

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

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**« Φυλογεωγραφική ανάλυση γονιδίων συνθάσης γεωσμίνης στο
υδάτινο περιβάλλον »**

Ηλιάδου Χριστίνα-Ολυμπία

ΒΟΛΟΣ 2019

**« Φυλογεωγραφική ανάλυση γονιδίων συνθάσης γεωσμίνης στο υδάτινο
περιβάλλον »**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Κωνσταντίνος Κορμάς, Καθηγητής, Μικροβιακή οικολογία υδάτινου περιβάλλοντος, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπων*.

Ελισάβετ Βαρδάκα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Βιολογία υδρόβιων μικροοργανισμών με έμφαση στα τοξικά φωτοσυνθετικά βακτήρια, Τμήμα Διατροφής και Διαιτολογίας, Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης, Διεθνές Πανεπιστήμιο της Ελλάδος, *Μέλος*.

Γεώργιος Γκάφας, Επίκουρος Καθηγητής, Μοριακή Βιολογία της Διατήρησης Θαλάσσιων Θηλαστικών και Ιχθυοαποθεμάτων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. Κ. Κορμά, για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του,

τόσο κατά τη διεξαγωγή της έρευνας όσο και κατά την συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου,

αποτελούμενη από τους Ε. Βαρδάκα και Γ. Γκάφα για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγηση τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία μελετά τη φυλογεωγραφική ανάλυση των γονιδίων της συνθάσης της γεωσμίνης τα οποία απαντώνται σε ποικίλα βακτήρια με κυριότερα τα κυανοβακτήρια, ακτινοβακτήρια και πρωτεοβακτήρια. Αρχικά διερευνάται η έννοια της γεωσμίνης, ο τρόπος έκφρασης των γονιδίων από τους διάφορους μικροοργανισμούς, η χημική δομή και βιοσύνθεση της, ο τρόπος με τον οποίον προσδιορίζεται και οι επιπτώσεις που έχει στα οικοσυστήματα και κατ' επέκταση στον άνθρωπο. Με τη βοήθεια της ιστοσελίδας Genbank συλλέχθηκαν 1777 γενετικές αλληλουχίες του γονιδίου *geoA*, από τις οποίες μελετήθηκαν οι 560 που αντιστοιχούσαν σε οργανισμούς που απαντώνται σε υδάτινα οικοσυστήματα και συγκρίθηκαν, με τη βοήθεια της ιστοσελίδας ClustalW, αντίστοιχα όλες οι αλληλουχίες μεταξύ τους με σκοπό την ομαδοποίηση τους. Με ποσοστό ομοιότητας μεγαλύτερο του 97% καταλήξαμε σε 116 τελικές ομάδες. Τέλος διαχωρίστηκαν ανάλογα με τα είδη και το ενδιαίτημα που βρέθηκαν. Όσων αφορά τα είδη στα οποία βρέθηκε το γονίδιο *geoA* από τις 560 συνολικά αλληλουχίες που μελετήθηκαν βρέθηκε ότι 10 ανήκουν σε πρωτεοβακτήρια, 70 σε ακτινοβακτήρια, 62 ανήκουν σε κυανοβακτήρια και 418 σε οργανισμούς για τους οποίους δεν έχουμε επαρκείς πληροφορίες για την συστηματική τους ταξινόμηση. Όσων αφορά το ενδιαίτημα στο οποίο εμφανίζονται, 74 βρέθηκαν σε περιοχές με γλυκό νερό, 43 σε περιοχές αλμυρού νερού, 417 σε τεχνητά οικοσυστήματα και υπήρξαν και 26 αλληλουχίες για τις οποίες δεν βρέθηκε αναφορά ενδιαιτήματος. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι οι οργανισμοί που φέρουν τα γονίδια γεωσμίνης χαρακτηρίζονται από ποικιλομορφία ειδών και απαιτείται συνεχής έρευνα για την κατανόηση των μηχανισμών έκφρασης τους στα διάφορα οικοσυστήματα, καθώς και ότι απαντώνται σε διάφορα

ενδιατήματα με την πλειονότητα των ειδών να έχει βρεθεί σε περιοχές γλυκού νερού και κατά κύριο λόγο στην Κίνα και την Αμερική.

Λέξεις κλειδιά: γεωσμίνη, φυλογεωγραφική ανάλυση, *geoA*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Ημιπτητικές Ενώσεις (semi-volatile organic compounds, SVOCs).....	2
1.2 Χημική δομή γεωσμίνης.....	3
1.3 Βιολογικός ρόλος γεωσμίνης	4
1.4 Προσδιορισμός γεωσμίνης.....	5
1.5 Μικροοργανισμοί παραγωγής γεωσμίνης	7
1.6 Επιπτώσεις γεωσμίνης στην υγεία	11
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	13
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	15
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	39
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	46
Ξένη βιβλιογραφία	46
Ελληνική βιβλιογραφία.....	50
ABSTRACT.....	52
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	1

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η γεωσμίνη αποτελεί μια οργανική ένωση η σύνθεση της οποίας οφείλεται σε μικροοργανισμούς και είναι χαρακτηριστική για την γήινη οσμή που προκαλεί στο νερό. (Juttner and Watson 2007) Το όνομα γεωσμίνη προέρχεται από τις λέξεις “γή” και “οσμή” δηλαδή μυρωδιά και μεταφράζεται ως ‘γήινη μυρωδιά’ από την προέλευσή της εδώ και 100 χρόνια τώρα.

Η παραγωγή της οφείλεται σε βακτήρια, με κύριους μικροοργανισμούς σύνθεσης τα ακτινοβακτήρια, κυανοβακτήρια και πρωτεοβακτήρια (Juttner and Watson 2007, Watson 2003) Η ουσία αυτή έχει ανιχνευθεί σε φυσικά ύδατα, στο πόσιμο νερό, στον αέρα εσωτερικών χώρων, στους ιστούς των ψαριών και στα τρόφιμα. Ο προσδιορισμός της γίνεται με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (GC/MS) και τεχνικές εκχύλισης. (Saito et al. 2008)

Πιο συγκεκριμένα η γεωσμίνη είναι μια τριτοταγής αλκοόλη ανθεκτική στην οξείδωση και συγκαταλέγεται στις ημιπητικές οργανικές ενώσεις. Χημικώς γνωστή ως 1,2,7,7-τετραμέθυλ-2-νορβορνεόλη, είναι μια οργανική ένωση με τη χαρακτηριστική οσμή χόματος, η οποία είναι συνήθως παγιδευμένη στα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων και απελευθερώνεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις όταν αυτά πεθαίνουν.(Γλυκιώτη 2015)

Η ανθρώπινη μύτη είναι ευαίσθητη στην οσμή της γεωσμίνης και το όριο συγκέντρωσης της οσμής για αυτή την ένωση που έχει καταγραφεί στο νερό είναι 4ng/l (Nakamura et al. 2005). Η γήινη οσμή που προσδίδεται στη γεωσμίνη υποβαθμίζει την ποιότητα των υδάτων καθώς μειώνεται η εμπιστοσύνη των καταναλωτών (Liu et al. 2017,

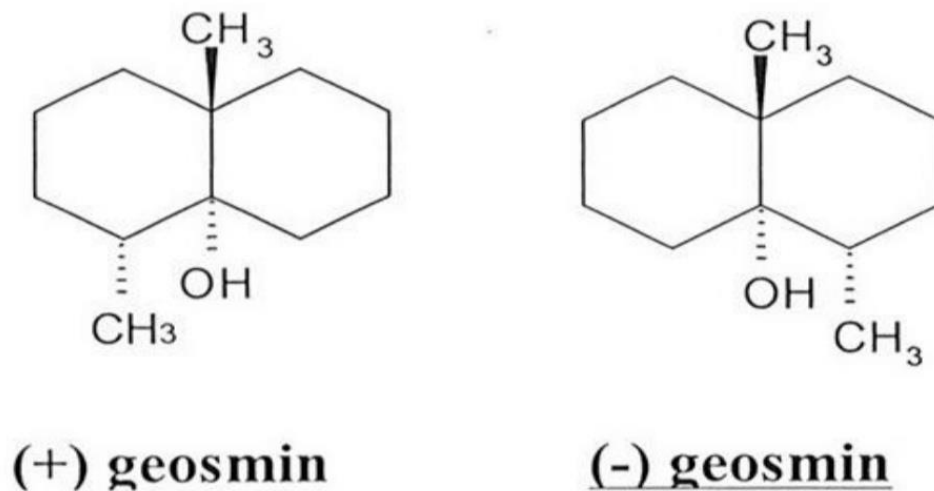
Bristow et al. 2019) Μέχρι στιγμής αν και έχει συζητηθεί η πιθανότητα μεταλλαξιγένεσης και ηπατοτοξικότητας λόγω παρουσίας γεωσμίνης δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για τον κίνδυνο που μπορεί να προκληθεί στην ανθρώπινη υγεία. (Γλυκιώτη 2015)

