

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Επίδραση υψηλής συγκέντρωσης χλωριούχου μαγνησίου στην
αύξηση θαλάσσιων ετερότροφων νανομαστιγωτών»**

Χρήστος Φράγκος

ΒΟΛΟΣ 2015

**«Επίδραση υψηλής συγκέντρωσης χλωριούχου μαγνησίου στην αύξηση θαλάσσιων
ετερότροφων νανομαστιγωτών»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

1. Κωνσταντίνος Αρ. Κορμάς, Καθηγητής – Υδάτινη Μικροβιακή Οικολογία, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών επιστημών,

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**.

2. Ιωάννης Μποζιάρης, Αναπληρωτής καθηγητής –Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών επιστημών,

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

3. Ιφιγένεια Κάγκαλου, Καθηγήτρια - Οικολογία, Τμήμα Πολιτικών Μηχανικών,

Πολυτεχνική Σχολή, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, **Μέλος**.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι υπεράλμυρες ανοξικές λεκάνες της βαθιάς ζώνης της Ανατολικής Μεσογείου (Υ.Α.Λ.) χαρακτηρίζονται από τα πιο ακραία ενδιαιτήματα του παγκόσμιου ωκεανού. Το γεγονός αυτό οφείλεται κατά κύριο λόγο στις υψηλές συγκεντρώσεις $MgCl_2$ (55mM-5,05M). Το $MgCl_2$ είναι μια ευδιάλυτη χημική ένωση, το δεύτερο σε αφθονία άλας μετά το $NaCl$ στο θαλασσινό νερό. Στα υπεράλμυρα θαλάσσια οικοσυστήματα κορεσμένα με $NaCl$ επιβιώνουν πολλοί μικροοργανισμοί, ενώ το αντίθετο συμβαίνει με τα αντίστοιχα ενδιαιτήματα κορεσμένα σε $MgCl_2$. Οι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί δεν μπορούν να επιβιώσουν στις Υ.Α.Λ της βαθιάς ζώνης της Α. Μεσογείου, παρά μόνο οι προκαρυωτικοί. Σκοπός της εργασίας είναι η ύπαρξη πιθανότητας επιβίωσης για τα ετερότροφα νανομαστιγωτά (E.N.), σε υπέρτονα δείγματα με $MgCl_2$ (>2.5M). Με τη μέθοδο της ηθμομεμβράνης και τη χρήση μικροσκοπίου, καταμετρήθηκε ο πληθυσμός των E.N. και ετερότροφων βακτηρίων (E.B.) σε σχέση με το χρόνο. Όσον αφορά τα υπέρτονα δείγματα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο πληθυσμός των E.N. συρρικνώθηκε σε σχέση με το χρόνο, ενώ ο πληθυσμός των E.B. επιβίωσε. Στα δείγματα συμβατικής αλατότητας ο πληθυσμός των E.N. αυξήθηκε λόγω της θήρευσης έναντι των E.B. Η σύγκριση των υπέρτονων δειγμάτων σε σχέση με αυτή των δειγμάτων-μαρτύρων με τη χρήση της ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (ANOVA), έδειξε τον αποκλειστικό αβιοτικό περιοριστικό ρόλο των υψηλών συγκεντρώσεων >2.5M $MgCl_2$ στο πληθυσμό των E.N.

Λέξεις κλειδιά: $MgCl_2$, Ετερότροφα Νανομαστιγωτά, Ετερότροφα Βακτήρια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	8
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	13
4. ΣΥΣΗΤΗΣΗ.....	19
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	37
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	38
7. ABSTRACT.....	43

1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στη βιόσφαιρα επικρατούν φυσικοχημικές συνθήκες, που καθορίζουν τη ποικιλομορφία των μικροοργανισμών. Οι θαλάσσιες μικροοργανισμικές κοινότητες μπορούν να βρεθούν σε ισορροπημένα και ακραία οικοσυστήματα. Η μελέτη των μηχανισμών προσαρμογής των μικροοργανισμών σε ακραία θαλάσσια οικοσυστήματα είναι ένα από τα αντικείμενα μελέτης της μικροβιολογίας. Ακραίο θαλάσσιο οικοσύστημα ορίζεται ως ένα σύστημα που οι φυσικοχημικοί παράγοντες όπως pH, θερμοκρασία, πίεση, θρεπτικά άλατα και η αλατότητα, βρίσκονται σε ακραίως υψηλές ή ακραίως χαμηλές τιμές (Rothschild & Mancinelli, 2001). Τα υπεράλμυρα θαλάσσια οικοσυστήματα (Υ.Θ.Ο), χαρακτηρίζονται ως ακραία θαλάσσια οικοσυστήματα, στα οποία απαντώνται υψηλές συγκεντρώσεις διαλυμένων αλάτων στο θαλασσινό νερό ($\geq 30\%$) (Oren, 2000). Η αύξηση της αλατότητας ($\geq 300\text{psu}$) του θαλασσινού νερού, αυξάνει το pH (>7) που με τη σειρά του προσδίδει αλκαλικά νερά (Hallsworth et al., 2007). Στη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών τα Υ.Θ.Ο. προσέλκυσαν τον ενδιαφέρον των επιστημόνων για αρκετούς λόγους (Gunde-Cimerman et al., 2005). Πρώτον, διότι προηγούμενες μελέτες χαρακτηρίζουν τα Υ.Θ.Ο. ως στείρα λόγω της υψηλής αλατότητας (Van der Wielen et al., 2005) ενώ νέες μελέτες διαβεβαιώνουν την ύπαρξη ποικίλων μορφών ζωής (Edgcomb et al., 2009). Δεύτερον, για τη ανάλυση των πολύπλοκων μηχανισμών που χρησιμοποιούν οι μικροοργανισμοί για να ανταπεξέλθουν στις υψηλές τιμές αλατότητας. Τρίτον, διότι οι κλιματικές αλλαγές που προβλέπονται να διαμορφωθούν με την πάροδο των χρόνων στον παγκόσμιο ωκεανό, μπορούν να αυξήσουν τον αριθμό τέτοιων ακραίων ενδιαίτημάτων (Mann & Saltzman, 1995). Τέταρτον, λόγω της εξερεύνησης των ακραίων συνθηκών που απαντώνται σε

ανοξικές υπεράλμυρες συνθήκες στα μεγάλα βάθη της υδάτινης στήλης, από την επιστήμη της αστροβιολογίας, ως προς τη ταυτοποίηση υποψήφιων μικροοργανισμών που μπορούν να επιβιώσουν στο διάστημα (Rothschild & Mancinelli, 2001). Η αλατότητα διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη σταθεροποίηση και την ομαλότητα των βιομορίων σε σχέση με τη διαθεσιμότητα του νερού (Hallsworth et al., 2007). Τα υπέρτονα ενδιαιτήματα δημιουργούν δυσμενείς συνθήκες στην επιβίωση των βιοκοινοτήτων, μιας και τα μικροβιακά κύτταρα προσπαθούν να εξισορροπήσουν τις σχέσεις τους με το εξωτερικό περιβάλλον. Η μείωση της ενεργότητας νερού του μικροβιακού κυττάρου και η αποδιάταξη της τεταρτογενούς δομής των πρωτεϊνών, είναι δυο από τις κύριες επιπτώσεις των υψηλών συγκεντρώσεων αλάτων. Οι μικροοργανισμοί που ανέχονται ή απαιτούν υψηλή συγκέντρωση αλατότητας για την αύξηση τους αποκαλούνται αλοανεκτικοί ή αλόφιλοι αντίστοιχα (Gilmour, 1990). Στα Υ.Θ.Ο επιβιώνουν αλόφιλοι και αλοανεκτικοί μικροοργανισμοί στο υπέρτονο αυτό σύστημα. Οι αλόφιλοι μικροοργανισμοί συναντώνται και στις τρεις επικράτειες ζωής, αυτής των Archaea, των Bacteria και των Eukarya (Oren, 2000). Τα Archaea, τα Bacteria και ορισμένα φύκη χαρακτηρίζονται ως οι πλέον αλόφιλοι/αλοανεκτικοί κάτοικοι των υπέρτονων συστημάτων. Στη Νεκρά Θάλασσα και σε αλυκές του παγκόσμιου ωκεανού που κυριαρχούν μονοσθενή ιόντα αλάτων διαλυμένα στο νερό όπως το NaCl, παρουσιάζονται τόσο τα Archaea της οικογένειας Halobacteriaceae, όσο και μονοκύτταρα ευκαρυωτικά φύκη του γένους *Dunaliella*. Τα Archaea εμφανίζονται στα Υ.Θ.Ο με εξής τρεις οικογένειες: Halobacteriaceae, Methanospirillaceae, και Methanosarcinaceae. Η οικογένεια Halobacteriaceae βρίσκεται αποκλειστικά στα Υ.Θ.Ο, ενώ οι δύο τελευταίες οικογένειες απαντώνται και στο τυπικό θαλασσινό νερό.

Οι αλόφιλοι/αλοανεκτικοί μικροοργανισμοί προσαρμόζονται στα Υ.Θ.Ο με τη ρύθμιση της οσμωτικής τους πίεσης (Oren, 2000). Σύμφωνα με τον Oren (2000) μια από τις στρατηγικές της οσμωρύθμισης είναι η ενδοκυττάρια συσσώρευση ανόργανων ιόντων. Αυτή η στρατηγική χρησιμοποιείται από τα αερόβια Archaea της οικογένειας Halobacteriaceae και από τα αναερόβια Bacteria της τάξης Halanaerobiales. Σύμφωνα με μελέτες οι μονοκύτταροι ευκαρυώτες είτε σπανίζουν είτε λείπουν εντελώς από τα ακραία υπεράλμυρα ενδιαιτήματα, με περιεκτικότητα αλάτων $\geq 30\%$ (Oren, 2000; Pedros-Allio et al., 2000; Elloumi et al., 2006). Το συγκεκριμένο πόρισμα επαληθεύεται από τους Hauer και Rogerson (2005), με αποτελέσματα που αποδεικνύουν τη μεγάλη διαφορά των μορφοτύπων που παρουσιάζονται στο συμβατικό και υπεράλμυρο θαλασσινό νερό, με τιμές να αντιστοιχούν στους 200 και 1-2 μορφοτύπους στο λίτρο, αντίστοιχα. Σε αντίθεση με τον Finlay (1990) που υποστήριζε τη έκφανση της ζωής των πρωτίστων στη μεγάλη αλμυρή λίμνη της πόλης Γιούτα των Η.Π.Α και στη Νεκρά θάλασσα του Ισραήλ, άλλες μελέτες υποστηρίζουν αφενός μεν ενεργή την προκαρυωτική συνιστώσα, αφετέρου δε περιορισμένη την ευκαρυωτική, με εξαίρεση το είδος *Dunaliella salina* (Pedrós-Alió et al., 2000). Άλλες μελέτες αναδεικνύουν τη βιωσιμότητα των ετερότροφων δινομαστιγωτών για τιμές αλατότητας 6%-30% σε υπεράλμυρες λίμνες της Τυνησίας και της Ανταρκτικής (Ayadi et al., 2002). Σύμφωνα με τους Park et al. (2007) πολύ λίγες ομάδες ευκαρυωτών μπορούν να επιβιώσουν, ανάμεσα τους και το ετερότροφο νανομαστιγωτό (E.N.) *Pleurostomum flabellatum*. Η προκαρυωτική συνιστώσα στα Υ.Θ.Ο είναι κατά προσέγγιση μια τάξη μεγέθους μεγαλύτερη από εκείνη των παράκτιων υδάτων (Pedrós-Alió et al. 2000).

Παρά τις μελέτες που έγιναν σε βάθος χρόνου για τα ακραία ενδιαιτήματα με τις μέγιστες δυνατές συγκεντρώσεις των μονοσθενών ιόντων, λίγες είναι οι μελέτες για τα

κορεσμένα ενδαιτήματα των δισθενών ιόντων. Μέχρι τη δεκαετία του 90' λίγα ήταν γνωστά γύρω από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση και το μηχανισμό πρόσληψης δισθενών ιόντων από τους αλόφιλους μικροοργανισμούς (Oren, 2000). Σύμφωνα με τον Oren (1983) ένα μεγάλο μέρος της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης δισθενών ιόντων εκ μέρους των μικροοργανισμών οφείλεται πιθανώς σε μακρομοριακές δομές, όπως είναι το DNA και τα ριβοσώματα. Ήδη από τα τέλη της δεκαετίας του 70' είχε εξακριβωθεί ένα σύστημα μεταφοράς δισθενών ιόντων εξωκυτταρικά, λειτουργώντας ως αντιμεταφορέας για το είδος *Halobacterium salinarum* (Belliveau & Lanyi, 1978).

Οι υπεράλμυρες ανοξικές λεκάνες στη βαθιά ζώνη της Ανατολικής Μεσογείου (Υ.Α.Λ.) είναι ένα από τα πιο ακραία θαλάσσια οικοσυστήματα που παρατηρούνται στο παγκόσμιο ωκεανό. Οι Υ.Α.Λ της βαθιάς ζώνης της Α.Μεσογείου χαρακτηρίζονται από έλλειψη οξυγόνου, υψηλές υδροστατικές πιέσεις ($\geq 35\text{Mpa}$), με υψηλές τιμές αλατότητας ($\geq 300\text{psu}$), κάτω από την εύρωτη ζώνη σε βάθη 3.5km από την επιφάνεια της θάλασσας (Yakimov et al., 2007; Alexander et al., 2009; Edgcomb & Bernhard, 2013; Filker et al., 2013). Η Discovery, η L'Atalante, η Bannock, η Urania, η Thetis, η Meddee, η Tyto και η Kryos συγκαταλέγονται στις Υ.Α.Λ της βαθιάς ζώνης της Α.Μεσογείου. Γεωγραφικά περικλείονται Νότιο Δυτικά της Κρήτης και Βόρειο Ανατολικά των ακτών της Λιβύης. Η χημική σύνθεση τους διαφέρει σε μεγάλο βαθμό, με υψηλές συγκεντρώσεις σουλφιδίων και μεθανίου και ένα πλήθος ιόντων και ανιόντων (Filker et al., 2013).

