

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

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μοριακή ποικιλότητα των Cyanobacteria στην υδάτινη στήλη
της λίμνης Κάρλας»**

Ευδοξία Πετρίδου

ΒΟΛΟΣ 2012

**«Μοριακή ποικιλότητα των Cyanobacteria στην υδάτινη στήλη
της λίμνης Κάρλας»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1) **Κωνσταντίνος Αρ. Κορμάς**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**,
- 2) **Ιφιγένεια Κάγκαλου**, Επίκουρη Καθηγήτρια, Υδρολογία, Λιμνολογία και Ποταμολογία, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**,
- 3) **Μαρία Μουστάκα-Γούνη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Υδροβοτανική, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, **Μέλος**.

Στην οικογένεια μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου σε όλους αυτούς τους ανθρώπους που βοήθησαν στο να φέρω εις πέρας την παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα Καθηγητή μου, τον κ. Κορμά Κωνσταντίνο για τη δυνατότητα που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον αντικείμενο που ανταποκρίνεται απολύτως στα επιστημονικά μου ενδιαφέροντα, καθώς και για την διαρκή και προπάντων ευχάριστη συνεργασία. Ακόμη, οφείλω να τον ευχαριστήσω για την επιστημονική του καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου και για τις πολλές ευκαιρίες που μου έδωσε να εντρυφήσω στην επιστήμη της οικολογίας των υδρόβιων μικροοργανισμών, ανοίγοντας μου νέους πνευματικούς ορίζοντες. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τις καθηγήτριες κ. Κάγκαλου Ιφιγένεια και κ. Μουστάκα-Γούνη Μαρία για τις γνώσεις που μου μετέδωσαν κατά τη διάρκεια των σπουδών μου, για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή και για τις χρήσιμες συμβουλές τους.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Μεζίτη Αλεξάνδρα για την άμεση μετάδοση γνώσεων και επίλυση διάφορων προβλημάτων που παρουσιάστηκαν στο εργαστήριο και για την αμέριστη συμπαράστασή της κατά τη διάρκεια του πειράματος. Όπως επίσης, την υποψήφια Δρ. Κατσιάπη Ματίνα και την Δρ. Παχιαδάκη Μαρία για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφεραν.

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου και στον αδερφό μου για την διαρκή τους υποστήριξη και υπομονή, που επέτρεψε την επιτυχή διεκπεραίωση των προπτυχιακών και μεταπτυχιακών σπουδών μου. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους τους φίλους μου που πίστεψαν σε μένα και με ενθάρρυναν σε κάθε στάδιο των σπουδών μου, καθώς και όσους συναδέλφους συμφοιτητές

συνέβαλαν με τα σχόλια, την κριτική και τις γνώσεις τους στην αντιμετώπιση των δυσκολιών που προέκυψαν κατά τη διάρκεια της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η λίμνη Κάρλα, η οποία στην αρχαιότητα ονομαζόταν «Βοϊβής», βρίσκεται νοτιοανατολικά της Λάρισας και βορειοδυτικά του Βόλου και παρουσιάζει μορφή κλειστής επιμήκους λεκάνης περίπου 35 km και πλάτους 9-15 km. Το έτος 1962, αποξηράνθηκε ύστερα από απαίτηση ακτημόνων αγροτών, ώστε να αποκτηθεί νέα καλλιεργήσιμη γη. Σαράντα χρόνια αργότερα ξεκίνησε η επανασύσταση της λίμνης αφού διαπιστώθηκαν οι αρνητικές επιπτώσεις της αποξήρανσης της τόσο στο περιβάλλον όσο και στους ανθρώπους. Σήμερα οι χρήσεις της είναι πολλαπλές συμπεριλαμβανομένων της άρδευσης, της αλιείας, της αναψυχής, και πιθανόν μελλοντικά του αθλητισμού, προσδίδοντας της μεγάλη βιολογική, οικολογική, κοινωνική και οικονομική σημασία. Η μελέτη των κυανοβακτηρίων που συμμετέχουν στην άνθηση του νερού είναι ιδιαίτερα σημαντική υπό το πρίσμα και της δημόσιας υγείας καθώς μεγάλος αριθμός ειδών τους έχει την ικανότητα να παράγει τοξίνες ως προϊόντα του μεταβολισμού τους. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η μοριακή ποικιλότητα των κυανοβακτηρίων στην υδάτινη στήλη της λίμνης Κάρλα. Πραγματοποιήθηκαν τρεις δειγματοληψίες νερού κατά τους μήνες Μάιο, Αύγουστο και Νοέμβριο του 2010. Απομονώθηκε DNA από τα δείγματα και ακολούθησε ενίσχυση του γονιδίου 16s rRNA με ειδικούς εκκινητές με την τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης, PCR (Polymerase Chain Reaction). Έπειτα πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR, επεξεργασία των αποικιών και αλληλούχιση. Έγινε ανάλυση των αλληλουχιών που προέκυψαν και συγκρίθηκαν με γνωστές αλληλουχίες της βάσης δεδομένων της GenBank μέσω του προγράμματος BLAST με σκοπό να βρεθούν οι κοντινότεροι συγγενείς φυλότυποι. Τέλος, κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα των 16s RNA γονιδίων με το λογισμικό

MEGA5. Η ταξινομική ομάδα Nostocales φαίνεται να κυριαρχεί στις βιβλιοθήκες Μαΐου και Αυγούστου, ενώ στη βιβλιοθήκη του Νοεμβρίου φαίνεται να κυριαρχεί η ταξινομική ομάδα Chroococcales και ακολουθεί η ταξινομική ομάδα Stigonematales η οποία εντοπίστηκε και στις βιβλιοθήκες του Μαΐου και Νοεμβρίου. Είδη κυανοβακτηρίων που εντοπίστηκαν στην παρούσα εργασία ανιχνεύθηκαν και σε άλλες λίμνες της Ελλάδος. Βρέθηκαν επίσης, και αντιπρόσωποι από τα φύλα των Verrucocomicrobia και Chloroflexi. Αναγνωρίστηκαν φυλότυποι οι οποίοι σχετίστηκαν με είδη κυανοβακτηρίων, πολλά από τα οποία έχουν την ικανότητα να παράγουν τοξίνες, όπως το *Microcystis aeruginosa*, το *Anabaena flos-aquae*, το *Anabaena arhanizomenoides* και το *Trichodesmium erythraeum* το οποίο φαίνεται να σχετίζεται με φυλότυπο που εντοπίστηκε για πρώτη φορά σε υδάτινα οικοσυστήματα γλυκού νερού στην Ελλάδα. Η παρουσία των κυανοτοξινών μπορεί να προκαλέσει βλάβες στους οργανισμούς, ακόμη και να επιφέρουν το θάνατο. Από όλα τα είδη κυανοβακτηρίων που ανιχνεύθηκαν μόνο τα είδος *Spirulina laxissima* ήταν κοινό και στις τρεις βιβλιοθήκες γεγονός που υποδηλώνει τη συνεχή ύπαρξη του στη λίμνη σε όλες τις δειγματοληψίες.

Λέξεις κλειδιά: Cyanobacteria, 16S rRNA, λίμνη, Κάρλα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Γενικά.....	1
1.2 Κυανοβακτήρια.....	4
1.3 Σκοπός της εργασίας.....	7
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	8
2.1 Περιοχή μελέτης (Λίμνη Κάρλα).....	8
2.2 Δειγματοληψία.....	10
2.3 Απομόνωση DNA.....	11
2.4 PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης) ενίσχυση του γονιδίου 16s rRNA.....	11
2.5 Κλωνοποίηση.....	13
2.6 Επεξεργασία αποικιών μετά την κλωνοποίηση.....	15
2.7 Υγρές καλλιέργειες.....	16
2.8 Αλληλούχιση DNA (sequencing).....	17
2.9 Φυλογενετική ανάλυση.....	17
2.10 Υπολογισμός κάλυψης βιβλιοθήκης (Clone coverage).....	18
2.11 Υπολογισμός δεικτών ποικιλότητας.....	19
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	21
3.1 Κάλυψη βιβλιοθήκης.....	21
3.2 Ποσοτική ανάλυση ποικιλότητας.....	21
3.3 Ανάλυση φυλοτύπων.....	23
3.4 Φυλογενετικά δέντρα.....	24
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	28
4.1 Ταξινομικές ομάδες που ανιχνεύθηκαν.....	31
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	41
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	45
7. ABSTRACT.....	55
8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	57

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Η στάση των ανθρώπων έναντι των οικοσυστημάτων των ρηχών νερών, που μόλις πριν από μερικές δεκαετίες αρχίσαμε να αποκαλούμε υγροτόπους, ήταν ανάλογη του τρόπου με τον οποίο επηρέαζε τη ζωή τους. Τα ποτάμια, πρόσφεραν καθαρό νερό και οδούς επικοινωνίας, παράλληλα όμως απειλούσαν με τις πλημμύρες τις καλλιέργειες. Οι λίμνες παρείχαν τροφή, ενώ τα έλη θεωρούνταν τόποι όχι μόνο άχρηστοι αλλά και επικίνδυνοι για την υγεία. Μερικοί από τους προϊστορικούς οικισμούς αναπτύχθηκαν γύρω ή και πάνω στις λίμνες (π.χ. λιμναίος οικισμός Καστοριάς).

Στην Ελλάδα, στις αρχές της δεκαετίας του 1920, η έκταση των υγροτόπων ήταν τριπλάσια από όση είναι σήμερα. Επικρατούσε η αντίληψη ότι ο υγρότοπος είναι άχρηστος τόπος, για τον οποίο το καλύτερο που είχε να κάνει ο άνθρωπος ήταν να τον μετατρέψει σε γεωργική γη. Μέσα σε χρόνο δύο γενεών περίπου αποξηράνθηκαν όλα σχεδόν τα έλη και πολλές λιμνοθάλασσες. Η έκταση πολλών λιμών περιορίστηκε, ενώ άλλες εξαφανίστηκαν εντελώς από τον χάρτη (Τσιούρης & Γεράκης 1991).

Η αξία των υγροτόπων αναγνωρίστηκε μετά την ολοκληρωτική αποξήρανση πολλών από αυτούς. Με τις αποξηράνσεις, βέβαια αμβλύθηκαν προβλήματα υγείας, (όπως για παράδειγμα η καταπολέμηση των κουνουπιών) και τροφής, καθώς αναπτύχθηκε η γεωργία. Προκλήθηκαν όμως νέα προβλήματα (π.χ. έλλειψης νερού), τόσο στο φυσικό όσο και στο γεωργικό περιβάλλον.

Για χιλιάδες χρόνια, η μεγάλη λίμνη Βοϊβηίδα (Κάρλα) της Θεσσαλίας, ένας παράδεισος πουλιών της ανατολικής Μεσογείου (Εικ. 1), ευεργετούσε τους παραλίμνιους κατοίκους με άφθονα ψάρια, θηράματα, τροφή για τα αγροτικά ζώα, ήπιο

κλίμα. Αποξηράνθηκε το 1962, ύστερα από απαίτηση ακτημόνων αγροτών, ώστε να αποκτηθεί νέα καλλιεργήσιμη γη. Είκοσι χρόνια αργότερα, τα παιδιά εκείνων που είχαν ζητήσει την αποξήρανση απαίτησαν την αποκατάσταση της λίμνης τους. Έτσι, η πανάρχαια λίμνη, συνδεδεμένη με την προϊστορία, την ιστορία και τη μυθολογία της Ελλάδας, άρχισε να αποκαθίσταται το έτος 2000 (Γεράκης 2004).



Εικόνα 1: Ιστορικός χάρτης της λίμνης Κάρλας (David Rumsey Historical Map Collection, Bartholomew, J. G., 1860-1920)

Οι ταμιευτήρες διαφέρουν σημαντικά από τις φυσικές λίμνες, σε σχέση με τις βασικές φυσικές, χημικές και βιολογικές διαδικασίες. Μια από τις πιο σημαντικές διαφορές, είναι η υδρολογική τους κατάσταση (Straskraba & Tundisi 1999). Λόγω μιας λειτουργικής διαχείρισης του όγκου του νερού τους, οι ταμιευτήρες έχουν λιγότερο χρόνο διατήρησης (κατακράτησης) σε σύγκριση με εκείνους των λιμνών, έντονες διακυμάνσεις της στάθμης του νερού, όπως επίσης και περιοδικές αναμίξεις ανάλογα με

τη χρήση τους (Toundisi *et al.* 1999). Τα χαρακτηριστικά αυτά έχουν σοβαρές επιπτώσεις μεταξύ άλλων και στη φυτοπλαγκτική κοινωνία ενός ταμιευτήρα (Naselli-Flores 2000, Naselli-Flores & Barone 2005).

Οι κοινότητες του φυτοπλαγκτού, συμπεριλαμβανομένων των κυανοβακτηρίων, είναι ευαίσθητες στις μεταβολές του περιβάλλοντός τους και ως εκ τούτου η συνολική βιομάζα τους και πολλά είδη φυτοπλαγκτού χρησιμοποιούνται ως δείκτες της ποιότητας του νερού (Reynolds 1997, Reynolds *et al.* 2002, Brettum & Andersen 2005, Padisak *et al.* 2006). Τα κυανοβακτήρια έχουν αναγνωριστεί ως ένα σημαντικό στοιχείο του ευτροφισμού σε γλυκά νερά που είναι εμπλουτισμένα με θρεπτικά συστατικά (Reynolds 1984, Moss 1998).

Ο όρος άνθιση του νερού ή κυανοβακτηριακός ανθός αναφέρεται στη μαζική συσσώρευση πλαγκτικών κυανοβακτηρίων στο επιφανειακό στρώμα του νερού κατά τη διάρκεια της περιόδου που αυτά σχηματίζουν σημαντικούς πληθυσμούς (Reynolds & Walsby 1975). Κατά τη διάρκεια της άνθισης του νερού συχνά παρατηρείται ανομοιόμορφη οριζόντια κατανομή των κυανοβακτηριακών ανθών οι οποίοι με τον κυματισμό του νερού είναι δυνατόν να συσσωρεύονται στην ακτή σχηματίζοντας μία επιφανειακή κυανοπράσινη κρούστα (scum) (Dokulil & Teubner 2000).

Ο σχηματισμός κυανοβακτηριακής άνθισης οφείλεται σε έναν συνδυασμό αβιοτικών και βιοτικών παραγόντων. Στους αβιοτικούς παράγοντες ανήκουν η υψηλή θερμοκρασία του νερού (>20 °C), ο μεγάλος χρόνος παραμονής του νερού, τα αυξημένα φορτία θρεπτικών αλάτων, η στρωμάτωση της στήλης του νερού, ο χαμηλός ατομικός λόγος ανόργανου αζώτου / φωσφόρου (<15) καθώς και το υψηλό pH (>8), ενώ στους βιοτικούς παράγοντες ανήκουν οι ιδιότητες των ίδιων των κυανοβακτηρίων, όπως η

ρύθμιση της πλευστότητας τους με τη βοήθεια αεροτοπίων, η επιλεκτική θήρευση που ασκεί το ζωοπλαγκτό και η παραγωγή τοξινών (Reynolds & Walsby 1975, Paerl 1996).

1.2 Κυανοβακτήρια

Κατά τις δύο τελευταίες δεκαετίες τα κυανοβακτήρια έχουν αναγνωρισθεί ως η σημαντικότερη ομάδα και με τη μεγαλύτερη ποικιλία ειδών στην επικράτεια των προκαρυωτικών οργανισμών. Η ταξινόμηση των ειδών αρχικά πραγματοποιήθηκε με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, το οποίο βοήθησε στο να αμφισβητηθούν οι προηγούμενες απόψεις για τις συνδέσεις τους με άλλα φύκη. Αυτή η ομαδοποίηση με άλλα φύκη ήταν βασισμένη κατά ένα μεγάλο μέρος στο γεγονός ότι όλοι αυτοί οι οργανισμοί κατέχουν ουσιαστικά κοινές φωτοσυνθετικές δομές και μηχανισμούς (Fredrick 1981). Η εξήγηση για αυτές τις ομοιότητες, βρίσκεται πίσω από την αναβίωση της ενδοσυμβιωτικής θεωρίας για την εξελικτική προέλευση των χλωροπλαστών, ένα θέμα που έχει εκτενώς μελετηθεί και αναθεωρηθεί (Margulis & Sagan 2001). Αρκετά στελέχη κυανοβακτηρίων εμφανίζουν υψηλή αντοχή στην υπεριώδη-B και C ακτινοβολία, μια ιδιότητα που πιθανότατα αναπτύχθηκε στις αρχές της προκάμβιας περιόδου όταν τα επίπεδα της υπεριώδους ακτινοβολίας ήταν υψηλά (Cronberg & Annadotter 2006).

Τα κυανοβακτήρια έχουν παίξει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ζωής στη γη. Πιστεύεται ότι ήταν από τους πρώτους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς που εμφανίστηκαν στην επιφάνεια της. Ξεκινώντας από περίπου δύο δισεκατομμύρια χρόνια πριν, το οξυγόνο που παρήχθη από τα κυανοβακτήρια εμπλούτισε τη γήινη ατμόσφαιρα μετατρέποντας τη στη σύγχρονη μορφή της. Η μετατροπή αυτή κατέστησε πιθανές όλες τις μορφές ζωής που χρησιμοποιούν το οξυγόνο στον μεταβολισμό τους.

Τα κυανοβακτήρια απαντώνται σχεδόν σε κάθε βιότοπο, από τους ωκεανούς σε εσωτερικά ύδατα (λίμνες, ποτάμια), σε γυμνό βράχο, στο έδαφος και σε ακραία περιβάλλοντα όπου δεν επιβιώνουν άλλα μικροφύκη (Mur *et al.* 1999). Εμφανίζονται ως μονοκύτταρες, νηματοειδείς και αποικιακές μορφές και, ως επί το πλείστον, είναι εγκλεισμένα σε βλεννώδεις κολεούς, είτε μεμονωμένα είτε ως αποικίες (Wetzel 2001). Το χρώμα τους είναι συνήθως κυανοπράσινο επειδή επικρατεί η χρωστική φυκοκυανίνη (Whitton & Potts 2000). Τα κυανοβακτήρια, όπως και η πλειονότητα των άλλων βακτηρίων, περιέχουν μουρείνη στο κυτταρικό τοίχωμα, αναπαράγονται με σχάση και δεν διαιρούνται με μίτωση όπως τα φύκη και οι ανώτεροι οργανισμοί (Wetzel 2001). Λόγω της ικανότητάς τους να δεσμεύουν το άζωτο σε αερόβιες συνθήκες αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με λειχήνες, φυτά, διάφορα πρώτιστα, ή σφουγγάρια παρέχοντας ενέργεια στον ξενιστή (Cronberg & Annadotter 2006).

Ένας μεγάλος αριθμός ειδών κυανοβακτηρίων που συμμετέχουν στην άνθιση του νερού έχει την ικανότητα να παράγει τοξίνες ως προϊόντα του μεταβολισμού του (Sivonen & Jones 1999). Οι κυανοβακτηριακές τοξίνες διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες ανάλογα με τη χημική τους δομή:

- κυκλικά πεπτίδια,
- αλκαλοειδή και
- λιποπολυσακχαρίτες (LPS).