1.1 Ημιπτητικές Ενώσεις (semi-volatile organic compounds, SVOCs)

Οι ημιπτητικές ενώσεις (semi-volatile organic compounds, SVOCs) συγκαταλέγονται στους εσωτερικούς οργανικούς ρύπους και περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα ρυπαντών, όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs), τα οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα (organochlorinated pesticides, OCPs) και τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (poly-chlorinated bisphenols, PCBs). Χαρακτηρίζονται από μικρή σταθερά Henry (K_h) με εύρος σημείων βρασμού μεταξύ 240/260°C με 380/400°C και προτιμούν την υδατική φάση. Διαφέρουν από τις υπόλοιπες πτητικές ενώσεις (volatile organic compounds, VOCs και very-volatile organic compounds, VVOCs) κυρίως στο εύρος των σημείων βρασμού όπου στις υπόλοιπες κυμαίνονται μεταξύ 50/100°C με 240/260°C (VOCs) και 50/100°C (VVOCs) αντίστοιχα. Συναντώνται στον αέρα, το νερό, το έδαφος, σε ζωντανούς οργανισμούς ακόμα και σε απομακρυσμένες παρθένες περιοχές όπως η Αρκτική. Πολλές από τις ημιπτητικές οργανικές ενώσεις είναι καρκινογόνες, μεταλλαξιογόνες και προκαλούν ενδοκρινείς διαταραχές ακόμα και στα θηλαστικά της κορυφής της τροφικής αλυσίδας. Οι ενώσεις αυτές εισάγονται στο περιβάλλον μέσω της ατμόσφαιρας, για αυτό και συγκαταλέγονται στους αέριους οργανικούς ρύπους, για παράδειγμα από τις εκπομπές της ελλιπούς καύσης του άνθρακα των καυσίμων (PAHs), από τους ρύπους που περιέχονται ήδη σε μετασχηματιστές και πυκνωτές (PCBs) και από ψεκασμούς σε εδάφη και βλαστήσεις (OCPs) (Γλυκιώτη 2015, EPA 2019).

1.2 Χημική δομή γεωσμίνης

Η γεωσμίνη είναι μια πτητική τριτοταγής αλκοόλη χαμηλού μοριακού βάρους.(Bentley and Meganathan 1981, Pirbazari et al. 1992) Χημικώς γνωστή ως 1,2,7,7-τετραμέθυλ-2-νορβορνεόλη με μοριακό τύπο $C_{12}H_{22}O$. Αποτελεί οργανική ένωση με χαρακτηριστική οσμή χόματος, παράγεται από μικροοργανισμούς οι οποίοι την φέρουν στα κυτταρικά τους τοιχώματα και απελευθερώνεται όταν αυτοί πεθαίνουν. Η ένωση αυτή υπάρχει ως θετικό (+) και ως αρνητικό (-) εναντιομερές αλλά η παραγωγή γεωσμίνης οφείλεται στο αρνητικό (-) στερεοϊσομερές το οποίο είναι 10 φορές πιο ισχυρό από το αντίστοιχο θετικό (+). (Juttner and Watson 2007)



Εικόνα 1. Χημική δομή γεωσμίνης (Clercic 2019)

1.3 Βιολογικός ρόλος γεωσμίνης

Τα τερπενοειδή στα οποία ανήκει και η γεωσμίνη είναι δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι επηρεάζουν την “χημική” επικοινωνία μεταξύ των οργανισμών. Οι ενώσεις αυτές τροποποιούν ενεργειακά τις διαδικασίες του οικοσυστήματος και η δραστηριότητά τους εξαρτάται από τον οργανισμό στόχο, το περιβάλλον και τον λειτουργικό ρόλο της κάθε ένωσης. Αν και οι περισσότερες ημιπτητικές ουσίες μπορεί απλά να αντιπροσωπεύουν απόβλητα μεταβολικών υποπροϊόντων των κυτταρικών διεργασιών αποικοδόμησης, μπορούν όμως να χρησιμεύσουν ως σημαντικά χημικά σήματα που προσδίδουν αλλαγές στην ανάπτυξη των φυκών (μεταβολισμό, λειτουργεία, αλληλεπιδράσεις) καθώς και άλλων οργανισμών μεταξύ των οποίων κάποια είδη ιχθύων και στον άνθρωπο (Watson 2003).

Πειράματα έδειξαν ότι η γεωσμίνη συνδέεται με θεμελιώδη ενεργειακά στοιχεία των κυττάρων αλλά οι δεσμοί δεν έχουν ακόμα επιλυθεί. (Utkilen & Froshaug 1992) Αποτελεί συστατικό αρώματος ορισμένων τροφίμων (κρασί, τυρί, μανιτάρια) αλλά παράλληλα και δείκτη αλλοίωσης τροφίμων συσχετιζόμενα με την μούχλα (Karahadia et al 1985, Breheret et al. 1999, Schnurer et al. 1999, Darriet et al. 2000). Έρευνες έχουν δείξει ότι η γεωσμίνη μπορεί να αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για το είδος *Chlorella pyrenoidosa* (Ikawa et al. 2001) καθώς έχει βρεθεί και ότι παρουσιάζει αντιβιοτική δράση (Diongi et al. 1993, Nakajima et al. 1996), αλλά αυτές οι δράσεις προϋποθέτουν την παρουσία μεγάλων συγκεντρώσεων γεωσμίνης. Σε άλλες έρευνες έχουν παρατηρηθεί επιπτώσεις στην ανταγωνιστική χλωρίδα των φυκών καθώς και στην ανάπτυξή τους. Σε καλλιέργειες φυκών του είδους *Selenastrum* παρατηρήθηκε πως η παραγωγή γεωσμίνης επηρεάζει την αύξηση της χλωροφύλλης και δημιουργήθηκε η υπόθεση ότι η γεωσμίνη

δρα ενάντια στην ανταγωνιστική μικροβιακή χλωρίδα του είδους (Sklenar & Horne 1999), όπως επίσης εικάζεται ότι μπορεί να αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για τους σπόρους βλάστησης κάποιων ειδών φυκών. (Ogura et al. 2000) Υπάρχουν υποθέσεις ότι μπορεί να επηρεάζει την επιλογή τροφής κάποιων μικρόσωμων φυτοφάγων ζώων (Demot 1989) ή κάποιων κοπήποδων. (Andrews 1983, Jackson 1987) Είδη ψαριών του γλυκού νερού (τιλάπια, κυπρίνος, πέστροφα) εντοπίζουν την οσμή της γεωσμίνης σε χαμηλές συγκεντρώσεις αλλά δεν έχει παρατηρηθεί κάποια αλλαγή στην συμπεριφορά τους, αντιθέτως έχει βρεθεί ότι η γεωσμίνη σε συνδυασμό με την αλατότητα των θαλάσσιων υδάτων επηρεάζει την συμπεριφορά των ανάδρομων ψαριών. (Tosi & Sola 1993) Τέλος η γεωσμίνη επηρεάζει την ανθρώπινη συμπεριφορά καθώς η οσμή της αποτελεί κριτήριο επιλογής τροφίμων και αποφυγής πόσιμων υδάτων λόγω του ότι είναι απωθητική για αυτόν.

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες γύρω από την δράση, τον βιολογικό ρόλο και την λειτουργία της παραγωγής της γεωσμίνης αλλά απαιτείται περαιτέρω και συνεχής έρευνα για την κατανόηση και την επίλυση των προβλημάτων που μπορεί να προκαλεί στους διάφορους οργανισμούς και κατ' επέκταση στον άνθρωπο.