Μεταξύ 5.6 και 5.3 εκατομμύριων χρόνων, στη Μεσσηνιακή περίοδο αυξήθηκε η συγκέντρωση διαλυμένων αλάτων προκαλώντας ιζηματογενείς εναποθέσεις, τους εβαπορίτες, αποτέλεσμα φυσικών διεργασιών της εξάτμισης του νερού λόγω ανόδου της θερμοκρασίας (Hsü et al., 1977). Οι εβαπορίτες είναι ιζηματογενείς αποθέσεις που

οφείλονται στις κατακρημνίσεις αλάτων. Οι συγκεντρώσεις βόριου (B), μαγνησίου (Mg), καλίου (K), λιθίου (Li), βρωμίου (Br) και φθορίου (F), κυριαρχούν στη σύσταση των εβαποριτών (Hsü et al., 1977). Οι εναποθέσεις αλάτων διέπουν το ¼ της ξηράς της γης και χαρακτηρίζονται συχνά από πάχος εκατοντάδων μέτρων. Η λεκάνη της Urania χαρακτηρίζεται από υψηλές συγκεντρώσεις σουλφιδίων και μεθανίου, η λεκάνη της L'Atalante από υψηλές συγκεντρώσεις νατρίου, καλίου και θεικού άλατος και η λεκάνη της Discovery από υψηλές συγκεντρώσεις δισθενών ιόντων μαγνησίου (Van der Wielen et al. 2005; Hallsworth et al., 2007; Edgcomb et al., 2009).

Η λεκάνη της Discovery έχει εμβαδόν 7.52 km^2 ενώ ο όγκος της υπεράλμυρης μάζας είναι $2 \cdot 10^8 \text{ m}^3$. Ο όγκος είναι ίδιος με αυτής του κόλπου της Γκουαναμπάρα της Βραζιλίας και 500 φορές μεγαλύτερος από τον όγκο των συγκεντρώσεων CaCO_3 των αλυκών Don Juan στην Ανταρκτική. Το υπεράλμυρο στρώμα της Discovery πάχους 2m, διακρίνεται για την απότομη μεταβολή των συγκεντρώσεων MgCl_2 με τιμές από 55 mM έως 5,05 M. Μελέτες που επικεντρώνονται στην αφθονία του Mg και στις σχέσεις των μικροοργανισμών με αυτό, οφείλονται στον πρόσφατο εντοπισμό ενυδατωμένων αλάτων Mg στον πλανήτη Άρη (Vaniman et al., 2004) και στη πιθανή πλούσια συσσώρευση Mg στο δορυφόρο του πλανήτη Δία, Ευρώπη (Marion et al., 2003), μιας και είναι αναγκαία η κατανόηση των ορίων της μικροβιακής δραστηριότητας.

Το Mg είναι συμπράγοντας εκατοντάδων ενζύμων, συνεισφέρει στη σταθεροποίηση μακρομορίων όπως τα λιπίδια και το DNA και είναι κεντρικό άτομο της χλωροφύλλης. Το Mg είναι το τρίτο πλέον πιο άφθονο χημικό στοιχείο στην υδάτινη στήλη και παρατηρείται ως αντιδρόν με πλήθος ανιόντων. Το Mg βρίσκεται στα μέταλλα (αλκαλικές γαίες) ενώ το χλώριο στα αμέταλλα (αλογόνα). Το MgCl_2 απαντάται ως εξαένυδρη χημική ένωση, δηλαδή συγκρατεί στο εσωτερικό της έξι μόρια

νερού ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Το μοριακό του βάρος είναι $203,3\text{g/mol}$. Είναι μια ένωση με μεγάλη διαλυτότητα με την έννοια ότι τα έξι μόρια νερού απελευθερώνονται, με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο όγκος του νερού. Ως μια ιοντική ένωση, δίσταται πλήρως, είναι δηλαδή ισχυρός ηλεκτρολύτης. Για το λόγο αυτό το υδατικό διάλυμα καθώς και το τήγμα της είναι καλός αγωγός του ηλεκτρικού ρεύματος και έχει υψηλό σημείο τήξης.

Στις Υ.Α.Λ. της βαθιάς ζώνης της Α.Μεσόγειου η έλλειψη του ηλιακού φωτός αναιρεί κάθε προσπάθεια φωτοσυνθετικής παραγωγής, ευνοώντας αποκλειστικά τους ετερότροφους μικροοργανισμούς. Μιας και δεν υφίσταται η σύνθεση οργανικών μορίων από τους ίδιους τους μικροοργανισμούς, λαμβάνουν χώρα οι αλληλεπιδράσεις των μικροοργανισμικών κοινοτήτων μέσω της θήρευσης και του ανταγωνισμού. Οι υψηλές τιμές της υδροστατικής πίεσης ($\geq 35\text{Mpa}$), ευνοούν τους βαρόφιλους μικροοργανισμούς (Grant, 1990). Η έλλειψη οξυγόνου σχετίζεται με τις αναερόβιες συνθήκες, με τις διεργασίες της θειικής αναγωγής και μεθανιογένεσης. Οι μεγάλες συγκεντρώσεις MgCl_2 ($\geq 2,5\text{M}$) προκαλούν αύξηση του pH (>7), με την σχεδόν αποκλειστική παρουσία αλκαλόφιλων μικροοργανισμών (Hallsworth et al., 2007).

Σε ένα κλασσικό τροφικό πλέγμα τα πρώτιστα παίζουν σημαντικό ρόλο στην ροή της διαλυμένης οργανικής ύλης (Δ.Ο.Υ) τόσο στα πελαγικά όσο και στα βενθικά οικοσυστήματα. Το πικοπλαγκτόν περιέχει ποικίλες ομάδες με τιμές μεγέθους μικροβιακών κυττάρων $<2\mu\text{m}$. Στο πικοπλαγκτόν συμπεριλαμβάνονται ετερότροφα Bacteria (E.B.) και μερικά πρώτιστα (Pedrós-Alió et al. 2000). Τα E.B. έχουν μέγεθος από $0,2$ έως $10\mu\text{m}$ συμβάλλοντας στη μεταφορά της Δ.Ο.Υ και των θρεπτικών αλάτων σε ανώτερα τροφικά επίπεδα (Christaki et al. 2001). Τα ετερότροφα νανομαστιωτά (E.N) είναι κυρίαρχοι θηρευτές του πικοπλαγκτού. Το νανοπλαγκτό με τη σειρά του

διακρίνεται σε τρεις κλάσεις μεγεθών: <3μm, 3-5μm και 5-10μm. Ένα σημαντικό μέρος του βακτηριοπλαγκτού καταναλώνεται από μαστιγωτά μεγέθους 2-20nm (Christaki et al. 2001). Με της σειρά τους τα μαστιγωτά καταναλώνονται από μεγαλύτερους θηρευτές όπως το μεσοζωοπλαγκτόν, καθοδηγώντας την Δ.Ο.Υ στα ανώτερα τροφικά επίπεδα. Ως επί το πλείστον οι μελέτες υποστηρίζουν τις δυσμενείς συνθήκες που προκαλούν στους μικροοργανισμούς, οι υπέρμετρες συγκεντρώσεις MgCl₂ (Hallsworth et al., 2007; Edgcomb et al., 2009 Yakimov et al., 2007). Σύμφωνα τους Van der Wielen et al. (2005) στις Υ.Α.Λ ζουν αρκετές μικροβιακές κοινότητες, με την προκαρυωτική συνιστώσα να παίζει τον κατεξοχήν πρωταγωνιστικό ρόλο ενώ η ευκαρυωτική τον τελευταίο. Όμως ποιοι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί δεν μπορούν να εξασφαλίσουν την ακεραιότητα της κυτταρικής τους δομής και σε ποιες συγκεντρώσεις MgCl₂; Στόχος της παρούσας εργασίας να απαντηθούν ερωτήματα όπως: 1) Αν τα E.N. επιβιώνουν σε συγκεντρώσεις 2.5M MgCl₂, 2) Ποιά είναι η αφθονία των E.N. και των E.B., στις υπέρτονες συνθήκες, μιας και αφθονία των E.B. αντικατοπτρίζει τις δραστηριότητες των E.N.

2) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η συλλογή του θαλασσινού νερού πραγματοποιήθηκε σε αβαθή νερά της παραλίας του Αναβρου στη πόλη του Βόλου σε πλαστικές φιάλες. Αρχικά τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο μικροβιολογικό εργαστήριο καλυμμένα από το φως του ηλίου, ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η διήθηση των δειγμάτων με χρήση διηθητικού ηθμού (0,2μM). Διηθήθηκαν 2,4L θαλασσινού νερού με την ηθμομεμβράνη. Με το τέλος της διήθησης ξεκίνησε η διαδικασία της αποστείρωσης σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (αυτόκαυστο). Το θερμοκρασιακό εύρος του κυμαίνεται από 121 °C έως 134 °C ωστόσο για τις ανάγκες του πειράματος ρυθμίστηκε στους 121 °C. Τα περιβαλλοντικά δείγματα υπέστησαν θέρμανση σε ατμό υπό πίεση 1,1kg/cm². Μετά από τη διήθηση του θαλασσινού νερού με πόρους ηθμομεμβράνης (2μM-11μM), έγινε εμβολιασμός των E.N. στο αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό μέσο.

Έπειτα το διηθημένο και αποστειρωμένο θαλασσινό νερό μοιράστηκε ανά 400ml σε έξι γυάλινες κωνικές φιάλες του ενός λίτρου. Στη συνέχεια ζυγίστηκε το βάρος των 2,5 M MgCl₂·6H₂O που αντιστοιχεί στη τιμή των 508,3 gr, ώστε να χρησιμοποιηθεί για τις ανάγκες του πειράματος. Το μοριακό βάρος του MgCl₂·6H₂O είναι 203,3 gr. Στις τρεις από τις έξι γυάλινες κωνικές φιάλες προστέθηκαν 2,5M MgCl₂·6H₂O, ενώ στις υπόλοιπες τρεις δεν υπήρξε κάποια αλλαγή. Ακολούθησε ανάδευση της διαλυμένη ουσίας ώστε να σχηματιστεί ένα ομογενοποιημένο διάλυμα. Κατά τη διάλυση του MgCl₂·6H₂O απελευθερώθηκαν μόρια νερού, με συνέπεια η περιεκτικότητα του τελικού διαλύματος σε ml να αυξηθεί. Ο αρχικός όγκος του θαλασσινού νερού

αυξήθηκε κατά 500ml. Ο τελικός όγκος του διαλύματος έφτασε το ποσό των 900ml. Η διάσπαση των έξι μορίων νερού έδωσαν τιμές βάρους διαλυμένης ουσίας 237,5g δηλαδή 1,16M $MgCl_2$. Οι έξι γυάλινες κωνικές φιάλες διατηρήθηκαν στους 18°C, ώστε να επωαστούν οι μικροοργανισμοί, με σταθερή τιμή θερμοκρασίας συναρτήσει χρόνου.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της ηθμομεμβράνης σε οκτώ χρονικά διαστήματα (t_0 - t_7) που μεσολάβησαν σε διάστημα 623 ωρών και 5 λεπτών, όσο διήρκησε η επώαση των Ε.Ν. Η μέθοδος της διήθησης προαπαιτούσε τα εξής εργαστηριακά υλικά (Πιν 1.):

Πίνακας 1. Εργαστηριακά υλικά και χρήσεις.	
Φορμαλδεΰδη CH_2O (40%)	Φθορίζουσα χρωστική ουσία DAPI (4,6-διαμιδινο-2- γαινυλιδόνη)
6 Δοκιμαστικοί σωλήνες των 40 ml	Έλαιο καταδυτικού φακού (Immersion oil)
Ηθμομεμβράνη (Φίλτρα 1μm)	Αντικειμενοφόρος πλάκα
Γυάλινη κωνική φιάλη διήθησης	Καλυπτρίδα

Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλες ποσότητες θαλασσινού νερού (15ml-30ml) από τη κάθε γυάλινη κωνική φιάλη, που προστέθηκαν σε έξι δοκιμαστικούς σωλήνες. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες με $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ μαρκαρίστηκαν ως $MgCl_2(1)$, $MgCl_2(2)$, $MgCl_2(3)$, ενώ οι υπόλοιποι τρεις που προσομοιάζουν το συμβατικό θαλασσινό νερό ως

A,B,C. Με τη προσθήκη φορμαλδεϋδης (40%) επιτεύχθηκε η μονιμοποίηση των μικροβιακών κυττάρων, ώστε να εκτιμηθεί ο πληθυσμός των E.N. Με τη μέθοδο της ηθμομεμβράνης τα δείγματα των δοκιμαστικών σωλήνων διηθήθηκαν δια μέσω των πολύ μικρών πόρων της ηθμομεμβράνης (1μm) με βάση τα ml διήθησης (Πιν.2).

Πίνακας 2. Συνοπτική παρουσίαση των ml διήθησης των δειγμάτων στις οκτώ χρονικές στιγμές (ώρες).								
Δείγματ	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅	t ₆	t ₇
α	0,00	48,55	92,50	162,35	213,50	268,50	432,05	623,05
A	15 ml	25 ml	20 ml	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml
B	30 ml	25 ml	20 ml	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml
C	30 ml	25 ml	20 ml	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml
MgCl ₂ (1)	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml
MgCl ₂ (2)	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml
MgCl ₂ (3)	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml

Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να αποτρέπεται η διέλευση των E.N. διαμέσου της ηθμομεμβράνης. Κατά τη διάρκεια της διήθησης του κάθε δείγματος, έγινε προσθήκη φθορίζουσας χρωστικής της DAPI, ώστε να γίνει χρώση των κύτταρων των E.N. Το

ομοιογενές μείγμα DAPI (τελική συγκέντρωση 10μg/ml) κατακρατήθηκε παρατεταμένα στο γυάλινο χωνί της φιάλης για διάρκεια έξι λεπτών στο σκοτάδι. Το διάστημα αυτό καθιστά ικανή τη φθορίζουσα χρωστική της DAPI να προσδεθεί με το DNA των E.N. Κάτω από το φως μήκους κύματος των 365nm, το σύμπλοκο DNA-DAPI φθορίζει κυανό χρώμα στα 390 nm.

