προς την *dme* τιμή μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας (π.χ. της *i*).

Ο παραπάνω λόγος ονομάζεται *preference score* και εκφράζεται ως εξής:

$$\text{preference}[i] = \frac{\text{dme}}{\text{dme}[i]}$$

Όταν η τιμή του *preference score* είναι >1 , τότε υποδεικνύεται η ύπαρξη πιθανής χίμαιρας. Οι τιμές των *preference scores* εξαρτώνται από το σύνολο των δεδομένων που εξετάζουμε και μπορούν να συγκριθούν μόνο μεταξύ αυτών των δεδομένων.

Για να ελέγξουμε τις υποδεικνυόμενες χίμαιρες, χωρίζουμε την αλληλουχία στο σημείο τομής (breakpoint) που δίνει η ανάλυση. Στη συνέχεια ελέγχουμε ξεχωριστά τα δύο κομμάτια με το RDP Classifier και το RDP SeqMatch. Αν τα αποτελέσματα συμπίπτουν με το αποτέλεσμα που προκύπτει από ολόκληρη την αλληλουχία, τότε δεν πρόκειται για χίμαιρα. Στην αντίθετη περίπτωση η αλληλουχία αφαιρείται από την ανάλυση.

Η ανάλυση των 124 αλληλουχιών βακτηριακού 16S rDNA που έγινε με το συγκεκριμένο πρόγραμμα υπέδειξε 34 χίμαιρες. Ωστόσο, όταν αυτές ελέγχθηκαν διαπιστώθηκε πως μόνο μία ήταν στην πραγματικότητα χιμαιρική (κλώνος 20110726DS23P1_G03) και αφαιρέθηκε από τις περαιτέρω αναλύσεις.

Όσον αφορά τις 16S rDNA αλληλουχίες των Αρχαίων υποδείχθηκαν 5 αλληλουχίες, από τις οποίες όμως καμία δεν ήταν πραγματικά χιμαιρική. Έτσι στις υπόλοιπες αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν και οι 91 αλληλουχίες.

4.4.3 Ribosomal Database Project (RDP) και BLAST

Όλες οι αλληλουχίες Βακτηρίων και Αρχαίων αναλύθηκαν μία προς μία με τα προγράμματα RDP και BLAST. Με βάση τα αποτελέσματα που πήραμε από το RDP, η βιβλιοθήκη BAC περιείχε

βακτήρια 4 διαφορετικών κλάσεων: α-, β-, γ-πρωτεοβακτήρια και *Sphingobacteria*. Στον Πίνακα 18 φαίνεται αναλυτικά ο αριθμός των κλώνων που αντιστοιχεί σε κάθε κλάση. Παρατηρούμε ότι ο αριθμός των κλώνων που ανήκουν στα β-πρωτεοβακτήρια είναι κατά πολύ μεγαλύτερος συγκριτικά με τις τρεις άλλες κλάσεις που εντοπίστηκαν. Χρησιμοποιώντας το RDP Classifier καταφέραμε να ταυτοποιήσουμε σε επίπεδο γένους 90 από αυτούς τους κλώνους, ενώ οι υπόλοιποι ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο τάξης (7 κλώνοι), οικογένειας (12 κλώνοι) ή απλά κλάσης (14 κλώνοι).

Πίνακας 18: Αριθμός κλώνων της βιβλιοθήκης BAC που αντιστοιχούν στην κάθε κλάση

ΚΛΑΣΗ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΛΩΝΩΝ
A-πρωτεοβακτήρια	29
B- πρωτεοβακτήρια	89
Γ- πρωτεοβακτήρια	2
<i>Sphingobacteria</i>	3

Όσον αφορά τους κλώνους που ταυτοποιήθηκαν μόνο σε επίπεδο οικογένειας, αυτοί ομαδοποιούνται στις εξής κατηγορίες: *Rhodocyclaceae*, *Erythrobacteraceae*, *Methylophilaceae*, *Comamonadaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Hydrogenophilacea*, *Sphingomonadaceae*. Ο κοντινότερος συγγενής τους, καθώς και το ποσοστό ταυτοποίησής τους με βάση το BLAST φαίνονται στον Πίνακα 19. Οι βακτηριακές οικογένειες που εντοπίστηκαν ανήκουν στα α-, β- και γ-πρωτεοβακτήρια, ενώ καμία από αυτές δεν ανήκει στα *Sphingobacteria*.

Στη συνέχεια της ανάλυσής μας θελήσαμε να καταγράψουμε τους κλώνους που ταυτοποιούνται σε επίπεδο γένους. Τα γένη που εντοπίσαμε στην BAC βιβλιοθήκη ήταν τα ακόλουθα: *Herbaspirillum* sp., *Curvibacter* sp., *Methylothenera* sp., *Polaromonas* sp., *Rhizobium* sp., *Methylophilus* sp., *Devosia* sp., *Pseudolabrys* sp., *Asticcacaulis* sp., *Algoriphagus* sp., *Pedobacter* sp.

Τα γένη *Devosia* sp., *Asticcacaulis* sp., *Rhizobium* sp., *Pseudolabrys* sp. ανήκουν στα α-πρωτεοβακτήρια, ενώ το *Pedobacter* sp. και το *Algoriphagus* sp. ανήκουν στα *Sphingobacteria*. Παρατηρούμε πως η πλειοψηφία των διαφορετικών γενών ανήκουν στα β-πρωτεοβακτήρια και συγκεκριμένα πρόκειται για τα *Methylothenera* sp., *Polaromonas* sp., *Curvibacter* sp., *Methylophilus* sp., *Herbaspirillum* sp. Να σημειωθεί πως οι κλώνοι των γ-πρωτεοβακτηρίων δεν μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν πέρα από το επίπεδο κλάσης. Στον Πίνακα 20 φαίνεται ο αριθμός των κλώνων που ανήκουν στο κάθε γένος, το μέγιστο ποσοστό κάλυψης της αλληλουχίας και τέλος το μέγιστο ποσοστό ομοιότητάς τους με αλληλουχίες του BLAST.

Πίνακας 19: Στον πίνακα φαίνονται οι βακτηριακές οικογένειες που ταυτοποιήθηκαν, ο κοντινότερος συγγενής τους με βάση το BLAST, ο αριθμός πρόσβασής τους στην βάση GenBank (accession number) και το ποσοστό ομοιότητάς τους με βάση το BLAST.

Βακτηριακές Οικογένειες	ΚΟΝΤΙΝΟΤΕΡΟΣ ΣΥΓΓΕΝΗΣ (BLAST)	GENBANK ACCESSION NUMBER	IDENTITY (%)
<i>Rhodocyclaceae</i>	Uncultured <i>Rhodocyclaceae</i> bacterium	FM207949.1	99
<i>Erythrobacteraceae</i>	Uncultured alpha proteobacterium clone	DQ811848.1	97
<i>Methylophilaceae</i>	Uncultured soil bacterium clone	FJ444667.1	99
<i>Comamonadaceae</i>	Uncultured bacterium clone	JF697359.1	99
<i>Oxalobacteraceae</i>	Uncultured bacterium clone	GQ263842.1	98
<i>Hydrogenophilaceae</i>	<i>Sulfuricella</i> sp.	AB506456.1	98
<i>Sphingomonadaceae</i>	Uncultured <i>Sphingomonadaceae</i> bacterium	JN679131.1	97

Πίνακας 20: Ο αριθμός των κλώνων που αντιπροσωπεύουν κάθε γένος, το μέγιστο ποσοστό κάλυψης της αλληλουχίας τους με βάση το BLAST και το μέγιστο ποσοστό ομοιότητάς τους με αλληλουχίες της βάσης δεδομένων BLAST.

Βακτηριακά Γένη	ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΛΩΝΩΝ	Κάλυψη αλληλουχίας (%)	IDENTITY (%)
<i>Methylothera</i> sp.	26	100	97
<i>Herbaspirillum</i> sp.	16	100	99
<i>Methylophilus</i> sp.	13	100	98
<i>Polaromonas</i> sp.	12	99	98
<i>Curvibacter</i> sp.	7	98	99
<i>Rhizobium</i> sp.	6	100	99
<i>Asticcacaulis</i> sp.	3	99	99
<i>Algoriphagus</i> sp.	2	99	98
<i>Devosia</i> sp.	2	99	99
<i>Pedobacter</i> sp.	1	100	98
<i>Pseudolabrys</i> sp.	1	99	97

Το *Methylothera* sp. αποτελείται από Gram αρνητικά βακτήρια ραβδοειδούς μορφής. Τα βακτήρια αυτού του γένους είναι μεθυλότροφα και χρησιμοποιούν τη μεθυλαμίνη και τη μεθανόλη σαν μοναδικές πηγές άνθρακα, αζώτου και ενέργειας (Chistoserdova 2011; Kalyuzhnaya et al. 2006). Η απομόνωσή τους έχει γίνει κυρίως από λίμνες γλυκού νερού (Chistoserdova 2011).

Το *Herbaspirillum* sp. ανήκει στα β-πρωτεοβακτήρια, μια κλάση που εμπεριέχει πολλά βακτήρια που σχετίζονται με τα φυτά. Έχει απομονωθεί κυρίως από φυτικό ιστό και ειδικότερα από ρίζες, μίσχους και κορμούς δέντρων (π.χ. μπανάνα, ψυχανθή φυτά, κλπ.) και ανήκει στα Gram αρνητικά βακτήρια (Rothballer et al. 2006). Τα περισσότερα μέλη του *Herbaspirillum* sp. είναι νιτροποιητικά και αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες από 25-34°C και σε pH από 5.3-8 (Rothballer et al. 2006; Rosconi et al. 2006).

Το *Methylophilus* sp. αποτελείται από αερόβια Gram αρνητικά βακτήρια. Ανήκει και αυτό το γένος στα μεθυλότροφα, όπως και το *Methylotenera* sp. και χρησιμοποιεί την μεθανόλη, και ενδεχομένως και τη μεθουλαμίνη, ως πηγές άνθρακα και ενέργειας (Jenkins et al. 1987). Το *Methylophilus* sp. έχει απομονωθεί από ποτάμια, λίμνες, αλλά και από τη ριζόσφαιρα διάφορων φυτών, όπως το ρύζι (Madhaiyan et al. 2009; Jenkins et al. 1987).

Τα μέλη του γένους *Polaromonas* sp. είναι Gram αρνητικά, χημειοργανότροφα βακτήρια. Αναπτύσσονται μόνο σε αερόβιες συνθήκες και η μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης των μέχρι τώρα γνωστών ειδών είναι 15°C (ψυχρόφιλα) (Irgens et al. 1996). Βακτήρια του γένους *Polaromonas* sp. έχουν απομονωθεί από θαλάσσιες περιοχές της Ανταρκτικής, αλλά και από παγετώνες των Άλπεων (Irgens et al. 1996; Margesin et al. 2011).