1.4 Προσδιορισμός γεωσμίνης

Ο προσδιορισμός της γεωσμίνης γίνεται με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (GC/MS) και τη χρήση τεχνικών εκχύλισης. Οι τεχνικές εκχύλισης που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των ουσιών αυτών είναι η μικροεκχύλιση στερεής φάσης (solid phase microextraction-SPME), η εκχύλιση με

προσροφητικό αναδευτήρα (stir bar sorptive extraction-SBSE) και η μικροεκχύλιση υγρής φάσης (liquid phase microextraction-LPME). (Saito et al. 2008)

Οι κλασσικές τεχνικές προετοιμασίας δείγματος έχουν πολλά προβλήματα όπως, την χρήση μεγάλων ποσοτήτων τοξικών διαλυτών που τις καταστούν μη φιλικές προς το περιβάλλον και υψηλό κόστος πραγματοποίησης. Περιλαμβάνουν πολλά βήματα με αποτέλεσμα να είναι χρονοβόρες και κουραστικές και τέλος βασικό μειονέκτημα αποτελεί το ότι υπάρχει απώλεια μεγάλου μέρους της ποσότητας των αναλυτών κατά τη διαδικασία. (Γλυκιώτη 2015)

Ο υπολογισμός της γεωσμίνης στα υδάτινα οικοσυστήματα χρήζει μεγάλης σημασίας καθώς η παρουσία της υποβιβάζει την ποιότητα των υδάτων. Ο άνθρωπος εντοπίζει τις οσμές της γεωσμίνης σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις μειώνοντας έτσι την εμπιστοσύνη του ως καταναλωτή. Για αυτό και η απαίτηση τεχνικών που να εντοπίζουν την γεωσμίνη σε χαμηλές συγκεντρώσεις αλλά και η εύρεση τεχνικών καθαρισμού των υδάτων αποτελεί σημαντική αναλυτική πρόκληση (Bristow et al. 2019)

Μια μέθοδος ανίχνευσης ειδικά για τις χαμηλές συγκεντρώσεις της γεωσμίνης θα πρέπει να είναι ευαίσθητη, επιλεκτική και αξιόπιστη. Ευρέως χρησιμοποιείται ένα στάδιο προεπεξεργασίας που ακολουθείται από αέρια χρωματογραφία και έναν ανιχνευτή ιόντων. Ωστόσο διατίθενται διάφορα βήματα προετοιμασίας όπως: ανάλυση απογύμνωσης κλειστού βρόγχου (closed-loop stripping analysis-CLSA), ρητίνη προσρόφησης (resin adsorption-RA), εκχύλιση υγρών-υγρών (liquid-liquid extraction-LLE), εκχύλιση στερεής φάσης (soil phase extraction-SPE), μικροεκχύλιση στερεής φάσης (solid phase microextraction-SPME), εκχύλιση με προσροφητικό αναδευτήρα (stir bar sorptive extraction-SBSE), μικροεκχύλιση υγρής

φάσης (liquid phase microextraction-LPME), καθαρισμός και παγίδα (purge and trap-P & T), στατική δειγματοληψία (static headspace-SH) και δυναμική δειγματοληψία (dynamic headspace-DH). (Bristow et al. 2019)

Επομένως δημιουργήθηκε η ανάγκη για εύρεση νέων τεχνικών προσδιορισμού, χωρίς διαλύτες και άλατα οι οποίες θα συγκεντρώνουν πλήθος επιθυμητών ιδιοτήτων όπως χαμηλό κόστος, μικρή απαίτηση σε διαλύτες, άμεση ολοκλήρωση της διαδικασίας σε λίγα βήματα και την ικανότητα αυτοματοποίησης. Ορισμένες εναλλακτικές μέθοδοι όπως αντιδράσεις με χρώμιο (bromine reaction), ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (Enzyme-linked Immunosorbent Assay-ELISA), χημειοφωταύγεια (chemiluminescence reaction), βιοηλεκτρονικές μύτες (bioelectronic noses) και ηλεκτρονικές γλώσσες (electronic tongues) παρέχουν δυνατότητες όπως ταχύτερη συλλογή, λιγότερο χρόνο επεξεργασίας και μικρό κόστος εξοπλισμού αλλά εξακολουθεί να υπάρχει έντονη ανάγκη για νέες καινοτόμες αναλυτικές μεθόδους που θα επιτρέπουν την ταχύτερη και απλούστερη ανίχνευση (Bristow et al. 2019)

1.5 Μικροοργανισμοί παραγωγής γεωσμίνης

Η γεωσμίνη προσδιορίστηκε πρώτα σε ακτινοβακτήρια και αργότερα σε κυανοβακτήρια και φύκη. Η παραγωγή γεωσμίνης από αυτούς τους μικροοργανισμούς δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητή αλλά σίγουρα ενισχύεται από διάφορα περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά, όπως η παρουσία θρεπτικών συστατικών, η δυνατότητα διείσδυσης του φωτός στο νερό, οι θερμοκρασίες που επικρατούν στο αντίστοιχο περιβάλλον, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφόρων μικροοργανισμών και η παρουσία φυτοπλαγκτόν (Boomer et al. 1992, Xuwei et al. 2019)

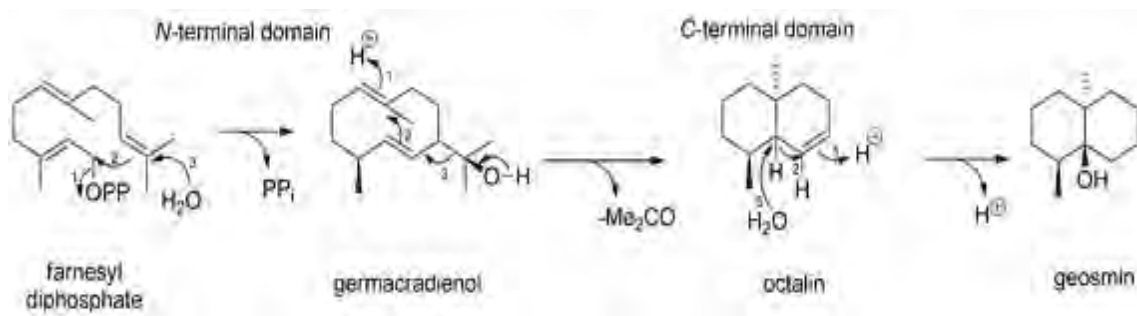
Η κατανόηση των μικροοργανισμών που προκαλούν τις ανεπιθύμητες, για τον άνθρωπο, οσμές στο νερό και των συνθηκών που ευνοούν την ανάπτυξη αυτών συμβάλλει τελικά στην θεμελιώδη κατανόηση της παρουσίας τους στα υδάτινα οικοσυστήματα καθώς και στους παράγοντες που ελέγχουν τις δραστηριότητες τους. Η παραγωγή γεωσμίνης στα υδάτινα οικοσυστήματα έχει αποδοθεί κυρίως σε κυανοβακτήρια και ακτινοβακτήρια, ιδίως του γένους *Streptomyces*, καθώς και σε έναν αριθμό μυκοβακτηρίων (Juttner and Watson 2007).

Η χημική προέλευση της χαρακτηριστικής οσμής χόματος ερευνήθηκε αρχικά από τον Berthelot το 1891 αλλά μέχρι και το 1965 δεν είχε αποδοθεί στην γεωσμίνη. Ακολούθησαν πολλές έρευνες γύρω από την παραγωγή, την ανίχνευση και τους τρόπους αντιμετώπισης της γεωσμίνης αλλά δεν υπήρξαν περαιτέρω αναφορές για τον μηχανισμό βιοσύνθεσης της μέχρι το 2002. (Jiang et al. 2007)

Λόγω της ευρείας προέλευσης της παραγωγής γεωσμίνης η μοριακή ταυτοποίηση γίνεται σχεδόν αποκλειστικά με βάση την συνθάση της γεωσμίνης η οποία είναι ένα διλειειτουργικό ένζυμο που συγκαταλέγεται σε μια μεγάλη οικογένεια τερπενών. Το γονίδιο γεωσμίνης *geoA* το οποίο κωδικοποιεί 730 αμινοξέα παρουσιάζεται καθολικά σε όλους τους γνωστούς μικροοργανισμούς παραγωγής γεωσμίνης. (Jiang et al. 2007)