Η διεργασία της διήθησης για τα υπέρτονα δείγματα ήταν χρονοβόρα λόγω της φραγής των πόρων της ηθμομεμβράνης από τα μόρια του $MgCl_2$. Με τη βοήθεια της πίεσης που ασκήθηκε από ελεγχόμενη αντλία κενού δια μέσω του κενού της διηθητικής φιάλης, η διεργασία της διήθησης πραγματοποιήθηκε σε σύντομο και ελεγχόμενο χρονικό διάστημα. Με το τέλος της διήθησης η ηθμομεμβράνη με το τοποθετημένο εναιώρημα των E.N. απομακρύνθηκε από τη διηθητική φιάλη με τη χρήση λαβίδας. Σε αντικειμενοφόρο πλάκα έγινε επίχριση με 1ml έλαιο μη φθορίζοντος καταδυτικού φακού (Immersion oil), στο ανώτερο και κατώτερο τμήμα της. Ακολούθησε η τοποθέτηση της ηθμομεμβράνης στην αντικειμενοφόρο πλάκα στα σημεία που επικαλύφθηκαν με έλαιο καταδυτικού φακού. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη 1ml ελαίου καταδυτικού φακού στην επιφάνεια της ηθμομεμβράνης. Στο πάνω μέρος της ηθμομεμβράνης τοποθετήθηκε καλυπτρίδα. Η καλυπτρίδα διακρίνεται για την πολύ λεπτή μορφή της και τον κατάλληλο δείκτη διάθλασης που απαιτεί η φωτεινή πηγή του μικροσκοπίου. Η τοποθέτηση της καλυπτρίδας πραγματοποιήθηκε με τέτοιο τρόπο ώστε να διακριθεί μια ομοιογενής εξάπλωση του ελαίου καταδυτικού φακού ώστε να μην μετακινηθούν οι μικροοργανισμοί από τη θέση τους. Με το τέλος της προετοιμασίας των δειγμάτων διακρίθηκαν ως προς το σύνολο 96 δείγματα. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πλαστική θήκη ώστε να αποφευχθεί η έκθεσή τους στο φως, σε τιμές θερμοκρασίας $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Η καταγραφή του πληθυσμού των E.N.

(12)

πραγματοποιήθηκε σε σχέση με τον αριθμό πεδίων, που παρατηρήθηκαν στο πλέγμα του μικροσκοπίου (x100 αντικειμενικός φακός x10 προσοφθάλμιος φακός). Ο αριθμός των πεδίων που μελετήθηκαν ήταν 141. Ο υπολογισμός της αφθονίας των E.N. και των E.B. ανά ml θαλασσινού νερού, επιτεύχθηκε από τον τύπο (1)

$$\text{Κύτταρα/ml} = (\text{Πληθυσμός/πεδία}) * 12108,7 * (10/9)/\text{ml διήθησης} \quad (1)$$

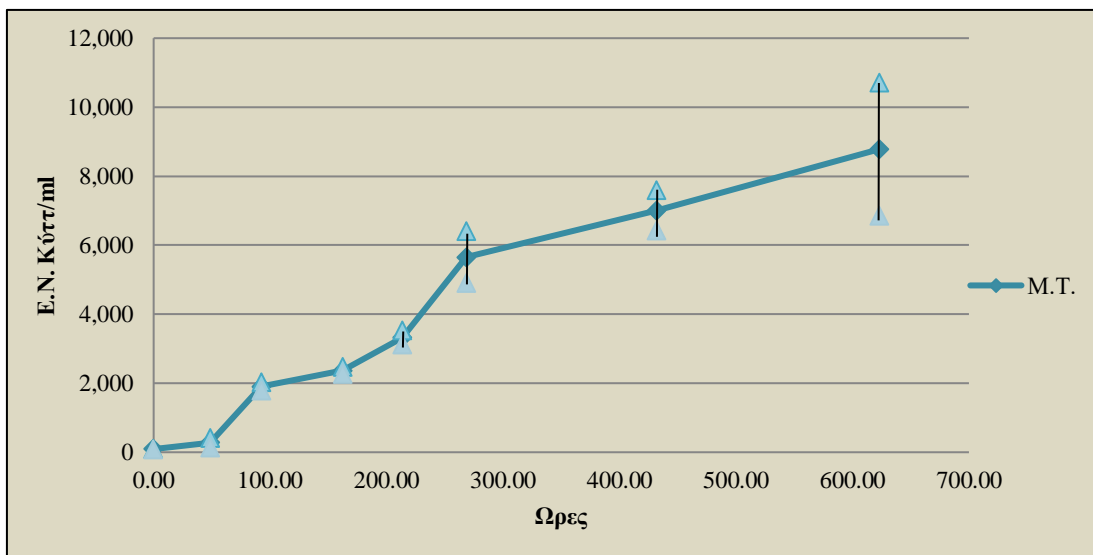
3) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Με το τέλος του πειράματος πραγματοποιήθηκε η καταγραφή του πληθυσμού των E.N. και των E.B τόσο για τα υπέρτονα όσο και για τα δείγματα μάρτυρες, στο χρονικό διάστημα των 623 ωρών και 5 λεπτών. Όσον αφορά τα E.B. στα δείγματα μάρτυρες τη χρονική στιγμή των 92 ωρών και 50 λεπτών παρατηρήθηκε η μέγιστη αύξηση του πληθυσμού με τιμές $30.345.123 \pm 266.733$ κυτ/ml, ενώ η ελάχιστη σε διάστημα 268 ωρών και 50 λεπτών με τιμές 487.987 ± 10.128 κυτ/ml. Σε διάστημα 176 ωρών που μεσολαβεί στο διάστημα της μέγιστης έως την ελάχιστης τιμής πληθυσμού των E.B, παρατηρήθηκε μείωση με διαφορά μεταβολής $29.857.136$ κυτ/ml.

Παράλληλα, στα υπέρτονα δείγματα παρατηρήθηκε η μέγιστη αύξηση του πληθυσμού των E.B. με τιμές $2.512.345 \pm 11.093$ κυτ/ml τη χρονική στιγμή των 162 ωρών και 35 λεπτών, ενώ η ελάχιστη τιμή στην αρχή της επώασης με τιμές 745.678 ± 3.452 κυτ/ml. Παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού από την αρχή της επώασης έως την χρονική στιγμή των 162 ωρών και 35 λεπτών με διαφορά μεταβολής $1.766.667$ κυτ/ml. Από το διάστημα των 162 ωρών και 35 λεπτών που καταγράφηκε μέγιστη τιμή του πληθυσμού των E.B. έως και την χρονική στιγμή των 623 ωρών και 5 λεπτών παρατηρήθηκε μείωση με διαφορά μεταβολής $1.713.580$ κυτ/ml. Στα υπέρτονα δείγματα ο ειδικός ρυθμός αύξησης των E.B. είναι $\mu_{\max}=0,6 \text{ h}^{-1}$ ενώ στα δείγματα μάρτυρες είναι $\mu_{\max}=0,5 \text{ h}^{-1}$.

Από την άλλη μεριά όσο αφορά τα E.N. στα δείγματα μάρτυρες παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού. Μέγιστη τιμή παρατηρήθηκε τη χρονική στιγμή των 623 ωρών και 5 λεπτών με τιμές 8.782 ± 1.938 κυτ/ml ενώ ελάχιστη τιμή στην αρχή της επώασης με τιμές 91 ± 7 κυτ/ml. Από την αρχή της επώασης έως τη χρονική στιγμή των 623

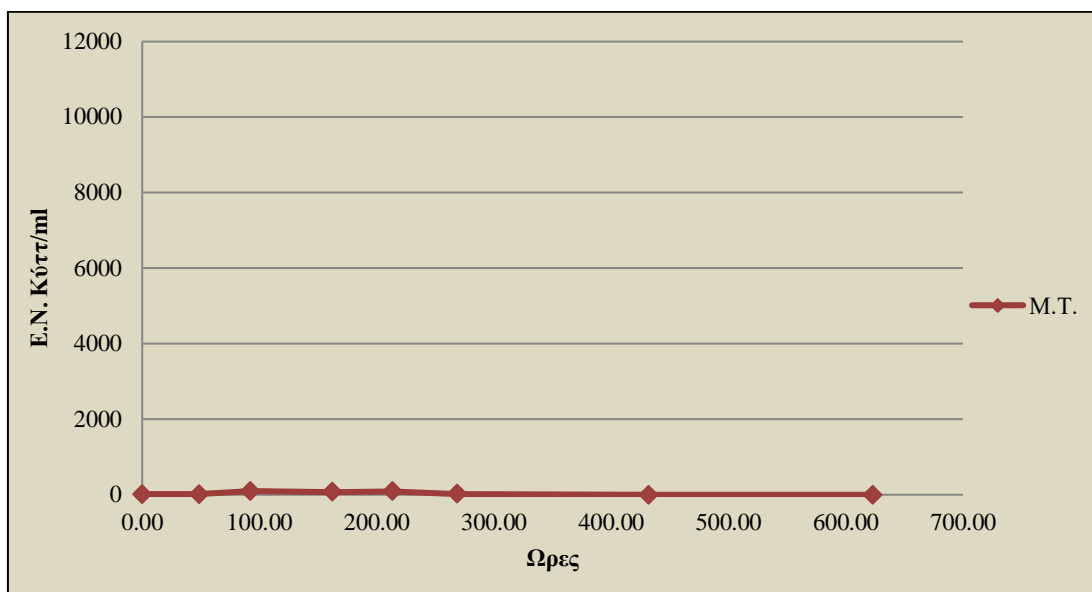
ωρών και 5 λεπτών η διαφορά μεταβολής του πληθυσμού των Ε.Ν. είναι 8.691 κυτ/ml. Η μέγιστη διαφορά μεταβολής μεσολάβησε στο χρονικό διάστημα των 213 ωρών και 50 λεπτών έως το χρονικό διάστημα των 268 ωρών και 50 λεπτών (55 ώρες διαφορά) κατά 2.327 κυτ/ml. Η ελάχιστη διαφορά μεταβολής μεσολάβησε από την αρχή της επώασης έως το χρονικό διάστημα των 48 ωρών και 55 λεπτών κατά 186 κυτ/ml. (Σχ.1). Στα δείγματα μάρτυρες ο ειδικός ρυθμός αύξησης των Ε.Ν. είναι $\mu_{\max}=0,8 \text{ h}^{-1}$.



Σχήμα 1. Μέση τιμή των κυττάρων των Ε.Ν. στα δείγματα-μάρτυρες στο ml.

Στα υπέρτονα δείγματα παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού των Ε.Ν. Μέγιστη τιμή παρατηρήθηκε τη χρονική στιγμή των 92 ωρών και 50 λεπτών με τιμές 98 ± 20 κυτ/ml ενώ ελάχιστη τιμή στην χρονική στιγμή των 432 ωρών και 5 λεπτών με τιμές μηδενικές. Η μέγιστη διαφορά μεταβολής μεσολάβησε στο χρονικό διάστημα των 48 ωρών και 55 λεπτών έως το χρονικό διάστημα των 92 ωρών και 50 λεπτών (43 ώρες και 95 λεπτά διαφορά) κατά 87 κυτ/ml. Η ελάχιστη διαφορά μεταβολής μεσολάβησε στο

χρονικό διάστημα των 213 ωρών και 50 λεπτών έως το χρονικό διάστημα των 268 ωρών και 50 λεπτών (55 ώρες διαφορά) κατά 67 κυτ/ml (Σχ.2). Στα υπέρτονα δείγματα ο ειδικός ρυθμός αύξησης των E.N. είναι $\mu_{\max} = 0,01 \text{ h}^{-1}$.