Στα κυκλικά πεπτίδια ανήκουν οι μικροκυστίνες και οι νοντουλαρίνες οι οποίες έχουν σαν κύριο ιστό-στόχο το ήπαρ και παράγονται από τα γένη *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Nostoc*, *Hapalosiphon*, *Anabaenopsis* και *Nodularia*. Στα αλκαλοειδή ανήκουν η ανατοξίνη-α, οι κυλινδροσπερμοψίνες και οι σαξιτοξίνες με κύριο ιστό-στόχο τις νευρικές συνάψεις, το ήπαρ και νευράξονες και παράγονται από τα

γένη *Anabaena*, *Planktothrix*, *Lyngbya*, *Aphanizomenon* και *Cylindrospermopsis*. Τέλος οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) προσβάλλουν οποιονδήποτε εκτεθειμένο ιστό και βρέθηκαν ότι παράγονται από όλες τις ομάδες κυανοβακτηρίων (Sivonen & Jones 1999).

Η μικροκυστίνη συνδέεται γενικά με την ηπατοτοξικότητα (Chorus & Bartram 1999, Falconer *et al.* 1988). Οι μικροκυστίνες είναι κυκλικά οκταπεπτίδια με μεταβλητά αμινοξέα σε επτά διαφορετικές θέσεις. Το όνομα μικροκυστίνη προέρχεται από το *Microcystis aeruginosa* που ήταν ο πρώτος οργανισμός από τον οποίο απομονώθηκε αυτή η τοξίνη. Η τοξικότητά τους οφείλεται στη στενή σύνδεσή τους με τις φωσφατάσες στα κύτταρα των θηλαστικών. Μετά από οξεία έκθεση με ενδοφλέβια χορήγηση παρατηρείται δρυμεία ηπατική βλάβη που χαρακτηρίζεται από διάρρηξη της αρχιτεκτονικής του ηπατικού ιστού εξαιτίας βλαβών στον κυτοσκελετό των ηπατοκυττάρων, απώλεια της συνοχής των κολποειδών ενδοθηλιακών κυττάρων των τριχοειδών της πυλαίας κυκλοφορίας, η οποία οδηγεί σε αύξηση του βάρους του ήπατος εξαιτίας ενδοηπατικής αιμορραγίας, αιμοδυναμική πλήξη, καρδιακή ανεπάρκεια και τελικά θάνατο (Carmichael 1992, 1994, Falconer *et al.* 1994).

Η παραγωγή των κυανοτοξινών συνιστά μια από τις πλέον επιτυχημένες οικολογικά στρατηγικές των ίδιων των κυανοβακτηρίων, η παρουσία τους ακόμη και σε συγκεντρώσεις που απαντούν στο φυσικό περιβάλλον μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στους οργανισμούς ακόμη και να επιφέρουν θάνατο (Codd *et al.* 1999). Η έκθεση στις κυανοτοξίνες μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της κατανάλωσης μολυσμένου νερού ή μέσω της επαφής με αυτό (Hitzfeld *et al.* 2000, Honkanen *et al.* 1990, Toivola *et al.* 1994). Οι μικροκυστίνες ανιχνεύονται στους ιστούς ζωικών οργανισμών που ζουν σε υδάτινα συστήματα με επιπολασμούς κυανοβακτηρίων. Ο ανθρώπινος πληθυσμός

μπορεί να εκτεθεί επίσης, μέσω της κατανάλωσης υδρόβιων μολυσμένων οργανισμών (Carmichael 2001).

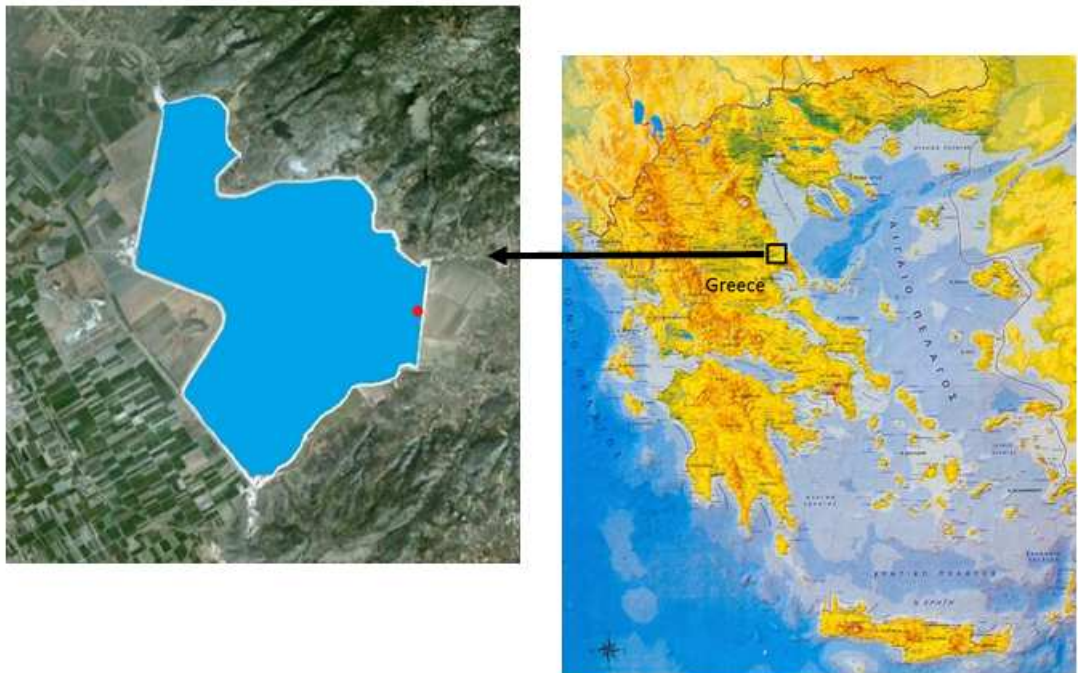
1.3 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση των διαφορών στη σύσταση των κυανοβακτηριακών κοινοτήτων και η ύπαρξη τυχόν δυνητικώς τοξικών ειδών σε τρεις διαφορετικές περιόδους κατά το πρώτο έτος επαναπλήρωσης της λίμνης Κάρλας, μέσω ανάλυσης της φυλογενετικής ποικιλότητας των κυανοβακτηρίων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

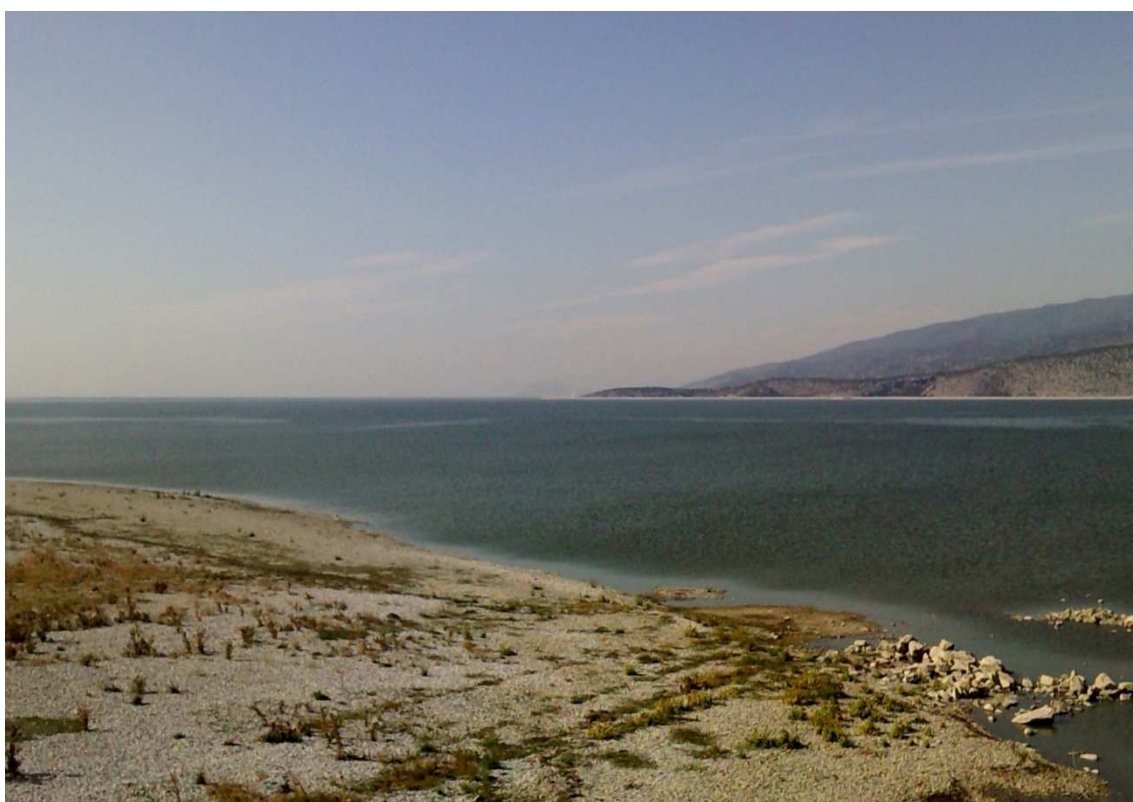
2.1 Περιοχή μελέτης (Λίμνη Κάρλα)

Η λίμνη Κάρλα ($39^{\circ} 29'02''\text{N}$, $22^{\circ} 51'41''\text{E}$), βρίσκεται νοτιοανατολικά της Λάρισας και βορειοδυτικά του Βόλου και παρουσιάζει μορφή κλειστής επίμηκους λεκάνης περίπου 35 km και πλάτους 9-15 km (Εικ. 2). Η λεκάνη της λίμνης Κάρλας συνδέεται στο βορρά με τον ποταμό Πηνειό, κι έτσι τα πλημμυρικά φαινόμενα του Πηνειού παρείχαν νερό στην Κάρλα, πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά (Ananiadis 1956). Στο μέσο της λεκάνης αυτής βρίσκεται το βαθύτερο τμήμα της Θεσσαλικής πεδιάδας, τα χαμηλότερα της οποίας μέχρι το 1961, καλύπτονταν από τα νερά της λίμνης, που αποτελούσε πριν από την εκτέλεση των έργων αποξήρανσης και τον κύριο αποδέκτη της (Σιδηρόπουλος 2007, Πατσώνας 2008).



Εικόνα 2: Χάρτης της λίμνης Κάρλα, Ελλάδα και το σημείο δειγματοληψίας (κόκκινη κουκίδα).

Το έτος 1962, η λίμνη Κάρλα, έπειτα από μια ιστορική πορεία πολλών αιώνων, αποστραγγίστηκε με απόφαση της πολιτείας κυρίως για την εξασφάλιση καλλιεργήσιμων εκτάσεων που θα αποκαλύπτονταν από την αποστράγγιση των νερών. Σαράντα χρόνια αργότερα κρίθηκε ότι οι επιπτώσεις στο περιβάλλον από την αποστράγγιση της λίμνης επέβαλλαν την ανασύσταση της (Εικ. 3), έργο που ξεκίνησε το 1999 και προχώρησε με μεγάλες καθυστερήσεις. Ένα τέτοιο οικοσύστημα το οποίο βρίσκεται σε συνεχείς μεταβολές, μέχρι να σταθεροποιηθεί η στάθμη της λίμνης και σε συνδυασμό με την επικρατούσα κλιματική αλλαγή, αποτελεί ένα οικοσύστημα μοναδικό για τη μελέτη του εποικισμού και την επακόλουθη εγκατάσταση μικροοργανισμικών κοινοτήτων σε φυσική κλίμακα.



Εικόνα 3: Λίμνη Κάρλα, Οκτώβριος 2011

2.2 Δειγματοληψία

Τα δείγματα νερού που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των αναλύσεων συλλέχθηκαν από το σημείο βυθομέτρησης στο νοτιοανατολικό άκρο της λίμνης (Εικ. 2) στις 28 Μαΐου 2010, 28 Αύγουστου 2010 και 25 Νοεμβρίου 2010 σε αποστειρωμένα πλαστικά δοχεία των 5 L και διηθήθηκαν σχεδόν αμέσως (<2 ώρες) μετά τη συλλογή τους. Χρησιμοποιήθηκε συσκευή διήθησης υπό κενό μέσω μεμβρανικού ηθμού σε κενό του οποίου η πίεση ήταν μικρότερη από 150 mm Hg, ώστε να αποφευχθεί η καταστροφή των κυττάρων που επικάθονταν στο φίλτρο. Για τον προσδιορισμό των κυανοβακτηρίων τους μήνες Μάιο, Αύγουστο και Νοέμβριο διηθήθηκαν 220, 170 και 350 mL νερό, αντιστοίχως, σε ηθμούς των 0,2 μm. Τα φίλτρα αποθηκεύτηκαν προσωρινά στους -24 °C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους.

Η θερμοκρασία, το pH, η αλατότητα, και η αγωγιμότητα του νερού μετρήθηκαν in situ (WTW, Germany) στις περιόδους της δειγματοληψίας (Πίν. 1).

Πίνακας 1: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της λίμνης Κάρλα

	Ημερομηνία Δειγματοληψίας	pH	Θερμοκρασία °C	Αλατότητα PSU	Αγωγιμότητα mS/cm
KRL03	28.05.2010	8,0	19,7	9,1	17,01
KRL06	28.08.2010	8,5	31,7	13,2	23,01
KRL09	25.11.2010	8,8	12,2	2,9	5,51

2.3 Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε το UltraClean Soil DNA isolation Kit (MoBio, USA) σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή, με τη μόνη διαφορά ότι στο τελευταίο βήμα αντί για 8 ml Solution S5 χρησιμοποιήθηκαν 6 ml, τα οποία προστέθηκαν σταδιακά σε 3 δόσεις (2 ml τη φορά) και ακολούθησε φυγοκέντρηση 3 min μετά την κάθε προσθήκη. Τα φίλτρα τεμαχίστηκαν σε λεπτές λωρίδες χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο νυστέρι. Μετά τη διαδικασία έγινε έλεγχος της ποσότητας του DNA που υπάρχει στα δείγματα με τη βοήθεια του φασματοφωτόμετρου NanoDrop ND-1000 δίνοντας τιμές 10,35 ng/μL, 6,2 ng/μL και 2,6 ng/μL για τους μήνες Μάιο, Αύγουστο και Νοέμβριο αντίστοιχα και έπειτα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20 °C.

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

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (Saiki *et al.* 1988) αποτελεί έναν από τους αποτελεσματικότερους τρόπους ώστε να ερευνήσουμε τους μικροοργανισμούς από ένα περιβαλλοντικό δείγμα. Το κύριο μίγμα που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR είχε για κάθε δείγμα, την αναλογία των αντιδραστηρίων που φαίνεται στον πίνακα 2.

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

CYA106F	5'-CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA-3'
CYA781R(a)	5'-GACTACTGGGGTATCTAATCCCAT-3'
CYA781R(b)	5'-GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT-3'

Πίνακας 2: Μίγμα για την πραγματοποίηση της PCR τελικού όγκου 20μl και περιεκτικότητας περιβαλλοντικού DNA (template) βιβλιοθήκης Μαΐου: 10,35 ng/μl, βιβλιοθήκης Αυγούστου: 6,2 ng/μl και βιβλιοθήκης Νοεμβρίου: 2,6 ng/μl

Template	0,5μl
dNTPs (2 mM)	0,4μl
Buffer 5x	4μl
MgCl ₂ (25 mM)	1,2μl
CyA106F (100 pmol/μl)	0,2μl
CyA781Rmix* (100 pmol/μl)	0,2μl
Taq (5 u/μl)	0,1μl
PCR-H ₂ O	13,5μl

*CYA781Rmix(0,1μl CyA781R(a)(100 pmol/μl) and 0,1μl CyA781R(b)(100 pmol/μl))

Στις PCR που έγιναν ακολουθήθηκε το πρόγραμμα που φαίνεται στον πίνακα 3 και ο θερμοκρασιακός κύκλος των σταδίων 1, 2 και 3 επαναλήφθηκε για 35 κύκλους.

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

Η αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης του γονιδίου 16s rRNA μειώνεται όσο αυξάνονται οι κύκλοι που πραγματοποιείται μια αντίδραση PCR, καθώς μειώνονται οι συγκεντρώσεις των εκκινητών, των τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων αλλά και

η δραστηριότητα του ενζύμου (Ruano *et al.* 1991, Sardelli 1993). Συνεπώς, για να ελαχιστοποιηθούν οι εγγενείς περιορισμοί της PCR (Spiegelman *et al.* 2005) και η διαφορετική εκπροσώπηση των γονιδίων του 16S rRNA με χαμηλό και υψηλό αριθμό αντιγράφων, πραγματοποιήθηκε με διαδικασία βελτιστοποίησης του αριθμού των κύκλων σύμφωνα με την οποία ακολουθούνται οι ίδιες συνθήκες για διαφορετικό αριθμό κύκλων. Το πρωτόκολλο ολοκληρώθηκε με τον μικρότερο αριθμό κύκλων στους οποίους ανιχνεύθηκε το επιθυμητό προϊόν και ήταν 25 κύκλοι για το δείγμα του Μαΐου, 26 κύκλοι για το δείγμα του Αυγούστου και 25 για το δείγμα του Νοεμβρίου.

Πίνακας 3: Συνθήκες PCR

Hot Start	5min	94 °C
1. Αποδιάταξη	30sec	94 °C
2. Ισχυροποίηση	30sec	57 °C
3. Επιμήκυνση	30sec	72 °C
	5min	72 °C

2.5 Κλωνοποίηση

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

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

Η αντίδραση τερματίστηκε με τη προσθήκη 0,5 μL 6X TOPO Cloning Stop Solution και ανάμιξη για μερικά δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια ακολούθησε το στάδιο του μετασχηματισμού των βακτηριακών κυττάρων του είδους *Escherichia coli*. Για την πραγματοποίηση του μετασχηματισμού χρησιμοποιήθηκαν 2 μL από τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια, τα οποία τοποθετήθηκαν σε κύτταρα *E. coli* και αφού έγινε η ανάμιξη τους τοποθετήθηκαν σε κυψελίδα. Μέσα σε ηλεκτροεκκενωτή (electroporator 2510, Eppendorf USA) πραγματοποιήθηκε ηλεκτροεκκένωση με τάση 1800 Volt κατά την οποία τα πλασμίδια εισέρχονται στα κύτταρα του *E. coli*. Αφού βγήκε η κυψελίδα από τον ηλεκτροεκκενωτή προστέθηκαν σε αυτήν 450 μL θρεπτικού μέσου S. O. C., αναμίχθηκαν καλά, τοποθετήθηκαν σε σωλήνα τύπου Eppendorf 1,7 μL και μεταφέρθηκαν για 1 ώρα στους 37 °C με σκοπό να προσαρμοστούν τα κύτταρα στις νέες συνθήκες, αλλά και για να εκφραστεί το γονίδιο της ανθεκτικότητας στη канаμυκίνη. Η επίστρωση πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό Luria-Bertani και μέσο επιλογής канаμυκίνη, προκειμένου να αναπτυχθούν μόνο τα μετασχηματισμένα κύτταρα εφόσον αυτά περιέχουν το γονίδιο ανθεκτικότητας στη канаμυκίνη. Η επίστρωση σε τρυβλία στην παρούσα μελέτη έγινε σε τρία τρυβλία με

διαφορετικούς όγκους αρχικού εμβολίου (το πρώτο είχε 30 μl κυττάρων, το δεύτερο 60 μl και το τρίτο 90 μl), σε ασηπτικές συνθήκες και ακολούθησε επώαση για 18 h στους 37 °C.