Η παραγωγή της γεωσμίνης ξεκινάει από την ένωση πυροφοσφορικό φαρνεσύλιο (farnesyl pyrophosphate FPP) ή αλλιώς διφωσφορικό φαρνεσύλιο (farnesyl diphosphate FDP) το οποίο κωδικοποιείται από διαφορετικό γονίδιο σε κάθε μικροοργανισμό. Η συνθάση της γεωσμίνης αποτελεί ένα διλειειτουργικό ένζυμο που διαθέτει δύο ανεξάρτητες ενεργές θέσεις, με ξεχωριστές καταλυτικές λειτουργίες, οι οποίες είναι το N-τερματικό (N-terminal) και C-τερματικό (C-terminal). Στην περιοχή

του N-τερματικού καταλύεται ο ιονισμός και η κυκλοποίηση του διφωσφορικού φαρνεσυλίου (FPP) και πραγματοποιείται ο σχηματισμός των 2 κυκλικών προϊόντων, γεμμακραδιενόλη (germacradienol) και γεμμακρένιο D (germacrene D) σε ποσοστά 85% και 15% αντίστοιχα. Στη συνέχεια η γεμμακραδιενόλη αποσυνδέεται από την περιοχή του N-τερματικού και συνδέεται σε ενεργό θέση του C-τερματικού όπου μέσω κυκλοποίησης, πρωτονίωσης και απομάκρυνσης ακετόνης μετατρέπεται σε γεωσμίνη. (Εικ.2) Και στις δύο περιοχές για να πραγματοποιηθεί η κατάλυση απαιτείται η παρουσία μαγνησίου (Mg^{2+}). (Jiang et al. 2007, Giglio et al. 2008, Harris 2015)



Εικόνα 2. Βιοσύνθεση γεωσμίνης (Ueberbacher 2012)

Ο μηχανισμός βιοσύνθεσης της γεωσμίνης απαιτεί διαρκή μελέτη καθώς οι μικροοργανισμοί χαρακτηρίζονται από ποικιλομορφία στους μηχανισμούς έκφρασης τους. Σύμφωνα με μία έρευνα που έγινε γύρω από τα γονίδια έκφρασης γεωσμίνης στον μικροοργανισμό *Streptomyces coelicolor* αποδείχτηκε ότι η βιοσύνθεση της γεωσμίνης μπορεί να πραγματοποιηθεί και εξ ολοκλήρου στο N-τερματικό άκρο του ενζύμου χωρίς καμία βιοσυνθετική διαδικασία να ακολουθεί στο C-τερματικό άκρο (Gust et al. 2003)

Επίσης σε μελέτη που έγινε στο βακτήριο *Streptomyces avermitilis* παρατηρήθηκε η βιοσύνθεση της γεωσμίνης να εκτελείται εξ ολοκλήρου στο N-τερματικό άκρο του ενζύμου (Cane et al. 2006) Υπάρχουν δηλαδή μικροοργανισμοί που η έκφραση του γονιδίου της γεωσμίνης δεν απαιτεί ολόκληρη τη διαδικασία βιοσύνθεσης που αναφέρθηκε παραπάνω αλλά γίνεται χρήση ενός μέρους της συνθάσης με πλήρη παραγωγή γεωσμίνης (Gust et al. 2003, Cane et al. 2006)

Η γεωσμίνη αποτελεί τριτοταγή αλκοόλη η δομή της οποίας την καθιστά ανθεκτική στην οξείδωση, διαδικασία που εφαρμόζεται συνήθως στον καθαρισμό του νερού. Γύρω από την δομή και την παραγωγή γεωσμίνης έχουν γίνει πολλές μελέτες και έρευνες κατά την διάρκεια πολλών ετών. (Wnporowski et al. 1992)

Βιοχημικές έρευνες γύρω από την παραγωγή γεωσμίνης σε ακτινοβακτήρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η ουσία αυτή συντίθεται με την διαδικασία της μεθυλίωσης της L-μεθειονίνης και του φολικού οξέος (Aoyama 1990).Οι συνθήκες που επηρεάζουν την παραγωγή γεωσμίνης, σε μελέτη που έγινε σε ακτινοβακτήρια, είναι τα υψηλά επίπεδα σε θρεπτικά, η παρουσία φυτικού σωματιδιακού υλικού, η δομή του οικοσυστήματος, η συσσώρευση των ιζημάτων καθώς και οι αερόβιες συνθήκες στα ιζήματα (Wood et al. 1983), καθώς και ότι το άζωτο αποτελεί περιβαλλοντικό παράγοντα που συμβάλλει στην παραγωγή γεωσμίνης (Lind and Katzif 1988). Σε μελέτες που έγιναν στο κυανοβακτήριο *Fischerella muscicola* η παραγωγή γεωσμίνης από αυτούς τους μικροοργανισμούς γίνεται κατά το αρχικό στάδιο (φάση υστέρησης) της αύξησής τους και μειώνεται στη συνέχεια. Παράγεται τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες και η συγκέντρωσή της επηρεάζεται από το εύρος των θερμοκρασιών ξεχωριστά για κάθε είδος, αλλά είναι μέγιστη κατά τους θερινούς μήνες (Juttner 1988).Σε μελέτες που έγιναν στο κυανοβακτήριο *Oscillatoria* γύρω από την επίδραση του φωτός

του αζώτου και του φωσφόρου βρέθηκε ότι αυτοί οι τρεις παράγοντες δεν έχουν άμεση επίδραση στο ποσοστό βιοσύνθεσης του αζώτου και ότι η αύξηση της συγκέντρωσης γεωσμίνης στα ευτροφικά οικοσυστήματα είναι αποτέλεσμα αυξημένης βιομάζας και όχι λόγω παραγωγής γεωσμίνης (Naes et al. 1988).

Συμπερασματικά η παραγωγή γεωσμίνης επηρεάζεται από διάφορους και ποικίλους περιβαλλοντικούς παράγοντες καθώς και από το είδος του κάθε οργανισμού το οποίο έχει διαφορετικό μηχανισμό παραγωγής γεωσμίνης και επηρεάζεται και από διαφορετικούς παράγοντες. Η παραγωγή της γεωσμίνης δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητή λόγω του μεγάλου φάσματος παραγόντων που την επηρεάζουν και συνεχώς διερευνάται ο μηχανισμός γύρω από αυτήν καθώς και άλλες ουσίες που προσδίδουν οσμές στα υδάτινα οικοσυστήματα.

1.6 Επιπτώσεις γεωσμίνης στην υγεία

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η παρουσία ενώσεων όπως η γεωσμίνη, οι οποίες προσδίδουν γεύση και οσμή στο νερό αποτελούν κυρίως αισθητική ανησυχία και δεν συνδέονται με επιπτώσεις στην υγεία (McGuire 1995, Jardine et al. 1999) Μέχρι στιγμής αν και έχει συζητηθεί η πιθανότητα μεταλλαξιγένεσης και ηπατοτοξικότητας λόγω της παρουσίας γεωσμίνης δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία που να την καθιστούν επιβλαβή για την υγεία. (Saito et al. 2008) Σε έρευνα που έγινε σε φύκη με καλλιέργεια τριών ειδών κυανοβακτηρίων (*Anabaena*, *Microcystis*, *Oscillatoria*) παρουσιάστηκαν ποσοστά μεταλλαξιγένεσης τα οποία όμως δεν σχετίζονται με την παραγωγή γεωσμίνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παραγωγή γεωσμίνης ήταν μεγαλύτερη στις καλλιέργειες *Anabaena* και *Oscillatoria* ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό μεταλλαξιγένεσης σχετίστηκε με την καλλιέργεια του είδους *Microcystis* (Huang et al. 2007) Σε έρευνα που έγινε σε

ιριδίζουσες πέστροφες (*Ocorhynchus mykiss*), για τον προσδιορισμό ηπατοτοξικότητας λόγω γεωσμίνης, δεν υπήρξαν σημαντικά αποτελέσματα στα σχετικά επίπεδα του H₂O₂ στα ηπατοκύτταρα γεγονός που υποδηλώνει ότι η γεωσμίνη δεν επηρεάζει τον οξειδωτικό μεταβολισμό των ηπατοκυττάρων. (Gagne F. et al. 1999)