Σχήμα 2. Μέση τιμή των κυττάρων των E.N. στα υπέρτονα δείγματα στο ml.

$$\mu_{\max} = (\ln_t - \ln_o) / \Delta t \quad (2)$$

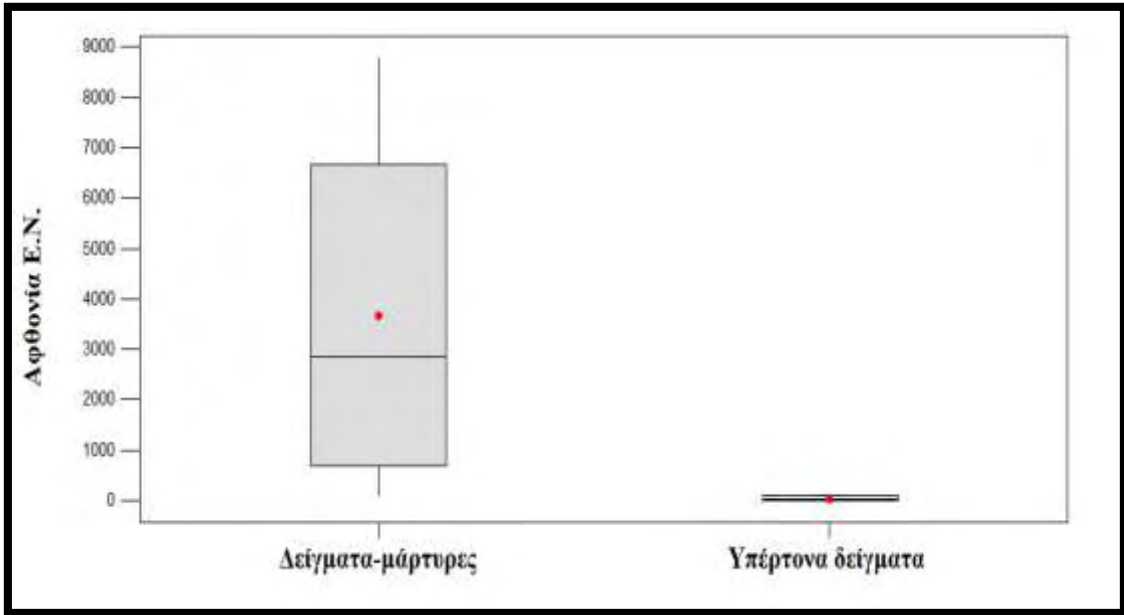
Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (ANOVA) για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Πάρθηκαν δύο στατιστικές υποθέσεις H_0 και H_1 . Η πρώτη υπόθεση σχετίζεται με την ακολουθία της κανονικής κατανομής των τιμών. Η δεύτερη υπόθεση απορρίπτει το ενδεχόμενο της κανονικής κατανομής. Ο στόχος ήταν ο έλεγχος της μηδενικής σε σχέση της εναλλακτικής υπόθεσης. Τα αποτελέσματα της ANOVA κατέδειξαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές εντός και μεταξύ των δειγμάτων για τα E.N. Ο δείκτης F που

εκφράζει τον λόγο των διαφορών εντός των δειγμάτων σε σχέση με τις διαφορές μεταξύ των δειγμάτων είναι 10,51. Η τιμή αυτή είναι μεγαλύτερη της μονάδος, γεγονός που καταδεικνύει τις τεράστιες διαφορές των υπέρτονων δειγμάτων σε σχέση με τα δείγματα-μάρτυρες. Επίσης η περιοχή απόρριψης είναι μικρότερη του 0,05 με τιμή 0,006. Αυτό σημαίνει ότι οι διαφορές μεταξύ των δειγμάτων είναι μεγαλύτερες από εκείνες του εσωτερικού των δειγμάτων (Πιν.3) Από την άλλη πλευρά για τα E.B. ο δείκτης F είναι ίσος με 0,61 ενώ η περιοχή απόρριψης είναι ίση με 0,405 γεγονός που υποδηλώνει ότι οι διαφορές εντός και μεταξύ των δειγμάτων είναι μικρές (Πιν.4)

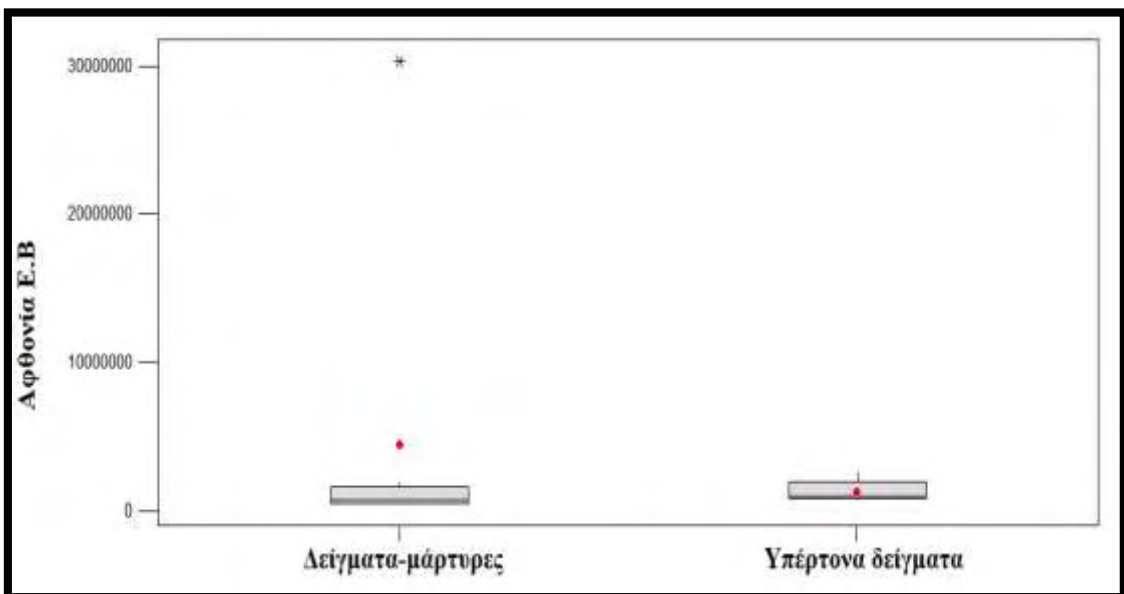
Πίνακας 3. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα για τα υπέρτονα δείγματα-MgCl ₂ και στα δείγματα-μάρτυρες, ως προς τον πληθυσμό των E.N.					
Πίνακας ανάλυσης διασποράς					
Πηγή μεταβλητότητας	B.E.	Άθροισμα τετραγώνων SS	Μέσο άθροισμα τετραγώνων MS	Κριτήριο F	Περιοχή απόρριψης
Διαφορές μεταξύ των δειγμάτων	1	52914713	52914713	10,51	0,006
Διαφορές εντός των δειγμάτων	14	70463771	5033127		

Πίνακας 4. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα για τα υπέρτονα δείγματα με MgCl ₂ και στα δείγματα-μάρτυρες, ως προς το πληθυσμό των βακτηρίων.					
Πίνακας ανάλυσης διασποράς					
Πηγή μεταβλητότητας	B.E	Άθροισμα τετραγώνων SS	Μέσο άθροισμα τετραγώνων MS	Κριτήριο F	Περιοχή απόρριψης
Διαφορές μεταξύ των δειγμάτων	1	3,58E+13	3,587E+13	0,61	0,405
Διαφορές εντός των δειγμάτων	13	7,677E+14	5,90E+13		
Ολική	14	8,035E+14			

Στα δείγματα μάρτυρες η διακύμανση της αφθονίας των E.N. είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή των υπέρτονων δειγμάτων. Η ολική αφθονία των E.N ποικίλει μεταξύ 10^3 έως και $7 \cdot 10^3$ κυτ/ml ενώ αυτή των υπέρτονων δειγμάτων ποικίλει μεταξύ 0 έως και 10^2 (Σχ.3). Οι κόκκινες τελείες αναφέρονται σε ακραίες τιμές (outliers). Όσο αφορά τα E.B. η διακύμανση της αφθονίας δεν διαφέρει σχέση με αυτή των υπέρτονων δειγμάτων. Η ολική αφθονία των E.B. ποικίλει μεταξύ $4 \cdot 10^4$ έως και $2 \cdot 10^6$ κυτ/ml ενώ αυτή των υπέρτονων δειγμάτων ποικίλει μεταξύ $7,5 \cdot 10^5$ έως και $2,5 \cdot 10^6$ (Σχ.4).



Σχήμα 3. Αφθονία των Ε.Ν. για τα δείγματα-μάρτυρες και τα υπέρτονα δείγματα



Σχήμα 4. Αφθονία των Ε.Β. για τα δείγματα-μάρτυρες και τα υπέρτονα δείγματα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 70' στα πλαγκτικά τροφικά πλέγματα οι κύριοι παραγωγοί οργανικής ύλης θεωρούνταν τα μικροσκοπικά φύκη μέσω της φωτοσύνθεσης, ενώ τα Bacteria θεωρούνταν μόνο ως μεσολαβητές στην ανακύκλιση ανόργανων θρεπτικών στοιχείων. Σήμερα έχει διαπιστωθεί ότι ο ρόλος των Bacteria είναι πολύ σημαντικός, διότι το βακτηριοπλαγκτόν είναι η μεγαλύτερη πηγή άνθρακα και άλλων ανόργανων στοιχείων στην εύρωτη ζώνη, με τη βιομάζα τους να είναι μεγαλύτερη από αυτή του φυτοπλαγκτού (Cho & Azam, 1990; Fuhrman et al., 1989). Στις αρχές της δεκαετίας του 80', το νέο προτεινόμενο τροφικό πλέγμα της υδάτινης στήλης ονομάστηκε "μικροβιακός βρόγχος" (Azam et al. 1983). Στη συνέχεια ο όρος αντικαταστάθηκε από τον όρο "μικροβιακό τροφικό πλέγμα". Η οργανική ύλη παράγεται από τη φωτοσύνθεση του φυτοπλαγκτού. Το ένα μερίδιο αυτής της ύλης χρησιμοποιείται από τον ίδιο οργανισμό και το υπόλοιπο μέρος της εκλύεται απευθείας στο θαλασσινό νερό. Τα πρώτιστα και το μεσοζωοπλαγκτόν ως θηρευτές άλλων μικροοργανισμών εκλύουν οργανική ύλη. Η μόλυνση των βακτηριακών κυττάρων από ιούς μπορεί να προκαλέσει λύση των κυττάρων, γεγονός που εκλύει κυτταρικά περιεχόμενα.

Το σύνολο της οργανικής ύλης αποκαλείται διαλυμένη οργανική ύλη (DOM). Η DOM χωρίζεται σε διαλυμένο οργανικό άνθρακα και διαλυμένο οργανικό άζωτο (DON). Οι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί είναι οι μοναδικοί άμεσοι χρήστες της DOM. Πολλά πρώτιστα τρέφονται με σωματίδια μεγέθους βακτηρίων και με πικοφυτοπλαγκτόν (<2μm), αξιοποιώντας μια τάξη μεγέθους Bacteria, φυκών και σωματιδιακού θρύμματος που δεν αξιοποιείται επιτυχώς από το ανώτερο θηρευτές.

Τα Bacteria καταναλώνονται από τα νανομαστιγωτά, που με τη σειρά τους καταναλώνονται από μεγαλύτερα πρώτιστα και έως κάποιο βαθμό από νεαρά άτομα μεσοζωοπλαγκτού (Sanders & Wickham, 1993). Στη συνέχεια το μεσοζωοπλαγκτόν καταναλώνεται από το μάκροζωοπλαγκτόν και αυτό με τη σειρά του από μεγαλύτερους θηρευτές. Έτσι η ροή της DOM μεταφέρεται από τα χαμηλότερα προς τα υψηλότερα τροφικά επίπεδα. Αξιοσημείωτο ότι τα βλεφαριδιωτά και τα τροχόζωα καταναλώνουν σε μικρότερο βαθμό τους πληθυσμούς των Bacteria σε σχέση με τα νανομαστιγωτά (Wetzel 2001). Οι αλληλεπιδράσεις των μικροοργανισμών είναι πολύ σημαντικές για τη ροή της ενέργειας σε όλα τα τροφικά επίπεδα, με την κάθε μικροοργανισμική κοινότητα να παίζει τον δικό της ρόλο στο περιβάλλον (Πιν.5)

Πίνακας 5. Βιοχημικές δραστηριότητες των μικροοργανισμών της υδάτινη στήλη (Kirchman, 2008)		
Λειτουργικές μικροοργανισμικές ομάδες	Βιοχημικές λειτουργίες	Μικροοργανισμοί
Πρωτογενείς παραγωγοί	Δεσμεύουν CO ₂ και παράγουν διαλυμένη οργανική ύλη (DOM)	Eukarya & Cyanobacteria
Φωτοετερότροφα	Χρησιμοποιούν την DOM, καθοδηγούμενη από την ηλιακή ενέργεια	Cyanobacteria & άλλα Bacteria
Ετερότροφοι προκαρυώτες	Ανοργανοποίηση και οξείδωση της DOM για την αύξηση βιομάζας και παραγωγή ανόργανων στοιχείων	Bacteria & Archaea
Θηρευτές	Ελέγχουν το πληθυσμό των θηραμάτων μέσω της θήρευσης και αποδίδουν DOM στα ανώτερα τροφικά επίπεδα	Eukarya

Ιοί	Ελέγχουν το πληθυσμό των θηραμάτων, αποδίδουν DOM στα ανώτερα τροφικά επίπεδα και μεσολαβούν στη γενετική ανταλλαγή	Μη προσδιορίσιμοι
Μετατροπείς του N ₂ (Διαζότροφα)	Μετασχηματίζουν το N ₂ σε αμμωνία	Cyanobacteria
Νιτροποιητές	Οξειδωση της αμμωνίας σε νιτρικά άλατα	Bacteria & Archaea
Απονιτροποιητές	Απελευθερώνουν N ₂ ή N ₂ O κατά τη διάρκεια της οξειδωσης της αμμωνίας ή την αναγωγή των νιτρικών	Bacteria & Archaea

Τα υδρόβια πρώτιστα είναι μια σημαντική συνιστώσα της ζωντανής βιομάζας των θαλάσσιων οικοσυστημάτων και αντιπροσωπεύουν μια ταξινομικός ποικίλη ομάδα ειδών. Τα πρώτιστα ποικίλουν στο μέγεθος με εύρος διαστάσεων να καλύπτει αρκετές τάξεις μεγέθους. Τα περισσότερα είδη είναι μικροσκοπικά και κυμαίνονται <2μm διάμετρο κυττάρου, όπως μερικά μονήρη μαστιγωτά (Guillou et al., 1999ab) έως μερικές εκατοντάδες μικρόμετρα σε μήκος όπως μερικά μαστιγωτά και βλεφαριδωτά. Μερικά μονήρη ακτινόζωα και τρηματοφόρα σχηματίζουν δομές >1cm. Οι συνηθέστερες μορφές πρωτίστων στα υδάτινα συστήματα περιλαμβάνουν αμοιβαδοειδή, τρηματοφόρα, ακτινόποδα, μαστιγωτά και βλεφαριδωτά. Η θρέψη τους είναι διαφορετική σε κάθε είδος όπως αυτή της θήρευσης, της απορρόφησης οργανικών ουσιών και της πρόσληψης νερού και διαλυμένων οργανικών ουσιών σε εξειδικευμένα τροφικά σωματίδια. Η διαίτα τους διαφέρει ανάμεσα στις διάφορες φυλογενετικές

ομάδες και εξειδικεύεται ανάλογα με το είδος το μέγεθος και τον τρόπο τροφοληψίας και περιλαμβάνει προκαρυωτικά κύτταρα, άλλα πρώτιστα και άλλα μικροφύκη και μετάζωα. Ο οικολογικός τους ρόλος είναι βαρυσήμαντος μιας και είναι πρωταρχικοί καταναλωτές των υδρόβιων μικροοργανισμών χαρακτηρίζοντας τους ως ένα σημαντικό τροφικό σύνδεσμο μεταξύ μιας μεγάλης ποικιλίας προκαρυωτών και μεγαλύτερων ευκαρυωτικών. Ανοργανοποιούν την οργανική ύλη τροφοδοτώντας με ανόργανα θρεπτικά στοιχεία τους πρωτογενείς παραγωγούς. Τα πρώτιστα απαντούν ως ικανότεροι στη σύλληψη θηραμάτων με τη προϋπόθεση να έχουν στη διάθεση τους περισσότερους πόρους και για αυτό το λόγο θα πρέπει υπό φυσιολογικές συνθήκες, να έχουν μεγαλύτερη αρμοστικότητα από τους λιγότερους ικανούς στη θήρευση μικροοργανισμούς. Η δράση της φυσικής επιλογής στο μικροοργανισμικό πληθυσμό των πρωτίστων τείνει να αυξάνει την αποτελεσματικότητα του στην ανεύρεση, σύλληψη και κατανάλωση βακτηριοπλαγκτού. στα θαλάσσια οικοσυστήματα.