2.6 Επεξεργασία αποικιών μετά την κλωνοποίηση

Μετά την ανάπτυξη των μετασχηματισμένων κυττάρων *E.coli* στα τρυβλία LB agar με καναμυκίνη, πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την επιβεβαίωση της ύπαρξης του ενθέματος (γονίδιο 16S rRNA), με colony PCR χρησιμοποιώντας το ζεύγος των εκκινητών:

- M13F (5'-GTAAAACGACGCCAG-3')
- M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')

οι οποίοι είναι ειδικοί για το συγκεκριμένο πλασμίδιο.

Πίνακας 4: Μίγμα για PCR για τον έλεγχο των κλώνων τελικού όγκου 20μl και περιεκτικότητας περιβαλλοντικού DNA βιβλιοθήκης Μαΐου: 4,4 ng/μl, βιβλιοθήκης Αυγούστου: 4,1 ng/μl και βιβλιοθήκης Νοεμβρίου: 4 ng/μl

dNTPs (2 mM)	2μl
Buffer 5x	4μl
MgCl ₂ (25 mM)	1,2μl
M13F (100 pmol/μl)	0,2μl
M13R (100 pmol/μl)	0,2μl
Taq (5 u/μl)	0,08μl
PCR-H ₂ O	12,32μl

Το μίγμα που χρησιμοποιήθηκε στη PCR για τον έλεγχο των κλώνων καθώς και οι συνθήκες της PCR, φαίνονται στους πίνακες 4 και 5 αντίστοιχα.

Πίνακας 5: Συνθήκες για την PCR των κλώνων

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

Ο θερμοκρασιακός κύκλος των σταδίων 1, 2 και 3 επαναλήφθηκε για 25 κύκλους. Μετά την PCR ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% σε διάλυμα TAE 1X σε συνθήκες 80V και μετά χρώση σε EtBr και έλεγχος του αποτελέσματος σε λάμπα υπεριώδους φωτός (UV).

2.7 Υγρές καλλιέργειες

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

2.8 Αλληλούχιση DNA (sequencing)

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

2.9 Φυλογενετική ανάλυση

Από την αλληλούχιση που προηγήθηκε προέκυψαν οι αλληλουχίες για κάθε γονίδιο, οι οποίες συγκρίθηκαν με άλλες γνωστές αλληλουχίες της GENBANK με τη βοήθεια του προγράμματος BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), με σκοπό να βρεθούν οι κοντινότεροι συγγενείς σύμφωνα με τη πρωτογενή δομή των γονιδίων. Δημιουργήθηκαν ομάδες, βάσει ομοιότητας 98% (Stackebrandt & Goebel 1994) και οι μοναδικοί φυλότυποι τοποθετήθηκαν στο πρόγραμμα MEGA5, όπου ακολούθησε η ευθυγράμμιση τους, με τους ήδη γνωστούς συγγενείς, σύμφωνα με το λογισμικό ClustalW, επεξεργασία με τη μέθοδο αποστάσεων Neighbour-Joining και διόρθωση με τη μέθοδο Jukes Cantor και στη συνέχεια τοποθέτηση των αλληλουχιών σε φυλογενετικό δέντρο.

Η μέθοδος Neighbour Joining αποτελεί μία μέθοδο αποστάσεων. Με αυτή τη μέθοδο, οι αποστάσεις εκφράζονται ως το ποσοστό των περιοχών που διαφέρουν ανάμεσα σε δύο αλληλουχίες σε μία πολλαπλή ευθυγράμμιση. Αποτελεί μία

αλγοριθμική μέθοδο στην οποία χρησιμοποιούνται υπολογισμοί που περιλαμβάνουν τον χειρισμό μίας μήτρας αποστάσεων που προκύπτει από τις πολλαπλές ευθυγραμμίσεις. Όποτε ξεκινάει μία ευθυγράμμιση, υπολογίζεται για κάθε ζεύγος αλληλουχιών η απόσταση ή το ποσοστό των διαφορών και καταγράφονται τα στοιχεία στη μήτρα των αποστάσεων (Hall 2001).

2.10 Υπολογισμός κάλυψης βιβλιοθήκης (Clone coverage)

Η κάλυψη των κλώνων της βιβλιοθήκης υπολογίζεται από τον δείκτη Good's C, ο οποίος δίνεται από τον τύπο $[1-(n_i/N)]$ (Good 1953), όπου n_i είναι ο αριθμός των φυλοτύπων που εμφανίζονται μόνο μία φορά στη βιβλιοθήκη (singletons) και N είναι ο συνολικός αριθμός κλώνων.

Για να μπορέσουμε να βγάλουμε ασφαλή συμπεράσματα, οι βιβλιοθήκες των κλώνων πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικές του περιβάλλοντος που μελετάται. Αν από μια βιβλιοθήκη αναλυθούν λιγότεροι κλώνοι από ότι πρέπει η ποικιλότητα δεν θα αντιπροσωπεύει την ποικιλότητα του υπό μελέτη περιβάλλοντος (Kemp & Aller 2004).

Ο αριθμός των προβλεπόμενων φυλοτύπων για την κάθε βιβλιοθήκη των κλώνων υπολογίστηκε μετά από την αφθονία βασισμένο στον τύπο $S_{\text{chao } 1}$ (Chao 1984, 1987): $S_{\text{chao } 1} = S_{\text{obs}} + [F_1^2/2 (F_2 + 1)] - [(F_1 F_2)/2 (F_2 + 1)^2]$

Όπου S_{obs} είναι ο αριθμός των φυλοτύπων που παρατηρήθηκαν στη βιβλιοθήκη, και F_1 και F_2 είναι ο αριθμός των φυλοτύπων που εμφανίζεται μια ή δυο φορές. Ο δείκτης αυτός είναι ιδιαίτερα κατάλληλος για δεδομένα στα οποία οι περισσότεροι φυλότυποι είναι σπάνιοι (Chao 1987).

2.11 Υπολογισμός δεικτών ποικιλότητας

Για την ποσοτικοποίηση της ποικιλότητας στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης ποικιλότητας Shannon – Weaver (H'). Ο δείκτης αυτός βασίζεται στην ιδέα ότι όσο αυξάνεται η ποικιλότητα ενός συστήματος, τόσο αυξάνεται η αβεβαιότητα να επιλεγεί τυχαία ένα άτομο κάποιου συγκεκριμένου είδους (Gliessman 2000). Ο τύπος που υπολογίζει τον δείκτη είναι ο παρακάτω:

$$H' = -\sum_{i=1}^s \left(\frac{n_i}{n} \right) \ln \left(\frac{n_i}{n} \right)$$

Όπου: H' = η μέση αβεβαιότητα ανά είδος σε μια βιοκοινωνία, που πρακτικά έχει απειράριθμα μέλη

S = ο αριθμός των ειδών του δείγματος

n_i = ο αριθμός των ατόμων που ανήκουν στο είδος i

n = ο συνολικός αριθμός ατόμων του δείγματος

Ο δείκτης αυτός προϋποθέτει ότι τα άτομα του δείγματος συλλέγονται τυχαία από πολύ μεγάλους (θεωρητικά τείνουν στο άπειρο) πληθυσμούς και όλα τα είδη της βιοκοινωνίας αντιπροσωπεύονται στο δείγμα. Επειδή ο αριθμός ειδών του δείγματος είναι συνήθως μικρότερος από τον αριθμό των ειδών της βιοκοινωνίας, ο δείκτης περικλείει υποκειμενική εκτίμηση επειδή αγνοούνται τα πολύ σπάνια είδη. Ο δείκτης παίρνει την τιμή 0 όταν υπάρχει ένα μόνο είδος στο δείγμα και τη μέγιστη τιμή όταν όλα τα είδη του δείγματος εκπροσωπούνται από τον ίδιο αριθμό ατόμων. Δηλαδή, ο δείκτης αυξάνεται με τον αριθμό των taxa (n) και γίνεται μέγιστος όταν τα taxa είναι ισομερώς κατανομημένα στο δείγμα (Shannon & Weaver 1949). Η αντικειμενικότητα

του δείκτη αυξάνει όσο αυξάνει το μέγεθος του δείγματος. Η τιμή του δείκτη αυτού κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 1,5 και 3,5 (σπανιότερα υπερβαίνει την τιμή 4,5).

Η χρησιμότητα του δείκτη έχει αμφισβητηθεί έντονα από διάφορους ερευνητές και η χρήση του τελικά γίνεται με εμπειρικά, παρά με θεωρητικά στοιχεία (Hulbert, 1971, Spatharis *et al.* 2011). Παρόλα αυτά, ο δείκτης Shannon-Wiener συνεχίζει να χρησιμοποιείται λόγω της ευρείας εξάπλωσης του κατά το παρελθόν με στόχο την σύγκριση αποτελεσμάτων (Magurran 2004), καθώς επίσης έχει διερευνηθεί και η αποτελεσματικότητά του στην εκτίμηση της οικολογικής κατάστασης (Molvaer *et al.* 1997, Hill *et al.* 2003, Simboura *et al.* 2005, Muxica *et al.* 2007).

Εκτός του δείκτη Shannon χρησιμοποιήθηκε και ο δείκτης ομοιογένειας ή ισομερούς κατανομής J (Pielou 1969), ο οποίος υπολογίζεται από τον τύπο H'/H_{max} , όπου H' είναι ο δείκτης ποικιλότητας του Shannon χρησιμοποιώντας Log_2 και H_{max} , ο δείκτης ποικιλότητας όταν όλα τα είδη του δείγματος αντιπροσωπεύονται από ίσο αριθμό ατόμων στο δείγμα. Το H_{max} υπολογίζεται από τον τύπο: $H_{max} = \ln(S)$, όπου S είναι ο αριθμός των ειδών στο δείγμα. Παρατηρούμε δηλαδή ότι στους υπολογισμούς συμμετέχει και ο αριθμός των ειδών που έχουμε στο δείγμα μας, ο δείκτης αυτός εξαρτάται επίσης από το μέγεθος του δείγματος. Ένα άλλο μειονέκτημα του δείκτη αυτού είναι πως είναι πολύ ευαίσθητος στις αλλαγές του αριθμού (πρόσθεση-αφαίρεση) των πολύ σπάνιων ειδών του δείγματος.

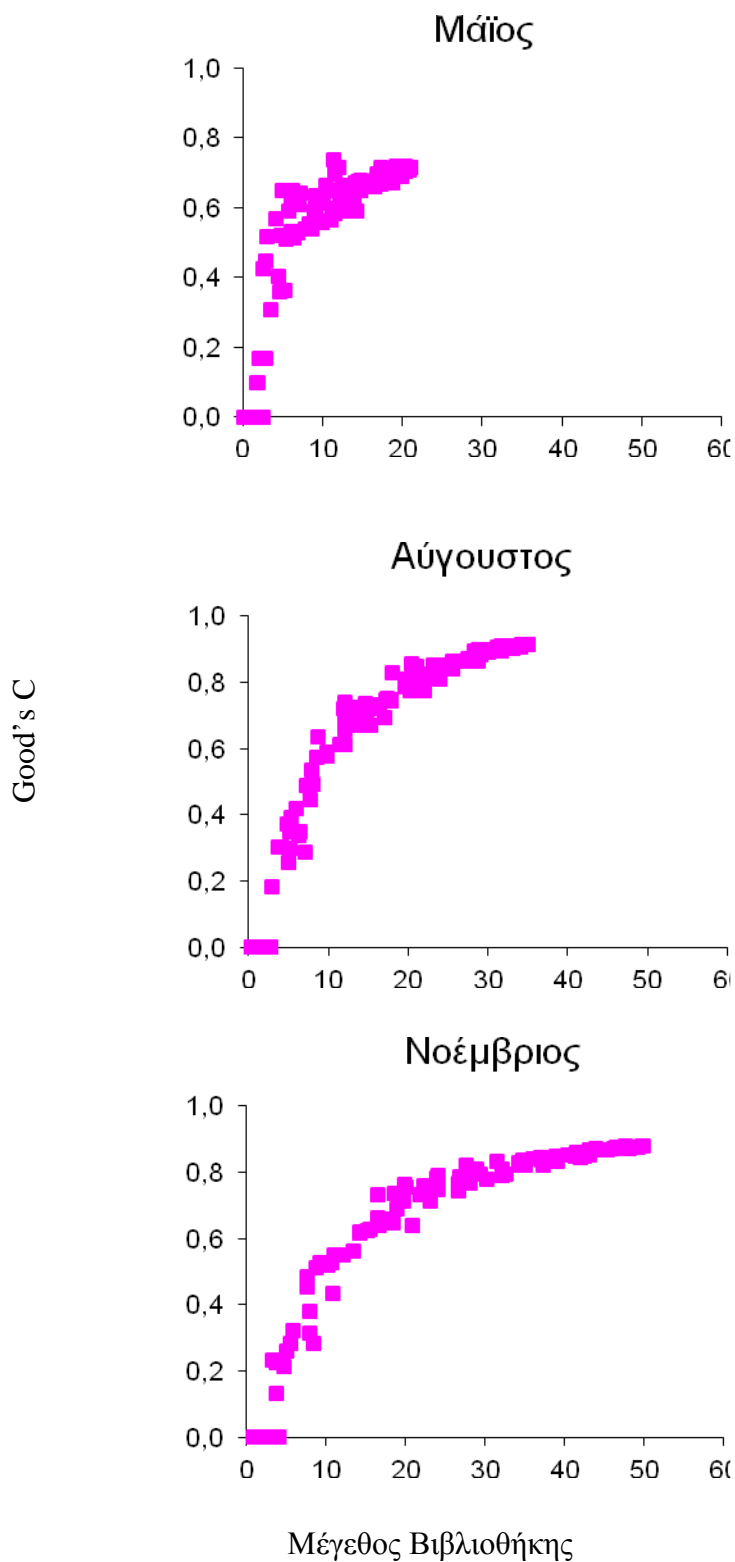
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Κάλυψη βιβλιοθήκης

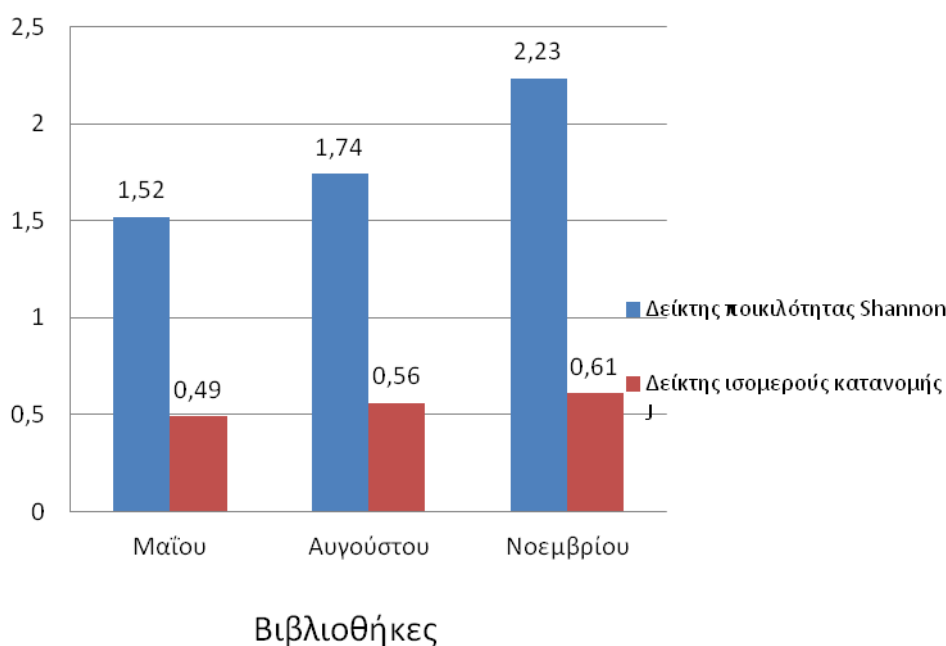
Η ανάλυση της κάλυψης των κλώνων βασίζεται στον δείκτη Good's C (Good 1953, Kemp & Aller 2004). Οι τιμές που έδωσε ο δείκτης για τον μήνα Μάιο ήταν 0,71, για τον μήνα Αύγουστο 0,91 και για τον μήνα Νοέμβριο 0,88. Αυτό σημαίνει ότι το υπόδειγμα που πήραμε καλύπτει το 71%, το 91% και το 88% των βιβλιοθηκών για τους μήνες Μάιο, Αύγουστο και Νοέμβριο αντίστοιχα. Μια καλή εκτίμηση για την ποικιλότητα των φυλοτύπων σε σχέση με τον αριθμό των κλώνων που αλληλουχήθηκαν δίνουν τα διαγράμματα, (Σχ. 1) όπου όπως φαίνεται οι καμπύλες τείνουν να γίνουν ασυμπτωτικές.

3.2 Ποσοτική ανάλυση ποικιλότητας

Ο δείκτης ποικιλότητας Shannon για τις βιβλιοθήκες Μαΐου, Αυγούστου και Νοεμβρίου έδωσε τις τιμές 1,52, 1,74 και 2,23, αντίστοιχα. Ο δείκτης ισομερούς κατανομής για την βιβλιοθήκη του Μαΐου ήταν 0,49 για την βιβλιοθήκη του Αυγούστου 0,56 και τέλος για την βιβλιοθήκη του Νοεμβρίου 0,61 (Σχ. 2). Η μέγιστη τιμή του δείκτη Shannon που θα μπορούσαμε να παρατηρήσουμε στη βιβλιοθήκη του Μαΐου είναι $H_{max} = 3,09$ του Αυγούστου είναι $H_{max} = 3,09$ και του Νοεμβρίου είναι $H_{max} = 3,64$.



Σχήμα 1: Κάλυψη των κυανοβακτηριακών κλώνων των βιβλιοθηκών Μαΐου, Αυγούστου, Νοεμβρίου, 2010 βασισμένη στο δείκτη Good's C, από την υδάτινη στήλη της λίμνης Κάρλας.



Σχήμα 2: Μεταβολή του δείκτη ποικιλότητας Shannon και του δείκτη ισομερούς κατανομής J στις βιβλιοθήκες Μαΐου, Αυγούστου και Νοεμβρίου 2010, Κάρλα.