Τα στελέχη του *Curvibacter* sp. είναι Gram αρνητικά βακτήρια, που αναπτύσσονται σε αεροβικές ή μικροαεροβικές συνθήκες. Το κυτταρικό τους σχήμα είναι ραβδοειδές και ελαφρώς κυρτό και οι θερμοκρασίες ανάπτυξής τους είναι από 25-30°C (Ding & Yokota 2010). Μέχρι στιγμής έχουν απομονωθεί από πηγές γλυκού νερού (Ding & Yokota 2004).

Το *Rhizobium* sp. είναι ένα γένος Gram αρνητικών βακτηρίων, που ανήκουν στην κατηγορία των νιτροποιητικών (Djordjevic et al. 1987). Εντοπίζονται στις ρίζες ψυχανθών φυτών και αναπτύσσονται σε αερόβιες συνθήκες (Chen et al. 1991).

Το γένος *Asticcacaulis* sp. περιλαμβάνει και αυτό Gram αρνητικά, αερόβια και ψυχρόφιλα βακτήρια (Liu et al. 2005). Μέχρι στιγμής έχουν χαρακτηριστεί ελάχιστα είδη του συγκεκριμένου γένους και έχουν εντοπιστεί σε λίμνες γλυκού νερού, αλλά και στο έδαφος (Vasilyeva et al. 2006).

Το γένος *Algoriphagus* sp. περιλαμβάνει βακτήρια που είναι Gram αρνητικά, αερόβια και ψυχρόφιλα (Van Trappen et al. 2004). Έχουν κι αυτά ραβδοειδές σχήμα και έχουν απομονωθεί από θαλάσσιες περιοχές, λίμνες, θαλάσσια φύκη και πάγους της Ανταρκτικής (Nedashkovskaya et al. 2004).

Τα μέλη του γένους *Devosia* sp. είναι Gram αρνητικά, αυστηρώς αερόβια βακτήρια. Έχουν ραβδοειδές σχήμα, αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες από 25-30°C και έχουν απομονωθεί κατά κύριο λόγο από το έδαφος (Yoon et al. 2007). Το 2010 ένα νέο είδος *Devosia* απομονώθηκε από ψυχανθή φυτά και ονομάστηκε *Devosia yakushimensis* (Bautista et al. 2010)

Το γένος *Pedobacter* sp. ανήκει στα *Sphingobacteria* και εμπεριέχει βακτήρια που είναι Gram αρνητικά, ψυχρόφιλα και αναπτύσσονται μόνο σε αερόβιες συνθήκες (Ten et al. 2006). Τα μέλη του έχουν απομονωθεί από το έδαφος, από παγετώνες των Άλπεων, αλλά και από ψάρια (Ten et al. 2006; Margesin et al. 2003).

Το γένος *Pseudolabrys* sp. ανήκει στα α-πρωτεοβακτήρια και τα μέλη του είναι Gram αρνητικά αερόβια. Μέχρι στιγμής έχει χαρακτηριστεί μόνο το είδος *Pseudolabrys taiwanensis*, το οποίο απομονώθηκε από το έδαφος (Kämpfer et al. 2006).

Η ανάλυση της AR βιβλιοθήκης (Αρχαία) έδειξε την ύπαρξη κλώνων που ομαδοποιούνται σε δύο βασικά φύλα: τα *Crenarchaeota* και τα *Euryarchaeota*. Συγκεκριμένα, 54 κλώνοι ανήκουν στα *Crenarchaeota*, ενώ οι υπόλοιποι 37 ανήκουν στα *Euryarchaeota*. Σε αντίθεση με την BAC βιβλιοθήκη, από το σύνολο των 91 κλώνων μόνο οι 6 ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο γένους και πιο συγκεκριμένα ανήκουν στο γένος *Methanotorris* sp. (*Euryarchaeota*). Οι υπόλοιποι ταυτοποιήθηκαν είτε σε επίπεδο κλάσης (*Thermoprotei* ή *Methanococci*), είτε σε επίπεδο τάξης (*Thermoproteales*, *Desulfurococcales*, *Methanococcales*). Αξίζει να σημειωθεί πως πάνω από το 50% (49 κλώνοι) κατατάχθηκαν στην κλάση *Thermoprotei*. Τα αποτελέσματα του BLAST σχετικά με τον κοντινότερο συγγενή όλων των κλώνων της βιβλιοθήκης υπέδειξαν στελέχη Αρχαίων που δεν έχουν καλλιεργηθεί (“uncultured archaeon clone”).

Πίνακας 21: Κατάταξη των κλώνων Αρχαίων που εντοπίστηκαν στην AR βιβλιοθήκη μετά την ανάλυση με το RDP Classifier.

ΦΥΛΟ	ΚΛΑΣΗ	ΤΑΞΗ	ΓΕΝΟΣ
<i>Crenarchaeota</i>	<i>Thermoprotei</i>	<i>Thermoproteales</i>	-
<i>Crenarchaeota</i>	<i>Thermoprotei</i>	<i>Desulfurococcales</i>	-
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanococci</i>	<i>Methanococcales</i>	<i>Methanotorris</i> sp.

Όλα τα μέλη των *Crenarchaeota* είναι θερμοφιλοι ή υπερθερμόφιλοι οργανισμοί που έχουν απομονωθεί από ηπειρωτικά ή υποθαλάσσια υδροθερμικά συστήματα (Burggraf et al. 1997). Τα Αρχαία που ανήκουν στην τάξη των *Thermoproteales* έχουν ραβδωτό, δισκοειδές ή σφαιρικό σχήμα. Επιπλέον είναι αυστηρώς αναερόβια και αναπτύσσονται σε ουδετερόφιλα ή οξεόφιλα περιβάλλοντα (Zillig et al. 1981; Ramos-Vera et al. 2009). Είναι χημειολιθότροφοι οργανισμοί και χρησιμοποιούν το CO₂ σαν πηγή άνθρακα (Ramos-Vera et al. 2009). Η τάξη των *Desulfurococcales* περιέχει Αρχαία που έχουν κοκκώδες ή ραβδοειδές σχήμα και μπορούν να είναι είτε αερόβια, είτε αναερόβια. Η θερμοκρασία ανάπτυξής τους κυμαίνεται από 85-100°C και είναι και αυτοί χημειολιθότροφοι οργανισμοί που χρησιμοποιούν το CO₂ σαν πηγή άνθρακα (Burggraf et al. 1997).

Το άλλο φύλο που εντοπίστηκε στην AR βιβλιοθήκη, τα *Euryarchaeota*, περιλαμβάνουν τα μεθανειογόνα, που παράγουν μεθάνιο, τα αλοβακτήρια, που μπορούν να επιβιώσουν σε ακραίες συγκεντρώσεις άλατος και κάποια υπερθερμόφιλα μέλη που είναι είτε αερόβια, είτε αναερόβια (Leigh et al. 2011). Τα αλοβακτήρια συναντώνται συνήθως σε λίμνες με υψηλή αλατότητα, ενώ τα μεθανειογόνα εντοπίζονται σε ανοξικά περιβάλλοντα (Bowers & Wiegel 2011). Είναι αξιοσημείωτο πως τα μεθανειογόνα Αρχαία μπορούν να μετατρέψουν σε μεθάνιο τουλάχιστον 10 διαφορετικά υποστρώματα (π.χ. μεθανόλη, μεθυλαμίνη, οξικό, κλπ.) (Ferry 2011). Παρόλο που έχουν βέλτιστο pH ανάπτυξης περίπου ουδέτερο (~6), ωστόσο υπάρχουν και κάποια που αναπτύσσονται και σε όξινα περιβάλλοντα. Τα Αρχαία του γένους *Methanoterris* sp. είναι υπερθερμόφιλα, αυστηρώς αναερόβια και χρησιμοποιούν διοξείδιο του άνθρακα και υδρογόνο για να τα μετατρέψουν σε μεθάνιο (Takai et al. 2004).

4.4.4 Φυλογενετική ανάλυση BAC βιβλιοθήκης με το Mothur

Η ομοπαράθεση των 123 αλληλουχιών της BAC βιβλιοθήκης έγινε με το αρχείο "silva.bacteria", το οποίο περιέχει 14.956 αλληλουχίες βακτηριακού 16S rRNA. Για την ομοπαράθεση χρησιμοποιήθηκε η εντολή "kmer", βάσει της οποίας η αναζήτηση της «κοντινότερης» αλληλουχίας για κάθε υποψήφια αλληλουχία της βιβλιοθήκης μας γίνεται με τη χρήση 8μερών, καθώς και ο αλγόριθμος "goth", ο οποίος αξιολογεί τις βάσεις που ταιριάζουν με +1, τα mismatch με -1 και τα κενά με -2. Για να συνεχίσουμε την ανάλυση, αφαιρούμε τις αλληλουχίες που έχουν μήκος μικρότερο των 200bp και απομένουν τελικά 73 αλληλουχίες. Στον Πίνακα 22 φαίνονται οι κωδικοί των αλληλουχιών της βιβλιοθήκης BAC, τα ζεύγη βάσεων τους, η αλληλουχία με την οποία έχουν τη μεγαλύτερη ομοιότητα από το αρχείο "silva.bacteria" και τέλος το ποσοστό ομοιότητας των δύο. Παρατηρούμε ότι το μικρότερο ποσοστό ομοιότητας είναι το 88.93, το οποίο αντιπροσωπεύει βακτηριακό κλώνο που δεν έχει καλλιεργηθεί. Αντίθετα το μεγαλύτερο ποσοστό ομοιότητας είναι το 99.82, που αντιπροσωπεύει ομοιότητα σε επίπεδο είδους, αλλά πρόκειται και πάλι για βακτηριακό κλώνο που δεν έχει καλλιεργηθεί.

Στη συνέχεια οι 73 αλληλουχίες ομαδοποιήθηκαν σε Λειτουργικές Ταξινομικές Μονάδες (OTUs). Η Λειτουργική Ταξινομική Μονάδα περιέχει αλληλουχίες που διαφέρουν μεταξύ τους κατά ένα συγκεκριμένο ποσοστό (π.χ. 3%). Για την ομαδοποίηση χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος "average neighbor", η οποία εντοπίζει τις δύο πιο όμοιες αλληλουχίες και τις ομαδοποιεί με βάση τον μέσο όρο των διαφορών που υπάρχουν ανάμεσα σε αυτές και στις υπόλοιπες αλληλουχίες. Η τιμή cutoff που χρησιμοποιήθηκε για τις αποστάσεις μεταξύ των αλληλουχιών ήταν 0.10 (10% διαφορά μεταξύ των αλληλουχιών). Τα OTUs που προέκυψαν για την BAC βιβλιοθήκη ήταν τα 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, καθώς και οι αλληλουχίες που ήταν μοναδικές (unique) μέσα στη βιβλιοθήκη.

Πίνακας 22: Τα αποτελέσματα της ομοπαράθεσης με βάση το αρχείο silva.bacteria. Τα ζεύγη βάσεων αναφέρονται στις αλληλουχίες της βιβλιοθήκης.