Αν και αποτελεί ημιπτητική ένωση που παράγεται από μικροοργανισμούς, μεταξύ των οποίων πολλά κυανοβακτήρια , δεν έχει συσχετιστεί με την παρουσία τοξινών προερχόμενες από αυτά, οι οποίες μάλιστα είναι εξαιρετικά τοξικές ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, πράγμα που υποδηλώνει ότι οποιαδήποτε επιρροή στην υγεία θα ήταν εύκολα και άμεσα αντιληπτή. (Jardin et al 1999)

Μελέτες επίσης έχουν ανιχνεύσει γεωσμίνη σε διάφορα είδη ιχθύων τα οποία διατίθενται στους καταναλωτές αλλά έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι δεν οδηγούν σε καμία τοξικότητα στους ιχθύες αλλά και στους καταναλωτές. Οι ιχθύες προσλαμβάνουν την γεωσμίνη μέσω των βραγχίων του εντέρου και του δέρματος και αποθηκεύεται στον λιπώδη ιστό τους προσδίδοντάς τους έτσι την χαρακτηριστική οσμή χόματος. (Howgate 2004)

Συμπερασματικά η παρουσία γεωσμίνης σαφώς και υποβαθμίζει την ποιότητα των υδάτων αλλά καθαρά λόγω της αποθητικής οσμής της για τον άνθρωπο, με αποτέλεσμα να μειώνεται η εμπιστοσύνη των καταναλωτών, αλλά όχι για λόγους υγείας. (Wnorowski et al. 1992, Mcuire 1995)

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ιστοσελίδες: GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) και ClustalW (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Η GenBank αποτελεί μια βάση δεδομένων με ανοιχτή πρόσβαση, είναι μέρος του International Nucleotide Sequence Database Collaboration και στην ουσία είναι ένας οργανισμός που συγκεντρώνει πληροφορίες για τις γενετικές αλληλουχίες οι οποίες έχουν δημοσιευθεί. Περιλαμβάνει την βάση δεδομένων DNA της Ιαπωνίας (DNA DataBank of Japan), το Ευρωπαϊκό Μοριακό και Βιολογικό Εργαστήριο (European Molecular Biology Laboratory) και το Εθνικό Κέντρο Βιοτεχνολογίας Η.Π.Α. (National Center of Biotechnology Information) τα οποία αποτελούν οργανισμούς που ανταλλάσσουν δεδομένα καθημερινά.

Το ClustalW αποτελεί ένα πρόγραμμα παγκοσμίως χρησιμοποιούμενο το οποίο αποσκοπεί στην ευθυγράμμιση αλληλουχιών DNA ή πρωτεϊνών. Αποτελεί ένα πρόγραμμα “ μηχανή “ με βάση το οποίο γίνεται ο υπολογισμός της αντιστοιχίας, των ομοιοτήτων και των διαφορών μεταξύ αλληλουχιών. Τέλος παρέχει το πλεονέκτημα εμφάνισης της σχέσης μεταξύ αλληλουχιών με την μορφή γραφημάτων.(Θερμογιάννη 2016)

Οι παραπάνω ιστοσελίδες ήταν απαραίτητες για την ταξινόμηση των αλληλουχιών του γονιδίου *geoA* των μικροοργανισμών και τη σύγκριση της ομοιότητας τους από 97-100 %. Για την εύρεση των συγκεκριμένων αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε αρχικά η GenBank. Το αποτέλεσμα της αναζήτησης “ *geosmin* ” (έως 22/9/17) ήταν

συνολικά 1777 αλληλουχίες γονιδίων γεωσμίνης, από τις οποίες έγινε η επιλογή μελέτης των 560 που αντιστοιχούσαν σε υδάτινο οικοσύστημα. Από κάθε αποτέλεσμα που βρέθηκε καταχωρήθηκε σε αρχείο Excel η ονομασία (LOCUS), η δημοσίευση (JOURNAL), η πηγή απομόνωσης του γονιδίου (ISOLATION_SOURCE), η συστηματική κατάταξη (TAXONOMY) και ο αντίστοιχος κωδικός πρόσβασης στην GenBank (GENBANK NUMBER).

Στη συνέχεια οι αλληλουχίες στοιχήθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα πολλαπλής στοίχισης ClustalW και χρησιμοποιώντας το κριτήριο ομοιότητας, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η διαδοχική αντιστοίχιση των αλληλουχιών ώστε να γίνει η καταγραφή των γονιδίων με ομοιότητα 97-100%, μέχρι που κατέληξαν σε 116 ομάδες

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

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

1. KM013396.1
2. KP013063.1
3. KJ658377.1
4. CP017839.1
5. MKKE01000026.1
6. MKJY01000111.1
7. NZ_CP014485.1
8. LJGX01002014.1
9. CP009313.1
10. CP021080.1
11. NZ_NAVC01000052.1
12. NCTE01000057.1
13. NZ_LMTQ02000021.1
14. NZ_ALNP01000004.1
15. LJGY01001158.1
16. CP018047.1
17. LJGX01002055.1

18. LJGZ01000096.1
19. LJGU01000133.1
20. JPFN01000090.1
21. MRCE01000009.1
22. KM013403.1
23. KM013402.1
24. LWAJ01000248.1
25. KJ658374.1
26. KJ658373.1
27. KJ658367.1
28. LJOT01000061.1
29. KP013066.1
30. EU816422.1
31. HM989961.1
32. GQ365216.1
33. HM209471.1
34. HM209469.1
35. GQ365217.1
36. HM989959.1
37. KF735768.1
38. KP013057.1
39. LC151466.1
40. LC151466.1
41. KF735776.1

42. KF735778.1
43. KF735772.1
44. KF735775.1
45. JQ247065.1
46. GQ365215.1
47. JQ247064.1
48. KF735766.1
49. KF735767.1
50. KX879174.1
51. LYOY01000001.1
52. LWAB01000002.1
53. LOSR01000121.1
54. KQ949087.1
55. JJOB01000003.1
56. CP020570.1
57. JXUQ02000001.1
58. NZ_LZQS01000004.1
59. CP011492.1
60. CP019779.1
61. NZ_JOHN01000015.1
62. KX879227.1
63. KX879193.1
64. KX879194.1
65. KX879195.1

66. KX879199.1
67. KX879205.1
68. KX879142.1
69. KX879173.1
70. KX879177.1
71. KX879191.1
72. NZ_JOAI01000014.1
73. CP021121.1
74. NZ_LZNS01000001.1
75. KX879163.1
76. KX879150.1
77. KX879247.1
78. KX879296.1
79. KX879275.1
80. KX879198.1
81. KX879262.1
82. KX879287.1
83. KX879175.1
84. KX879280.1
85. KX879176.1
86. KX879402.1
87. KX879388.1
88. KX879322.1
89. KX879389.1

90. KX879342.1
91. KX879329.1
92. KX879331.1
93. KX879344.1
94. KX879492.1
95. KX879498.1
96. KX879397.1
97. KX879500.1
98. GQ365214.1
99. KX879506.1
100. KX879526.1
101. KX879537.1
102. KX879539.1
103. KX879521.1
104. KX879524.1
105. KX879530.1
106. KX879505.1
107. KX879535.1
108. KX879520.1
109. KX879540.1
110. KX879546.1
111. KX879545.1
112. KX879544.1
113. KX879534.1