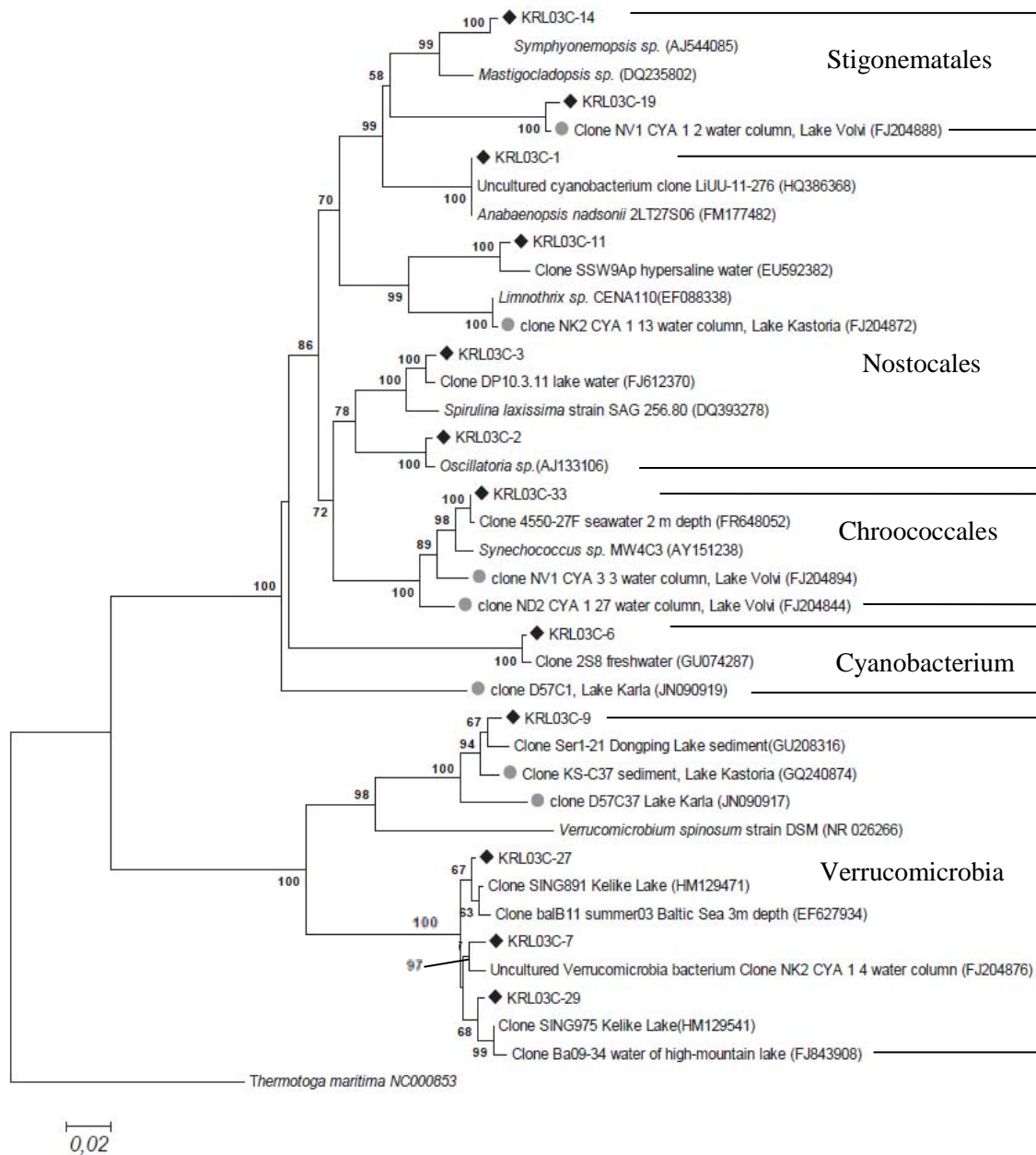
3.3 Ανάλυση φυλοτύπων

Οι πίνακες 1,2 και 3 του παραρτήματος απεικονίζουν τους φυλοτύπους των βακτηρίων που προέκυψαν μετά την αλληλούχιση για τις βιβλιοθήκες του Μαΐου, του Αυγούστου και του Νοεμβρίου. Οι κυανοβακτηριακοί φυλότυποι που ανακτήθηκαν από την παρούσα μελέτη συνδέονται με τις ταξινομικές ομάδες των Nostocales, Chroococcales, και Stigonematales. Παρόλο που, οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη θεωρούνται ειδικοί για τον εντοπισμό των κυανοβακτηρίων (Nübel *et al.* 1997), φαίνεται να εντοπίζουν και αλληλουχίες και από άλλα φύλα, όπως τα Verrucomicrobia με αρκετά μεγάλο ποσοστό σχετικής αφθονία, 31,2% στη βιβλιοθήκη του Μαΐου, 31,5% στη βιβλιοθήκη του Αυγούστου και 14,0% στη βιβλιοθήκη του Νοεμβρίου. Τα Verrucomicrobia είναι ευρέως διανεμημένα και αρκετά

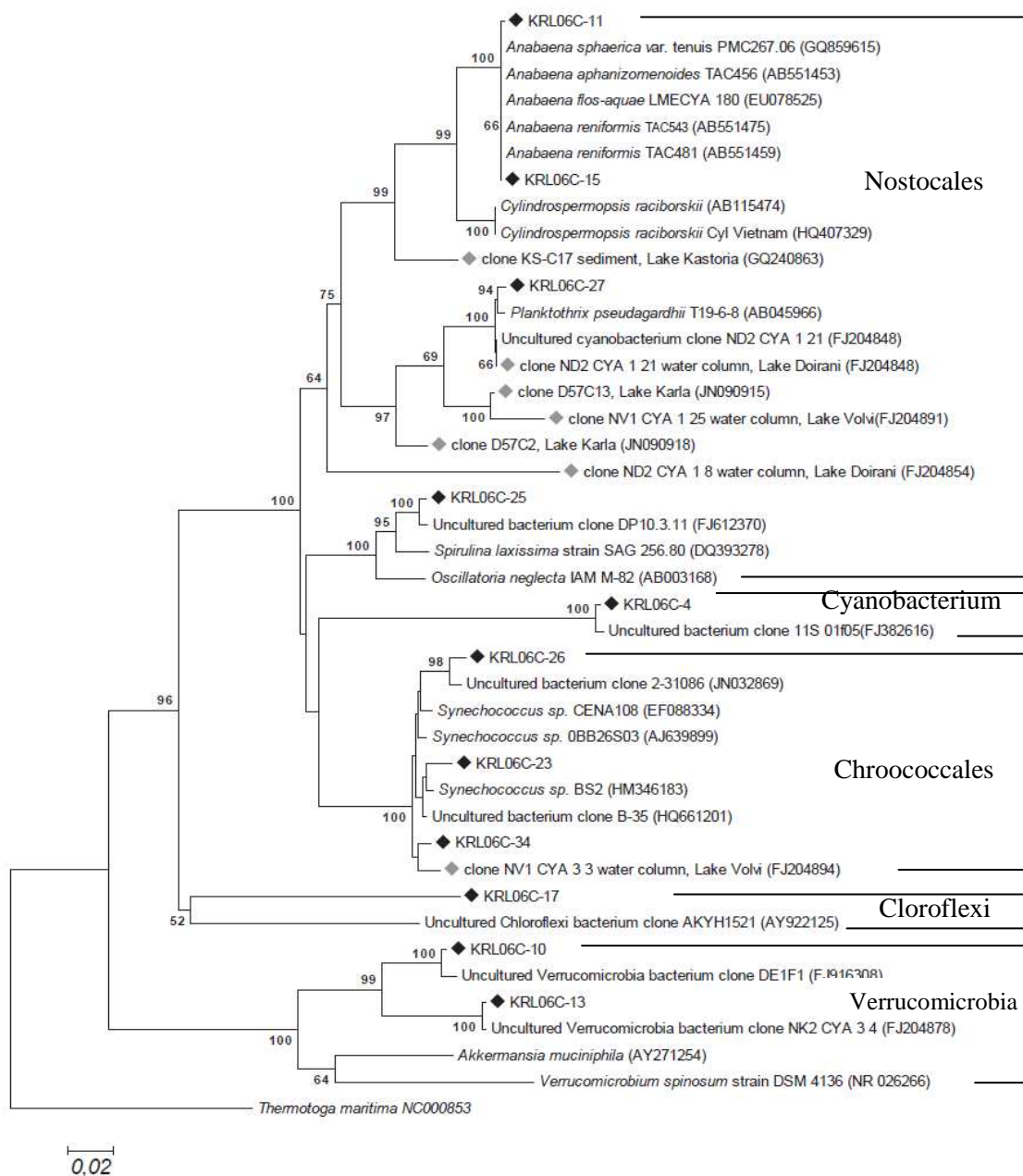
από αυτά ζουν σε συνδυασμό με ευκαρυωτικά κύτταρα (Wagner *et al.* 2006) και έχουν βρεθεί με κυανοβακτηριακές ανθίσεις όχι μόνο στη μελέτη μας, αλλά και σε άλλες εύτροφες λίμνες (Wu *et al.* 2007, Ye *et al.* 2009, Kormas *et al.* 2010).

3.4 Φυλογενετικά δέντρα

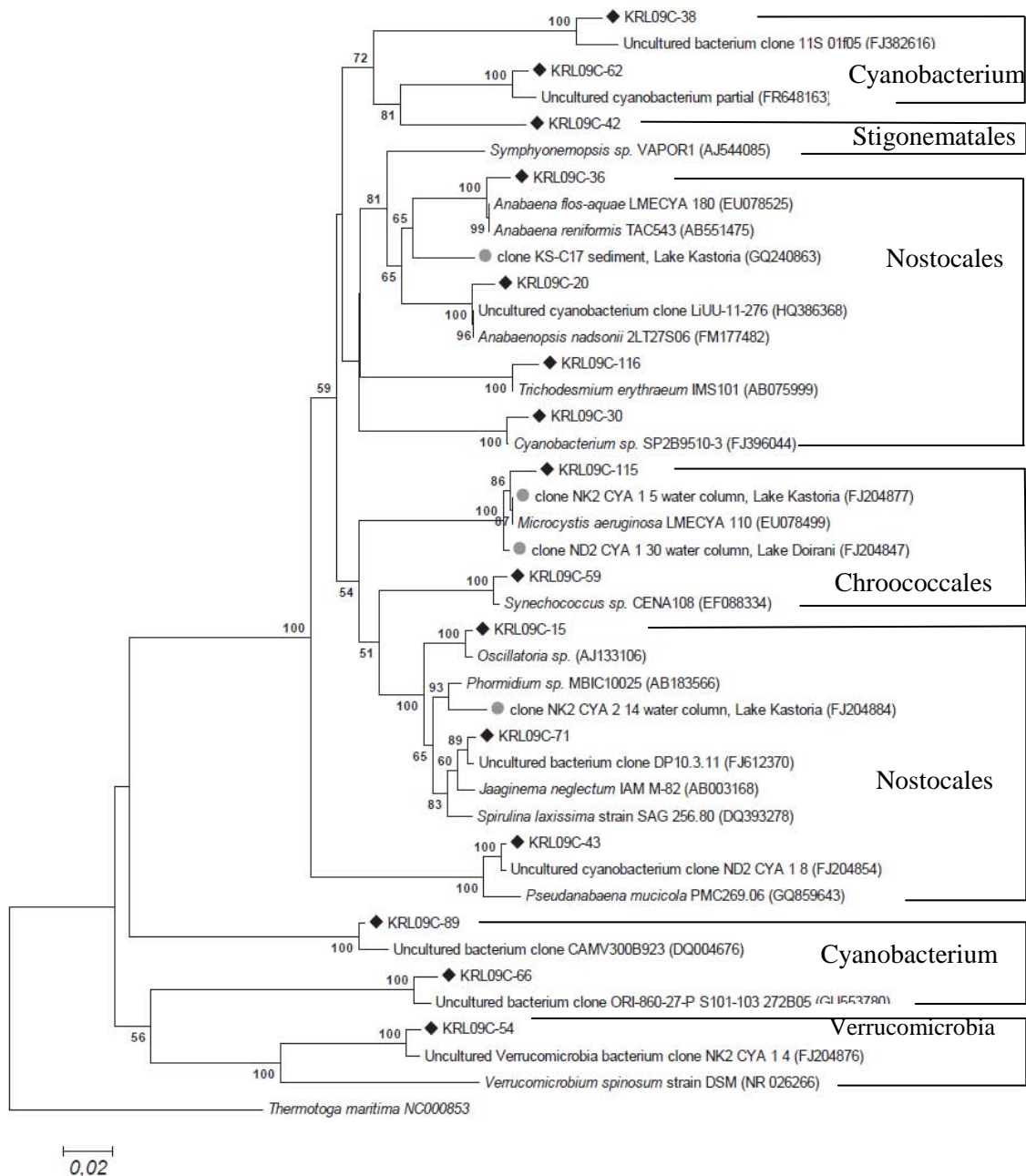
Για την καλύτερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων, από τις αλληλουχίες που προέκυψαν και με τη διαδικασία που αναφέρεται στη μεθοδολογία, κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα (Εικ.: 4, 5, 6) στα οποία ομαδοποιήθηκαν οι αλληλουχίες σε ταξινομικές ομάδες με απώτερο σκοπό την αποκάλυψη της δομής της βιοκοινότητας των κυανοβακτηρίων της λίμνης Κάρλας. Για να εντοπιστεί η ρίζα του φυλογενετικού δέντρου, χρησιμοποιήθηκε και μία απομακρυσμένη από τις υπόλοιπες, αλληλουχία (outgroup).



Εικόνα 4: Φυλογενετικό δέντρο των σχέσεων των 16s rRNA γονιδίων των μοναδικών κυανοβακτηριακών φυλοτύπων που ανιχνεύθηκαν στο νερό της λίμνης Κάρλας τον μήνα Μάιο, βασισμένο στη μέθοδο neighbour-joining όπως καθορίζεται από την ανάλυση αποστάσεων Jukes-Cantor με 1000 επαναλήψεις bootstrap (τα ποσοστά αναγράφονται στους κόμβους). Οι αριθμοί στις παρενθέσεις είναι αριθμοί καταχώρησης της GenBank. Οι φυλότυποι που βρέθηκαν στη λίμνη Κάρλα επισημαίνονται με μαύρο ρόμβο ενώ, με γκρι κύκλο επισημαίνονται φυλότυποι που ανιχνεύθηκαν σε άλλες Ελληνικές λίμνες. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει 2% φυλογενετική απόσταση.



Εικόνα 5: Φυλογενετικό δέντρο των σχέσεων των 16s rRNA γονιδίων των μοναδικών κυανοβακτηριακών φυλοτύπων που ανιχνεύθηκαν στο νερό της λίμνης Κάρλας τον μήνα Αύγουστο, βασισμένο στη μέθοδο neighbour-joining όπως καθορίζεται από την ανάλυση αποστάσεων Jukes-Cantor με 1000 επαναλήψεις bootstrap (τα ποσοστά αναγράφονται στους κόμβους). Οι αριθμοί στις παρενθέσεις είναι αριθμοί καταχώρησης της GenBank. Οι φυλότυποι που βρέθηκαν στη λίμνη Κάρλα επισημαίνονται με μαύρο ρόμβο ενώ, με γκρι κύκλο επισημαίνονται φυλότυποι που ανιχνεύθηκαν σε άλλες Ελληνικές λίμνες. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει 2% φυλογενετική απόσταση.



Εικόνα 6: Φυλογενετικό δέντρο των σχέσεων των 16S rRNA γονιδίων των μοναδικών κυανοβακτηριακών φυλοτύπων που ανιχνεύθηκαν στο νερό της λίμνης Κάρλας τον μήνα Νοέμβριο, βασισμένο στη μέθοδο neighbour-joining όπως καθορίζεται από την ανάλυση αποστάσεων Jukes-Cantor με 1000 επαναλήψεις bootstrap (τα ποσοστά αναγράφονται στους κόμβους). Οι αριθμοί στις παρενθέσεις είναι αριθμοί καταχώρησης της GenBank. Οι φυλότυποι που βρέθηκαν στη λίμνη Κάρλα επισημαίνονται με μαύρο ρόμβο ενώ, με γκρι κύκλο επισημαίνονται φυλότυποι που ανιχνεύθηκαν σε άλλες Ελληνικές λίμνες. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει 2% φυλογενετική απόσταση.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας, αναλύθηκε ένα σύνολο 32, 35 και 50 αλληλουχιών του γονιδίου 16S rRNA από τις βιβλιοθήκες Μαΐου, Αυγούστου και Νοεμβρίου 2010 αντίστοιχα. Οι κλώνοι αυτοί στη συνέχεια ομαδοποιήθηκαν σε 12, 11 και 15 φυλότυπους αντίστοιχα, με κριτήριο ομοιότητας 98%. Οι φυλότυποι που είχαν έναν αντιπροσωπευτικό κλώνο (singletons) αποτελούσαν το 18,75% των φυλοτύπων που βρέθηκαν στη βιβλιοθήκη του Μαΐου, το 8,57% στη βιβλιοθήκη του Αυγούστου και το 8,00% στη βιβλιοθήκη του Νοεμβρίου. Οι κυανοβακτηριακοί φυλότυποι αποτελούσαν το 68,8% της βιβλιοθήκης Μαΐου, 62,9% της βιβλιοθήκης Αυγούστου και 72% της βιβλιοθήκης Νοεμβρίου. Οι φυλότυποι που σχετίστηκαν με τα *Verrucocomicrobia*, αποτελούσαν στη βιβλιοθήκη του Μαΐου το 31,2%, στη βιβλιοθήκη του Αυγούστου το 31,5% και στη βιβλιοθήκη του Νοεμβρίου το 14,0%. Το 2,8% των φυλοτύπων του Αυγούστου συνδέονταν με τα *Chloroflexi*, ενώ με ακαλλιέργητα κυανοβακτήρια συνδέονταν το 2,8% των φυλοτύπων του Αυγούστου και το 14,0% των φυλοτύπων του Νοεμβρίου.

Το Μάιο φαίνεται να κυριαρχεί το είδος *Anabaenopsis nadsonii*, τον Αύγουστο τα είδη *Anabaena flos-aquae* και *Planktothrix pseudagardhii*, ενώ το Νοέμβριο κυριαρχεί το είδος *Synechococcus* sp..