Αλληλουχία BAC Βιβλιοθήκης	bp	Αλληλουχία SILVA	Ομοιότητα %
20111216AS1P1_2011-12-21_A01.ab1	601	AY212692.1	95.36
20111216AS73P1_2011-12-21_A10.ab1	666	AF523002.1	97.46
20111216AS81P1_2011-12-21_A11.ab1	629	AY212692.1	96.66
20111216AS9P1_2011-12-21_A02.ab1	603	AY212692.1	95.21
20111216AS49P1_2011-12-21_A07.ab1	609	AF423277.1	89.36
20111216AS65P1_2011-12-21_A09.ab1	613	AY662038.1	99.67
20111216AS2P1_2011-12-21_B01.ab1	632	AY212692.1	95.58
20111216AS74P1_2011-12-21_B10.ab1	561	AF423277.1	89.3
20111216AS82P1_2011-12-21_B11.ab1	614	AY212692.1	95.45
20111216AS90P1_2011-12-21_B12.ab1	557	AF423277.1	89.8
20111216AS10P1_2011-12-21_B02.ab1	683	AY532566.1	99.71
20111216AS18P1_2011-12-21_B03.ab1	616	AY212692.1	95.47
20111216AS34P1_2011-12-21_B05.ab1	630	AF523002.1	97.78
20111216AS3P1_2011-12-21_C01.ab1	613	AY212692.1	95.45
20111216AS75P1_2011-12-21_C10.ab1	570	AY532535.1	99.82
20111216AS83P1_2011-12-21_C11.ab1	616	AY212692.1	95.31
20111216AS19P1_2011-12-21_C03.ab1	631	AB013355.1	96.04
20111216AS51P1_2011-12-21_C07.ab1	602	AY212692.1	94.87
20111216AS59P1_2011-12-21_C08.ab1	595	AY212692.1	95.31
20111216AS76P1_2011-12-21_D10.ab1	624	AB024305.1	97.92
20111216AS84P1_2011-12-21_D11.ab1	644	AY212692.1	95.67
20111216AS12P1_2011-12-21_D02.ab1	617	AB024305.1	98.06
20111216AS28P1_2011-12-21_D04.ab1	656	AF523051.1	98.02
20111216AS52P1_2011-12-21_D07.ab1	662	AM279216.1	96.53
20110726DS74P1_2011-07-28_B10.ab1	615	AF523051.1	97.89
20110726DS76P1_2011-07-28_D10.ab1	550	AB183858.1	99.64
20110726DS77P1_2011-07-28_E10.ab1	506	AB120966.1	99.01
20110726DS79P1_2011-07-28_G10.ab1	603	AF523051.1	97.84
20110726DS83P1_2011-07-28_C11.ab1	514	AY532535.1	99.42
20110726DS84P1_2011-07-28_D11.ab1	508	AB024305.1	98.23
20110726DS86P1_2011-07-28_F11.ab1	581	AY212692.1	95.03
20110726DS87P1_2011-07-28_G11.ab1	550	AY212692.1	94.75
20110726DS88P1_2011-07-28_H11.ab1	571	AF423277.1	90.05
20110726DS90P1_2011-07-28_B12.ab1	549	AY212692.1	95.1
20110726DS93P1_2011-07-28_E12.ab1	528	AF423293.1	91.13
20110726DS94P1_2011-07-28_F12.ab1	505	AY328719.1	96.63

20110726DS12P1_2011-07-28_D02.ab1	596	AY532535.1	93.21
20110726DS19P1_2011-07-28_C03.ab1	592	AB013355.1	95.95
20110726DS21P1_2011-07-28_E03.ab1	626	AB183858.1	99.68
20110726DS22P1_2011-07-28_F03.ab1	507	AY532535.1	92.82
20110726DS24P1_2011-07-28_H03.ab1	563	AB013355.1	96.1
20110726DS25P1_2011-07-28_A04.ab1	632	AY212692.1	95.27
20110726DS29P1_2011-07-28_E04.ab1	596	AB186840.1	88.93
20110726DS31P1_2011-07-28_G04.ab1	617	AB024305.1	98.06
20110726DS32P1_2011-07-28_H04.ab1	563	AB024305.1	98.22
20110726DS34P1_2011-07-28_B05.ab1	613	AY212692.1	95.45
20110726DS36P1_2011-07-28_D05.ab1	610	AY212692.1	95.42
20110726DS37P1_2011-07-28_E05.ab1	613	AY212692.1	95.28
20110726DS38P1_2011-07-28_F05.ab1	613	AY212692.1	95.45
20110726DS39P1_2011-07-28_G05.ab1	621	AF523051.1	97.91
20110726DS40P1_2011-07-28_H05.ab1	550	AY212692.1	95.11
20110726DS35P1_2011-07-28_C05.ab1	626	AF523002.1	97.77
20110726DS42P1_2011-07-28_B06.ab1	550	AB120966.1	98.73
20110726DS43P1_2011-07-28_C06.ab1	589	AF523051.1	97.79
20110726DS44P1_2011-07-28_D06.ab1	613	AY212692.1	95.12
20110726DS45P1_2011-07-28_E06.ab1	586	AY212692.1	95.08
20110726DS48P1_2011-07-28_H06.ab1	596	AB013355.1	95.98
20110726DS50P1_2011-07-28_B07.ab1	554	AY532563.1	92.78
20110726DS53P1_2011-07-28_E07.ab1	622	AF523051.1	97.75
20110726DS54P1_2011-07-28_F07.ab1	550	AB120966.1	98.73
20110726DS56P1_2011-07-28_H07.ab1	599	EF540508.1	95.16
20110726DS57P1_2011-07-28_A08.ab1	615	AJ318156.1	92.68
20110726DS58P1_2011-07-28_B08.ab1	632	AB183858.1	99.05
20110726DS59P1_2011-07-28_C08.ab1	615	AF523051.1	97.72
20110726DS61P1_2011-07-28_E08.ab1	550	AY212692.1	95.11
20110726DS62P1_2011-07-28_F08.ab1	634	AF423277.1	89.78
20110726DS63P1_2011-07-28_G08.ab1	550	AY212692.1	95.11
20110726DS64P1_2011-07-28_H08.ab1	610	AF423277.1	89.38
20110726DS65P1_2011-07-28_A09.ab1	612	AY212692.1	95.12
20110726DS66P1_2011-07-28_B09.ab1	645	AY212692.1	95.67
20110726DS68P1_2011-07-28_D09.ab1	552	AY188320.1	96.93
20110726DS70P1_2011-07-28_F09.ab1	615	AB024305.1	98.05
20110726DS72P1_2011-07-28_H09.ab1	579	X67228.1	98.1

Επιπλέον με βάση τις γενετικές αποστάσεις των αλληλουχιών υπολογίστηκε ο βαθμός κάλυψης της βιβλιοθήκης, καθώς και οι δείκτες ποικιλότητας Chao1, και Shannon index (H').

Το ποσοστό κάλυψης της βιβλιοθήκης "Good's C" υπολογίζεται με βάση τον τύπο $[1-(n_1/N)]$, όπου n_1 είναι ο αριθμός των OTUs που αντιπροσωπεύονται από έναν μόνο κλώνο της βιβλιοθήκης και N είναι ο συνολικός αριθμός των κλώνων που εξετάζονται (73 στην περίπτωση της BAC βιβλιοθήκης) (Chao 1984).

Ο δείκτης ποικιλότητας Chao1 υπολογίζεται με βάση τον τύπο $S_{Chao1} = S_{obs} + n_1(n_1 - 1) / 2(n_2 + 1)$, όπου S_{obs} είναι ο αριθμός των παρατηρούμενων OTUs, n_1 ο αριθμός των OTUs που έχουν μόνο μία αλληλουχία και n_2 ο αριθμός των OTUs που έχουν μόνο δύο αλληλουχίες (Chao 1987). Ο υπολογισμός του δείκτη ποικιλότητας Chao1 γίνεται με διάστημα εμπιστοσύνης 95% (confidence interval, CI).

Ο δείκτης Shannon index (H') υπολογίζει την ποικιλότητα των ειδών, λαμβάνοντας υπόψη τη σχετική αφθονία των ειδών που υπάρχουν στη βιβλιοθήκη. Υψηλές τιμές του δείκτη H' καταδεικνύουν ποικιλότητα της βιβλιοθήκης, ενώ τιμή 0 του δείκτη αντιπροσωπεύει μια βιβλιοθήκη με ένα μόνο είδος.

Στον Πίνακα 23 φαίνονται τα OTUs που προέκυψαν για την BAC βιβλιοθήκη, ο αριθμός των OTUs που αντιπροσωπεύονται μόνο από μία αλληλουχία (singletons) και τέλος ο αριθμός των OTUs που αντιπροσωπεύονται μόνο από δύο αλληλουχίες (doubletons).

Στον Πίνακα 24 παρατίθενται οι τιμές των δεικτών ποικιλότητας και το ποσοστό κάλυψης της βιβλιοθήκης που προέκυψαν για κάθε OTU. Παρατηρούμε ότι στην περίπτωση του 0.03, δηλαδή για αλληλουχίες που είναι ομαδοποιούνται σε επίπεδο γένους (97% ομοιότητα) το ποσοστό κάλυψης της βιβλιοθήκης είναι 89% και οι δείκτες Chao1 και Shannon H' έχουν τιμές 31 και 2.23, αντίστοιχα.

Πίνακας 23: Τα OTUs των 73 αλληλουχιών της BAC βιβλιοθήκης. Στη δεύτερη στήλη φαίνεται ο αριθμός των OTUs που αντιπροσωπεύονται από έναν κλώνο της βιβλιοθήκης και στην τρίτη στήλη ο αριθμός των OTUs που αντιπροσωπεύονται από δύο κλώνους.

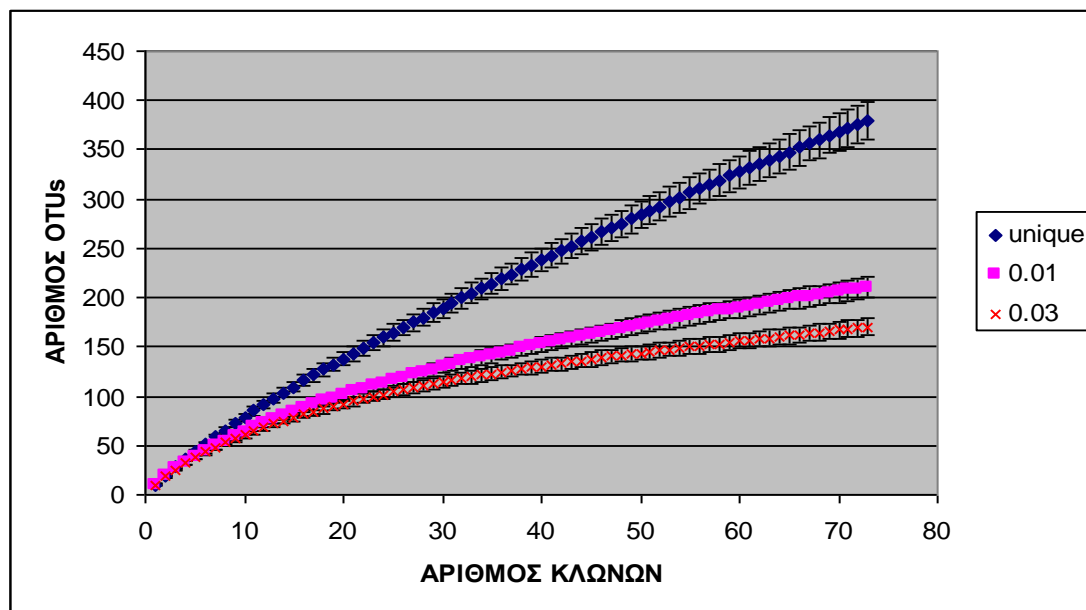
OTUs	Singletons	Doubletons
unique	29	5
0.01	11	3
0.02	9	1
0.03	8	1
0.04	8	0
0.05	8	0
0.06	8	0

Πίνακας 24: Στον πίνακα φαίνεται το ποσοστό κάλυψης της BAC βιβλιοθήκης για όλα τα OTUs, καθώς επίσης και οι δείκτες ποικιλότητας Chao1 και Shannon H'.