114. KX879522.1

115. KX250361.1

116. KX250360.1

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

1^η ομάδα: 5

2^η ομάδα: 3

3^η ομάδα: 2

4^η ομάδα: 1

5^η ομάδα: 2

6^η ομάδα: 2

7^η ομάδα: 3

8^η ομάδα: 1

9^η ομάδα: 2

10^η ομάδα: 1

11^η ομάδα: 2

12^η ομάδα: 2

13^η ομάδα: 1

14^η ομάδα: 1

15^η ομάδα: 5

16^η ομάδα: 2

17^η ομάδα: 1

18^η ομάδα: 2

19^η ομάδα: 2

20^η ομάδα: 2

21^η ομάδα: 2

22^η ομάδα: 4

23^η ομάδα: 1

24^η ομάδα: 1

25^η ομάδα: 3

26^η ομάδα: 1

27^η ομάδα: 3

28^η ομάδα: 8

29^η ομάδα: 3

30^η ομάδα: 1

31^η ομάδα: 1

32^η ομάδα: 1

33^η ομάδα: 1

34^η ομάδα: 2

35^η ομάδα: 1

36^η ομάδα: 1

37^η ομάδα: 2

38^η ομάδα: 3

39^η ομάδα: 1

40^η ομάδα: 2

41^η ομάδα: 15

42^η ομάδα: 2

43^η ομάδα: 1

44^η ομάδα: 1

45^η ομάδα: 5

46^η ομάδα: 1

47^η ομάδα: 8

48^η ομάδα: 1

49^η ομάδα: 1

50^η ομάδα: 1

51^η ομάδα: 1

52^η ομάδα: 2

53^η ομάδα: 2

54^η ομάδα: 2

55^η ομάδα: 2

56^η ομάδα: 2

57^η ομάδα: 2

58^η ομάδα: 1

59^η ομάδα: 2

60^η ομάδα: 1

61^η ομάδα: 1

62^η ομάδα: 42

63^η ομάδα: 1

64^η ομάδα: 1

65^η ομάδα: 3

- 66^η ομάδα: 1
67^η ομάδα: 28
68^η ομάδα: 16
69^η ομάδα: 1
70^η ομάδα: 1
71^η ομάδα: 20
72^η ομάδα: 1
73^η ομάδα: 2
74^η ομάδα: 1
75^η ομάδα: 33
76^η ομάδα: 90
77^η ομάδα: 23
78^η ομάδα: 1
79^η ομάδα: 55
80^η ομάδα: 1
81^η ομάδα: 1
82^η ομάδα: 1
83^η ομάδα: 2
84^η ομάδα: 1
85^η ομάδα: 1
86^η ομάδα: 4
87^η ομάδα: 1
88^η ομάδα: 10
89^η ομάδα: 3

90^η ομάδα: 3

91^η ομάδα: 1

92^η ομάδα: 12

93^η ομάδα: 1

94^η ομάδα: 5

95^η ομάδα: 3

96^η ομάδα: 1

97^η ομάδα: 1

98^η ομάδα: 1

99^η ομάδα: 1

100^η ομάδα: 3

101^η ομάδα: 1

102^η ομάδα: 1

103^η ομάδα: 1

104^η ομάδα: 1

105^η ομάδα: 4

106^η ομάδα: 1

107^η ομάδα: 1

108^η ομάδα: 8

109^η ομάδα: 2

110^η ομάδα: 1

111^η ομάδα: 2

112^η ομάδα: 5

113^η ομάδα: 1

114^η ομάδα: 6

115^η ομάδα: 3

116^η ομάδα: 7

Σύμφωνα με τα παραπάνω δημιουργήθηκε ο παρακάτω πίνακας που περιέχει αναλυτικά τις ομάδες με τους αντίστοιχους αντιπροσώπους αλφάριθμους και τις αλληλουχίες που περιέχονται στην κάθε ομάδα.

Πίνακας 1. Αντιστοιχία αλληλουχιών κάθε εκπροσώπου στην αντίστοιχη ομάδα.

ΟΜΑΔΑ	ΕΚΠΡΟΣΩΠΟΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ
1	KM013396.1	5
2	KP013063.1	3
3	KJ658377.1	2
4	CP017839.1_c6468669-6467620	1
5	MKKE01000026.1_49260-51568	2
6	MKJY01000111.1_191054-193221	2
7	NZ_CP014485.1_1818750-1820924	3

8	LJGX01002014.1_c1283-60	1
9	CP009313.1_5780514-5782733	2
10	CP021080.1_6029941-6032103	1
11	NZ_NAVC01000052.1_22620-24806	2
12	NCTE01000057.1_4549-6697	2
13	NZ_LMTQ02000021.1_c55703-53541	1
14	NZ_ALNP01000004.1_63101-65356	1
15	LJGY01001158.1_c1100-1	5
16	CP018047.1_4096871-4099186	2
17	LJGX01002055.1_650-1697	1
18	LJGZ01000096.1_103010-105223	2
19	LJGU01000133.1_c191674-189356	2
20	JPFN01000090.1_c2704-485	2

21	MRCE01000009.1_211922-214216	2
22	KM013403.1	4
23	KM013402.1	1
24	LWAJ01000248.1_4612-6882	1
25	KJ658374.1	3
26	KJ658373.1	1
27	KJ658367.1	3
28	LJOT01000061.1_10541-12808	8
29	KP013066.1	3
30	EU816422.1	1
31	HM989961.1	1
32	GQ365216.1	1
33	HM209471.1	1

34	HM209469.1	2
35	GQ365217.1	1
36	HM989959.1	1
37	KF735768.1	2
38	KP013057.1	3
39	LC151466.1	1
40	KF735770.1	2
41	KF735776.1	15
42	KF735778.1	2
43	KF735772.1	1
44	KF735775.1	1
45	JQ247065.1	5
46	GQ365215.1	1

47	JQ247064.1	8
48	KF735766.1	1
49	KF735767.1	1
50	KX879174.1	1
51	LYOY01000001.1_131838-134081	1
52	LWAB01000002.1_c1274649-1272487	2
53	LOSR01000121.1_4709-6889	2
54	KQ949087.1_c118241-116052	2
55	JJOB01000003.1_112725-114962	2
56	CP020570.1_124727-126961	2
57	JXUQ02000001.1_c8045030-8042817	2
58	NZ_LZQS01000004.1_105204-107417	1

59	CP011492.1_516604-518829	2
60	CP019779.1_4752116-4754353	1
61	NZ_JOHN01000015.1_c24150-23048	1
62	KX879227.1	42
63	KX879193.1	1
64	KX879194.1	1
65	KX879195.1	3
66	KX879199.1	1
67	KX879205.1	28
68	KX879142.1	16
69	KX879173.1	1
70	KX879177.1	1
71	KX879191.1	20

72	NZ_JOAI01000014.1_c50703-48412	1
73	CP021121.1_c2940794-2938509	2
74	NZ_LZNS01000001.1_c3781047-3778789	1
75	KX879163.1	33
76	KX879150.1	90
77	KX879247.1	23
78	KX879296.1	1
79	KX879275.1	55
80	KX879198.1	1
81	KX879262.1	1
82	KX879287.1	1
83	KX879175.1	2
84	KX879280.1	1

85	KX879176.1	1
86	KX879402.1	4
87	KX879388.1	1
88	KX879322.1	10
89	KX879389.1	3
90	KX879342.1	3
91	KX879329.1	1
92	KX879331.1	12
93	KX879344.1	1
94	KX879492.1	5
95	KX879498.1	3
96	KX879397.1	1
97	KX879500.1	1

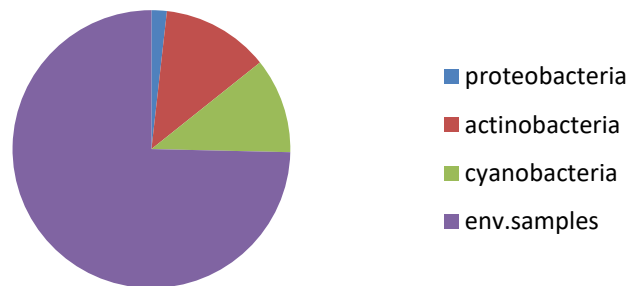
98	GQ365214.1	1
99	KX879506.1	1
100	KX879526.1	3
101	KX879537.1	1
102	KX879539.1	1
103	KX879521.1	1
104	KX879524.1	1
105	KX879530.1	4
106	KX879505.1	1
107	KX879535.1	1
108	KX879520.1	8
109	KX879540.1	2
110	KX879546.1	1

111	KX879545.1	2
112	KX879544.1	5
113	KX879534.1	1
114	KX879522.1	6
115	KX250361.1	3
116	KX250360.1	7

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 560 μικροοργανισμοί σε υδάτινα οικοσυστήματα, τα αποτελέσματα έδειξαν την παρουσία κυανοβακτηρίων (cyanobacteria), ακτινοβακτηρίων (actinobacteria), πρωτεοβακτηρίων (proteobacteria) καθώς και έναν μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών για τους οποίους δεν υπάρχουν επαρκής πληροφορίες για την συστηματική ταξινόμηση τους (environmental samples), σε αριθμούς ειδών 62, 70, 10 και 418 αντίστοιχα

Πιο συγκεκριμένα, οι ομάδες 1 έως 3 , 21 έως 29, 48, και 49 αποτελούνται από κυανοβακτήρια. Οι ομάδες 4 έως 19, 32, 45 έως 47, 51 έως 61 και 72 έως 74 αποτελούνται από ακτινοβακτήρια. Οι ομάδες 20, 30, 31, και 33 έως 36 αποτελούνται

από πρωτεοβακτήρια και τέλος οι ομάδες 50, 62 έως 74 και 75 έως 116 αποτελούνται από είδη για τα οποία δεν υπάρχουν πληροφορίες για την συστηματική τους ταξινόμηση.