Από την άλλη μεριά τα μέλη του πληθυσμού των Bacteria, που είναι ικανότερα να ξεφεύγουν με διάφορους μηχανισμούς προσαρμογής από τους θηρευτές, συνήθως διακρίνονται για το "ένδοπληθυσμιακό επιλεκτικό πλεονέκτημα". Κατά συνέπεια, η επιλογή στον πληθυσμό του θηράματος προάγει νέες προσαρμογές που επιτρέπουν στο βακτηριοπλαγκτό αυτού να αποφεύγουν την ανεύρεση, τη σύλληψη και την κατανάλωση από τους θηρευτές. Συνεπώς το θήραμα γίνεται πιο επιδέξιο στην αποφυγή των θηρευτών, ενώ οι θηρευτές αναπτύσσουν αποτελεσματικότερους μηχανισμούς για τη σύλληψη των θηραμάτων. Τα Bacteria διαθέτουν μερικά προσαρμοστικά χαρακτηριστικά ως προς τη θήρευση: α) εξειδικευμένες κυτταρικές επιφάνειες (Wildshutte et al., 2004) β) βιοενεργούς μεταβολίτες (Matz et al., 2004a) γ) ικανή ταχύτητα κολύμβησης (Matz & Jugens 2005) δ) σχηματισμός μικροαποικιών και

διακυτταρική επικοινωνία (Matz et al., 2004b). Οι μηχανισμοί αυτοί αυξάνουν τη βιωσιμότητα των Bacteria, έναντι της βόσκησης.

Στη Μεσόγειο θάλασσα η θήρευση του βακτηριοπλαγκτού από τα νανομαστιγωτά, εκτιμάται ότι αγγίζει το 45-87%. Στο οξικό στρώμα (0-200m) η αφθονία των E.B. είναι $3,37 \cdot 10^5$ κυττ/ml, ενώ η αφθονία των E.N. είναι $0,74 \cdot 10^3$ κυττ/ml (Christaki et al., 2001). Η θήρευση των E.B. από μικρά πρώτιστα μεγέθους $>3\mu\text{M}$ μπορεί να ξεπεράσει το 90%. Η Μεσόγειος θάλασσα χαρακτηρίζεται ως ολιγοτροφική, γεγονός που υποδηλώνει τις χαμηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών που μεταφέρονται από τα κατώτερα τροφικά επίπεδα στα ανώτερα. Παρόλο αυτά η Μεσόγειος θάλασσα χαρακτηρίζεται από σημαντικές μικροβιακές δραστηριότητες. Η βαθμιαία μείωση παραγωγικότητας ξεκινά από τη Δυτική Μεσόγειο προς την Ανατολική με τιμές 75 και 13 $\text{mg C m}^{-2} \text{d}^{-1}$ αντίστοιχα. Η ροή της Δ.Ο.Υ μεταφέρεται από τους φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς στα πρώτιστα σε ποσοστό 27% του συνόλου της. Η διαίτα των νανομαστιγωτών για τους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς της ομάδας *Prochlorococcus*, είναι με ποσοστά πρόσληψης ημερησίως 1,4% έως 21% με μέση τιμή 6%. Για τους προκαρυώτες του γένους *Synechococcus* τα ημερήσια ποσοστά θήρευσης είναι 0,5% έως 45% με μέση τιμή 13%. Ο χρόνος διπλασιασμού των E.N. κυμαίνεται από 3 έως 17 μέρες, γεγονός που υποδηλώνει την ολιγοτροφική φύση της Α.Μεσογείου, όπως συμβαίνει και στη θάλασσα των Σαργασσών. Είναι προφανές ότι η χαμηλή ροή θρεπτικών εξηγεί την χαμηλή παρουσία των πικοπλαγκτονικών θηρευτών. Το ποσοστό ημερήσιας κατανάλωσης E.B από τα E.N. εμφανίζεται μικρό στα οξικά στρώματα.

Έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες με αντικείμενο μελέτης την επιβίωση των πρωτίστων στα υπεράλμυρα υδάτινα οικοσυστήματα ($>300\text{psu}$) (Patterson & Simpson,

1996; Park et al. 2003; Post et al. 1983;). Τα E.N, τα βλεφαριδωτά και οι αμοιβάδες αποτελούν τις κυριότερες ομάδες πρωτίστων, που έχουν προσαρμοστεί σε νερά με υψηλή συγκέντρωση μονοσθενών ιόντων αλάτων (Javor, 1989; Post et al. 1983). Ωστόσο στα Υ.Θ.Ο. αναδεικνύεται ο περιοριστικός ρόλος της υψηλής αλατότητας στην επιβίωση των E.N. όπως και αντίστοιχα των άλλων φυσικο-χημικών παραμέτρων σε άλλα ακραία οικοσυστήματα (Atkins et al. 2000). Στις τεχνητές αλυκές της Κορέας η αφθονία των E.N. μειώθηκε με σταθερό ρυθμό στους μήνες Απρίλιο έως Αύγουστο, με τιμές από $7 \cdot 10^3$ - $28 \cdot 10^3$ κύτ/ml (Park et al., 2003). Η προκαρλωτική αφθονία κυμάνθηκε από $69 \cdot 10^9$ - $276 \cdot 10^9$ κύτ/ml, η οποία αυξήθηκε από τον Απρίλιο προς τον Αύγουστο. Η βακτηριοφαγία εκ μέρους των E.N. κυμάνθηκε από $1,4 \cdot 10^8$ - $13 \cdot 10^8$ κύτ/ml (Park et al., 2003). Ο βαθμός βόσκησης ήταν μεγαλύτερος τους θερινούς μήνες. Ο υψηλός ρυθμός θήρευσης πυροδότησε την αφθονία των E.N. με το χρόνο διπλασιασμού σε διάστημα 2,3 ημερών.

Από την άλλη μεριά, στις αλυκές της Ισπανίας τα E.N. απουσιάζουν (>300psu), ωστόσο η αφθονία τους με τιμές αλατότητας 300psu, καταγράφηκε $3 \cdot 10^4$ κυτ/ml (Pedros-Alio et al., 2000). Τα αποτελέσματα εκτιμήθηκαν με βάση το βαθμό βόσκησης, τη βιομάζα και τη ολική αποδοτικότητα (Ο.Α.) που παρουσίασαν οι μικροβιακές κοινότητες στο 10% (Park et al., 2003). Τα E.N. μπορούν να επιβιώσουν με αντίτιμο το υψηλή ενεργειακή καταπόνηση. Η θήρευση από τα E.N. σε Υ.Θ.Ο, εξηγεί τον υψηλό ρυθμό ανακύκλισης της αμμωνίας στις τεχνητές αλυκές της Ισπανίας. Κατά κύριο λόγο οι υψηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας οφείλονται στο μικροζωοπλαγκτόν και στην αυξημένη βακτηριοφαγία από τα E.N. στο θαλασσινό νερό (Glibert, 1982). Στις αλυκές της Ισπανίας, οι ζωοπλαγκτονικοί οργανισμοί, κυρίως το είδος *Artemia salina*, επιβιώνει στα Υ.Θ.Ο (320 psu), αλλά απουσιάζει σε συγκεντρώσεις >350 psu (Joint et

al., 2002). Σε έρευνες του Cho et al. (1995) πραγματοποιήθηκε αξενική καλλιέργεια του είδους "*Pleurostomum flabellatum*" (άκρως αλόφιλο), το οποίο παρουσίασε μέγιστη ανάπτυξη σε Υ.Θ.Ο. (250-300 psu) αλλά εμφάνισε μη προσαρμοστικότητα <100 psu. Στη σημερινή εποχή πολλά είδη μικροοργανισμών είναι ακόμη άγνωστα και δεν έχουν ταυτοποιηθεί. Λαμβάνοντας υπόψη τα ενδιαιτήματα που είναι ακόμη άγνωστα ως προς τη σύνθεση αφθονία των ειδών, αρκετά είδη συμπεριλαμβανομένων των Eukarya (Πιν.6), επιβιώνουν στα Υ.Θ.Ο. σύμφωνα με μοριακές αναλύσεις (Casamayor et al., 2002). Ωστόσο η βιοποικιλότητα των E.N. είναι περιορισμένη.

Πίνακας 6. Είδη νανομαστιγωτών που επιβιώνουν στα Υ.Θ.Ο μονοσθενών ιόντων NaCl ₂ (>300psu). (Patterson & Simpson, 1996; Post et al., 1983)			
Είδη	Δ.Αυστραλία¹	Δ.Αυστραλία²	Κορέα³
<i>Bodo saltans</i>		+	
<i>Bodo spp</i>	+		+
<i>Colpodella pugnax</i>		+	
<i>Palustrimonas Yorkeensis</i>		+	
<i>Phyllomitius sp.</i>	+		+
<i>Pleurostomum flabellatum</i>		+	+
<i>Pleurostomum turgidum</i>		+	
<i>Tetramitius spp.</i>	+		+
¹ Λιμνοθάλασσα Hutt, Δυτική Αυστραλία (Post et al., 1983)			

²Αλυκές Δυτική Αυστραλία (Pattern and Simpson, 1996)

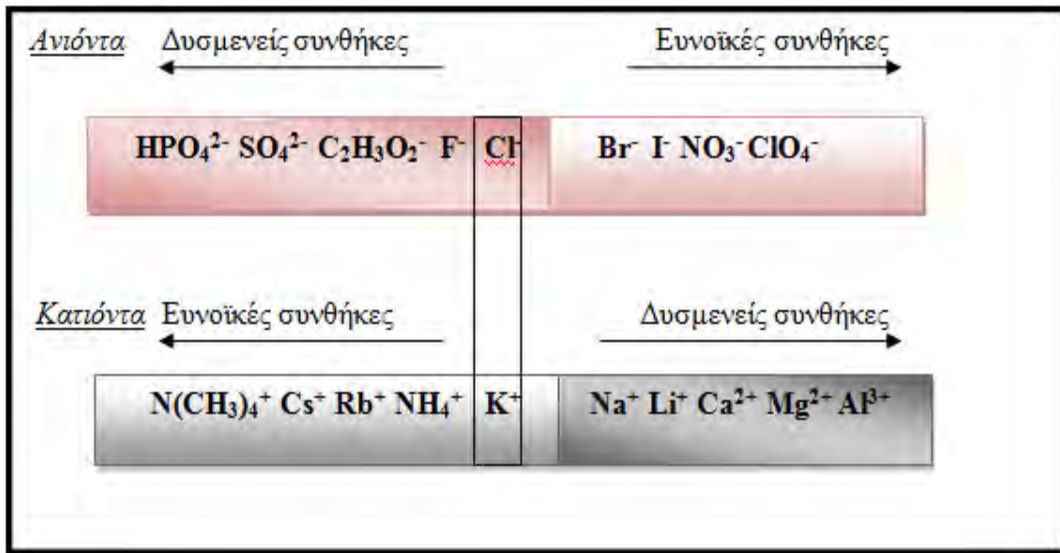
³Τεχνητές αλυκές Seoshin Κορέα (Park et al., 2003)

Ακραία ενδιαιτήματα πλούσια με δισθενή ιόντα Mg^{++} δημιουργούν δυσμενείς συνθήκες στην επιβίωση και προσαρμογή των μικροοργανισμών σε σύγκριση με περιβάλλοντα που υπερτερεί το NaCl. Συγκεντρώσεις $>1.26M$ $MgCl_2$ αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών από δείγματα που πάρθηκαν από την ζώνη διεπαφής της Discovery (Halsworth et al., 2007). Παρόλο που το DNA και το rRNA είναι κλειδί στην ανακάλυψη της ζωής κάτω τις συγκεντρώσεις δισθενή ιόντων Mg^{++} , το mRNA δεν είναι ενδεικτικός δείκτης μεταβολικών δραστηριοτήτων. Αρκετοί μικροοργανισμοί όπως τα αλόφιλα Archaea απαιτούν υψηλή αλατότητα, παρουσιάζοντας υψηλή βιομάζα σε συγκεντρώσεις $>5M$ NaCl (Oren, 2000). Αντιθέτως ενδιαιτήματα κορεσμένα σε $MgCl_2$ έχουν αναφερθεί ως στείρα (Javor, 1989) γεγονός που αποδόθηκε στην μείωση της διαθεσιμότητας του νερού (a_w) στο εσωτερικό του μικροβιακού κυττάρου. Η μείωση της a_w εμφανίζεται πιο έντονη υπό παρουσία $MgCl_2$ σε σύγκριση με το NaCl στις ίδιες μοριακές συγκεντρώσεις. Μόνο ένας μικρός αριθμός αρχαίων επιβιώνουν σε συγκεντρώσεις $>2,5M$ $MgCl_2$ κάτι που επιτυγχάνουν με την παρουσία σημαντικών συγκεντρώσεων NaCl (Mullakhanbhai & Larsen, 1975; Oren, 1983; Oren et al., 1984). Ενώ το Mg^{++} είναι απαραίτητο για τη ζωή, υπέρμετρες συγκεντρώσεις $MgCl_2$ λειτουργούν ως ανασταλτικός παράγοντας στα κυτταρικά συστήματα. Η μείωση της διαθεσιμότητας του νερού ($a_w < 0.72$) που οφείλεται είτε στην αφυδάτωση του κυττάρου είτε σε υπεροσμωτικό στρές από την παρουσία δισθενή αλάτων ιόντων είναι από τις πιο πλέον διάχυτες καταπονήσεις που ασκούνται στα βιολογικά συστήματα.