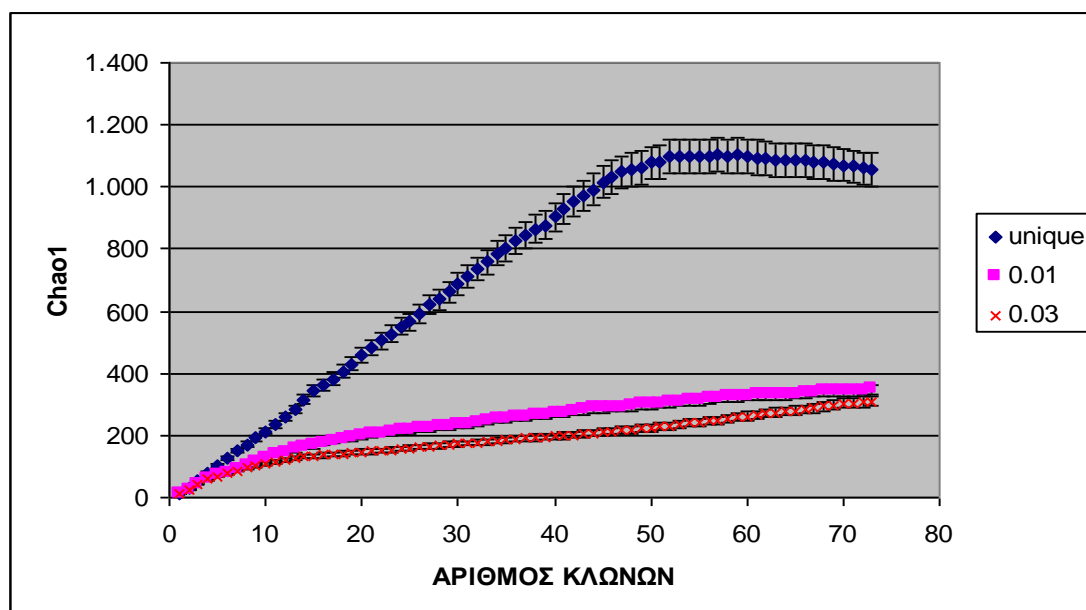
OTUs	Coverage %	Chao1	Shannon H'
unique	60.2	105.6	3.13
0.01	84.9	34.75	2.38
0.02	87.6	36	2.27
0.03	89	31	2.23
0.04	89	44	2.18
0.05	89	43	2.10
0.06	89	42	1.95

Για να ολοκληρωθεί η φυλογενετική ανάλυση της BAC βιβλιοθήκης κατασκευάσαμε τις καμπύλες "rarefaction" και του δείκτη ποικιλότητας Chao1. Η rarefaction καμπύλη συσχετίζει τον αριθμό των κλώνων της βιβλιοθήκης που μελετήσαμε με τον αριθμό των παρατηρούμενων OTUs. Στην **Εικόνα 17** φαίνονται οι δύο καμπύλες, που δημιουργήθηκαν με διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

A.



B.



Εικόνα 17: A. Καμπύλη rarefaction **B.** Καμπύλη του δείκτη ποικιλότητας Chao1 για τις 73 αλληλουχίες της BAC βιβλιοθήκης. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

4.4.5 Φυλογενετική ανάλυση AR βιβλιοθήκης με το Mothur

Η ομοπαράθεση των 91 αλληλουχιών της AR βιβλιοθήκης έγινε με το αρχείο "silva.archaea", το οποίο περιέχει 2.297 αλληλουχίες 16S rRNA Αρχαίων. Όπως και στην BAC βιβλιοθήκη, χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος "gotoh" και η εντολή "kmer", ενώ μετά το πέρας της ομοπαράθεσης αφαιρέσαμε και πάλι τις αλληλουχίες που είχαν μήκος μικρότερο των 200bp. Οι 54 αλληλουχίες που απέμειναν, καθώς και το ποσοστό ομοιότητάς τους με αλληλουχίες του αρχείου "silva.archaea" φαίνονται στον Πίνακα 25. Τα ποσοστά ομοιότητας δεν ξεπερνούν το 94.5%, ενώ τα μήκη των αλληλουχιών κυμαίνονται από 500-650 ζεύγη βάσεων. Στη συνέχεια οι 54 αλληλουχίες ομαδοποιήθηκαν σε Λειτουργικές Ταξινομικές Μονάδες (OTUs) και προέκυψαν τα εξής OTUs: 0.01, 0.02, 0.03, 0.06, καθώς και οι αλληλουχίες που ήταν μοναδικές (unique) μέσα στη βιβλιοθήκη. Τέλος υπολογίσαμε και σε αυτή την περίπτωση τον βαθμό κάλυψης της βιβλιοθήκης, καθώς και τους δείκτες ποικιλότητας Chao1, και Shannon index (H').

Στον Πίνακα 26 φαίνονται συγκεντρωτικά τα OTUs που προέκυψαν για την AR βιβλιοθήκη, ο αριθμός των OTUs που αντιπροσωπεύονται μόνο από μία αλληλουχία (singletons) και τέλος ο αριθμός των OTUs που αντιπροσωπεύονται μόνο από δύο αλληλουχίες (doubletons).

Στον Πίνακα 27 παρατίθενται οι τιμές των δεικτών ποικιλότητας και το ποσοστό κάλυψης της βιβλιοθήκης που προέκυψαν για κάθε OTU. Παρατηρούμε ότι στην περίπτωση του 0.03, δηλαδή για αλληλουχίες που είναι ομαδοποιούνται σε επίπεδο γένους (97% ομοιότητα) το ποσοστό κάλυψης της βιβλιοθήκης είναι 92.6% και οι δείκτες Chao1 και Shannon H' έχουν τιμές 15 και 1.7, αντίστοιχα.

Τέλος κατασκευάσαμε την καμπύλη "rarefaction" και την καμπύλη του δείκτη ποικιλότητας Chao1, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 18**. Οι δύο καμπύλες δημιουργήθηκαν με διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

Πίνακας 25: Τα αποτελέσματα της ομοπαράθεσης με βάση το αρχείο silva.archaea. Τα ζεύγη βάσεων αναφέρονται στις αλληλουχίες της βιβλιοθήκης.

Αλληλουχία AR βιβλιοθήκης	bp	Αλληλουχία SILVA	Ομοιότητα %
20111109GS10P1_2011-11-15_B02.ab1	614	FJ821636.1	93.32
20111109GS11P1_2011-11-15_C02.ab1	650	AB050213.1	87.44
20111109GS12P1_2011-11-15_D02.ab1	641	EU559699.1	90.81
20111109GS16P1_2011-11-15_H02.ab1	610	EU155994.1	93.28
20111109GS17P1_2011-11-15_A03.ab1	591	AB050223.1	94.25
20111109GS18P1_2011-11-15_B03.ab1	598	AB050223.1	94.48
20111109GS19P1_2011-11-15_C03.ab1	615	EU155995.1	93.66
20111109GS2P1_2011-11-15_B01.ab1	583	AB050223.1	94.17
20111109GS22P1_2011-11-15_F03.ab1	580	EU155995.1	93.97
20111109GS24P1_2011-11-15_H03.ab1	574	AB050223.1	94.43
20111109GS25P1_2011-11-15_A04.ab1	615	AB262704.1	92.2
20111109GS27P1_2011-11-15_C04.ab1	588	EU155994.1	93.03
20111109GS32P1_2011-11-15_H04.ab1	577	AB050223.1	94.11
20111109GS33P1_2011-11-15_A05.ab1	615	AB262704.1	92.68
20111109GS34P1_2011-11-15_B05.ab1	599	AB262704.1	92.32
20111109GS35P1_2011-11-15_C05.ab1	562	AB262704.1	92.53
20111109GS37P1_2011-11-15_E05.ab1	558	FJ649514.1	84.85
20111109GS39P1_2011-11-15_G05.ab1	599	AB262704.1	92.49
20111109GS40P1_2011-11-15_H05.ab1	543	AB262704.1	92.63
20111109GS43P1_2011-11-15_C06.ab1	590	AB260058.1	87.12
20111109GS44P1_2011-11-15_D06.ab1	585	AB050223.1	94.36
20111109GS46P1_2011-11-15_F06.ab1	525	AB050223.1	93.71
20111109GS47P1_2011-11-15_G06.ab1	609	EU155994.1	93.1
20111109GS48P1_2011-11-15_H06.ab1	579	AB262704.1	92.57
20111109GS7P1_2011-11-15_G01.ab1	593	AB262704.1	92.58
20110726DS1P1_2011-07-28_A01.ab1	596	EU155995.1	93.46
20110726DS2P1_2011-07-28_B01.ab1	594	FJ821636.1	91.76
20110726DS6P1_2011-07-28_F01.ab1	604	FJ821636.1	91.57
20110726DS7P1_2011-07-28_G01.ab1	606	FJ821636.1	91.6
20110726DS8P1_2011-07-28_H01.ab1	583	AB050223.1	94.17
20110930BS49P1_2011-10-05_A07.ab1	591	AB262704.1	92.55
20110930BS50P1_2011-10-05_B07.ab1	473	AB050223.1	94.5
20110930BS52P1_2011-10-05_D07.ab1	610	AB262704.1	92.79
20110930BS56P1_2011-10-05_H07.ab1	585	AB050223.1	94.19
20110930BS58P1_2011-10-05_B08.ab1	601	EU155994.1	93.34
20110930BS59P1_2011-10-05_C08.ab1	588	EU155995.1	93.88
20110930BS60P1_2011-10-05_D08.ab1	591	AB050223.1	94.59