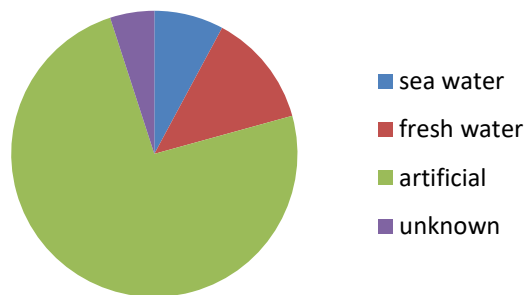
Εικόνα 3. Ποσοστά αλληλουχιών ανά ομάδα βακτηρίων .

Επίσης στην παρούσα εργασία ερευνήθηκε η φυλογεωγραφική εξάπλωση αυτών των μικροοργανισμών όπου και παρατηρείται παγκόσμια εξάπλωση και σε ποικίλα υδάτινα οικοσυστήματα.

Οι μικροοργανισμοί αυτοί έχουν παρατηρηθεί σε φυσικά και τεχνητά οικοσυστήματα παγκοσμίως. Τα είδη που μελετήθηκαν έχουν βρεθεί σε οικοσυστήματα με γλυκό νερό (λίμνες, ποτάμια), στη θάλασσα, σε δεξαμενές, σε ενυδρεία και στις υδατοεκτροφές καθώς υπάρχουν και κάποιοι μικροοργανισμοί παραγωγής γεωσμίνης για τους οποίους δεν υπάρχουν αναφορές εξάπλωσης. Όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα από τα 560 είδη που μελετήθηκαν τα 43 βρέθηκαν σε οικοσυστήματα με αλμυρό

νερό, τα 74 σε οικοσυστήματα γλυκού νερού, τα 417 σε τεχνητά οικοσυστήματα και τέλος υπήρχαν 26 είδη χωρίς αναφορά προέλευσης.

Πιο συγκεκριμένα, οι ομάδες 1, 2, 7, 9, 21, 22, 27 έως 29, 31, 33 έως 34, 36 έως 44, 48, 49, 51, 57, 58, 60 και 61 αντιστοιχούν σε είδη τα οποία βρέθηκαν σε υδάτινα οικοσυστήματα γλυκού νερού (fresh water). Οι ομάδες 4 έως 6, 7, 8, 10 έως 20, 52, 54 έως 56, 59 και 72 έως 74 αντιστοιχούν σε είδη τα οποία βρέθηκαν σε υδάτινα οικοσυστήματα αλμυρού νερού (sea water) . Οι ομάδες 3, 24 έως 26, 32, 35, 46, 50, 53, 62 έως 71 και 75 έως 114 αντιστοιχούν σε είδη τα οποία βρέθηκαν σε τεχνητά οικοσυστήματα (artificial). Τέλος οι ομάδες 23, 30, 45, 47, 115 και 116 αντιστοιχούν σε είδη για τα οποία δεν υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες για την φυλογεωγραφική τους εξάπλωση (unknown).



Εικόνα 4. Φυλογεωγραφική εξάπλωση μικροοργανισμών.

Παρατηρούμε την συχνότητα κάποιων περιοχών δηλαδή περιοχές στις οποίες συναντάμε πάνω από μία ομάδα.

Οι περισσότερες έχουν παρατηρηθεί στην 36^η περιοχή (OTHER SOURCES) με 72 κοινές ομάδες, η οποία περιοχή περιλαμβάνει όλες εκείνες τις ομάδες οι οποίες είναι καταγεγραμμένες με την πηγή στην οποία βρέθηκαν χωρίς όμως κάποια αναφορά στον τόπο προέλευσης. Στην συνέχεια παρατηρούμε την 22^η περιοχή (JAPAN, LAKE KASUMIGAURA) με 5 κοινές ομάδες. Στην 23^η (USA), 16^η (AUSTRALIA, LAKE CARGELLIGO) και 3^η (CHINA, HUBEI) περιοχή βρέθηκαν 4 κοινές ομάδες στην κάθε μία περιοχή. Τέλος στην 9^η (CHINA), 10^η (CHINA, NANSHA), 18^η (JAPAN), και 31^η (NORWAY, CAMAU FJORD) περιοχή βρέθηκαν 2 κοινές ομάδες στην κάθε μια περιοχή.

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

Συγκεκριμένα οι αντιπρόσωποι της 1^{ης} ομάδας εμφανίζονται σε 2 περιοχές: 1^η (CHINA, DONGHU LAKE) και 2^η (CHINA, TAIHU LAKE). Οι αντιπρόσωποι της 7^{ης} ομάδας εμφανίζονται σε 3 περιοχές: 7^η (USA, SOUDAN), 8^η (USA, CALIFORNIA), 9^η (CHINA). Οι αντιπρόσωποι της 22^{ης} ομάδας εμφανίζονται σε 2 περιοχές: 3^η (CHINA, HUBEI), 19^η (CHINA, XINGHU LAKE). Οι αντιπρόσωποι της 27^{ης} ομάδας εμφανίζονται σε 2 περιοχές: 21^η (CHINA, WUHAN LAKE), 22^η (JAPAN, LAKE KASUMIGAURA). Τέλος οι αντιπρόσωποι της 28^{ης} ομάδας εμφανίζονται σε 6 περιοχές: 23^η (USA), 24^η (AUSTRALIA, LAKE CARGELLIGO), 25^η (CHINA, QIANDO

LAKE), 26ⁿ (CHINA, LAKE ERHAI), 27ⁿ (CHINA, LAKE DIANCHI), 28ⁿ (CHINA, LUSHUI RESERVOIR).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με την τελική κατάταξη και διαχωρισμό των γονιδίων καταλήγουμε στις 2 παραπάνω εικόνες.

Η πρώτη εικόνα (Εικ.3) αναφέρεται στον διαχωρισμό των τελικών ομάδων των γονιδίων με βάση το είδος στο οποίο ανήκουν οι μικροοργανισμοί. Η δεύτερη εικόνα (Εικ.4) αναφέρεται στο διαχωρισμό των τελικών ομάδων με βάση την φυλογεωγραφική τους εξάπλωση.

Η παραγωγή γεωσμίνης οφείλεται σε βακτήρια. Οι πρώτοι οργανισμοί που επιβεβαιώθηκαν να προκαλούν ανεπιθύμητες οσμές ήταν τα ακτινοβακτήρια (Safferman et al.) και πλέον γνωρίζουμε ότι η παραγωγή γεωσμίνης οφείλεται επίσης και σε διάφορα είδη κυανοβακτηρίων, πρωτεοβακτηριδίων, φυκών καθώς και αρκετά είδη μικροοργανισμών για τα οποία δεν υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες για την συστηματική τους ταξινόμηση. (Godo et al. 2017)

Στην παρούσα έρευνα παρατηρούμε ότι από τις 116 ομάδες που προέκυψαν από την ανάλυση γονιδίων οι 22 περιλαμβάνουν κυανοβακτήρια, οι 34 περιλαμβάνουν ακτινοβακτήρια, οι 7 περιλαμβάνουν πρωτεοβακτήρια και τέλος οι 53 περιλαμβάνουν οργανισμούς για τους οποίους δεν έχουμε επαρκείς πληροφορίες για την συστηματική τους ταξινόμηση.

Στις 22 ομάδες που περιλαμβάνονται κυανοβακτήρια αντιστοιχούν συνολικά 65 οργανισμοί, στις 34 ομάδες που περιλαμβάνουν ακτινοβακτήρια αντιστοιχούν 63 οργανισμοί, στις 7 ομάδες που περιλαμβάνουν πρωτεοβακτήρια αντιστοιχούν 9 οργανισμοί και τέλος στις 53 ομάδες που περιλαμβάνουν είδη με ελλιπείς πληροφορίες για την συστηματική τους ταξινόμηση αντιστοιχούν 425 οργανισμοί.