Μελέτες πραγματεύονται τα εχθρικά για τη ζωή των μικροοργανισμών ενδιαιτήματα εισάγοντας τον όρο της χαοτροπίας και κοσμοτροπίας (Halsworth et al., 2007). Εκτός από την μείωση της ενεργότητας του νερού, διαλυμένες στο νερό ενώσεις μπορούν να λειτουργήσουν ως χαοτροπικές με την αποδυνάμωση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και την αποσταθεροποίηση των βιολογικών μακρομορίων, ενώ άλλες δρουν ως κοσμοτροπικές με την ενδυνάμωση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και την σταθεροποίηση των μακρομορίων (Collins, 1997; Halsworth et al., 2003a). Χαοτροπικές ενώσεις είναι το χλωριούχο μαγνήσιο, η ουρία, η φαινόλη, το χλωριούχο λίθιο και η υδροχλωρική γουανιδίνη ενώ κοσμοτροπικές είναι το χλωριούχο νάτριο (NaCl), η προλίνη, η γλυκίνη και η βεταΐνη. (Halsworth et al., 2008). Συγκεντρώσεις $>2,3\text{M MgCl}_2$ με την απουσία κοσμοτροπικών ενώσεων εμποδίζουν την επιβίωση (Halsworth et al., 2007).

Η κλίμακα Hofmeister αναδεικνύει το βαθμό δραστικότητας των ιόντων αλάτων στα μακρομόρια των πρωτεϊνών, που με τη σειρά τους επιφέρουν είτε ευνοϊκές είτε δυσμενείς συνθήκες στους μικροοργανισμούς (Σχ.6). Τα ηλεκτρόνια σθένους των ιόντων αλάτων έχουν ως αντίκτυπο την αποδιάταξη της δομής των πρωτεϊνών. Οι διαλυμένες ουσίες καθορίζουν την λειτουργικότητα των μακρομορίων και παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση παραγόντων στρες όπως αυτής της ιοντικής ισχύς. Τα δισθενή ιόντα Mg^{2+} και Ca^{2+} διακρίνονται ως πιο δραστικά στην μετουσίωση των πρωτεϊνών σε σχέση με τα μονοσθενή ιόντα του νατρίου Na^+ και καλίου K^+ . Οι αρνητικές επιπτώσεις των δραστικών αλάτων στους μικροοργανισμούς οφείλονται στη τοξικότητα των συγκεκριμένων ιόντων. Ως επί το πλείστον οι κοσμοτροπικές ενώσεις έχουν μοριακό βάρος $42 < \text{Mr} < 182$, ενώ οι χαοτροπικές $\text{Mr} > 182$. Οι ιοντικές ενώσεις

όπως το MgCl_2 , προσδίδουν ηλεκτρολυτικά διαλύματα και έχουν χαοτροπικό χαρακτήρα αλληλεπιδρώντας με τα μακρομόρια (Hallsworth et al. 2007).



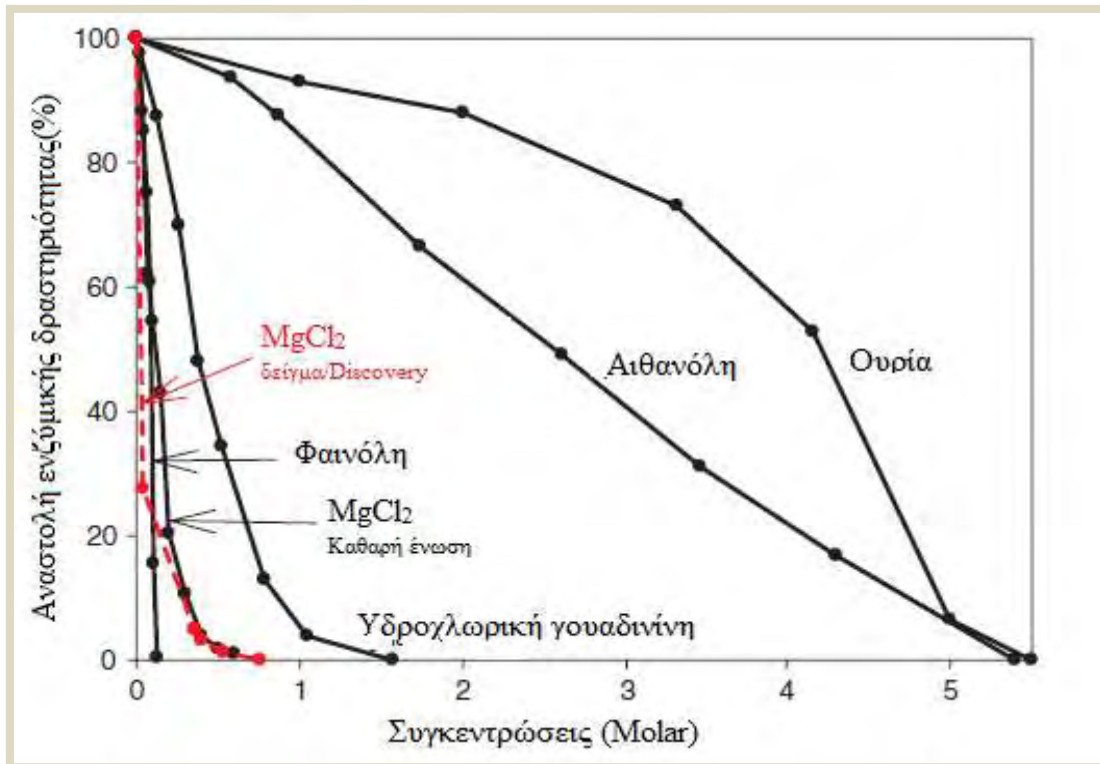
Σχήμα 6. Ο βαθμός δραστηριότητας των ιόντων της κλίμακας Hofmeister (Washabaugh & Collins, 1986)

Η κοσμοτροπία μπορεί να αντισταθμίσει τις στρεσογόνες επιδράσεις της χαοτροπίας, με αποτέλεσμα να μειωθεί η μικροβιακή καταπόνηση κάτω από χαμηλές θερμοκρασίες (Hallsworth, 1998; Hallsworth et al. 2007). Οι ελάχιστες τιμές a_w που επιτυγχάνεται μικροβιακή ανάπτυξη και δραστηριότητα είναι 0,61 (Pitt, 1975; Brown, 1990). Είναι προφανής η εξαιρετική χαοτροπική φύση του MgCl_2 έναντι της αιθανόλης και της ουρίας και είναι προτιμότερη η χρήση της για πειραματικές απόπειρες σε σχέση με τη φαινόλη και την υδροχλωρική γουαδινίνη. Το γεγονός αυτό οφείλεται και στην εξαιρετική δυαλυτότητα του MgCl_2 στο νερό, δημιουργώντας υψηλότερες χαοτροπικές συνθήκες από τις δύο τελευταίες ενώσεις, με συγκεντρώσεις 5M να ασκούν

χαοτροπικές επιδράσεις σε τιμές 212 kJ/g, δύο φορές περισσότερο από αυτές τις φαινόλης.

Μελέτες πραγματοποιούνται την ανασταλτική επίδραση του $MgCl_2$ σε ενδεικτικά ένζυμα όπως η γλυκόζη-6-φωσφορική αφυδρογενάση (G6PD). Το ένζυμο G6PD εξετάστηκε από το είδος *Leuconostoc mesenteroides*, είδος Bacteria που συναντάται σε οικοσυστήματα με υψηλές τιμές αλατότητας και χαμηλές τιμές θερμοκρασίας σε μεγάλα βάθη. Η αναστολή της δραστηριότητας της G6PD πραγματοποιείται σε συγκεντρώσεις 0,2M $MgCl_2$ και 0,4M $MgCl_2$ με ποσοστά 80% και 95% αντίστοιχα (Σχ.7). Οι διεξαγωγή των αποτελεσμάτων δείχνει ότι είτε η ζωή δεν υφίσταται στην λεκάνη της Discovery, είτε οι μικροοργανισμοί σε βάθος χρόνου απέκτησαν προσαρμογές που εξουδετερώνουν το χαοτροπικό στρές του $MgCl_2$, όπως είχε ειπωθεί από προηγούμενες μελέτες για τα ακραία ενδιαιτήματα (Ferrer et al., 2003). Σύμφωνα με δείγματα που πάρθηκαν από την λεκάνη της Discovery, στα 2/3 της υπεράλμυρης μάζας διακρίνεται ενεργότητα νερού με τιμές 0,61 και το υπόλοιπο τμήμα με τιμές στο 0,4.

Οι διαλυμένες στο νερό ενώσεις που δημιουργούν χαοτροπικές συνθήκες και αναστέλλουν την μικροβιακή ανάπτυξη αναπαρίστανται σε μία σειρά μικροοργανισμών (Πιν.7). Στη περίπτωση της αιθανόλης το είδος *Saccharomyces cerevisiae* ένα από τα πιο ανθεκτικά μικρόβια, με τιμές αιθανόλης στο 3,3M να εμφανίζεται μείωση της δραστηριότητας των γλυκολιτικών ενζύμων κατά 50% (Millar et al., 1982). Η γλυκερόλη ως χαοτροπική ένωση μειώνει με τη σειρά της την ενζυματική δραστηριότητα σε τιμές 5,8M (Daffonchio et al., 2006). Οι επιπτώσεις του $MgCl_2$ στο είδος *Halorubrum sodomense* με συγκεντρώσεις 2,5M, προσδίδουν χαοτροπική επίδραση στη τιμή των 87,3 KJ/g και ενεργότητα του νερού στη τιμή 0,759.



Σχήμα 7. Η αναστολή του ενζύμου G6PD από μια σειρά χαοτροπικών ενώσεων (Hallsworth et al. 2007)

Τα επίπεδα αυτά καταγράφονται με προσθήκη 0,5M NaCl. Τιμές χαοτροπικής επίδρασης κυμαίνονται από 12,4 kJ/g έως 87,3 kJ/g με ανώτατο όριο μικροβιακής ανάπτυξης τα 2,5M MgCl₂. Οι χαοτροπικές επιδράσεις και η διαθεσιμότητα του νερού είναι δύο από τις διογκούμενες επιπτώσεις του MgCl₂ σε συγκεντρώσεις μεταξύ 2,2M έως 2,5M. Ωστόσο το σύμπλεγμα MgCl₂/ NaCl μειώνει την χαοτροπία και μειώνει τις χαοτροπικές επιδράσεις μιας και αντισταθμίζονται από κοσμοτροπικές ενώσεις (Oren, 1983).