20110930BS61P1_2011-10-05_E08.ab1	610	AB262704.1	92.79
20110930BS62P1_2011-10-05_F08.ab1	582	AJ937877.1	91.78
20110930BS65P1_2011-10-05_A09.ab1	623	AB050223.1	93.9
20110930BS68P1_2011-10-05_D09.ab1	585	AB050223.1	94.19
20110930BS71P1_2011-10-05_G09.ab1	601	FJ821636.1	93.18
20110930BS73P1_2011-10-05_A10.ab1	610	EU155994.1	93.28
20110930BS74P1_2011-10-05_B10.ab1	524	AB262704.1	93.7
20110930BS75P1_2011-10-05_C10.ab1	591	AB262704.1	92.72
20110930BS79P1_2011-10-05_G10.ab1	582	AB262704.1	92.61
20110930BS80P1_2011-10-05_H10.ab1	629	AB050223.1	94.59
20110930BS81P1_2011-10-05_A11.ab1	561	AB050223.1	94.47
20110930BS83P1_2011-10-05_C11.ab1	591	AB050223.1	94.92
20110930BS84P1_2011-10-05_D11.ab1	562	AB262704.1	92.35
20110930BS85P1_2011-10-05_E11.ab1	606	AB262704.1	92.74
20110930BS89P1_2011-10-05_A12.ab1	592	EU155994.1	94.59
20110930BS90P1_2011-10-05_B12.ab1	601	AJ937877.1	91.53
20110930BS92P1_2011-10-05_D12.ab1	528	AB050223.1	92.05

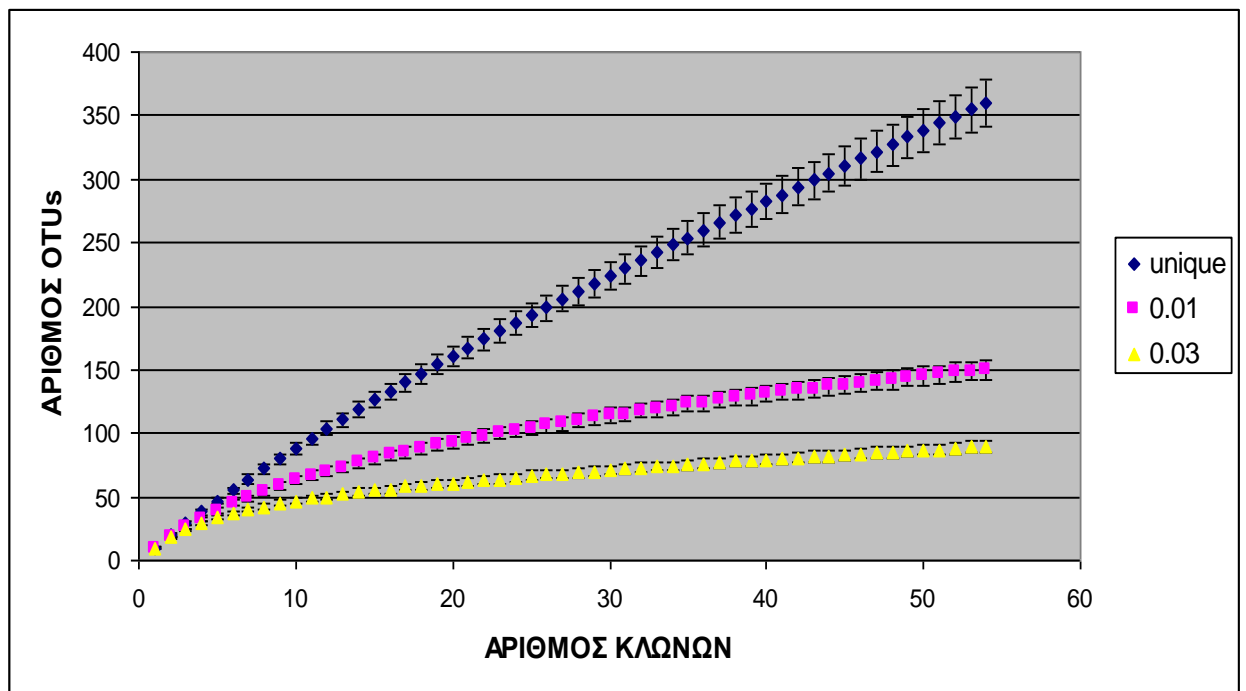
Πίνακας 26: Τα OTUs των 54 αλληλουχιών της AR βιβλιοθήκης. Στη δεύτερη στήλη φαίνεται ο αριθμός των OTUs που αντιπροσωπεύονται από έναν κλώνο της βιβλιοθήκης και στην τρίτη στήλη ο αριθμός των OTUs που αντιπροσωπεύονται από δύο κλώνους.

OTUs	Singletons	Doubletons
unique	29	2
0.01	7	1
0.02	6	0
0.03	4	0
0.05	3	0
0.06	3	0

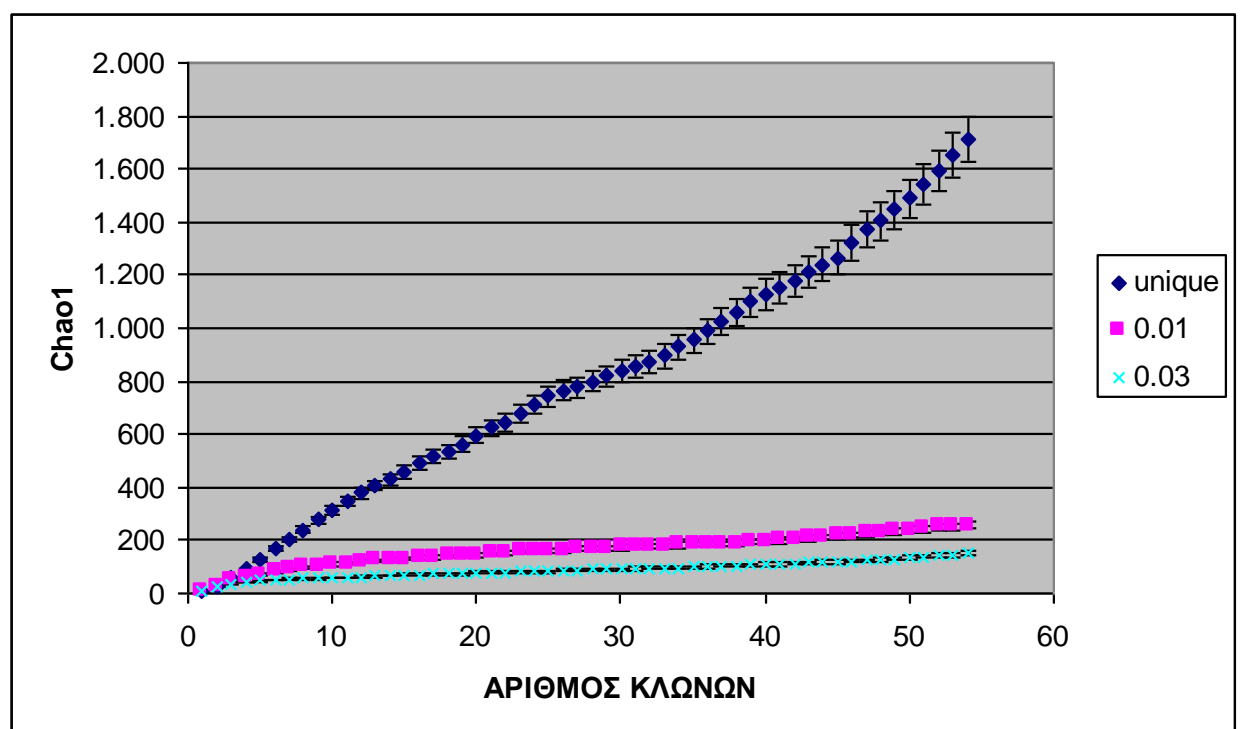
Πίνακας 27: Στον πίνακα φαίνεται το ποσοστό κάλυψης της AR βιβλιοθήκης για όλα τα OTUs, καθώς επίσης και οι δείκτες ποικιλότητας Chao1 και Shannon H'.

OTUs	Coverage %	Chao1	Shannon H'
unique	46.2	171.3	3.34
0.01	87	25.5	2.25
0.02	88.9	27	1.91
0.03	92.6	15	1.7
0.05	94.4	11	1.63
0.06	94.4	10	1.48

A.



B.



Εικόνα 18: A. Καμπύλη *rarefaction* **B.** Καμπύλη του δείκτη ποικιλότητας Chao1 για τις 54 αλληλουχίες της AR βιβλιοθήκης. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μελέτη δείγματος ξύλου από το απολιθωμένο δάσος του Bükkrány έδειξε εκτεταμένα σημάδια βιοαλλοίωσης. Συγκεκριμένα με τη χρήση της οπτικής και της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης εντοπίστηκαν πρότυπα αλλοίωσης που ανήκουν σε βακτήρια διάβρωσης και σε βακτήρια που δημιουργούν σήραγγες. Η κατασκευή των 16S rRNA βιβλιοθηκών κλώνων, τόσο για Βακτήρια όσο και για Αρχαία, μας έδωσε μια πρώτη εικόνα σχετικά με την προκαρυωτική ποικιλότητα του ξύλου. Τα βακτήρια που χαρακτηρίστηκαν σε επίπεδο γένους περιλαμβάνουν ενδοφυτικά και μεθυλότροφα μέλη ή ανήκουν σε γένη που εντοπίζονται σε υδάτινα περιβάλλοντα. Στα ενδοφυτικά, δηλαδή εκείνα που πιθανότατα ανήκουν στη φυσιολογική χλωρίδα του ξύλου και που το είχαν αποικίσει πριν την υπερκάλυψή του από τη λίμνη ανήκουν τα *Herbaspirillum* sp., *Rhizobium* sp., και *Devosia* sp. Τα τρία αυτά γένη εντοπίζονται τόσο σε ρίζες όσο και σε κορμούς δέντρων και η απομόνωσή τους από αρχαίο δείγμα ξύλου έχει αναφερθεί σε προγενέστερες μελέτες (Zhang et al. 2008; Landy et al. 2008). Τα μεθυλότροφα γένη έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν απλές οργανικές ενώσεις (με ένα άτομο άνθρακα), ως πηγή άνθρακα και ενέργειας για την ανάπτυξή τους. Στην 16S rRNA βιβλιοθήκη εντοπίστηκαν δύο γένη μεθυλότροφων: το *Methylothera* sp. και το *Methylophilus* sp. Τα δύο αυτά γένη αναπτύσσονται σε αερόβιες συνθήκες και μπορούν να μεταβολίσουν τη μεθανόλη και τη μεθυλαμίνη εξίσου αποτελεσματικά. Μέχρι στιγμής η απομόνωσή τους έχει γίνει από πηγές γλυκού νερού, γεγονός που σημαίνει πως μάλλον περιλαμβάνονταν στη φυσική χλωρίδα της λίμνης και βρέθηκαν στο ξύλο μετά την άνοδο της στάθμης της. Τα γένη *Polaromonas* sp., *Curvibacter* sp., *Asticcacaulis* sp., *Algoriphagus* sp., έχουν απομονωθεί από υδάτινα περιβάλλοντα, ενώ τα *Pedobacter* sp. και *Pseudolabrys* sp. αναφέρονται στη βιβλιογραφία σαν βακτήρια εδάφους.