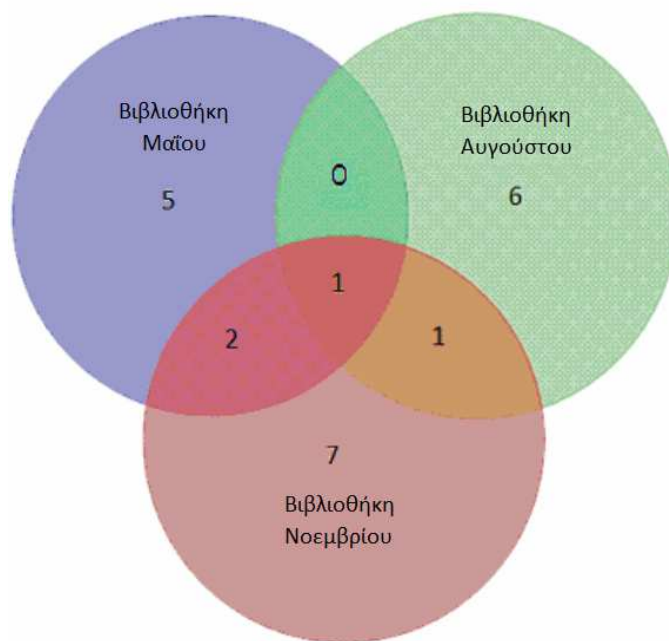
Στη βιβλιοθήκη του Μαΐου από τα οκτώ είδη κυανοβακτηρίων που ανιχνεύθηκαν μόνο το *Spirulina laxissima* είναι κοινό και για τις τρεις βιβλιοθήκες, γεγονός που υποδηλώνει τη συνεχή ύπαρξη του στη λίμνη σε όλες τις δειγματοληψίες. Στη βιβλιοθήκη του Αυγούστου ανιχνεύθηκαν οκτώ είδη κυανοβακτηρίων, από τα οποία εκτός από το είδος *Spirulina laxissima*, κανένα άλλο είδος δεν ήταν κοινό με τα είδη της βιβλιοθήκης του Μαΐου, ενώ με τα είδη της βιβλιοθήκης του Νοεμβρίου έχει

ένα κοινό είδος το *Anabaena flos-aquae*. Στη βιβλιοθήκη του Νοεμβρίου, από τα 11 είδη κυανοβακτηρίων που ανιχνεύθηκαν και εκτός από τα είδη, *Spirulina laxissima* το οποίο όπως προαναφέρθηκε είναι κοινό και για τις τρεις βιβλιοθήκες και το *Anabaena flos-aquae* το οποίο ανιχνεύθηκε και στη βιβλιοθήκη του Αυγούστου, το είδος *Anabaenopsis nadsonii* και μερικά ακαλλιέργητα κυανοβακτήρια εντοπίστηκαν και στη βιβλιοθήκη του Μαΐου (Σχ. 3).

Παρατηρούμε λοιπόν, από την άνοιξη προς το καλοκαίρι και καθώς οι θερμοκρασίες ανεβαίνουν, η στάθμη της λίμνης λόγω της εξάτμισης κατεβαίνει αυξάνοντας την αλατότητα του νερού, νέα είδη κυανοβακτηρίων εμφανίζονται και επικρατούν σε αντικατάσταση αυτών που είχαν ανιχνευθεί στη βιβλιοθήκη του Μαΐου, εκτός από το *Spirulina laxissima* το οποίο εμφανίζεται καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου της δειγματοληψίας. Τα μέλη αυτού του γένους είναι γνωστό ότι έχουν παγκόσμια κατανομή σε θαλάσσια, γλυκά και υφάλμυρα νερά. Είδη του γένους *Spirulina* είναι επίσης κοινά σε εσωτερικές αλμυρές λίμνες και σε ορισμένες θερμές πηγές με θερμοκρασίες ακόμη και 50°C (Castenholz 1977, 1978). Μερικά είδη ή οικότυποι είναι ανθεκτικά σε ένα ευρύ φάσμα της αλατότητας (Javor 1989). Το κατώτατο όριο αλατότητας στο οποίο μπορεί να ανθίσει η *Spirulina* είναι περίπου 5 psu, ενώ η υψηλότερη άνθιση της παρουσιάζεται σε τιμές αλατότητας μεγαλύτερες από 20 psu (Ciferri 1983), αυτό εξηγεί και τις χαμηλές της συγκεντρώσεις που παρατηρήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου δειγματοληψίας.

Μετά τον Αύγουστο προς το τέλος του φθινοπώρου, (Νοέμβριο) και καθώς οι θερμοκρασίες μειώνονται, το είδος *Anabaenopsis nadsonii* και μερικά ακαλλιέργητα κυανοβακτήρια που είχαν εμφανιστεί στη βιβλιοθήκη του Μαΐου επανεμφανίζονται, ευνοούμενα από τις χαμηλότερες θερμοκρασίες. Από τα κυανοβακτήρια της

βιβλιοθήκης του Αυγούστου, μόνο το *Anabaena flos-aquae* εξακολουθεί να ανιχνεύεται στη βιβλιοθήκη του Νοεμβρίου, μαζί φυσικά με το *Spirulina laxissima*, ενώ εμφανίζονται να επικρατούν και άλλα επτά νέα είδη κυανοβακτηρίων.



Βιβλιοθήκες Μαΐου – Αυγούστου - Νοεμβρίου: KRL03C-3

Βιβλιοθήκες Αυγούστου - Νοεμβρίου: KRL06C-11

Βιβλιοθήκες Νοεμβρίου - Μαΐου: KRL09C-20

KRL09C-62

Σχήμα 3: Διάγραμμα Venn των κοινών φυλοτύπων μεταξύ των βιβλιοθηκών Μαΐου, Αυγούστου και Νοεμβρίου. Παρουσιάζονται οι κωδικοί των κοινών φυλοτύπων

Οι τιμές του δείκτη ποικιλότητας H, στη λίμνη Κάρλα κυμάνθηκαν από 1,52 έως 2,23 και είναι ανάλογες με αυτές που μετρήθηκαν στη λίμνη της Καστοριάς και στη λίμνη Δοϊράνη το έτος 2004 (Kormas *et al.* 2011), ενώ είναι σχετικά χαμηλές σε σύγκριση με αυτές που μετρήθηκαν στη λίμνη Δοϊράνη την περίοδο Ιουλίου – Οκτωβρίου 2004, που ξεπέρασαν την τιμή 3 (Πολυκάρπου 2006). Οι χαμηλές τιμές του

δείκτη ποικιλότητας πιθανόν να υποδηλώνουν, την επικράτηση των κυανοβακτηρίων, *Anabaenopsis nadsonii*, *Anabaena flos-aquae*, *Planktothrix pseudagardhii*, και *Synechococcus sp.* στην υδάτινη στήλη της λίμνης Κάρλας. Η ελάχιστη τιμή του δείκτη ισομερούς κατανομής J μέγιστη τιμή του δείκτη ποικιλότητας Shannon απαντάται στη βιβλιοθήκη Νοεμβρίου ακολουθώντας τη διακύμανση τιμών του.

4.1 Ταξινομικές ομάδες που ανιχνεύθηκαν

Nostocales: Η ταξινομική ομάδα Nostocales φαίνεται να κυριαρχεί στις βιβλιοθήκες του Μαΐου και του Αυγούστου. Περιλαμβάνει αποκλειστικά νηματοειδή κυανοβακτήρια με ετεροκύτταρα και ψευδείς διακλαδώσεις. Τα τριχώματα είναι ομοιοπολικά ή ετεροπολικά, υποχρεωτικά μονόσειρα και τα κύτταρα διαιρούνται πάντοτε κάθετα προς τον επιμήκη άξονα του κυττάρου. Εμφανίζονται σε γλυκά νερά, σε χερσαία ενδιαιτήματα, ενώ έχουν παρατηρηθεί και σε υφάλμυρες λίμνες (Jungblut & Neilan 2010). Μερικά είδη της ομάδας αυτής αναπτύσσουν συμβιωτική σχέση με άλλα φυτά (Singh *et al.* 2009). Τα είδη των κυανοβακτηρίων που ανήκουν στην ταξινομική ομάδα αυτή και αναγνωρίστηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας έρευνας απαντώνται και σε άλλα υδάτινα συστήματα της Ελλάδας (Καστοριά, Κερκίνη, Δοϊράνη, Παμβώτιδα και Αμβακία) των οποίων η τροφική κατάσταση είναι κυρίως εύτροφη (Anagnostidis & Economou-Amilli 1980, Hindák & Moustaka 1988, Moustaka-Gouni 1988, Moustaka-Gouni & Nikolaidis 1990, Σπαρτινού 1992, Moustaka *et al.* 2000, Temponeras *et al.* 2000, Vardaka *et al.* 2005, Moustaka *et al.* 2006, Kormas *et al.* 2010).

Στη βιβλιοθήκη του Μαΐου και στη βιβλιοθήκη του Νοεμβρίου, ο φυλότυπος KRL03C-1 με σχετική αφθονία 37,5% και ο φυλότυπος KRL09C-20 με σχετική

αφθονία 6,0% αντίστοιχα, σχετίστηκαν με τον φυλότυπο *Anabaenopsis nadsonii* 2LT27SO6 ο οποίος βρέθηκε στη λίμνη Trasimeno στην κεντρική Ιταλία (Mugnai *et al.* 2008) (ποσοστό ομοιότητας 100%). Οι πιο πυκνοί πληθυσμοί του ενδεχομένως τοξικού κυανοβακτηρίου που ανιχνεύθηκαν στη λίμνη Trasimeno παρατηρήθηκαν από τις αρχές του καλοκαιριού ως και τα τέλη του φθινοπώρου, χωρίς να φτάσουν όμως οι συγκεντρώσεις τους σε υψηλά επίπεδα (Mugnai *et al.* 2008). Στο ίδιο είδος ανήκει και ο κλώνος KS_C17 ο οποίος εντοπίστηκε στο ίζημα της λίμνης της Καστοριάς (Kormas *et al.* 2010).

Στην ίδια ταξινομική ομάδα ανήκουν και οι φυλότυποι KRL06C-11 και KRL09C-36, που εντοπίστηκαν στις βιβλιοθήκες Αυγούστου και Νοεμβρίου, με ποσοστό σχετικής αφθονίας 14,3% και 10,0% αντίστοιχα και σχετίζονται με τον φυλότυπο *Anabaena flos-aquae* LMECYA 180 ο οποίος εντοπίστηκε σε λίμνη της Πορτογαλίας (Valerio *et al.* 2009). Το είδος αυτό είναι ένα από τα είδη των κυανοβακτηρίων που ευθύνονται κυρίως για τους τοξικούς επιπολασμούς (Gkelis *et al.* 2001). Τα νηματοειδή *Anabaena flos-aquae* διαθέτουν αεροτόπια, τα οποία τους δίνουν τη δυνατότητα να ρυθμίζουν τη θέση τους στη στήλη του νερού και ευνοούνται κυρίως σε υψηλές τιμές θερμοκρασίας και φωτός και όταν δεν επικρατεί ανάμειξη της στήλης. Οι βροχοπτώσεις έχουν ανασταλτική επίδραση στη ανάπτυξη τους ενώ πτώση των πληθυσμών τους παρατηρείται με μείωση της θερμοκρασίας του νερού (Moustaka-Gouni 1988, Τρύφων 1994, Vardaka *et al.* 2000, Reynolds *et al.* 2002).

Ο φυλότυπος KRL06C-15, με σχετική αφθονία 8,6%, ο οποίος εντοπίστηκε στη βιβλιοθήκη του Αυγούστου, σχετίστηκε με τον φυλότυπο *Anabaena aphanizomenoides* TAC456 ο οποίος εντοπίστηκε σε λίμνη της Ιαπωνίας, Ibaraki (Tuji & Niiyama 2010). Το είδος *Anabaena aphanizomenoides* είναι γνωστό ως τοξικό κυανοβακτήριο (Sivonen

& Jones 1999, Cook *et al.* 2004, Burch & Humpage 2005, Vardaka *et al.* 2005). Η αύξηση του φαίνεται να ευνοείται σε αλατότητα μεγαλύτερη από 15 psu (Moisander *et al.* 2002) αυτό ίσως εξηγεί και την εμφάνιση του μόνο τον μήνα Αύγουστο όπου η αλατότητα είναι στα 13,2 psu.

Ο φυλότυπος KRL09C-116, με σχετική αφθονία 4,0%, ο οποίος ανιχνεύθηκε στη βιβλιοθήκη του Νοεμβρίου, συνδέεται με το είδος *Trichodesmium erythraeum*, ένα είδος θαλάσσιου κυανοβακτηρίου που τείνει να σχηματίζει εκτεταμένες ανθίσεις σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές, κυρίως στον Ινδικό και Ειρηνικό ωκεανό. Εντοπίστηκε στην υφάλμυρη λίμνη Chilka στην ανατολική ακτή της Ινδίας (Adhikary & Sahu 1992), ενώ για πρώτη φορά εντοπίζεται σε κάποια ελληνική λίμνη, στην παρούσα εργασία. Αυτό το είδος είναι σημαντικό στο παγκόσμιο οικοσύστημα καθώς συμβάλλει ως και 40% στη δέσμευση του αζώτου που συμβαίνει στον ωκεανό και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο ως "βιολογική αντλία του άνθρακα". Μια εκτενής άνθιση αυτού του είδους καταγράφηκε για πρώτη φορά σε γεωγραφικό πλάτος μεγαλύτερο από 30° Β στην Ανατολική Μεσόγειο. Η άνθιση εμφανίστηκε το Σεπτέμβριο του 2010 μετά από μια παρατεταμένη περίοδο υψηλών θερμοκρασιών επιφάνειας και απάνεμων ημερών. Οι συνθήκες αυτές, σπάνια συναντώνται στην περιοχή και θεωρούνται από τους κύριους παράγοντες που οδήγησαν σε υψηλές πυκνότητες του *T. erythraeum*. Αυτά τα συμπεράσματα φαίνεται να συνδέονται άμεσα με την αλλαγή του κλίματος που παρατηρείται στην περιοχή της Μεσογείου (Spatharis *et al.* 2012). Οι ανθίσεις του *Trichodesmium* έχουν συνδεθεί με τοξικότητα σε θαλάσσια ασπόνδυλα καθώς και στους ανθρώπους (Hawser *et al.* 1992). Από το είδος *Trichodesmium erythraeum* δεν έχει απομονωθεί τοξίνη σε χημικές αναλύσεις που

πραγματοποιήθηκαν στην Αυστραλία, διαφορετικές όμως περιβαλλοντικές συνθήκες δεν αποκλείουν την ανάπτυξη τους (Negri *et al.* 2003)

Φυλότυποι και από τις τρεις βιβλιοθήκες συνδέθηκαν με το είδος *Spirulina laxissima*. Στη βιβλιοθήκη του Μαΐου ο φυλότυπος εμφανίστηκε με σχετική αφθονία 3,1% και ποσοστό ομοιότητας 97%, στη βιβλιοθήκη του Αυγούστου με σχετική αφθονία 5,7% και ποσοστό ομοιότητας 97% και στη βιβλιοθήκη του Νοεμβρίου με σχετική αφθονία 2,0% και ποσοστό ομοιότητας 97%. Το ταξινομικό όνομα «*Spirulina*» έχει χρησιμοποιηθεί από το 1932 για να δηλώσει κυανοβακτήρια που μορφολογικά εμφανίζονται ως πολυκύτταρα μη διακλαδισμένα τριχώματα με σπειροειδή περιέλιξη. Στη φύση απαντώνται συνήθως σε αλκαλικές, εύτροφες και με υψηλή αλατότητα λίμνες έως και 70 psu (Ciferri 1983). Η αύξησή τους ευνοείται σε υψηλές τιμές θερμοκρασίας (Umesh 2002). Η χαμηλή αφθονία που εμφανίζουν οι φυλότυποι οι οποίοι σχετίζονται με το είδος αυτό, καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου δειγματοληψίας, οφείλεται στη χαμηλή αλατότητα, που απαντάται στην υδάτινη στήλη της λίμνης Κάρλας, σε σχέση με τις τιμές αλατότητας που ευνοούν την αύξηση του. Τον Αύγουστο που η θερμοκρασία και η αλατότητα της υδάτινης στήλης αυξάνονται, εμφανίζεται και η μεγαλύτερη αφθονία του. Είναι τρόφιμο υψηλής διατροφικής αξίας. Περιέχει ένα πλήθος βιοδραστικών θρεπτικών συστατικών όπως υψηλής ποιότητας πρωτεΐνη, σίδηρο, σελήνιο, γ-λινολενικό οξύ, β-καροτένιο (Προβιταμίνη Α), βιταμίνες του συμπλέγματος Β, βιταμίνη Ε και μεταλλικά στοιχεία (Sotiroudis 2006).

Ο φυλότυπος KRL03C-11 εντοπίστηκε στην βιβλιοθήκη του Μαΐου και συνδέεται με ποσοστό ομοιότητας 92% με το *Limnothrix sp.* CENA 110, το οποίο απομονώθηκε στη Βραζιλία (Furtado *et al.* 2009) και εντοπίστηκε και στην υδάτινη στήλη της λίμνης της Καστοριάς με τον κλώνο NK2 CYA_1_13 (Kormas *et al.* 2010).

Εκτός από τη λίμνη της Καστοριάς το κυανοβακτήριο *Limnothrix sp.* έχει παρατηρηθεί και σε άλλα υδάτινα συστήματα της Ελλάδας, στον ταμιευτήρα πόσιμου νερού του Μαραθώνα (Lymperopoulou *et al.* 2011) και στο λιμνοποτάμιο σύστημα του Αλιάκμονα (Montesanto *et al.* 2000, Chrisostomou *et al.* 2009), φτάνοντας σε πολλές περιπτώσεις υψηλές πληθυσμούς (Vardaka *et al.* 2000). Τα είδη του γένους *Limnothrix* χαρακτηρίζονται από την ανθεκτικότητα τους σε συνθήκες υψηλής και συνεχούς ανάμιξης και είναι προσαρμοσμένα σε συνθήκες χαμηλής έντασης φωτός (Rojo & Alvarez Cobelas 1994).

Ο φυλότυπος KRL09C-15 συνδέεται στενά με ποσοστό 99% με το *Oscillatoria sp.* το οποίο εντοπίστηκε στην Ολλανδία (Swart *et al.* 2005) καθώς και με ποσοστό 96% με το είδος *Jaaginema neglectum* IAM M-82 (Ishida *et al.* 1997). Στο ίδιο είδος ανήκει και ο κλώνος NK2 CYA_2_14 ο οποίος εντοπίστηκε στην υδάτινη στήλη της λίμνης της Καστοριάς (Kormas *et al.* 2010). Ο φυλότυπος KRL09C-43 εμφανίζει ομοιότητα 99% με το κλώνο ND2_CYA_1_8 ο οποίος απομονώθηκε στην υδάτινη στήλη της λίμνης Δοιράνης (Kormas *et al.* 2011). Ο φυλότυπος KRL06C-27 εμφανίζει ομοιότητα 99% με το φυλότυπο ND2_CYA_1_21 ο οποίος εμφανίζεται και αυτός στην υδάτινη στήλη της λίμνης Δοϊράνης και συνδέονται με το είδος *Planktothrix pseudagardhii*. Στο ίδιο είδος ανήκουν και οι κλώνοι ND2 CYA_1_8, D57C13, NV1 CYA_1_25 (GenBank, unpublished) και D57C2 οι οποίοι εντοπίστηκαν στις λίμνες Δοϊράνη (Kormas *et al.* 2011), Κάρλα (Oikonomou *et al.* 2012), Βόλβη (Kormas *et al.* 2008, GenBank, unpublished) και Κάρλα (Oikonomou *et al.* 2012) αντίστοιχα. Το είδος αυτό φαίνεται να συνδέεται μορφολογικά με το είδος *Planktothrix agardhii* όμως διαφέρουν σημαντικά όσον αφορά την τοξικότητα καθώς το τελευταίο είναι γνωστό για την παραγωγή μικροκυστινών (Sivonen 1990).