Πίνακας 7. Όρια μικροβιακής δραστηριότητας από τη σκοπιά της χαοτροπίας για μια σειρά χαοτροπικών ενώσεων. ³ (Pitt & Hocking, 1977); ⁵ (Oren, 1983) ² (Randall et al.,1996); ¹ (Hallsworth, 1998); ⁴ (El-Sayed et al., 2003); ⁶ (Hallsworth et al. 2007)					
Χημικές ενώσεις	Είδη μικροοργανισμών	Χαοτροπικές συγκεντρώσεις (M)	Μοριακό Βάρος (Mr)	Ενεργότητα νερού (a_w)	Χαοτροπική επίδραση (KJ/g)
Αιθανόλη	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ¹	4,3	46,07	0,896	25,3
Ουρία	<i>Escherichia coli</i> ²	1,0	60,06	0,973	14,5
Γλυκερόλη	<i>Eurotium chevalieri</i> ³	5,8	92,09	0,732	12,4
Φαινόλη	<i>Burkholderia cepacia</i> ⁴ & <i>Pseudomonas putida</i> ⁴	0,32	94,11	0,979	45,5
MgCl ₂	<i>Halorubrum sodomense</i> ⁵	2,5	95,23	0,759	87,3
Γουαδινίνη (HCL)	<i>Aspergillus wentii</i> ⁶	0,93	95,53	0,975	26,5

Προκειμένου να μελετηθεί η χαοτροπία και η κοσμοτροπία διεξοδικά, πραγματοποιήθηκαν έντεκα απομονώσεις από την λεκάνη της Discovery και εννιά από

άλλα Υ.Θ.Ο που κυριαρχεί το NaCl. Στόχος να προσδιοριστεί η ικανότητας ανάπτυξης σε θρεπτικό μέσο πλούσια σε αμινοξέα, πεπτόνη και άμυλο (CPS) με διάφορες συγκεντρώσεις MgCl₂ και NaCl. Οι μέσες μέγιστες συγκεντρώσεις αλάτων που καταγράφηκε μικροοργανισμική ανάπτυξη, ήταν με τιμές 0,42M MgCl₂ και 2,76M NaCl. Καμία από τις απομονώσεις δεν παρουσίασε ανάπτυξη με τιμές >1,05M MgCl₂, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι στις ιζηματογενείς εναποθέσεις της λεκάνης Discovery (>5M MgCl₂), οι μικροοργανισμοί είναι αδρανείς μέσω προσαρμογών όπως αυτές των σπορίων που εμφανίζονται κυρίως στα είδη του γένους *Bacillus*. Εν τέλη ύστερα από εμβολιασμούς θρεπτικών μέσων με προσθήκη ενός μεγάλου εύρους συγκεντρώσεων MgCl₂, κάτω από αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, με την επώαση στους 15°C σε διάστημα 18 μηνών, συνάχθηκε το συμπέρασμα ότι η μικροβιακή ανάπτυξη αντιστοιχεί σε συγκεντρώσεις 1,26M MgCl₂ με τιμές a_w στο 0,916. Τιμές a_w αφενός μεν είναι πάνω από το κατώτατο όριο ανάπτυξης, αφετέρου δε λόγω των χαοτροπικών επιδράσεων 26,1 kJ/g, προκλήθηκε η πλήρης αναστολή των ενζύμων εξαιτίας της αποδόμησης και αποσταθεροποίησης της δομής των πρωτεϊνών. Αξιοσημείωτο είναι ότι σε συγκεντρώσεις 3,7M MgCl₂ που αντιστοιχούν σε τιμές a_w=0,61, παρατηρείται ανάπτυξη των αποκλειστικά ξερόφιλων μικροοργανισμών, με τιμές χαοτροπικών επιπτώσεων 193 kJ/g. Τα συγκεκριμένα επίπεδα χαοτροπίας δεν έχει αποδειχτεί έως τώρα αν τα έχει ξεπεράσει μικροοργανισμός, κάτω από όλο το εύρος των συγκεντρώσεων των χαοτροπικών ενώσεων.

Σύμφωνα με γενετικές μελέτες με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) εξετάστηκαν γενετικοί δείκτες όπως το *mcrA* που εκφράζει την άλφα υπομονάδα του μεθυλοενζύμου M αναγωγάση και ο δείκτης *dsrAB* που κωδικοποιεί με τη σειρά του τις άλφα και βήτα υπομονάδες της θειώδους αναγωγάσης,

για την μεθανογένεση και θεϊκή αναγωγή αντίστοιχα, όπως επίσης φυλογενετικοί δείκτες όπως το γονίδιο 16S rRna. Το γονίδιο 16S rRna μπορεί να εξηγήσει με τη σειρά του αν οι μικροοργανισμοί του αλοκλινούς είναι μεταβολικά ενεργοί ή όχι. Οι αλληλουχίες των γονιδίων 16S rRna, επαλήθευσαν την ύπαρξη μεθανογενών αρχαίων και θειοαναγωγικών προκαρυωτών κατά μήκος της στήλης του αλοκλινούς (>5M MgCl₂). Σε αντίθεση με την ανίχνευση των αλληλουχιών των *mcrA* και *dsrAB* κάτω από τη σκοπιά της PCR και της αντίστροφης μεταγραφής, οι συγκεκριμένες κοινότητες βρέθηκαν μόνο σε συγκεντρώσεις >1,88 M MgCl₂ στη περίπτωση του *dsrAB* mRNA και <2,23M MgCl₂ στη περίπτωση του *mcrA* mRNA. Σε συγκεντρώσεις >2,3M MgCl₂ τα Bacteria είτε είναι νεκρά είτε βιώσιμα αλλά σε καμία των περιπτώσεων μεταβολικά ενεργά. Παρά την ασυμφωνία των γενετικών και φυλογενετικών δεικτών, βρέθηκε κοινό σημείο τομής τους στην ύπαρξη των μεθανοαλόφιλων (*Methanohalophilus*) και των ειδών της οικογένειας *Desulfobacteraceae* που κυριαρχούν μεταξύ των τιμών 1,60 M έως 2,23 M MgCl₂. Η ταξινομική διαστρωμάτωση του αλοκλινούς ήταν ακόμα πιο έντονη με την παρουσία της φυλογενετικής ομάδας *Crenarchaeota* στο ανώτερο όριο του αλοκλινούς, Archaea που σε γενική βάση παρατηρούνται σε οικοσυστήματα με μεγάλα βάθη και σχετίζονται με υδροθερμικές αναβλύσεις (Takai & Horikoshi, 1999), πλούσιες σε συγκεντρώσεις σουλφιδίων. Συνεπώς οι μικροοργανισμοί που επιβιώνουν στις ακραίες/χαοτροπικές συνθήκες, μπορούν να οριστούν εκτός από ακραιόφιλοι και ως χαόφιλοι (Hallsworth et al., 2007). Οι λεκάνες της Discovery και Bannock δημιουργούν χαοτροπικές και κοσμοτροπικές συνθήκες αντίστοιχα. Η Bannock εμφανίζει υψηλή βιοποικιλότητα και αύξηση βιομάζας, παρόλο που οι υπερσυγκεντρώσεις NaCl ασκούν οσμωτικό στρες (Daffonchio et al., 2006). Θρεπτικά άλατα και βιώσιμα ή μη, μικροβιακά κύτταρα συσσωρεύονται στο ανώτερο όριο του

αλοκλινούς, προερχόμενα από το οξικό στρώμα και συγκεντρώσεις μεθανίου και θείου από το κατώτερο όριο, τροφοδοτούν με τη σειρά τους τον κύκλο της ζωής των Υ.Α.Λ. της βαθιάς ζώνης της Α. Μεσογείου (Daffonchio et al., 2006) Συγκεντρώσεις >2,3M MgCl₂.

Στο αλοκλινές της ανοξικής υπεράλμυρης λεκάνης Discovery έχουν καταγραφεί τμηματικές αλληλουχίες της μορφής I (cbbL) και της μορφή II (cbbM) του ενζύμου ριβουλόζης-1,5διφωσφορικής καρβοξυλάσης/οξυγενάσης (RuBisCO) (Van der Wielen, 2006). Οι δύο τύποι ενζύμων βρέθηκαν στην υπεράλμυρη μάζα, ενώ στο υπερκείμενο στρώμα απουσίαζαν. Φυλογενετικές αναλύσεις έδειξαν ότι οι ακολουθίες cbbL σχετίζονται με το είδος *Thiobacillus sp.* και ένα από τα δύο ένζυμα με το είδος *Hydrogenovibrio marinus*. Ο δείκτης ποικιλομορφίας Shannon για το γονίδιο cbbM είναι μεγαλύτερος σε σχέση με αυτόν του γονιδίου cbbL στην υπεράλμυρη μάζα της Discovery (Πιν. 8). Οι ταξινομικές μονάδες (OTUs) και ο δείκτης ποικιλομορφίας Shannon είναι χαμηλός για τη λεκάνη της Discovery και για τους δύο τύπους ενζύμων 'cbbL' και 'cbbM', γεγονός που οφείλεται στις υψηλές συγκεντρώσεις MgCl₂. Σύμφωνα με το δείκτη Morosita σχετικά με την ομοιότητα που παρουσιάζουν ως προς την κατανομή τα ένζυμα στο αλοκλινές και στη ζώνη διεπαφής της Discovery, το ένζυμο cbbL έχει τιμή 0,36 ενώ το ένζυμο cbbM τη τιμή 0,95. Αυτό σημαίνει το ένζυμο cbbM κυριαρχεί στο αλοκλινές και στη ζώνη διεπαφής ενώ διαφορετική είναι η κατανομή για το ένζυμο cbbL. Συνεπάγεται ότι οι ταξινομικές μονάδες OTUs των βακτηρίων που φιλοξενούν το ένζυμο cbbM, είναι ίδιες κατά προσέγγιση για το αλοκλινές και τη ζώνη διεπαφής ενώ το αντίθετο για αυτά με το ένζυμο cbbL.

Πίνακας 8. Ο αριθμός ακολουθιών, οι ταξινομικές μονάδες (OTUs) και ο δείκτης ποικιλομορφίας 'Shannon' για τους δύο τύπους ενζύμων 'cbbL' και 'cbbM' στην λεκάνη της Discovery (Van der Wielen, 2006)		
Βιβλιοθήκες του κλώνου	Υπεράλμυρη μάζα δισθενή ιόντων Mg ⁺⁺	Ζώνη διεπαφής
<i>cbbL</i>		
Αλληλουχίες	50	50
OTUs	4	3
Δείκτης Shannon	0,595	0,871
Βιβλιοθήκες του κλώνου		
<i>cbbM</i>		
Αλληλουχίες	50	50
OTUs	5	3
Δείκτης Shannon	1,209	0,702

Η συνεισφορά του ενζύμου RuBisCO είναι πολυσήμαντη στην στερέωση του CO₂, το οποίο καταλύει την καρβοξυλίωση ή την οξυγενόλυση της ριβουλόζης 1,5-διφωσφορικής. Οι συγκεντρώσεις σουλφιδίων και μεθανίου στη λεκάνη της Discovery, ευνοούν την παρουσία μεθανιοαναγωγικών θειοαναγωγικών βακτηρίων, στα οποία διακρίνονται τα ένζυμα RuBisCO. Η αύξηση της θειικής αναγωγής και μεθανιογένεσης στην λεκάνη της Discovery σχετίζεται με συγκεντρώσεις μεθανίου και θείου, 20.000 και 200.000 φορές υψηλότερες από αυτές του τυπικού θαλασσινού νερού αντίστοιχα (Van der Wielen et al., 2005). Μελέτες αποδεικνύουν μια μεγάλη ποικιλία βακτηριακών αλληλουχιών του γονιδιώματος 16S rRNA στο αλοκλινές της Discovery και στην ζώνη

διεπαφής με το υπερκείμενο (Van der Wielen et al., 2005). Πολλά αναερόβια και χημειολιθοαυτότροφα Bacteria διαθέτουν τους δύο τύπους ενζύμων, στα οποία διακρίνεται η ικανότητα της σύνθεσης της μορφής cbbM σε ανοξικές συνθήκες (English et al., 1992). Η ύπαρξη των δύο ενζύμων επαληθεύουν τις συναθροίσεις των χημειολιθοαυτότροφων και χημειοαυτότροφων μικροοργανισμών στο αλοκλινές της Discovery. Αλληλουχίες του γονιδιώματος 16S rRNA έδειξαν ότι το 26% των αλληλουχιών στη ζώνη διεπαφής και το 48% των αλληλουχιών της υπεράλμυρης μάζας δισθενή ιόντων Mg^{++} , ανήκουν στα *A-proteobacteria* στα *E-proteobacteria* και στα *G-proteobacteria* (Van der Wielen et al., 2005). Τα γονίδια cbbL σχετίζονται με τα *G-proteobacteria*. Αρκετά από τα χημειοαυτότροφα Bacteria είναι προεραϊκά αναερόβια και μπορούν να οξειδώσουν τα σουλφίδια με νιτρικά ιόντα ως δέκτες ηλεκτρονίων (English et al., 1992; Elsaied & Naganuma, 2001). Οι ανοξικές συνθήκες αποκλείουν την επιβίωση αερόβιων προκαρυωτών που κατέχουν τα συγκεκριμένα ένζυμα μιας και είναι ενεργοί στο οξικό και υποξικό στρώμα (Elsaied & Naganuma, 2001). Οι δυσμενείς συνθήκες περιορίζουν την ποικιλομορφία των cbbL γονιδίων σε σχέση με τα cbbM γονίδια. Η πλειοψηφία των αλληλουχιών του ενζύμου cbbM στη ζώνη διεπαφής και στο αλοκλινές της Discovery, συνδέεται με το ενδοσυμβιωτικό είδος *Thiobacillous sp.* Καμμία από τις αλληλουχίες που ανακτήθηκαν από την Discovery δεν σχετίζεται με τις αλληλουχίες των βάσεων δεδομένων της GenBank.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας συγκεντρώσεις $>2.5M$ $MgCl_2$ εμποδίζουν την επιβίωση των E.N. λόγω της επίδρασης στην οσμωτική πίεση και της αποδιάταξης της δομής των πρωτεϊνών. Ο πληθυσμός των E.N. κατέρρευσε την χρονική στιγμή των 432 ωρών και 5 λεπτών με μηδενικές τιμές. Την χρονική στιγμή των 432 ωρών και 5 λεπτών ο πληθυσμός των E.B. καταγράφηκε 912.321 ± 3.981 κυτ/ml. Ως αλόφιλοι/αλοανεκτικοί μικροοργανισμοί, τα E.B. ανταπεξήλθαν στις υπέρτονες συνθήκες σε σχέση με τα E.N. Στα δείγματα μάρτυρες ο πληθυσμός των E.N. αυξήθηκε ενώ ο πληθυσμός των E.B. μειώθηκε. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην βακτηριοφαγία εκ μέρους των E.N. Η ελάχιστη τιμή του πληθυσμού των E.B. καταγράφηκε τη χρονική στιγμή 268 ωρών και 50 λεπτών με τιμές 487.987 ± 10.128 κυτ/ml. Η σύγκριση των υπέρτονων δειγμάτων σε σχέση με τα δείγματα μάρτυρες έδειξε τον αποκλειστικό περιοριστικό ρόλο των συγκεντρώσεων $>2.5M$ $MgCl_2$ στο πληθυσμό των E.N.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alexander E., Stock E., Breiner H., Behnke J., Bunge J., Yakimov M., Stoeck T., (2009) Microbial eukaryotes in the hypersaline anoxic L'Atalante deep-sea basin. *Environmental Microbiology*, 11:360-381.
- Atkins M.S., Teske A.P., Anderson O.R. (2000) A survey of flagellate diversity at four deep-sea hydrothermal vents in the Eastern Pacific ocean using structural and molecular approaches. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 47, 400-411.
- Ayadi, H., Toumi, N., Abid, O., Medhioub, K., Hammami, M., Sime-Ngando, T., (2002) Qualitative and quantitative study of phyto- and zooplankton communities in the saline ponds of Sfax. *Revue Des sciences de l'Eau*, 15:123–135.
- Azam F., Fenchel T., Field J.G., Gray J.S., Meyer-Reil L.A., Thingstad F. (1983) The ecological role of water – column microbes in the sea. *Marine Ecological Search*, 10:257-263.
- Belliveau J.W., Lanyi J.K, (1978) Calcium transport in *Halobacterium halobium* envelope vesicles. *Biochemistry*, 186: 98-105.
- Brown A.D. (1990) *Microbial Water Stress Physiology: Principles and Perspectives*. Wiley, UK, pp.300.
- Casamayor E.O., Massana R., Benlloch S., Ovreas L., Díez B., Goddard V.J., Gasol J.M., Joint I., Rodríguez-Valera F., Pedrós-Alió C. (2002) Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environmental Microbiology*, 4: 338-348.
- Cho B.C., Azam F., (1990) Major role of bacteria in biogeochemical fluxes in the ocean's interior. *Nature*, 332:441–443.
- Christaki U., Giannakourou A., Van Wambeke F., Gérald Grégori (2001) Nanoflagellate predation on auto- and heterotrophic picoplankton in the oligotrophic Mediterranean Sea. *Journal of plankton research*, 23:1297-1310.
- Collins K.D. (1997) Charge density-dependent strength of hydration and biological structure. *Biophysics Journal*, 72: 65–76.
- Daffonchio D., Borin S., Brusa T., Brusetti L., Van der Wielen P.W., Bolhuis H. (2006) Stratified prokaryote network in the oxic-anoxic transition of a deep sea halocline. *Nature*, 440: 203–207.
- Edgcomb V.P., Orsi W., Leslin C., Epstein S.S., Bunge, J., Jeon S., (2009) Protistan community patterns within the brine and halocline of deep hypersaline anoxic basins (DHABs) in the Eastern Mediterranean Sea. *Extremophiles*, 13:151–167.
- Edgcomb V., Bernhard M.J. (2013) Heterotrophic protists in Hypersaline Microbial Mats and Deep Hypersaline Basin Water Columns. *Extremophiles and Extreme Environments*, 3:346-362.
- Elloumi J., Carrias F., Ayadi H., Sime-Ngando T., Boukhris M., Bouain A. (2006) Composition and distribution of planktonic ciliates from ponds of different salinity in the solar saltwork of Sfax. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 67: 21–29.