Όλα τα παραπάνω γένη είναι Gram αρνητικά και αναπτύσσονται σε αερόβιες συνθήκες, υποδεικνύοντας πως υπήρχαν στο περιβάλλον της λίμνης, αλλά και στο περιβάλλον του ξύλου πριν την δημιουργία των ανοξικών συνθηκών. Η απομόνωση του *Algoriphagus* sp. έχει αναφερθεί ξανά από μελέτες του προγράμματος BACPOLES, που ερευνά την βιοαλλοίωση ιστορικών ξύλινων κτισμάτων που καλύπτονται από νερό στην Ευρώπη (Landy et al. 2008). Επιπλέον στην ίδια μελέτη έχει αναφερθεί και η απομόνωση βακτηρίων που ανήκουν στις οικογένειες *Oxalobacteraceae*, *Rhodocyclaceae*, *Comamonadaceae*, *Erythrobacteraceae* και *Sphingomonadaceae*, όπως και στην περίπτωση της BAC βιβλιοθήκης της παρούσας μελέτης. Βακτήρια που ταυτοποιήθηκαν ως μέλη της οικογένειας *Rhodocyclaceae* εντοπίζονται κυρίως σε υδάτινα περιβάλλοντα και κάποια από αυτά έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε συνθήκες μερικής ή ολικής έλλειψης οξυγόνου (π.χ. *Rhodocyclus tenuis*) (Helms et al. 2004). Τέλος υπάρχουν και 14 κλώνοι της βιβλιοθήκης που ταυτοποιήθηκαν μόνο σε επίπεδο κλάσης και ανήκουν στα α-, β-, και γ-πρωτεοβακτήρια. Υπάρχει περίπτωση να πρόκειται για προκαρυώτες που δεν εξελίχθηκαν σε κάποιο από τα γνωστά μέχρι σήμερα γένη, αλλά αποτελούν ξεχωριστό κλάδο στο φυλογενετικό δέντρο των Βακτηρίων.

Όπως προέκυψε από την ανάλυση των κλώνων, παρατηρούμε πως υπάρχει μεγαλύτερη ποικιλότητα όσον αφορά τα βακτηριακά γένη που αποτελούν τη φυσική χλωρίδα της λίμνης και μικρότερη όσον αφορά τη φυσική χλωρίδα του ξύλου. Αντίθετα ο αριθμός των κλώνων που ανήκουν στα ενδοφυτικά βακτήρια είναι μεγαλύτερος σε σχέση με εκείνον που αντιπροσωπεύουν τα γένη που εντοπίζονται σε πηγές νερού. Από την ομαδοποίηση των 73 αλληλουχιών της BAC βιβλιοθήκης με ποσοστό διαφοράς 3% μεταξύ των αλληλουχιών (διαχωρισμός των κλώνων σε επίπεδο γένους) προέκυψαν 17 OTUs. Από αυτά τα 17 OTUs, τα 8 αντιπροσωπεύονται από έναν μόνο κλώνο και το ποσοστό κάλυψης της βιβλιοθήκης που προκύπτει είναι

89%. Ενώ το ποσοστό κάλυψης είναι ικανοποιητικό, οι δείκτες ποικιλότητας Chao 1 και Shannon index με τιμές 31 και 2.23 αντίστοιχα, υποδηλώνουν μέτρια ποικιλότητα της βιβλιοθήκης.

Τα βακτήρια διάβρωσης που φαίνεται πως είναι τα κύρια υπεύθυνα για την αλλοίωση του ξύλου αντιπροσωπεύουν ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών. Παρ'όλ'αυτά η ομάδα των *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB σύμπλεγμα) φαίνεται πως συγκεντρώνει τις μεγαλύτερες πιθανότητες να ανήκει στα βακτήρια διάβρωσης, όπως προέκυψε από το πρόγραμμα BACPOLES (Klaassen 2005). Για την αλλοίωση του ξύλου σημαντικό ρόλο παίζουν συγκεκριμένες κατηγορίες ενζύμων που έχει το CFB σύμπλεγμα και τέτοια είναι οι κυτταρινάσες (cellulase), λακάσες (laccase), ξυλανάσες (xylanase) και πεκτινάσες (pectinase) (Landy et al. 2008). Οι κυτταρινάσες και οι ξυλανάσες υδρολύουν την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη του ξύλου, οι λακάσες δρουν πάνω σε φαινόλες και αποδομούν τη λιγνίνη και οι πεκτινάσες αποδομούν την πηκτίνη του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος. Επίσης είναι γνωστό πως πολλά από τα βακτήρια που εντοπίζονται στο έδαφος είναι ικανά να διασπούν την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη (Clausen 1996). Παρόλο λοιπόν που τα βακτηριακά γένη που εντοπίσαμε στην 16S rRNA βιβλιοθήκη δεν ανήκουν στο CFB complex, έχουν την ικανότητα να παράγουν τα παραπάνω ένζυμα που διασπούν τα βασικά δομικά συστατικά του ξύλου. Έτσι τα *Herbaspirillum* sp., *Methylothermobacter* sp., *Asticcacaulis* sp., *Polaromonas* sp., *Rhizobium* sp., και *Pedobacter* sp. παράγουν κυτταρινάσες, λακάσες και ξυλανάσες, ενώ τα *Algoriphagus* sp. και *Curvibacter* sp. παράγουν πεκτινάσες και κυτταρινάσες, αντίστοιχα (αναζήτηση με βάση το <http://www.genome.jp/kegg/>). Όπως είναι αναμενόμενο δεν είναι απαραίτητο όλα τα γένη που εντοπίστηκαν να συμμετέχουν στην βιοαλλοίωση του ξύλου, αλλά η παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων από τα προαναφερθέντα τα καθιστά υποψήφια ως βακτήρια διάβρωσης.

Η απομόνωση Αρχαίων από ξύλο δεν έχει αναφερθεί ξανά στο παρελθόν, από όσα μας είναι μέχρι στιγμής γνωστά από την παγκόσμια βιβλιογραφία. Οι κλώνοι που απομονώθηκαν ανήκουν στα φύλα *Crenarchaeota* και *Euryarchaeota*. Το 90% των κλώνων των *Crenarchaeota* (49/54) ανήκουν στα *Thermoprotei*, ενώ 6 κλώνοι από τα *Euryarchaeota* μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν σε επίπεδο γένους (*Methanotorris* sp.). Από την ομαδοποίηση των 54 αλληλουχιών της AR βιβλιοθήκης με ποσοστό διαφοράς 3% μεταξύ των αλληλουχιών (διαχωρισμός των κλώνων σε επίπεδο γένους) προέκυψαν 9 OTUs. Από αυτά τα 9 OTUs, τα 4 αντιπροσωπεύονται από έναν μόνο κλώνο και το ποσοστό κάλυψης της βιβλιοθήκης που προκύπτει είναι 92.6%. Η κάλυψη της βιβλιοθήκης είναι σε αρκετά υψηλό επίπεδο, αλλά η ποικιλότητά της είναι πολύ χαμηλή όπως φαίνεται και από τους δείκτες Chao 1 και Shannon index που έχουν τιμές 15 και 1.7, αντίστοιχα.

Τα μέλη και των δύο φύλων που προαναφέραμε είναι αναερόβια και μπορούν να αναπτυχθούν σε ουδέτερες ή όξινες τιμές pH. Επιπλέον κάποια *Euryarchaeota* είναι μεθανιογόνα, μετατρέποντας σε μεθάνιο τουλάχιστον 10 διαφορετικά υποστρώματα (π.χ. μεθανόλη, μεθυλαμίνη, οξικό, κλπ.). Ένα από αυτά είναι και το *Methanotorris* sp., το οποίο χρησιμοποιεί διοξείδιο του άνθρακα και υδρογόνο για να τα μετατρέψει σε μεθάνιο. Η συνύπαρξη των μεθανιογόνων Αρχαίων και των μεθυλότροφων Βακτηρίων ίσως να υποδηλώνει μια πιθανή σχέση αλληλεπίδρασης μεταξύ τους. Ένα πιθανό σενάριο θα μπορούσε να είναι η παραγωγή μεθανίου από τα μεθανιογόνα Αρχαία και η χρησιμοποίησή του από τα μεθυλότροφα Βακτήρια ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Ενδεχομένως η συνύπαρξή τους να έλαβε χώρα σε κάποια χρονική στιγμή που το περιβάλλον ήταν μικροαερόφιλο, καθώς η μεθανιογένεση γίνεται υπό αναερόβιες συνθήκες, ενώ η μεθυλοτροφία υπό αερόβιες. Ωστόσο η σχέση μεταξύ των δύο και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση είναι κάτι που θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.

Όσον αφορά την ενδεχόμενη συμμετοχή που μπορεί να έχουν τα Αρχαία στην βιοαλλοίωση του ξύλου, αξίζει να αναφέρουμε πως το γένος *Methanotorriss* sp. παράγει κυτταρινάσες και ξυλανάσες (αναζήτηση με βάση το <http://www.genome.jp/kegg/>). Επιπλέον σε πρόσφατη έρευνα επετεύχθη η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός μιας κυτταρινάσης που παράγεται από υπερθερμόφιλα Αρχαία (Graham et al. 2011). Η συγκεκριμένη κυτταρινάση μπορεί να διασπά κρυσταλλική κυτταρίνη, ενώ είναι ενεργή ακόμα και σε θερμοκρασίες άνω των 90°C. Η παραγωγή αυτών των ενζύμων από τα Αρχαία ίσως να συμβάλλει σε περαιτέρω αποικοδόμηση και καταστροφή του οργανικού ξυλώδους ιστού, αλλά μπορεί και να αποτελεί μια πιθανή εξήγηση για το πώς αποίκησαν τα συγκεκριμένα Αρχαία τον κορμό του δέντρου.