Chroococcales: Η τάξη αυτή περιλαμβάνει μονοκύτταρα και αποικιακά κυανοβακτήρια. Σχηματίζουν αποικίες σφαιρικές, επίπεδες, κυβόμορφες ή ακανόνιστης μορφής. Στην τάξη αυτή ανήκουν και όσα κυανοβακτήρια σχηματίζουν ψευδονήματα. Δεν παρατηρούνται τριχώματα, ετεροκύτταρα και έμμονα κύτταρα. Αναπαράγονται με απλή κυτταρική διαίρεση και δυαδική ή πολλαπλή σχάση (Graham & Wilcox 2000).

Το είδος *Microcystis aeruginosa* το οποίο ανήκει στην ταξινομική ομάδα Chroococcales, φαίνεται να κυριαρχεί στην υδάτινη στήλη της λίμνης Κάρλας το μήνα Νοέμβριο. Το μήνα αυτό σημειώθηκαν οι χαμηλότερες τιμές αλατότητας στη λίμνη Κάρλα κατά τη διάρκεια του πειράματος, γεγονός που επιτρέπει την ανάπτυξη του είδους *Microcystis aeruginosa* καθώς αυτό δεν αναπτύσσετε σε τιμές αλατότητας μεγαλύτερες των 10 psu (Tonk *et al.* 2007). Η τοξίνη που παράγει το *M. aeruginosa* είναι γνωστό ότι είναι μια από τις σημαντικότερες ηπατοτοξίνες (Sivonen & Jones 1999). Οι επιπολασμοί του είδους αυτού σε μεσογειακές χώρες όπως και η Ελλάδα, μπορεί να διαρκούν μεγάλα χρονικά διαστήματα. Ένας σημαντικός παράγοντας για την επικράτηση του *Microcystis* είναι η ικανότητα του να ρυθμίζει τη θέση του στη στήλη του νερού. Το είδος *Microcystis aeruginosa* έχει ανιχνευθεί στο φυτοπλαγκτό της λίμνης της Καστοριάς στο παρελθόν και επίσης κατά τη περίοδο 1996, 1997 και 1999 μετά τη μείωση των εξωτερικών φορτίων θρεπτικών (Βαρδάκα 2001, Moustaka-Gouni *et al.* 2007, Kormas *et al.* 2010). Εκτός από τη λίμνη της Καστοριάς το είδος *Microcystis aeruginosa* εντοπίστηκε και στις λίμνες Βιστωνίδα, Βόλβη, Κερκίνη, Δοϊράνη, Μικρή Πρέσπα και Παμβώτιδα (Cook *et al.* 2004). Ο φυλότυπος που εντοπίστηκε στον ταμιευτήρα της λίμνης του Μαραθώνα στην Αττική το έτος 2007, σχετίστηκε με το είδος αυτό, με διαφορετικούς όμως εκκινητες και με μικρότερη αλληλουχία (Lympferopoulou *et al.* 2011). Ο φυλότυπος KRL09C-115 ο οποίος

εντοπίστηκε τον μήνα Νοέμβριο στη λίμνη Κάρλα εμφάνισε ομοιότητα με το είδος *Microcystis aeruginosa*. Στο ίδιο είδος ανήκαν και οι κλώνοι NK2 CYA_1_5 και ND2 CYA_1_30 οι οποίοι εντοπίστηκαν στη λίμνη της Καστοριάς (Kormas *et al.* 2010) και στη λίμνη της Δοϊράνης (Kormas *et al.* 2011) αντίστοιχα. Υψηλές συγκεντρώσεις μικροκυστινών βρέθηκαν στις λίμνες της Καστοριάς και της Παμβώτιδας, ενώ χαμηλές συγκεντρώσεις βρέθηκαν στις λίμνες Βιστωνίδα, Βόλβη και Αμβρακία οι οποίες πιθανώς να οφείλονται στο είδος *Microcystis aeruginosa* (Γκέλης 2006). Την περίοδο Αυγούστου – Νοεμβρίου 2003, στη φραγμαλίμνη του Πολυφύτου πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα μελέτη για αερομεταφερόμενους φυτοπλακτονικούς μικροοργανισμούς από τους Chrisostomou *et al.*, (2009). Τα κυανοβακτήρια αποτέλεσαν το 18,4% του συνολικού πληθυσμού που ανιχνεύθηκε. Η σύνθεση της κοινότητας των αερομεταφερόμενων κυανοβακτηρίων και μικροφυκών μπορεί να επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, ανάμεσα στους οποίους είναι περιβαλλοντικές και κλιματικές συνθήκες (Sharma *et al.* 2007), καθώς και η εγγύτητα σε υδάτινα συστήματα που μπορούν να δράσουν ως δεξαμενές ειδών (Sharma *et al.* 2006, Chrisostomou *et al.* 2009). Στην ομάδα των κυανοβακτηρίων που εντοπίστηκαν να αερομεταφέρονται πάνω από τη φραγμαλίμνη του Πολυφύτου, ανιχνεύθηκαν και τα *Anabaena arhanizomenoides* και *Microcystis aeruginosa*. Στις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν στην υδάτινη στήλη της λίμνης Κάρλας στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, μεταξύ άλλων ανιχνεύθηκαν, τον μήνα Αύγουστο το είδος *Anabaena arhanizomenoides* και τον μήνα Νοέμβριο το είδος *Microcystis aeruginosa*, γεγονός που πιθανόν εξηγείται από την παραπάνω μελέτη των Chrisostomou *et al.*, (2009).

Σύμφωνα με δεδομένα που προέρχονται από επιδημιολογικά στοιχεία, οι κυανοτοξίνες έχουν σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου,

συμπεριλαμβανομένων δηλητηριάσεων ανθρώπινων πληθυσμών, δηλητηριάσεων ζώων και τοξικολογικών μελετών (Kuiper-Goodman *et al.* 1999). Η παρουσία μικροκυστινών στο πόσιμο νερό μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την υγεία του ανθρώπου (Codd *et al.* 1997, Falconer *et al.* 1999b). Οι αγρότες κατά τη διάρκεια των αρδεύσεων, δυνητικά βρίσκονται σε κίνδυνο από την εισπνοή σταγονιδίων που περιέχει τις τοξίνες (Ito *et al.* 2001) ή μέσω δερματολογικής επαφής με τοξίνες που περιέχει το νερό (Falconer *et al.* 1999a). Άρδευση με νερό που περιέχει κυανοβακτήρια μπορεί να οδηγήσει στη συσσώρευση τοξινών στις εξωτερικές επιφάνειες των βρώσιμων φυτικών υλών (Falconer *et al.* 1999a). Οι επιδράσεις των μικροκυστινών στον ανθρώπινο οργανισμό μπορεί να είναι από επεισόδια γαστρεντερίτιδας, ηπατικές βλάβες μέχρι και τον θάνατο, ενώ είναι ύποπτες για την πρόκληση καρκίνου στους ανθρώπους (Abe *et al.* 1996, Codd *et al.* 1997).

Οι φυλότυποι KRL03C-33 με σχετική αφθονία 3,1% από τη βιβλιοθήκη του Μαΐου, KRL06C-34 με σχετική αφθονία 8,6%, KRL06-23 με σχετική αφθονία 8,6% από τη βιβλιοθήκη του Αυγούστου και KRL09C-59 με σχετική αφθονία 18,0% από τη βιβλιοθήκη του Νοεμβρίου, εμφανίζουν ομοιότητα 99% ,99%,98% και 98% αντίστοιχα με το γένος *Synechococcus*. Στο ίδιο γένος ανήκαν επίσης και οι κλώνοι NV1 CYA33 και ND2 CYA 127 οι οποίοι εντοπίστηκαν στη λίμνη Βόλβη (Kormas *et al.* 2008 Unpublished) και στη λίμνη Δοϊράνη (Kormas *et al.* 2011) αντίστοιχα. Οι αποικίες *Synechococcus* μπορεί να βρεθούν σε υδάτινα οικοσυστήματα όπου η αλατότητα είναι σχετικά χαμηλή (<15-20 psu) και σε θερμοκρασίες <20 °C (Beardall *et al.* 2008). Αν και δεν προκαλούν άνθιση του νερού μπορούν να φτάσουν στην υψηλότερη αφθονία τους σε περιόδους όπου υπάρχει σοβαρός περιορισμός θρεπτικών όπως το καλοκαίρι και το φθινόπωρο. Θεωρείται ότι η συνήθεια τους για ομαδοποίηση προκειμένου να

σηματίσουν κλειστές αποικίες, βοηθά στην πιο αποτελεσματική ανακύκλωση των θρεπτικών συστατικών, επιτρέποντάς τους να ευημερήσουν σε δυσμενείς συνθήκες (Fahnenstiel & Carrick' 1991).

Και στα δύο στελέχη *Synechococcus*, του θαλάσσιου και του γλυκού νερού, η κυτταρική διαίρεση εξαρτάται από το φως και φθάνει στο ανώτερο της όριο το απόγευμα δημιουργώντας μια αύξηση του αριθμού των κυττάρων που σταδιακά μειώνεται καθώς προχωρά η νύχτα. Αυτοί οι κύκλοι φωτός / σκότους δημιουργούν ένα ρυθμικό μοτίβο κυτταρικής διαίρεσης και ανάπτυξης, το οποίο οδηγείται από τις επικρατούσες συνθήκες φωτισμού. Βέλτιστη ανάπτυξη εμφανίζεται κάτω από συνθήκες πολύ χαμηλού φωτισμού, αλλά χάρη σε μια μέθοδο της φωτο-προσαρμογής, η κυτταρική ανάπτυξη και φωτοσυνθετική δραστηριότητα συνεχίζεται ακόμα και σε συνθήκες πολύ υψηλής ηλιακής ακτινοβολίας (Scanlan & West 2002).

Stigonematales: Στη τάξη αυτή τα νήματα των κυανοβακτηρίων είναι μονόσειρα ή πολύσειρα, ετεροκύτταρα και έχουν γνήσια διακλάδωση (Gugger & Hoffmann, 2004). Η ανάλυση των φυλοτύπων έδειξε ότι οι φυλότυποι KRL03C-14 με σχετική αφθονία 3,1% από τη βιβλιοθήκη του Μαΐου και KRL09C-42 με σχετική αφθονία 4,0% από τη βιβλιοθήκη του Νοεμβρίου εμφανίζουν ομοιότητα 97% με το είδος *Symphyonemopsis* sp. VAPOR1 το οποίο απομονώθηκε από το σπήλαιο El vapor της Ισπανίας. Το ίδιο γένος έχει εμφανιστεί και σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Ελλάδα, στο σπήλαιο Κουτούκι της Παιανίας καθώς και στο σπήλαιο Καστρία της Αχαΐας (Lamprinou *et al.* 2011). Το είδος *Symphyonemopsis* sp. VAPOR1 έχει χρησιμοποιηθεί παλαιότερα σε διάφορες συγκρίσεις (Gugger & Hoffmann 2004, Korelusova' 2008), αλλά δεν θεωρείται ότι είναι ένα τυπικό στέλεχος αναφοράς του *Symphyonemopsis*, ενώ σύμφωνα με Korelusova (2008), ομαδοποιείται λανθασμένα με

την διακλάδωση *Brasilonema*. Ο φυλότυπος KRL03C-19 με σχετική αφθονία 6,4% εμφάνισε ομοιότητα 99% με τον κλώνο NV1 CYA_1_2 ο οποίος εντοπίστηκε στη λίμνη Βόλβη και σχετίζονται με το είδος *Mastigocladopsis sp.* Οι παραπάνω ταξινομικές ομάδες παρατηρήθηκαν και οπτικά σε φρέσκο δείγμα από την υδάτινη στήλη της λίμνης Κάρλα, με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά (M. Moustaka-Gouni, αδημοσίευτα δεδομένα).

Ένας φυλότυπος με ποσοστό σχετικής αφθονίας 2,8% εμφάνισε ομοιότητα με φυλότυπο που συνδέεται με την ταξινομική ομάδα των Chloroflexi και εντοπίστηκε σε έδαφος αγροκτήματος στη Μινεσότα (Tringe *et al.* 2005). Επτά φυλότυποι εμφάνισαν ομοιότητα με φυλοτύπους οι οποίοι σχετίζονται με τα Verrucomicrobia τα οποία θεωρούνται «παγκόσμια διανεμημένα» σε υδάτινα οικοσυστήματα γλυκού νερού (Eiler & Bertilsson 2004, Lemke *et al.* 2009). Επιπλέον πέντε φυλότυποι σχετίζονται με ακαλλιέργητα βακτήρια, πιθανώς λόγω της μη ειδικής επικάλυψης των εκκινητών.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η λίμνη Κάρλα της οποίας η επανασύσταση ξεκίνησε το έτος 2000 αποτελεί ένα νέο οικοσύστημα στο οποίο αναπτύσσονται δυναμικές σχέσεις μεταξύ των οργανισμών μέχρι να επέλθει μια σχετική οικολογική ισορροπία. Οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στο υδάτινο οικοσύστημα πιθανόν να προήλθαν από εισρέοντα ύδατα μέσω των ρεμάτων, χειμάρρων καθώς και του ποταμού Πηνειού, απ' όπου η λίμνη Κάρλα δέχεται τα νερά για την επανασύσταση της. Άλλος πιθανός τρόπος προέλευσης των κυανοβακτηρίων στην υδάτινη στήλη της λίμνης είναι η αερομεταφορά τους. Η πρώτη μελέτη για την αερομεταφορά των μικροοργανισμών που πραγματοποιήθηκε στην Ελλάδα ήταν από τους Chrisostomou *et al.*, (2009) οι οποίοι μελέτησαν τους αερομεταφερόμενους φυτοπλαγκτονικούς μικροοργανισμούς πάνω από τη φραγμαλίμνη του Πολυφύτου την περίοδο Αυγούστου – Νοεμβρίου 2003. Στην ομάδα των κυανοβακτηρίων που εντοπίστηκαν να αερομεταφέρονται πάνω από τη φραγμαλίμνη του Πολυφύτου, ανιχνεύθηκαν και τα *Anabaena arhanizomenoides* και *Microcystis aeruginosa*. Στις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκε στην υδάτινη στήλη της λίμνης Κάρλας στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, μεταξύ άλλων ανιχνεύθηκαν, τον μήνα Αύγουστο το είδος *Anabaena arhanizomenoides* και τον μήνα Νοέμβριο το είδος *Microcystis aeruginosa*, γεγονός που πιθανόν εξηγείται από την παραπάνω μελέτη.

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία αερομεταφερόμενα κυανοβακτήρια μπορεί να προέρχονται από θαλάσσια οικοσυστήματα (Genitsaris *et al.* 2011) γεγονός που πιθανόν ερμηνεύει την παρουσία του *Trichodesmium erythraeum* στην υδάτινη στήλη της λίμνης. Τέλος δεν αποκλείεται η πιθανότητα κάποιοι μικροοργανισμοί να απέμειναν στις ελώδεις εκτάσεις και στο ίζημα αυτών μετά την ξήρανση της λίμνης με ανθεκτικές

μορφές του κύκλου ζωής τους και να έδρασαν σαν εμβόλιο κατά τον επανασχηματισμό της λίμνης (Chrisostomou *et al.* 2009).

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι στην υδάτινη στήλη της λίμνης Κάρλας τον μήνα Μάιο όπου οι θερμοκρασίες και η αλατότητα δεν είναι πολύ υψηλές, εντοπίζονται κυρίως είδη κυανοβακτηρίων της τάξης των Nostocales τα οποία είναι ανταγωνιστικά σε συνθήκες ανάμειξης και υψηλού φωτός (Reynolds *et al.* 2002) όπως συμβαίνει αντίστοιχα και τον μήνα Αύγουστο, όπου έχουμε υψηλότερες θερμοκρασίες και αλατότητα καθώς, έκτος από γλυκά νερά και χερσαία ενδιαιτήματα, έχουν παρατηρηθεί και σε υφάλμυρες λίμνες (Jungblut & Neilan 2010). Τον μήνα Νοέμβριο, καθώς η θερμοκρασία μειώνεται, στην υδάτινη στήλη της λίμνης Κάρλας εντοπίζονται κυρίως κυανοβακτήρια της τάξης των Chroococcales τα οποία είναι ανταγωνιστικά τόσο σε συνθήκες στρωμάτωσης όσο και σε συνθήκες ανάμειξης της στήλης του νερού (Tryfon *et al.* 1997, Vardaka *et al.* 2000, Reynolds *et al.* 2002). Το είδος *Anabaena flos-aquae* το οποίο εμφανίστηκε αρχικά τον μήνα Αύγουστο, φαίνεται να μην επηρεάζεται από τις θερμοκρασιακές μεταβολές και διατηρείται έως και τον μήνα Νοέμβριο με μικρότερη όμως συχνότητα.

Το είδος *Spirulina laxissima* είναι το μοναδικό είδος το οποίο εμφανίζεται καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου δειγματοληψίας. Το κατώτατο όριο αλατότητας στο οποίο μπορεί να ανθίσει η *Spirulina* είναι περίπου 5 psu, ενώ η υψηλότερη άνθιση της παρουσιάζεται σε τιμές αλατότητας μεγαλύτερες από 20 psu (Ciferri 1983), αυτό εξηγεί και τις χαμηλές της συγκεντρώσεις που παρατηρήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου δειγματοληψίας. Τα μέλη αυτού του γένους είναι γνωστό ότι έχουν παγκόσμια κατανομή σε θαλάσσια, γλυκά και υφάλμυρα νερά (Castenholz 1977, 1978).

Αξίζει να σημειωθεί ότι είδη κυανοβακτηρίων τα οποία εντοπίστηκαν τον μήνα Μάιο και δεν μπόρεσαν να διατηρήσουν την παρουσία τους τον μήνα Αύγουστο επανεμφανίστηκαν στην υδάτινη στήλη της λίμνης τον Νοέμβριο με μικρότερη όμως συχνότητα.

Από το σύνολο των ειδών των κυανοβακτηρίων που αναγνωρίστηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας έρευνας στην υδάτινη στήλη της λίμνης Κάρλα, τα είδη *Anabaena flos-aquae* και *Anabaena aphanizomenoides* που ανιχνεύθηκαν τον μήνα Αύγουστο, με ποσοστά σχετικής αφθονίας 14,3% και 8,6% αντίστοιχα και τα είδη *Anabaena flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa* και *Trichodesmium erythraeum* που ανιχνεύθηκαν τον μήνα Νοέμβριο με ποσοστά σχετικής αφθονίας 10,0%, 4,0% και 4,0% αντίστοιχα, είναι γνωστό ότι παράγουν τοξίνες. Το είδος *Anabaenopsis nadsonii* που ανιχνεύθηκε τον μήνα Μάιο και τον μήνα Νοέμβριο με ποσοστό σχετικής αφθονίας 37,5% και 6,0% αντίστοιχα είναι γνωστό ως ενδεχομένως τοξικό κυανοβακτήριο.