- Elsaied H., Naganuma T. (2001) Phylogenetic diversity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase largesubunit genes from deep-sea microorganisms. *Applied Environmental Microbiology*, 67: 1751–1765.
- El-Sayed W.S., Ibrahim M.K., Abu-Shady M., El-Beih F., Ohmura N., Saiki H., Ando A. (2003) Isolation and characterization of phenol-catabolizing bacteria from a coking plant. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 67: 2026–2029.
- English R.S., Williams C.A., Lorbach S.C., Shively J.M. (1992) Two forms of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Thiobacillus denitrificans*. *FEMS Microbiology Letters*, 94: 111–120.
- Ferrer M., Chernikova T.N., Yakimov M.M., Golyshin P.N., Timmis K.N. (2003) Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. *Nature Biotechnology*, 2: 1266–1267.
- Filker S., Stock A., Breiner H., Edgcomb V., Orsi W., Yakimov M., Stoeck A., (2013) Environmental selection of protistan plankton communities in hypersaline anoxic deep-sea basins Eastern Mediterranean Sea. *Microbiology Open*, 2: 54–63
- Finlay B.J. (1990), Physiological ecology of free-living protozoa. *Advances in Microbial Ecology*, 11:1–34.
- Fuhrman J.A., Sleeter T.D., Carlson C.A., Proctor L.M. (1989) Dominance of bacterial biomass in the Sargasso Sea and its ecological implications. *Marine Ecology Progress Series*, 57:207–218.
- Gilmour D. (1990), Halotolerant and halophilic microorganisms, In: Edwards (eds) *Microbiology of extreme environments*. McGraw-Hill, New York, pp:147-177.
- Glibert P.M. (1982) Regional studies of daily, seasonal and size fraction variability in ammonium remineralization. *Marine Biology*, 70:209-222.
- Grant W.D. (1990) General view of halophiles, In: Superbugs (eds) *Microorganisms in Extreme Environments*. Springer, Tokyo, pp:15–37.
- Guillou L., Chretiennot-Dinet M-J, Boul-ben S., Moon-Van Der Staay S.Y., Vaultot D., (1990) *Symbiomonas scintillans* gen. et sp. Nov. and Picophagus flagellates gen. et sp. Nov. (Heterokonta): Two new heterotrophic flagellates of picoplanktonic size. *Protist*, 150:383-398.
- Gunde-Cimerman N., Oren A., Plemenitas A. (2005) *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria and Eukarya*. Springer. The Netherlands, pp.540.
- Hallsworth J.E. (1998) Ethanol-induced water stress in yeast. *Journal of Fermentation Bioengineering*. 85:125–137
- Hallsworth J.E., Heim S., Timmis K.N. (2003a) Chaotropic solutes cause water stress in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, 5:1270–1280.
- Hallsworth J.E, Yakimov M., Golyshin N., Gillion J.L., D’Auria G., De Lima Alves F., La Cono V., Genovese M., McKew B.A., Hayes S., Harris G., Giuliano L., Timmis K., McGenity T. (2007) Limits of life in MgCl₂-containing environments: chaotropicity defines the window. *Environmental Microbiology*, 9:801–813.
- Hauer G., Rogerson A. (2005) Heterotrophic protozoa from hypersaline environments, In: Gunde-Cimerman (eds) *In Adaptation to Life at High Salt*

- Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya. Springer. the Netherlands, pp: 540.
- Hsü K.J., Montadert L., Bernoulli D., Cita M.B., Erickson A., Garrison, R.E. (1977) History of the Mediterranean salinity crisis. *Nature*, 267:399–403.
 - Javor B. (1989) *Hypersaline Environments: Microbiology and Biogeochemistry*. Springer. Berlin, 328 pp.
 - Joint I., Henriksen P., Garde K., Riemann B. (2002) Primary production, nutrient assimilation and microzooplankton grazing along a hypersaline gradient. *FEMS Microbiology Ecology*, 39:245-257.
 - Kirchman D.L. (2008), *Microbial Ecology of the oceans*. Wiley. New York, pp:620
 - Mann M., Lall U., Saltzman B. (1995) Decadal - to centennial - scale climate variability: insights into the rise and fall of the Great Salt Lake. *Geophysic Research Letters*, 22: 937–940.
 - Matz C., Deines P., Boenigk J., Arndt H., Eberl K., Kjelleberg S., Jurgens K., (2004a) Impact of violacein-producing bacteria on survival and feeding of bacterivorous nanoflagellates. *Applied Environmental Microbiology*, 70:1593-1599.
 - Matz C., Bergfeld T., Rice S.A., Kjelleberg S., (2004b) Microcolonies, quorum sensing and cytotoxicity determine the survival of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to protozoan grazing. *Environmental Microbiology*, 6:218-226.
 - Matz C., Jurgens K., (2005) High motility reduces grazing mortality of planktonic bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 71:921-929.
 - Marion G.M., Fritsen C.H., Eicken H., Payne M.C (2003) The search for life on Europa: limiting environmental factors, potential habitats and earth analogues. *Astrobiology*, 3:785-811.
 - Millar D.G., Griffiths-Smith K., Algar E., Scopes R.K. (1982) Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. *Biotechnology Letters*, 4:601–606.
 - Morel A., Ahn Y.H. (1990). Optical efficiency factors of free-living marine bacteria influence of bacterioplankton upon the optical properties and particulate organic carbon in oceanic waters. *Journal Marine Research*, 48: 145–176.
 - Mullakhanbhai M.F., Larsen H. (1975), *Halobacterium volcanii* spec. nov., a Dead Sea halobacterium with a moderate salt requirement. *Archives of Microbiology*, 104: 207–214.
 - Oren A. (1983) *Halobacterium sodomense* sp. nov., a Dead Sea Halobacterium with an extremely high magnesium requirement. *Systematic Bacteriology*, 33: 381–386.
 - Oren A., Weisburg W.G., Kessel M., Woese C.R. (1984), *Halobacteroides halobius* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic anaerobic bacterium from the bottom sediments of the Dead Sea. *Systematic Applied Microbiology*, 5: 58–70.
 - Oren A. (2000) Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 28:56–63.

- Park J.S., Kim H.J., Choi D.H., Cho B.C. (2003) Active flagellates grazing on prokaryotes in high salinity waters of a solar saltern. *Aquatic Microbial Ecology*, 33:173–179.
- Park J.S., Simpson A.G., Lee W.J., Cho B.C. (2007) Ultrastructure and phylogenetic placement within Heterolobosea of the previously unclassified, extremely halophilic heterotrophic flagellate *Pleurostomum flabellatum*. *Journal of Protist*, 158: 397–413.
- Patterson D.J., Simpson A.G. (1996) Heterotrophic flagellates from coastal marine and hypersaline sediments in Western Australia. *European Journal of Protistology*, 32:423–448.
- Pedros-Alio C., Calderon-Paz J.I., MacLean M.H., Medina G., Marrase C., Gasol J.M., Guixa-Boixereu N. (2000) The microbial food web along salinity gradients. *FEMS Microbiology Ecology*, 32: 143–155.
- Pitt J.I. (1975) Xerophilic fungi and the spoilage of foods of plant origin, In: Duckworth R.B. (eds.) *Water Relations of Foods*. Academic Press. London, pp. 308.
- Pitt J.I., Hocking A.D. (1977) Influence of solute and hydrogen ion concentration on the water relations of some xerophilic fungi. *Journal of General Microbiology*, 101: 35–40.
- Post F.J., Borowitzka L.J., Borowitzka M.A., Mackay B., Moulton T. (1983) The protozoa of a Western Australian hypersaline lagoon. *Hydrobiology*, 105:95–113.
- Randall K., Lever M., Peddie B.A., Chambers S.T. (1996) Natural and synthetic betaines counter the effects of high NaCl and urea concentrations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1291: 189–194.
- Rothschild L.J., Mancinelli R.L. (2001) Life in extreme environments, *Nature* 409: 1092–1101.
- Sanders R.W., Wickham S.A. (1993) Planktonic protozoa and metazoan: predation, food quality and population control. *Marine Microbial Food Webs*, 7:197–223.
- Takai K., Horikoshi K. (1999) Genetic diversity of Archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics*, 152:1285–1297.
- Van der Wielen P.W., Bolhuis H., Borin S., Daffonchio D., Corselli C., Giuliano L. (2005), The enigma of prokaryotic life in deep hypersaline anoxic basins. *Science*, 307: 121–123.
- Van der wielen P.W. (2006) Diversity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit genes in the MgCl₂-dominated deep hypersaline anoxic basin discovery. *Federation of European Microbiological Societies*, 259:326–331.
- Vaniman D.T., Bish D.L., Chipera S.J., Fialips C.I, Carey J.W., Feldman W.C. (2004) Magnesium sulphate salts and the history of water on Mars. *Nature*, 431:663–665.
- Yakimov M., La Cono M., Denaro G., D’Auria F., Decembrini N., Timmis N. (2007). Primary producing prokaryotic communities of brine, interface and seawater above the halocline of deep anoxic lake L’Atalante, Eastern Mediterranean Sea. *International Society for Microbial Ecology*, 1:743–755.

- Washabaugh M.W., Collins, K.D. (1986) The systematic characterization by aqueous column chromatography of solutes which affect protein structure. *Journal of Biological Chemistry*, 261: 12477–12485.
- Wetzel R.G. (2001) *Limnology: Lake and river ecosystems*. Academic press, Amsterdam, pp: 123-290.
- Wildshutte H., Wolfe D.M., Tamewitz A., Lawrence J.G. (2004) Protozoan predation, diversifying selection, and the evolution of antigenic diversity in *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 10644-10649.

The effect of high magnesium concentration of magnesium chloride on the growth of Marine heterotrophic nanoflagellates

Deep-sea hypersaline anoxic basins (DHABs) of the eastern Mediterranean represent some of the most hostile environments on our planet. Brines of DHABs are nearly saturated with salt, leading many to suspect they are uninhabitable for eukaryotes. Many evaporate deposits and brines are rich in other salts, including MgCl_2 . Magnesium chloride is exceptionally soluble in water. However, while NaCl dominated hypersaline environments are habitats for a rich variety of salt-adapted microbes, there are contradictory indications of life in MgCl_2 -rich environments. Discovery anoxic basin is highly enriched in MgCl_2 (55mM-5.05M) and it is a remarkable uninhabitable extreme environment. In this work, we have sought to obtain new insights into how MgCl_2 (>2.5M) affects the populations of heterotrophic nanoflagellates (H.N.). Here, we report findings regarding the abundance of H.N. and bacteria and compare these to communities from hypersaline waters (>2.5M MgCl_2) against waters of typical salinity. We document here the exceptional toxicity of MgCl_2 . *In vitro*, the growth of H.N. was totally restricted by MgCl_2 , at concentrations above 2.5M. During the filtration process, DAPI staining reveals the presence of prokaryotic and H.N. cells. Microscopic cell counts suggested that high concentrations of MgCl_2 (>2.5M) kill H.N. populations against the time. On the other hand, the results suggest that prokaryotes' life is possible under these extreme conditions. At typical salinity samples the abundance of H.N. populations were increased due to the grazing effects on bacterial populations.

Key words: MgCl_2 , Heterotrophic Nanoflagellates, Heterotrophic Bacteria.