Τα αποτελέσματα που προαναφέραμε αποτελούν ένα πρώτο δείγμα δουλειάς πάνω στην προκαρυωτική ποικιλότητα που εμφανίζει το απολιθωμένο δάσος του Bückabrány. Ωστόσο θα πρέπει να ακολουθήσουν επιπρόσθετες μελέτες οι οποίες θα περιλαμβάνουν την αλληλούχηση ολόκληρου του *16S rRNA* γονιδίου για κάποιους κλώνους ιδιαίτερα αυτούς που ταυτοποιήθηκαν μόνο σε επίπεδο κλάσης, την ανάπτυξη τεχνικών FISH για την ανίχνευση βακτηρίων διάβρωσης και Αρχαίων *in situ* και τέλος τον χαρακτηρισμό γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα υπεύθυνα για την αλλοίωση του οργανικού ιστού του ξύλου.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Bautista VV**, Monsalud RG, Yokota A. *Devosia yakushimensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. (2010) *Int J Syst Evol Microbiol.* 60(Pt 3):627-32
- **Bjordan CG**, Nilsson T, Daniel G. Microbial decay of waterlogged archaeological wood found in Sweden. Applicable to archaeology and conservation (1999) *International Biodeterioration and Biodegradation*, 43 (1-2), pp. 63-73
- **Bjordan CG**, Nilsson T. Reburial of shipwrecks in marine sediments: a long-term study on wood degradation. (2008) *Journal of Archaeological Science*, 35 (4), pp.862-872
- **Blanchette RA**. A review of microbial deterioration found in archaeological wood from different environments (2000) *International Biodeterioration and Biodegradation*, 46 (3), pp.189-204
- **Blanchette RA**, Cease KR, Abad AndrR, Koestler RJ, Simpson E, Sams GK. An evaluation of different forms of deterioration found in archaeological wood (1991) *International Biodeterioration*, 28 (1-4), pp.3-22
- **Bowers KJ**, Wiegel J. Temperature and pH optima of extremely halophilic archaea: a mini-review. (2011) *Extremophiles*.15(2): 119-28
- **Bugani S**, Modugno F, Lucejko JJ, Giachi G, Cagno S, Cloetens P, Janssens K, Morselli L. Study on the impregnation of archaeological waterlogged wood with consolidation treatments using synchrotron radiation microtomography (2009) *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395 (7), pp.1977-1985
- **Burggraf S**, Huber H, Stetter KO. Reclassification of the crenarchael orders and families in accordance with 16S rRNA sequence data. (1997) *Int J Syst Bacteriol.* 47(3):657-60
- **Chao A**. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. (1984) *Scand. J Stat.* 11:265-270
- **Chao A**. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. (1987) *Biometrics.* 43:783-791
- **Chen WX**, Li GS, Qi YL, Wang ET, Yuan HL, Li JL. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. (1991) *Int. J Syst. Bacteriol.* 41(2):275-280
- **Chistoserdova L**. Methylo-trophy in a lake: from metagenomics to single-organism physiology. (2011) *Appl Environ Microbiol.* 77(14):4705-11

- **Clausen CA.** Bacterial associations with decaying wood: a review. (1996) *International Biodeterioration and Biodegradation*, 37 (1-2), pp. 101-107
- **Cole JR,** Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM, Tiedje JM. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. (2009) *Nucleic Acids Res.* 37(Database issue): D141-5
- **Colombini MP,** Lucejko JJ, Modugno F, Orlandi M, Tolppa E-L, Zoia L. A multi-analytical study of degradation of lignin in archaeological waterlogged wood (2009) *Talanta*, 80 (1), pp.61-70
- **Császár G, Kázmér M, Erdei B, Magyar I. (2009) A possible Late Miocene fossil forest PaleoPark in Hungary.- In:** LIPPS J.H. & GRANIER B.R.C. (eds.), *PaleoParks - The protection and conservation of fossil sites worldwide.- Carnets de Géologie / Notebooks on Geology, Brest, Book 2009/03,* Chapter 11 (CG2009_BOOK_03/11)
- **Ding L,** Yokota A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. (2004) *Int J Syst Evol Microbiol.* 54(Pt 6): 2223-30.
- **Ding L,** Yokota A. *Curvibacter fontana* sp. nov., a microaerobic bacteria isolated from well water. (2010) *J Gen Appl Microbiol.* 56(3): 267-71
- **Djordjevic SP,** Chen H, Batley M, Redmond JW, Rolfe BG. Nitrogen fixation ability of exopolysaccharide synthesis mutants of *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *Rhizobium trifolii* is restored by the addition of homologous exopolysaccharides. (1987) *J Bacteriol.* 169(1): 53-60
- **Erdei B,** Dolezych M, Hably L. The buried Miocene forest at **Bükkábrány, Hungary** (2009) *Review of Palaeobotany and Palynology*, 155 (1-2), pp.69-79
- **Ferry JG.** Fundamentals of methanogenic pathways that are key to the biometanation of complex biomass. (2011) *Curr Opin Biotechnol.* 22(3): 351-7
- **Garcia-Armisen T,** Vercammen K, Passerat J, Triest D, Servais P, Cornelis P. Antimicrobial resistance of heterotrophic bacteria in sewage-contaminated rivers. (2011) *Water Res.* 45(2): 788-96

- **Gelbrich J**, Mai C, Militz H. Chemical changes in wood degraded by bacteria (2008) *International Biodeterioration and Biodegradation*, 61 (1), pp.24-32
- **Graham JE**, Clark ME, Nadler DC, Huffer S, Chokhawala HA, Rowland SE, Blanch HW, Clark DS, Robb FT. Identification and characterization of a multidomain hyperthermophilic cellulase from an archaeal enrichment. (2011) *Nat Commun.* 2: 375. doi: 10.1038/ncomms1373.
- **Helms AC**, Martiny AC, Hofman-Bang J, Ahring BK, Kilstrup M. Identification of bacterial cultures from archaeological wood using molecular biological techniques (2004) *International Biodeterioration and Biodegradation*, 53 (2), pp.79-88
- **Hershberger KL**, Barns SM, Reysenbach A-L, Dawson SC, Pace NR. Wide diversity of Crenarchaeota [10] (1996) *Nature*, 384 (6608), pp.420
- **Huber T**, Faulkner G, Hugenholtz P. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. (2004) *Bioinformatics.* 20(14):2317-9
- **Hugenholtz P**, Huber T. Chimeric 16S rDNA sequences of diverse origin are accumulating in the public databases. (2003) *Int J Syst Evol Microbiol.* 53(Pt 1): 289-93
- **Huisman DJ**, Manders MR, Kretschmar EI, Klaassen RKWM, Lamersdorf N. Burial conditions and wood degradation at archaeological sites in the Netherlands (2008) *International Biodeterioration and Biodegradation*, 61 (1), pp.33-44
- **Irgens RL**, Gosink JJ, Staley JT. *Polaromonas vacuolata* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic, marine, gas vacuolate bacterium from Antarctica. (1996) *Int J Syst Bacteriol.* 46(3): 822-6
- **Jenkins O**, Byrom D, Jones D. *Methylophilus*: a new genus of methanol-utilizing bacteria. (1987) *Int. J Syst Bacteriol.* 37(4): 446-448
- **Jurgens JA**, Blanchette RA, Carlson DN. Evaluating the wooden remnants of the Tektas Burnu shipwreck (2003) *Art, biology, and conservation: biodeterioration of works of Art.* pp. 390-407. The Metropolitan Museum of Art, New York
- **Kalyuzhnaya MG**, Bowerman S, Lara JC, Lidstrom ME, Chistoserdova L. *Methylotenera mobilis* gen. nov., sp. nov., an obligately methylamine-utilizing bacterium within the family Methylophilaceae. (2006) *Int J Syst Evol Microbiol.* 56(Pt 12): 2819-23
- **Kämpfer P**, Young CC, Arun AB, Shen FT, **Jäckel U**, **Rosselló-Mora R**, Lai WA, Rekha PD. *Pseudolabrys taiwanensis* gen. nov., sp. nov., an alphaproteobacterium isolated from soil. (2006) *Int J Syst Evol Microbiol.* 56(Pt 10):2469-72

- **Kavroulakis N**, Ntougias S. Bacterial and β -proteobacterial diversity in *Olea europaea* var. *mastoidis*- and *O. europaea* var. *koroneiki*-generated olive mill wastewaters: Influence of cultivation and harvesting practice on bacterial community structure (2011) *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27 (1), pp.57-66
- **Kazmer M.** The miocene bükkábrány fossil forest in Hungary - Field observations and project outline (2008) *Hantkeniana*, (6), pp.229-244
- **Kazmer M.** Structure of the 7 Ma Bukkabrány fossil forest in Hungary (2011) *Jpn.J.Histor.Bot.* Vol. 19 Nos. 1–2 p.47-54
- **Klaassen RKWM.** Preserving cultural heritage by preventing bacterial decay of wood in foundation poles and archaeological sites. (Ed.) (2005) Bacpoles, Final report EVK4-CT-2001-00043, 223 p+8 appendices
- **Kormas KA**, Vardaka E, Moustaka-Gouni M, Kontoyanni V, Petridou E, Gkelis S, Neofitou C. Molecular detection of potentially toxic cyanobacteria and their associated bacteria in lake water column and sediment (2010) *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26 (8), pp.1473-1482
- **Landy ET**, Mitchell JI, Hotchkiss S, Eaton RA. Bacterial diversity associated with archaeological waterlogged wood: Ribosomal RNA clone libraries and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (2008) *International Biodeterioration and Biodegradation*, 61(1), pp.106-116
- **Lane DJ.** 16S/23S rRNA sequencing. (1991) In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, pp.115-175
- **Leigh JA**, Albers SV, Atomi H, Allers T. Model organisms for genetics in the domain Archaea: methanogens, halophiles, Thermococcales and Sulfolobales. (2011) *FEMS Microbiol Rev.* 35(4): 577-608. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00265.x.
- **Liu ZP**, Wang BJ, Liu SJ, Liu YH. *Asticcacaulis taihuensis* sp. nov., a novel stalked bacterium isolated from Taihu Lake, China. (2005) *Int J Syst Evol Microbiol.* 55(Pt 3): 1239-42
- **Madhaiyan M**, Poonguzhali S, Kwon SW, Sa TM. *Methylophilus rhizosphaerae* sp. nov., a restricted facultative methylotroph isolated from rice rhizosphere soil. (2009) *Int J Syst Evol Microbiol.* 59(Pt 11): 2904-8
- **Margesin R, Spröer C**, Schumann P, Schinner F. *Pedobacter cryoconitis* sp. nov., a facultative psychrophile from alpine glacier cryoconite. (2003) *Int J Syst Evol Microbiol.* 53(Pt 5): 1291-6