Η παρουσία των κυανοβακτηριακών τοξινών στα υδάτινα τροφικά πλέγματα έχει σημαντικές επιπτώσεις στην ικανότητα βόσκησης των κυανοβακτηρίων από το ζωοπλαγκτό καθώς και στην αναστολή της ανάπτυξης ορισμένων πρωτόζωων (Christoffersen 1996). Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί συνδέουν τη θνησιμότητα των ιχθύων σε λίμνες και ταμειυτήρες με την έκθεσή τους σε κυανοβακτηριακές ηπατοτοξίνες (Malbrouck & Kestemont 2006, Zurawell *et al.* 2005). Οι κυανοτοξίνες στα υδάτινα οικοσυστήματα μπορεί να προκαλέσουν σοβαρά προβλήματα υγείας στους ανθρώπους, μεταξύ άλλων γαστροεντερικές διαταραχές, αλλεργίες και ερεθισμούς, ηπατικές παθήσεις (Bell & Codd 1994) μέχρι και τον θάνατο, ενώ είναι ύποπτες για την πρόκληση καρκίνου στους ανθρώπους (Abe *et al.* 1996, Codd *et al.* 1997). Οι άνθρωποι μπορούν να εκτεθούν σε κυανοτοξίνες μέσω δερματικής επαφής,

αιμοδιάλυσης, κατάποσης και εισπνοής των αερομεταφερόμενων κυανοβακτηρίων ή των τοξινών τους (Codd *et al.* 1999).

Η επανασύσταση της λίμνης Κάρλας θα επαναδημιουργήσει τον υδροβιότοπο που χάθηκε με την αποξήρανση της και ταυτόχρονα θα συμβάλει στην άρδευση, στην αλιεία, στην αναψυχή, και πιθανόν μελλοντικά στον αθλητισμό και την ύδρευση της ευρύτερης περιοχής. Για τους λόγους αυτούς είναι σκόπιμη η περαιτέρω διερεύνηση των οργανισμών που αναπτύσσονται στην υδάτινη στήλη της λίμνης, των σχέσεων που αναπτύσσονται μεταξύ τους αλλά και των επιπτώσεων που έχουν, τόσο στο περιβάλλον όσο και στους ανθρώπους.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένα Βιβλιογραφία

- Abe T., Lawson T., Weyers J. D. B., Codd G. A. (1996) Microcystin LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* primary leaves: implications for current spray irrigation practice. *New Phytologist* 133:651-658
- Adhikary S. P., Sahu J. (1992) Studies on the *Trichodesmium* bloom of Chilka Lake, east coast of India. *Phykos Journal*, 30:101-107
- Anagnostidis K., Economou-Amilli A. (1980) Limnological studies on Lake Pamvotis (Ioannina), Greece I. Hydroclimatology, phytoplankton-periphyton with special reference to the valence of some microorganisms from sulphureta as bioindicators. *Archiv Hydrobiologie* 89:313-342
- Ananiadis C.I. (1956) Limnological study of lake Karla. *Bulletin de l' Institute Oceanographic*, 1083:1-19
- Bartholomew J. G. (1922) Times survey atlas of the world. The Times London 59,48
- Bell S. G., Codd G. A. (1994) Cyanobacterial toxins and human health. *Reviews in Medical Microbiology* 5:256-264
- Beardall J., Allen D., Bragg J., Finkel V. Z., Flynn J. K., Quigg A., Rees T. A. V., Richardson A., Raven A. J. (2008) Allometry and stoichiometry of unicellular, colonial and multicellular phytoplankton. *New Phytologist*, 181(2):295-309
- Brettum P., Andersen T. (2005) The use of phytoplankton as indicators of water quality. NIVA report SNO 4818-2004
- Burch M., Humpage A. (2005) Regulation and management of cyanobacteria, current approaches to cyanotoxins risk assessment, risk management and regulations in different countries 2: 9-20
- Carmichael W. W. (1992) Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology* 72:445-459
- Carmichael W. W. (1994) The toxins of cyanobacteria. *Scientific American*, 270(1):78-86
- Carmichael W.W. (2001) Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins (Caruaru syndrome). *Environmental Health Perspectives* Azevedo, S.M.F.O., An, J.S. 109:663-668
- Castenholz R. W. (1977) The effect of sulphide on the blue-green algae of hot springs. II Yellowstone National Park *Microbiol Ecology*, 3:79-105

- Castenholz R. W. (1978) The biogeography of hot spring algae through enrichment cultures. *Mitt International Verein Limnology* 21:296-315
- Chao A. (1984) Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 11:265-270
- Chao A. (1987) Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics* 43:783–791
- Chorus I., Bartram J. (1999) *Toxic Cyanobacteria in Water*. First Edition. World Health Organization, E. & F.N. Spon, London and New York, p.416
- Christoffersen K. (1996) Ecological implications of cyanobacterial toxins in aquatic food webs. *Phycologia* 35:42–50
- Chrisostomou A., Moustaka-Gouni M., Sgardelis S., Lanaras T. (2009) Air-dispersed phytoplankton in a Mediterranean riverreservoir system (Aliakmon-Polyphytos, Greece). *Journal of Plankton Research* 31:877-884
- Ciferri O. (1983) *Spirulina, the Edible Microorganism*. *Microbiological Reviews* 47:551-578
- Codd G. A., Ward C. J., Bell S. G. (1997) Cyanobacterial toxins: Occurrence, modes of action, health effects and exposure routes. In: *Applied toxicology*, Springer, Berlin p. 399-410
- Codd G., Bell S., Kaya K., Ward C., Beattie K., Metcalf J. (1999) Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *European Journal of Phycology* 34:405-415
- Cook C.M., Vardaka E., Lanaras T. (2004) Toxic cyanobacteria in Greek freshwaters, 1987–2000: occurrence, toxicity, and impacts in the Mediterranean region. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 32:107–124
- Cronberg G., Annadotter H. (2006) *Manual on Aquatic Cyanobacteria. A Photo Guide and a Synopsis of their Toxicology*. International Society for the Study of Harmful Algae and the UNESCO
- Dokulil M.T., Teubner K. (2000) Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia*, 438:1–12
- Eiler A., Bertilsson S. (2004) Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environmental Microbiology*, 6:1228–1243
- Fahnenstiel G. L., Carrick H. J. (1991) Physiological characteristics and food-web dynamics of *Synechococcus* in Lakes Huron and Michigan. *Limnology and Oceanography*, 36:219-234

- Falconer I. R., Smith J. V., Jackson A. R. B., Jones A., Runnegar M. T. C. (1988) Oral toxicity of a bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* administered to mice over periods of up to 1 year. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 24:291-305
- Falconer I.R., Burch M.D., Steffensen D.A., Choice M., Coverdate O.R., (1994) Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. *Environmental Toxicology and Water Quality* 9:131-139
- Falconer I. R., Bartram J., Chorus I., Kuiper-Goodman T., Utkilen H., Burch M., Codd G. A. (1999a) Safe levels and safe practices. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.): *Toxic Cyanobacteria in Water*. Spon, London, p. 155-178
- Falconer I. R. (1999b) An overview of problems caused by toxic blue-green algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water. *Environmental Toxicology* 14: 5-12
- Fredrick J. F. (1981) Origins and Evolution of Eukaryotic Intracellular organelles. *Annals of the New York Academy of Sciences* 361,512
- Furtado A., Henry R.J., Pellegrineschi, A. (2009) Analysis of promoters in transgenic barley and wheat. *Plant Biotechnology Journal* 7:240-253
- Gkelis S., Vardaka E., Moustaka-Gouni M., Lanaras T. (2001) The two most abundant toxic cyanobacteria in Greek lakes and their impact on water quality. In: M. Moustaka-Gouni, C.J. Bird, E.J. Cox & J. A. Raven (eds), 7th International Phycological Congress, Thessaloniki, Greece, *Phycologia*, 40(4):123
- Genitsaris S., Kormas K. A., Moustaka-Gouni M. (2011) Airborne algae and cyanobacteria: occurrence and related health effects. *Frontiers in Bioscience (Elite Ed)* 3:772-787
- Gliessman S.R. (2000) *Agroecology : ecological processes in sustainable agriculture*. Boca Raton: Lewis
- Good I. J. (1953) The population frequencies of species and the estimation of the population parameters. *Biometrika*, 40:237-264
- Graham, L. E., Wilcox L. W. (2000) *Algae*. Prentice Hall: Upper Saddle River, N.J. p.640
- Gugger M. F., Hoffmann L. (2004) Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:349-357
- Hall B.G. (2001) *Phylogenetic trees made easy*. 1st edition, release, Sinauer associates, Inc-Publishers Sunderland, Massachusetts, USA

- Hawser S. P., O'Neil J. M., Roman M. R., Codd G. A. (1992) Toxicity of blooms of the cyanobacterium *Trichodesmium* to zooplankton. *Journal of Applied Phycology* 4:79-86
- Hill T., Walsh K., Harris J., Moffett B. (2003) Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 43:1-11
- Hindák F., Moustaka M. T. (1988) Planktic cyanophytes of Lake Volvi, Greece. *Archiv Hydrobiologie Supplement* 80:497–528
- Hitzfeld B.C., Höger S.J., Dietrich D.R. (2000) Cyanobacterial toxins: Removal during drinking water treatment and human risk assessment. *Environmental Health Perspectives* 108:113-122
- Honkanen R.E., Zwiller J., Moore R., Daily S.L., Khatra B.S., Dukelow M., Boynton A.L. (1990) Characterisation of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *Journal of Biological Chemistry* 265:19401-19404
- Hurlbert S.H., 1971. The non-concept of species diversity. *Ecology*, 23:577-586
- Ishida T., Yokota A., Sugiyama J. (1997) Phylogenetic relationships of filamentous cyanobacterial taxa inferred from 16S rRNA sequence divergence. *Journal of General and Applied Microbiology* 43:237–241
- Ito E., Kondo F., Harada K.I. (2001) Intratracheal administration of microcystin-LR, and its distribution. *Toxicon* 39:265-271
- Javor B. (1989) *Hypersaline Environments, Microbiology and Biogeochemistry*. Springer-Verlag, Berlin
- Jungblut A. D., Neilan B. A. (2010) *nifh* gene diversity and expression in a microbial mat community on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Antarctic Science* 22:117-122
- Kemp P.F, Aller J.Y. (2004) Estimating prokaryotic diversity: When are 16S rDNA libraries large enough? *Limnology and Oceanography Methods*, 2:114–125
- Korelusová J. (2008) Phylogeny of heterocystous cyanobacteria (Nostocales and Stigonematales). MSc thesis, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budeřovice
- Kormas K. A., Gkelis S., Vardaka E., Moustaka-Gouni M. (2008) Phylogenetic diversity of cyanobacteria from the water column of Lake Volvi, Greece (Unpublished)
- Kormas K. A., Vardaka E., Moustaka-Gouni M., Kontoyanni V., Petridou E., Gkelis S., Neofitou C. (2010) Molecular detection of potentially toxic cyanobacteria and their associated bacteria in lake water column and sediment. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26(8):1473-1482

- Kormas K. A., Gkelis S., Vardaka E., Moustaka-Gouni M. (2011) Morphological and molecular analysis of bloom-forming Cyanobacteria in two eutrophic shallow Mediterranean lakes. *Limnologica*, 41(3):167-173
- Kuiper-Goodman T., Falconer I., Fitzgerald J. (1999) Human health aspects. In: Chorus, I., Bartram, J., (Eds). *Toxic Cyanobacteria in Water*. World Health Organization, E & FN Spon, London and New York, p. 113-153
- Lamprinou V., Hernández-Mariné M., Canals T., Kormas K., Economou-Amilli A., Pantazidou A. (2011) Two new stigonematalean cyanobacteria: *Ifinoe spelaeobios* gen. nov., sp. nov. And *Loriellopsis cavernicola* gen. nov., sp. nov. from Greek and Spanish caves. Morphology and molecular evaluation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61:2907-2915
- Lemke M. J., Lienau E. K., Rothe J., Pagioro T. A., Rosenfeld J., Desalle R. (2009) Description of freshwater bacterial assemblages from the upper Paraná river floodpulse system, Brazil. *Microbial Ecology*, 57:94–103
- Lymperopoulou D. S., Kormas K. A., Moustaka-Gouni M., Karagouni A. D. (2011) Diversity of cyanobacterial phylotypes in a Mediterranean drinking water reservoir (Marathonas, Greece). *Environmental Monitoring Assessment* 173(1-4):155-165
- Magurran A. E. (2004) *Measuring Biological Diversity*. Blackwell Publishing, Malden, MA
- Malbrouck C., Kestemont P. (2006) Effects of Microcystins on fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25:72–86
- Margulis L., Sagan D. (2001) "Marvellous microbes," *Resurgence* 206:10-12
- Moisander P. H., McClinton E., Paerl H. W. (2002) Salinity effects on growth, photosynthetic parameters, and nitrogenase activity in estuarine planktonic cyanobacteria. *Microbiol Ecology* 43:432-442
- Molvær J., Knutzen J., Magnusson J., Rygg B., Skei J. M., Sørensen J. (1997) Classification of environmental quality in fjords and coastal waters. A guide. *Veiledning 97:03*. Norwegian Pollution Control Authority, Oslo, p. 35
- Montesanto B., Ziller S., Danielidis D., Economou-Amilli A. (2000) Phytoplankton community structure in the lower reaches of a Mediterranean river (Aliakmon, Greece). *Archiv für Hydrobiologie* 147:171-191
- Moss B. (1998) *Ecology of Freshwaters Man and A medium, past to Future*, 3 rd edition, Blackwell Science Ltd.
- Moustaka – Gouni M. (1988) The structure and dynamics of the phytoplankton assemblages in Lake Volvi, Greece I. Phytoplankton composition and abundance during the period March 1984-March 1985. *Archiv Hydrobiologie* 112:251-264

- Moustaka – Gouni M., Nikolaidis G. (1990) Phytoplankton of a warm monomictic lake – Lake Vegoritis, Greece. *Hydrobiologia* 119 (3):299 – 313
- Moustaka – Gouni M., Albanakis K., Mitrakas M., Psilovikos A. (2000) Planktic autotrophs and environmental conditions in the newly – formed hydroelectric Thesaurus reservoir, Greece. *Archiv Hydrobiology* 149:507-526
- Moustaka–Gouni M., Vardaka E., Michaloudi E., Kormas K. A., Tryfon E., Mihalatou H., Gkelis S., Lanaras T. (2006) Plankton food web structure in a eutrophic polymictic lake with a history of toxic cyanobacterial blooms. *Limnology and Oceanography* 51:715-727
- Moustaka-Gouni M., Vardaka E., Tryfon E. (2007) Phytoplankton species succession in a shallow Mediterranean lake (L. Kastoria, Greece): steady-state dominance of *Limnithrix redekei*, *Microcystis aeruginosa* and *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Hydrobiologia* 575:129-140
- Mugnai M.A., Margheri M.C., Sili C., Turicchia S., Soldati E., Maffettone E., Funari E., Scardala S., Dibrizio M., Ventura S. (2008) The cyanobacterial community of Lake Trasimeno – *Algological Studies* 128:37–64
- Mur L.R., Skulberg O.M., Utkilen H. (1999) Cyanobacteria in the environment. In: Chorus I, Bartram J (Eds) *Toxic Cyanobacteria in Water*, World Health Organization, E & FN Spon, London, p. 179-209
- Muxica I., Borja A., Bald J., (2007) Using historical data, expert judgement and multivariate analysis in assessing reference condition and benthic ecological status, according to the European Framework Directive. *Marine Pollution Bulletin* 55:16-29
- Naselli-Flores L. (2000) Phytoplankton assemblages in twenty-one Sicilian reservoirs: relationships between species composition and environmental factors. *Hydrobiologia*, 424:1–11
- Naselli-Flores L., Barone R. (2005) Water-level fluctuations in Mediterranean reservoirs: setting a dewatering threshold as a management tool to improve water quality. *Hydrobiologia*, 548:85–99
- Negri A., Bunter O., Jones B., Llewellyn L. (2003) Effects of the bloom-forming alga *Trichodesmium erythraeum* on the pearl oyster *Pinctada maxima*. *Aquaculture*, 91-102
- Nübel U., Garcia-Pichel F., Muyzer G. (1997) PCR primers to amplify 16S rRNA genes from Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:3327-3332
- Oikonomou A., Katsiapi M., Karayanni H., Moustaka-Gouni M., Kormas K. A. (2012) Plankton microorganisms coinciding with two consecutive mass fish kills in a newly reconstructed lake. *The Scientific World Journal*

- Padisak J., Borics G., Grigorszky I., Soroczki-Pinter E. (2006) Use of phytoplankton assemblages for monitoring ecological status of lakes within the Water Framework Directive: the assemblage index. *Hydrobiologia*, 553:1-14
- Paerl H.W. (1996) A comparison of cyanobacterial bloom dynamics in freshwater, estuarine and marine environments. *Phycologia* 35:25–35
- Pielou E. C. (1969) Association tests versus homogeneity tests: Their use in subdividing quadrats into groups. *Plant Ecology*, 18:4-18
- Reynolds C. S., Walsby A. E. (1975) Water-blooms. *Biological Reviews* 50:437-481
- Reynolds C.S. (1984) *the Ecology of freshwater phytoplankton*, Cambridge University Press, Great Britain
- Reynolds C.S. (1997) Vegetation processes in the pelagic: a model for ecosystem theory. In: O. Kinne (ed.), *Excellence in ecology*. Ecology Institute, Oldendorf Luke Germany, p. 371
- Reynolds C. S., Huszar V., Kruk C., Naselli-Flores L., Melo S. (2002) Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of Plankton Research*, 24:417–428
- Rajo C., Alvarez Cobelas M. (1994) Population dynamics of *Limnothrix redekei*, *Oscillatoria lanceaeformis*, *Planktothrix agardhii* and *Pseudanabaena limnetica* (cyanobacteria) in a shallow hypertrophic lake (Spain). *Hydrobiologia* 276:165–171
- Ruano G., Brash D. E., Kidd K.K. (1991) PCR: the first few cycles. *Amplifications*, 7:1-4
- Sardelli A. D. (1993) Plateau effect—understanding PCR limitations. *Amplifications*, 9:1-5
- Saiki R., Gelfand D., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G., Mullis K., Erlich H. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 4839:487-491
- Scanlan D. J., West N. J. (2002) Molecular ecology of the marine cyanobacterial genera *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *FEMS Microbiology Ecology*, 40:1-12
- Shannon C.E., Weaver W. (1949) *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press. Urbana. p. 117
- Sharma N. K., Singh S., Rai A. K. (2006) Diversity and seasonal variation of viable algal particles in the atmosphere of a subtropical city in India. *Environmental Research* 102:252-259
- Sharma N. K., Rai A. K., Singh S., Brown R. M. Jr. (2007) Airborne algae: their present status and relevance. *Journal of Phycology* 43:615–627

- Singh V., Pande P. C., Jain D. K. (2009) A Text Book of Botany. Rastogi Publications, Meerut-New Delhi, p. 42
- Simboura N., Orfanidis S., Zenetos A., (2005) Ecological status and trends. In: Papathanasiou, E. & Zenetos, A. (eds). State of the Hellenic marine environment. HCMR Publications, Athens, 343 – 351
- Sivonen K. (1990) Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. Applied and Environmental Microbiology 56:2658–2666
- Sivonen K., Jones G. (1999) Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds). Toxic Cyanobacteria in Water. World Health Organization, E & FN Spon, London and New York, p. 41-110
- Sotiroudis T. G. (2006) Potential health effects of Spirulina, BIO, 19:66-69
- Spatharis S., Roelke D. L., Dimitrakopoulos P. G., Kokkoris G. D. (2011) Analyzing the (mis)behavior of Shannon index in eutrophication studies using field and simulated phytoplankton assemblages. Ecological Indicators 11(2):697-703
- Spatharis S., Skliris N., Meziti A., Kormas K. A. (2012) First record of a *Trichodesmium erythraeum* bloom in the Mediterranean Sea: a result of climate change. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science (in press)
- Spiegelman D, Whissell G., Greer C.W (2005) A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. Canadian Journal of Microbiology, 51:355–386
- Stackebrandt E., Goebel B. (1994) Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. International Journal of Systematic Bacteriology, 44:846-849
- Straškraba M., Tundisi, J. G. (1999) Reservoir ecosystem functioning: Theory and application. In J. G. Tundisi, & M. Straškraba (Eds.), Theoretical reservoir ecology and its applications pp. 565–583. The Netherlands: Backhuys
- Swart P. K., Porter J. W., Szmant A. M, Dodge R. E., Tougas J. I., Southam J. (2005) The isotopic composition of respired carbon dioxide in scleractinian corals: Implications for cycling of organic carbon in Corals. Geochim. Cosmochim. Acta 69:1495–1509
- Temponeras M., Kristiansen J., Moustaka – Gouni M. (2000) Seasonal variation in phytoplankton composition and physical – chemical features of the shallow Lake Doirani, Macedonia, Greece. Hydrobiologia 424:109 – 122

- Toivola D. M., Eriksson J. E., Brautigan D. L. (1994) Identification of protein phosphatase 2A as the primary target for microcystin-LR in rat liver homogenates. *FEBS Letters* 344:175-180
- Tringe S. G., Mering C., Kobayashi A., Salamov A. A., Chen K., Chang H. W., Podar M., Short J. M., Mathur E. J., Detter J. C., Bork P., Hugenholtz P., Rubin E. M. (2005) Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, 308:554-557
- Tonk L., Bosch K., Visser P. M., Huisman J. (2007) Salt tolerance of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Microbial Ecology* 462:117-123
- Tryfon E., Moustaka-Gouni M., Nikolaidis G. (1997) Planktic cyanophytes and their ecology in the shallow Lake Mikri Prespa, Greece. *Nordic Journal of Botany* 17:439-448
- Tundisi J., Matsumura-Tundisi T., Rocha O. (1999) Theoretical basis for reservoir management. In J. G. Tundisi and M. Straškraba (Eds.), *Theoretical reservoir ecology and its applications*, The Netherlands: Backhuys, p. 505-528
- Umesh B.V. (2002) *Spirulina*. Unicorn Books p. 4
- Valerio E., Chambel L., Paulino S., Faria N., Pereira P., Tenreiro R. (2009) Molecular identification, typing and traceability of cyanobacteria from freshwater reservoirs. *Microbiology* 155:642-656
- Vardaka E., Moustaka-Gouni M., Lanaras T. (2000) Temporal and spatial distribution of planktic cyanobacteria in Lake Kastoria, Greece, a shallow, urban lake. *Nordic Journal of Botany* 20:501–511
- Vardaka E, Moustaka–Gouni M, Cook CM and Lanaras T (2005) Cyanobacterial blooms and water quality in Greek waterbodies. *Journal of applied Phycology* 17:391 – 401
- Wagner M., Horn M. (2006) The Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chlamydiae and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance. *Environmental biotechnology/Energy biotechnology*. 17(3):241-249
- Wetzel R.G. (2001) *Limnology: Lake and River Ecosystems*. Third Edition. Academic Press
- Whitton B. A., Potts M. (2000) *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, p. 669
- Wu X., Xi W., Ye W. and Yang H. (2007) Bacterial community composition of a shallow hypertrophic freshwater lake in China, revealed by 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiology Ecology*, 61:85-96

Ye W., Liu X., Lin S., Tan J., Pan J., Li D. and Yang H. (2009) The vertical distribution of bacterial and archaeal communities in the water and sediment of Lake Taihu. *FEMS Microbiology Ecology*, 70:263-276

Zurawell R. W., Chen H., Burke J. M., Prepas B. R. (2005) Hepatotoxic cyanobacteria: A review of the biological importance of microcystins in freshwater environment. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B* 8:1-37

Ελληνική Βιβλιογραφία

Βαρδάκα Ε. (2001) Τοξικά κυανοβακτήρια και κυανοβακτηριακές τοξίνες στη λίμνη της Καστοριάς και σε άλλα υδάτινα οικοσυστήματα της Ελλάδας. Διδακτορική διατριβή, σελ. 251, Θεσσαλονίκη

Γεράκης Π. Α. (2004) Υγρότοποι. Μουσείο Γουλανδρή Φυσικής Ιστορίας, Ελληνικό Κέντρο Βιοτόπων Υγροτόπων, τα κρίσιμα Προβλήματα, Άνθρωπος και Περιβάλλον στον 21^ο αιώνα

Γκέλης Α. Σ. (2006) Πλαγκτικά κυανοβακτήρια: Χαρακτηρισμός και παραγόμενα βιοδραστικά πεπτιδία. Διδακτορική διατριβή, σελ. 84, Θεσσαλονίκη

Πατσώνας Γ. (2008) Επιπτώσεις σεναρίων κλιματικής αλλαγής και στρατηγικών διαχείρισης θδατικών πόρων στη λεκάνη απορροής της Λίμνης Κάρλας: Διπλωματική Εργασία. Τμήμα Πολιτικών Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Πολυκάρπου Π. (2006) Φυτοπλαγκτό και μικροβιακό τροφικό πλέγμα στη λίμνη Δοϊράνη: εκτίμηση της οικολογικής κατάστασης. Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Τμήμα Βιολογίας Α.Π.Θ.

Σιδηρόπουλος Π. (2007) Στοχαστική Προσομοίωση του Υπόγειου Υδροφορέα της Λίμνης Κάρλας. Μεταπτυχιακή Εργασία, Τμήμα Πολιτικών Μηχανικών Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σπαρτινού Δ., Μ.-Γ. (1992) Η μικρογλωρίδα της λίμνης Αμβρακίας. Συστηματική και οικολογική μελέτη. – Διδακτορική Διατριβή. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τρύφων Ε. (1994) Δομή και Δυναμική των φυτοπλαγκτικών πληθυσμών της λίμνης Μικρής Πρέσπας. Διδακτορική Διατριβή. Τμήμα Βιολογίας ΑΠΘ

Τσιουρής Σ. Ε., Γεράκης Π. Α. (1991) Υγρότοποι της Ελλάδος. Θεσσαλονίκη: Α.Π.Θ./Τμήμα Γεωπονίας, Εργαστήριο Οικολογίας και Προστασίας του Περιβάλλοντος, WWF, IUCN

7. ABSTRACT

Lake Karla, which in ancient times was called "Voivis" is located, southeast of Larissa and northwest of Volos cities and presents a restricted elongated basin about 35 km of 9-15 km in length. Lake Karla has great biological, ecological, socioeconomical importance. Lake Karla's usages are many (irrigation, fishing, relaxation). There are also future plans for sports usage. The study of Cyanobacteria, which are involved in water blooms, is particularly important for public health, as many of their species have the ability to produce toxins as their metabolism products. The phylogenetic diversity of cyanobacteria in the water body of Lake Karla was studied. Water samples were collected in three different months, in May, August and November 2010 and filtered on 0,2µm filters. DNA was isolated from the water body, followed by cycle-optimised PCR amplification of the 16S rRNA genes with cyanobacteria specific primers. Afterwards, a clone library was constructed for each sample after cloning the purified PCR products. Genes were sequenced using capillary electrophoresis and the relative phylotypes were compared with those Genbank database with the use of BLAST. Phylogenetic trees were constructed by using the MEGA5 software. The dominant group was that of Nostocales in the libraries of May and August, while in the library of November the dominant group seems to be Croococcales followed by the group of Stigonematales which was found in the libraries May and November. We also found phylotypes of the phyla Verrucomicrobia and Chloroflexi leaves. The observed diversity was relatively low, which indicates, perhaps, not good enough ecological status of the lake. We recognized phylotypes that were associated with species of cyanobacteria, which were detected in other lakes in Greece. Phylotypes recognised which are related to cyanobacteria species, many of which have the ability to produce

toxins, like *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena flos-aquae* and *Trichodesmium erythraeum* (which appears to be related with a phylotype which is confined for first time in greek lakes). The cyanotoxins present, can cause damages to the organisms and even death. *Spirulina laxissima* was the only common specie in all three libraries, a fact which indicates the constant existence of this specie in the lake, in all samplings.

Keywords: Cyanobacteria, 16S rRNA, lake, Karla.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1: Απεικόνιση των φυλοτύπων βιβλιοθήκης Μαΐου

Φυλότυπος	Σχετική αφθονία	Πλησιέστερος συγγενής (% ομοιότητα) κωδικός GenBank	Περιβάλλον απομόνωσης	Βιβλιογραφία	Κοντινότερος χαρακτηριστικός
KRL03C-1	37,5%	Uncultured cyanobacterium (100%) (HQ386368) clone LiUU-11-276	Περιβαλλοντικό δείγμα από τη λίμνη Vallentuna Sjoen	Newton et al (2011)	<i>Anabaenopsis nadsonii</i> 2LT27S06 (100%) (FM177482)
KRL03C-2	9,4%	<i>Oscillatoria sp.</i> (99%) (AJ133106)	Netherlands:Lake Loosdrecht	Zwart (1999)	
KRL03C-3	3,1%	Uncultured bacterium clone DP10.3.11 (99%) (FJ612370)	lake water	Li et al (2009)	<i>Spirulina laxissima</i> (97%) (DQ393278)
KRL03C-11	3,1%	Uncultured bacterium clone SSW9Ap (98%) (EU592382)	Δείγμα από υφάλμυρα νερά	Dillon al (2008)	<i>Limnothrix sp. CENA110</i> (92%) (AF212922)
KRL03C-19	6,4%	uncultured cyanobacterium clone NV1_CYA_1_2 (99%) (FJ204888)	Περιβαλλοντικό δείγμα από την υδάτινη στήλη της λίμνης Βόλβης	Kormas et al (2008)	<i>Mastigocladopsis sp.</i> (89%) (DQ235802)

KRL03C-14	3,1%	<i>Symphyonemopsis sp.</i> (98%) (AJ544085)	Σπήλαιο El Vapor στην Ισπανία	Gugger et al (2003)	
KRL03C-33	3,1%	uncultured cyanobacterium clone 4550-27F (99%) (FR648052)	Περιβαλλοντικό δείγμα από 2m βάθος από θαλασσινό νερό	Sjostedt et al (2010)	<i>Synechococcus sp.</i> MW4C3 (98%) (AY151238)
KRL03C-6	3,1%	uncultured cyanobacterium clone 2S8 (99%) (GU074287)	Δείγμα από γλυκό νερό	Gershtein et al (2009)	
KRL03C-7	15,6%	Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone NK2_CYA_1_4 (98%) (FJ204876)	Περιβαλλοντικό δείγμα από την υδάτινη στήλη της λίμνης Καστοριάς	Kormas et al (2010)	<i>Verrucomicrobium spinosum</i> strain DSM (NR_026266)
KRL03C-27	3,1%	Uncultured bacterium clone SING891 (99%) (HM129471)	Περιβαλλοντικό δείγμα από τη λίμνη Kelike	Zhang et al (2010)	Uncultured Verrucomicrobiales bacterium clone balB11_summer03 (98%) (EF627934)

KRL03C-29	3,1%	Uncultured bacterium clone SING975 (98%) (HM129541)	Περιβαλλοντικό δείγμα από τη λίμνη Kelike	Zhang et al (2010)	uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Ba09-34 (97%) (FJ843908)
KRL03C-9	9,4%	Uncultured prokaryote clone Ser1-21(98%) (GU208316)	Περιβαλλοντικό δείγμα από το ίζημα της λίμνης Dongping	Song et al (2009)	Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone KS-C37 (96%) (GQ240874)

Πίνακας 2: Απεικόνιση των φυλοτύπων βιβλιοθήκης Αυγούστου

Φυλότυπος	Σχετική αφθονία	Πλησιέστερος συγγενής (% Ομοιότητα) κωδικός GenBank	Περιβάλλον απομόνωσης	Βιβλιογραφία	Κοντινότερος χαρακτηριστικός
KRL06C-11	14,3%	<i>Anabaena flos-aquae</i> LMECYA 180 (99%) (EU078525)	Λίμνη της Πορτογαλίας	Valerio et al (2009)	
KRL06C-27	14,3%	Uncultured cyanobacterium clone ND2_CYA_1_21 (99%) (FJ204848)	Υδάτινη στήλη της λίμνης Δοϊράνη	Kormas et al (2008) (GenBank, Unpublished)	<i>Planktothrix pseudagardhii</i> LMECYA 162 (99%) (EU078517)
KRL06C-15	8,6%	<i>Anabaena aphanizomenoides</i> TAC456 (100%) (AB551453)	Λιμνούλα στην Ιαπωνία: Ibaraki	Tuji (2010)	
KRL06C-34	8,6%	<i>Synechococcus sp.</i> 0BB26S03 (99%) (AJ639899)	Ιταλία: Αιμιλία-Ρωμανία, Imola, λεκάνη Bubano	Castiglioni et al (2005)	
KRL06C-23	8,6%	Uncultured bacterium clone B-35 (98%) (HQ661201)	Περιβαλλοντικό δείγμα από γλυκό νερό ταμειυτήρα	Zhang et al (2010)	<i>Synechococcus sp.</i> BS2 (97%) (HM346183)

KRL06C-25	5,7%	Uncultured bacterium clone DP10.3.11 (99%) (FJ612370)	Νερό λίμνης	Li et al (2009)	<i>Spirulina laxissima</i> strain SAG 256.80 (97%) (DQ393278)
KRL06C-26	2,8%	Uncultured bacterium clone 2-31086 (98%) (JN032869)	Δείγμα από έντερο κυπρίνου	Ni (2011)	<i>Synechococcus sp.</i> CENA108 (96%) (EF088334)
KRL06C-13	25,8%	Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone NK2_CYA_3_4 (99%) (FJ204878)	Υδάτινη στήλη της λίμνης Καστοριάς	Kormas et al (2010)	<i>Akkermansia muciniphila</i> (86%) (AY271254)
KRL06C-10	5,7%	Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone DE1F1 (98%) (FJ916308)	Περιβαλλοντικό δείγμα από τη λίμνη Delton του Wisconsin	Jones et al (2009)	<i>Verrucomicrobium spinosum</i> strain DSM 4136 (85%) (NR_026266)
KRL06C-17	2,8%	Uncultured Chloroflexi bacterium clone AKYH1521 (88%) (AY922125)	Δείγμα από έδαφος από αγρόκτημα από τη Μινεσότα	Tringe et al (2005)	
KRL06C-4	2,8%	Uncultured bacterium clone 11S_01f05(99%) (FJ382616)	Περιβαλλοντικό δείγμα	Perkins et al (2009)	

Πίνακας 3: Απεικόνιση των φυλοτύπων βιβλιοθήκης Νοεμβρίου

Φυλότυπος	Σχετική αφθονία	Πλησιέστερος συγγενής (% ομοιότητα) κωδικός GenBank	Περιβάλλον απομόνωσης	Βιβλιογραφία	Κοντινότερος χαρακτηριστικός
KRL09C-59	18,0%	<i>Synechococcus sp.</i> CENA108 (98%) (EF088334)	waste stabilization pond	Furtado et al (2006)	
KRL09C-115	4,0%	<i>Microcystis aeruginosa</i> LMECYA 110 (100%) (EU078499)	Από γλυκό νερό της Πορτογαλίας	Valerio et al (2007)	
KRL09C-15	12,0%	<i>Oscillatoria sp.</i> (99%) (AJ133106)	λίμνη Loosdrecht	Zwart et al (1999)	<i>Oscillatoria neglecta</i> IAM M-82 (AB003168) (96%) (<i>Jaaginema neglectum</i>)
KRL09C-36	10,0%	<i>Anabaena flos-aquae</i> LMECYA 180 (EU078525) (99%)	Γλυκά νερά της Πορτογαλίας	Valerio et al (2009)	
KRL09C-43	6,0%	Uncultured cyanobacterium clone ND2_CYA_1_8 (99%) (FJ204854)	Περιβαλλοντικό δείγμα από την υδάτινη στήλη της λίμνης Δοϊράνη	Kormas et al (2011)	<i>Pseudanabaena mucicola</i> PMC269.06 (97%) (GQ859643)

KRL09C-20	6,0%	Uncultured cyanobacterium clone LiUU-11-276 (100%) (HQ386368)	Γλυκό νερό από τη λίμνη Vallentunasjoen	Newton et al (2010)	<i>Anabaenopsis nadsonii</i> 2LT27S06 (100%) (FM177482)
KRL09C-30	4,0%	Cyanobacterium sp. SP2B9510-3 (98%) (FJ396044)	Παλιρροιακές υδρόθερμες λίμνες στο Μεξικό	Lopez-Cortes et al (2008)	
KRL09C-116	4,0%	<i>Trichodesmium erythraeum</i> IMS101 (99%) (AB075999)		Tomitani et al (2001)	
KRL09C-71	2,0%	Uncultured bacterium clone DP10.3.11 (99%) (FJ612370)	Νερό λίμνης	Li et al (2009)	<i>Spirulina laxissima</i> strain SAG 256.80 (97%) (DQ393278)
KRL09C-42	4,0%	<i>Symphyonemopsis</i> sp. (98%) (AJ544085)	Σπήλαιο El Vapor στην Ισπανία	Gugger et al (2003)	
KRL09C-62	2,0%	Uncultured cyanobacterium (97%) (FR648163)	Θαλασσινό νερό , 2 m βάθος	Sjostedt et al (2010)	
KRL09C-54	14,0%	Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone NK2_CYA_1_4 (98%) (FJ204876)	Περιβαλλοντικό δείγμα από την υδάτινη στήλη της λίμνης της Καστοριάς	Kormas et al (2010)	<i>Verrucomicrobium spinosum</i> strain DSM (84%) (NR_026266)

KRL09C-38	10,0%	Uncultured bacterium clone 11S_01f05 (99%) (FJ382616)	Δείγμα από νερό από ντουζ νοσοκομείου	Perkins et al (2008)	
KRL09C-66	2,0%	Uncultured bacterium clone ORI- 860-27-P_S101-103_272B05 (98%) (GU553780)	Περιβαλλοντικό δείγμα από την κορυφογραμμή Yung-An	Lai et al (2010)	
KRL09C-89	2,0%	Uncultured bacterium clone CAMV300B923 (99%) (DQ004676)	Περιβαλλοντικό δείγμα από θαλασσίνο ίζημα	Niemann et al (2005)	