- **Margesin R, Spröer C**, Zhang DC, Busse HJ. *Polaromonas glacialis* sp. nov. and *Polaromonas cryoconiti* sp. nov., two novel bacteria from alpine glacier cryoconite. (2011) *Int J Syst Evol Microbiol.* [Epub ahead of print]
- **Nedashkovskaya OI**, Vancanneyt M, Van Trappen S, Vandemeulebroecke K, Lysenko AM, Rohde M, Falsen E, Frolova GM, Mikhailov VV, Swings J. Description of *Algoriphagus aquimarinus* sp. nov., *Algoriphagus chordae* sp. nov. and *Algoriphagus winogradskyi* sp. nov., from sea water and algae, transfer of *Hongiella halophila* Yi and Chun 2004 to the genus *Algoriphagus* as *Algoriphagus halophilus* comb. nov. and emended descriptions of the genera *Algoriphagus* Bowman et al. 2003 and *Hongiella* Yi and Chun 2004. (2004) *Int J Syst Evol Microbiol.* 54(Pt 5): 1757-64
- **Ramos-Vera WH**, Berg IA, Fuchs G. Autotrophic carbon dioxide assimilation in Thermoproteales revisited. (2009) *J Bacteriol.* 191(13): 4286-97
- **Rosconi F**, Souza EM, Pedrosa FO, Platero RA, **González C**, **González M**, Batista S, Gill PR, Fabiano ER. Iron depletion affects nitrogenase activity and expression of *nifH* and *nifA* genes in *Herbaspirillum seropedicae*. (2006) *FEMS Microbiol Lett.* 258(2): 214-9
- **Rothballer M**, Schmid M, Klein I, Gatteringer A, Grundmann S, Hartmann A. *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. (2006) *Int J Syst Evol Microbiol.* 56(Pt 6): 1341-8
- **Salanti A**, Zoia L, Tolppa E-L, Giachi G, Orlandi M. Characterization of waterlogged wood by NMR and GPC techniques (2010) *Microchemical Journal*, 95 (2), pp.345-352
- **Singh AP**, Kim YS, Wi SG, Lee KH, Kim I-J. Evidence of the degradation of middle Lamella in a waterlogged archaeological wood (2003) *Holzforschung*, 57 (2), pp.115-119
- **Schloss PD**, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Dec; 75(23): 7537-41
- **Takai K**, Nealson KH, Horikoshi K. *Methanotorris formicicus* sp. nov., a novel extremely thermophilic, methane-producing archaeon isolated from a black smoker chimney in the Central Indian Ridge. (2004) *Int J Syst Evol Microbiol.* 54(Pt 4): 1095-100

- **Ten LN**, Liu QM, Im WT, Lee M, Yang DC, Lee ST. *Pedobacter ginsengisoli* sp. nov., a DNase-producing bacterium isolated from soil of a ginseng field in South Korea. (2006) *Int J Syst Evol Microbiol.* 56(Pt 11):2565-70
- **Turner S**, Pryer KM, Miao VP, Palmer JD. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. (1999) *J Eukaryot Microbiol.* 46(4):327-38
- **Van Trappen S**, Vandecandelaere I, Mergaert J, Swings J. *Algoriphagus antarcticus* sp. nov., a novel psychrophile from microbial mats in Antarctic lakes. (2004) *Int J Syst Evol Microbiol.* 54(Pt 6):1969-73
- **Vasilyeva LV**, Omelchenko MV, Berestovskaya YY, Lysenko AM, Abraham WR, Dedysh SN, Zavarzin GA. *Asticcacaulis benevestitus* sp. nov., a psychrotolerant, dimorphic, prosthecate bacterium from tundra wetland soil. (2006) *Int J Syst Evol Microbiol.* Sep; 56(Pt 9): 2083-8
- **Weisburg WG**, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. (1991) *J Bacteriol.* 173(2):697-703
- **Yoon JH**, Kang SJ, Park S, Oh TK. *Devosia insulae* sp. nov., isolated from soil, and emended description of the genus *Devosia*. (2007) *Int J Syst Evol Microbiol.* 57(Pt 6):1310-4
- **Zhang H-B**, Yang M-X, Tu R. Unexpectedly high bacterial diversity in decaying wood of a conifer as revealed by a molecular method (2008) *International Biodeterioration and Biodegradation*, 62 (4), pp.471-474
- **Zillig W**, Tu J, Holz I. Thermoproteales--a third order of thermoacidophilic archaeobacteria. (1981) *Nature.* 293(5827):85-6


ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Π1

job title:

*** sequences are re-aligned using clustalw
*** Huber-Hugenholtz correction used
*** The chosen Window size is 200

all chimeras reported below are worth checking manually even if their preference scores are close to 1.0

***** putative chimera 1
preference score: 1.09423 
E.coli (chimera) break point: 331 (319)
% identities of parent sequences to chimera left and right of the break point
frag. 1 frag. 2
parent 1: 97.5 91.5
parent 2: 89.4 100.0

Sequence ID of chimera with parent sequences:
chimera =>20110726DS2P1_2011-07-28_B01.ab1
parent 1 =>20110726DS1P1_2011-07-28_A01.ab1
parent 2 =>20110930BS74P1_2011-10-05_B10.ab1

***** putative chimera 2
preference score: 1.09423
E.coli (chimera) break point: 331 (319)
% identities of parent sequences to chimera left and right of the break point
frag. 1 frag. 2
parent 1: 97.5 91.5
parent 2: 89.4 100.0

Π1: Η μορφή των αποτελεσμάτων μετά την επεξεργασία με το πρόγραμμα "Bellerophon". Με κόκκινο επισημαίνονται το preference score, η πιθανή χιμαιρική αλληλουχία και οι πατρικές αλληλουχίες.

Π2

RIBOSOMAL DATABASE PROJECT

[RDP HOME](#) | [ABOUT](#) | [ANNOUNCEMENTS](#) | [CITATION](#) | [CONTACT](#)

[BROWSERS](#) | [CLASSIFIER](#) | [LIBCOMPARE](#) | [SEQMATCH](#) | [PROBE MATCH](#) | [TREE BUILDER](#) | [PYRO](#) | [TAXOMATIC](#) | [SEQCART](#) | [ASSIGNGEN](#)

Classifier :: Hierarchy View

[[start over](#) | [assignment detail](#) | [help](#)]

Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.4, December 2011
Taxonomical Hierarchy: RDP 16S rRNA training set 7, moved Chloroplast, rearranged Firmicutes, Verrucomicrobia and Acidobacteria
Query File:
Query Submit Date: Sun Feb 19 11:39:40 EST 2012

Display depth: Auto **Confidence threshold:** 80% Refresh

domain	%	Library
Bacteria	100.0	

Hierarchy View (click a node to make it the root -- click the root to see sequence assignment detail):

norank Root (1 sequences) [[show assignment detail](#)] download hierarchy as text file
 » » domain Bacteria (1)
 » » » phylum "Proteobacteria" (1)
 » » » » class Betaproteobacteria (1)
 » » » » » order Burkholderiales (1)
 » » » » » » family Comamonadaceae (1)
 » » » » » » » genus Polaromonas (1)

Query Sequence: seqmatch_seq. 606 unique oligos

Match hit format:

short ID, orientation, similarity score, _s_ab score, unique common oligomers and sequence full name. More help is available.

Lineage:

```

+ norank Root (0/20/2110258) (selected/match/ total RDP sequences)
+ domain Bacteria (0/20/2017562)
+ phylum "Proteobacteria" (0/20/647358)
+ class Betaproteobacteria (0/20/150715)
+ order Burkholderiales (0/20/93983)
+ family Comamonadaceae (0/20/39605)
+ genus Polaromonas (0/18/1505)
  S000538395 - not_calculated 1.000 1428 uncultured bacterium; RB-C03; DQ065777
  S000714591 - not_calculated 0.983 1390 uncultured Comamonadaceae bacterium; A20(82); DQ628937
  S000715214 - not_calculated 0.980 1444 uncultured bacterium; SLB425; DQ767700
  S000942649 - not_calculated 0.988 1410 Polaromonas sp. BAC305; EU130979
  S000942651 - not_calculated 0.988 1369 Polaromonas sp. BAC311; EU130981
  S000942653 - not_calculated 0.988 1393 Polaromonas sp. BAC243; EU130983
  S000942654 - not_calculated 0.988 1427 Polaromonas sp. BAC68; EU130984
  S000942656 - not_calculated 0.983 1383 Polaromonas sp. BAC104; EU130986
  S000942666 - not_calculated 0.983 1406 Polaromonas sp. BAC3; EU130996
  S000998431 - not_calculated 0.988 0679 uncultured bacterium; C 3-01; AM947322
  S001046887 - not_calculated 0.988 1438 Polaromonas sp. O1WB02.3-26; FM161402
  S001134357 - not_calculated 0.977 1411 uncultured bacterium; 2C228373; EU800323
  S001134576 - not_calculated 0.977 1415 uncultured bacterium; 2C228676; EU800542
  S001135276 - not_calculated 0.977 1412 uncultured bacterium; 30002492; EU801242
  S001135354 - not_calculated 0.977 1414 uncultured bacterium; 30002582; EU801320
  S001327467 - not_calculated 0.980 1427 uncultured bacterium; ZWB4-9; FJ801206
  S001670655 - not_calculated 0.977 1411 uncultured bacterium; DP3.1.28; FJ612125
  S002162165 - not_calculated 0.977 1408 uncultured beta proteobacterium; Z5-4-37; FN668024
  
```

Π2: Η μορφή των αποτελεσμάτων όπως προκύπτουν μετά την επεξεργασία με το RDP Classifier και το RDP SeqMatch.

Π3

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
DQ065777.1	Uncultured bacterium clone RB-C03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1144	1144	100%	0.0	100%
FM161402.1	Polaromonas sp. 01WB02.3-26 partial 16S rRNA gene, strain 01WB02.3-26	1138	1138	100%	0.0	99%
AM94722.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone C 3-01	1138	1138	100%	0.0	99%
EU130984.1	Polaromonas sp. BAC68 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1138	1138	100%	0.0	99%
EU130983.1	Polaromonas sp. BAC243 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1138	1138	100%	0.0	99%
EU130981.1	Polaromonas sp. BAC311 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1138	1138	100%	0.0	99%
EU130979.1	Polaromonas sp. BAC305 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1138	1138	100%	0.0	99%
JN869138.1	Uncultured bacterium clone J591 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1133	1133	100%	0.0	99%
JN582276.1	Uncultured Polaromonas sp. clone PAS-51 16S ribosomal RNA gene, partial seq	1133	1133	100%	0.0	99%
FN669098.2	Uncultured beta proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone ZS-1-323'	1133	1133	100%	0.0	99%
FN668024.2	Uncultured beta proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone ZS-4-37	1133	1133	100%	0.0	99%
F612125.1	Uncultured bacterium clone DP3.1.28 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1133	1133	100%	0.0	99%
F3801206.1	Uncultured bacterium clone ZWB4-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1133	1133	100%	0.0	99%
EU801242.1	Uncultured bacterium clone 3C002492 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	1133	1133	100%	0.0	99%
EU800542.1	Uncultured bacterium clone 2C228676 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	1133	1133	100%	0.0	99%
EU800923.1	Uncultured bacterium clone 2C228973 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	1133	1133	100%	0.0	99%
D6287700.1	Uncultured bacterium clone SLB425 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1133	1133	100%	0.0	99%
AY752100.1	Uncultured lake bacterium P38.37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1133	1133	100%	0.0	99%
EU801428.1	Uncultured bacterium clone 3C002717 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	1131	1131	99%	0.0	99%
EU801320.1	Uncultured bacterium clone 3C002582 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	1131	1131	99%	0.0	99%
EU801930.1	Uncultured bacterium clone 3C003311 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	1127	1127	100%	0.0	99%
EU800932.1	Uncultured bacterium clone 2C229186 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	1127	1127	100%	0.0	99%
EU130996.1	Polaromonas sp. BAC3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1127	1127	99%	0.0	99%
EU130986.1	Polaromonas sp. BAC104 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1127	1127	99%	0.0	99%

Π3: Τα αποτελέσματα που προκύπτουν μετά την επεξεργασία με το nucleotide blast. Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν σύμφωνα με το *MaxScore*.