Αν και οι ομάδες των κυανοβακτηρίων υστερούν σε αριθμό σε σχέση με αυτές των ακτινοβακτηρίων παρατηρούμε ότι συνολικά οι ομάδες του δεύτερου είδους περιλαμβάνουν περισσότερους οργανισμούς καθώς και ότι οι παραπάνω δύο ομάδες υπερτερούν σε αριθμό οργανισμών σε σχέση με τα πρωτεοβακτήρια. Τα αποτελέσματα αυτά δικαιολογούνται σύμφωνα με τις ήδη υπάρχουσες έρευνες που έχουν γίνει για τους μικροοργανισμούς που φέρουν γονίδια γεωσμίνης, καθώς γνωρίζουμε ότι τα κυανοβακτήρια και ακτινοβακτήρια αποτελούν τους κύριους μικροοργανισμούς παραγωγής γεωσμίνης στα υδάτινα οικοσυστήματα. Επιπλέον παρατηρούμε ότι ο μεγαλύτερος αριθμός ομάδων και κατ'επέκταση οργανισμών περιλαμβάνει είδη για τα οποία δεν γνωρίζουμε την συστηματική τους κατάταξη, δηλαδή το είδος στο οποίο ανήκουν και αυτό συμβαίνει διότι οι μικροοργανισμοί χαρακτηρίζονται από μεγάλη ποικιλομορφία και απαιτούνται συνεχείς έρευνες για την πλήρη κατανόηση των ειδών και τον τρόπο έκφρασης των γονιδίων τους στα διάφορα οικοσυστήματα.

Οι μικροοργανισμοί αυτοί έχουν ποικίλους τρόπους έκφρασης των γονιδίων γεωσμίνης και η έκφραση των γονιδίων επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες. Έχει παρατηρηθεί έκφραση των γονιδίων σε ολιγότροφα καθώς και σε ευτροφικά οικοσυστήματα, σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες σε όλα τα είδη μικροοργανισμών. Επίσης έχει παρατηρηθεί σε πολλά οικοσυστήματα η παρουσία γνωστών

μικροοργανισμών που φέρουν τα γονίδια έκφρασης της γεωσμίνης αλλά δεν είναι απαραίτητο να προκαλούν φαινόμενα ανεπιθύμητων οσμών είτε γιατί οι οσμές προέρχονται από μικροοργανισμούς με ελλιπείς πληροφορίες της συστηματικής τους ταξινόμησης, είτε προέρχονται από μικροοργανισμούς οι οποίοι μέχρι τώρα δεν ήταν γνωστό ότι εκφράζουν αυτά τα γονίδια. Τέλος η παρουσία βακτηρίων, που φέρουν τα γονίδια γεωσμίνης δεν είναι απαραίτητο να προκαλεί φαινόμενα ανεπιθύμητων οσμών σε ένα οικοσύστημα καθώς μπορεί να μην εκφραστούν ποτέ καθ' όλη την διάρκεια ύπαρξης τους σε αυτά. (Klausen et al. 2005, Guttman & Rijn 2008, Zhang et al. 2014, Lukassen 2019)

Οι μικροοργανισμοί αυτοί έχουν βρεθεί σε ποικίλα ενδιαίτηματα παγκοσμίως. Αρχικά μπορούμε να τα διαχωρίσουμε σε φυσικά και τεχνητά ενδιαίτηματα όπου, στα φυσικά περιλαμβάνονται οικοσυστήματα γλυκού νερού όπως λίμνες και ποτάμια καθώς και αλμυρού νερού όπως θάλασσες και ωκεανοί. Στα τεχνητά ενδιαίτηματα περιλαμβάνονται ενυδρεία, δεξαμενές καθώς και τα διάφορα συστήματα υδατοκαλλιεργειών.

Στην παρούσα έρευνα βρέθηκε ότι από τις συνολικά 116 ομάδες που προέκυψαν οι 53 ομάδες περιλαμβάνουν μικροοργανισμούς οι οποίοι ζουν σε φυσικά ενδιαίτηματα, από τις οποίες οι 29 ομάδες αντιστοιχούν σε οικοσυστήματα γλυκού νερού και οι 24 σε οικοσυστήματα αλμυρού νερού. Σε τεχνητά οικοσυστήματα υπολογίστηκαν να αντιστοιχούν 57 ομάδες καθώς υπήρχαν και 6 ομάδες για τις οποίες δεν υπήρχε αναφορά ενδιαίτηματος.

Αναλυτικότερα, οι 29 ομάδες που βρέθηκαν σε ενδιαιτήματα γλυκού νερού εντοπίστηκαν κατά το πλείστον στην Κίνα και στην Αμερική καθώς βέβαια και σε άλλες περιοχές (CHINA:DONGHU LAKE, CHINA:TAIHU LAKE, USA:SOYDAN, USA:KALIFORNIA, CHINA, VENEZUELA:ORINOCO RIVER, CHINA:XINGHU LAKE, CHINA:HUBEI, CHINA:WUHAN LAKE, JAPAN:LAKE KASUMIGAURA, USA, AUSTRALIA:LAKE GARGELLIGO, CHINA:QUANDAO LAKE, CHINA:LAKE ERHAI, CHINA:LAKE DIANCHI, ETHIOPIA:LAKE CHITU, INDIA: INDUS RIVER, RUSIA:LAKE BAIKAL, USA, OTHER SOURCES)

Η Κίνα και η Αμερική αποτελούν χώρες που απαρτίζονται από μεγάλο αριθμό ενδιαιτημάτων γλυκού νερού (λίμνες και ποτάμια) για αυτό και ο μεγαλύτερος αριθμός μικροοργανισμών που φέρουν γονίδια γεωσμίνης έχουν βρεθεί κατά κύριο λόγο σε αυτές τις περιοχές. Με βάση τα αποτελέσματα είδαμε ότι οι περισσότεροι οργανισμοί έχουν βρεθεί σε ενδιαιτήματα γλυκού νερού, γεγονός που εξηγεί την συχνότητα των δύο αυτών περιοχών.

Παρατηρούμε ότι στην ομάδα 28 συναντώνται γονίδια τα οποία έχουν βρεθεί σε φυσικό και τεχνητό ενδιαίτημα γλυκού νερού (USA, AUSTRALIA:LAKE CARGELLIGO, CHINA: QIANDAO LAKE, CHINA,LAKE ERHAI, CHINA:LAKE DIANCHI, CHINA:LUSHUI RESERVOIR).

Επίσης στην ομάδα 7 παρατηρούμε ότι συναντώνται γονίδια τα οποία βρέθηκαν σε ενδιαίτημα γλυκού νερού (CHINA, SOUDAN) καθώς και αλμυρού νερού (USA:CALIFORNIA, CHINA).

Οι 24 ομάδες που βρέθηκαν σε ενδιαιτήματα αλμυρού νερού παρατηρούμε ότι έχουν μεγάλο εύρος περιοχών παγκοσμίως (KOREA, USA:SAN DIEGO, PALAU, CHINA:HUBEI, CHINA:NANSHA, MALASIA:MANGROVE, GERMANY, CHINA, USA:CONNECTICAT, CHINA,YELLOW SEA, SOUTH CHINA, NORWAY:CAMAU FJORD, SPAIN, INDIA:BAY OF BENGAL, OTHER SOURCES).

Το παγκόσμιο εύρος των οργανισμών που βρέθηκαν σε ενδιαιτήματα αλμυρού νερού είναι αποτέλεσμα και του μεγάλου εύρους των θαλάσσιων οικοσυστημάτων. Τα θαλάσσια ενδιαιτήματα αποτελούν ενιαία και εκτεταμένα οικοσυστήματα με αποτέλεσμα να υπάρχει μεταφορά μικροοργανισμών σε μεγάλο εύρος περιοχών. Με βάση αυτό θα μπορούσαμε να υποθέσουμε και ότι οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί παραγωγής γεωσμίνης θα μπορούσαν κάλλιστα να υπερτερούν αριθμητικά σε σχέση με αυτούς του γλυκού νερού αλλά το εύρος του θαλάσσιου οικοσυστήματος είναι τόσο μεγάλο που η διευκρίνηση τέτοιων αποτελεσμάτων χρήζει μεγάλης και εκτεταμένης έρευνας για την εύρεση και την κατανόηση των μικροοργανισμών σε αυτά τα οικοσυστήματα.

Οι πλειονότητα των ομάδων φαίνεται να έχει βρεθεί σε τεχνητά ενδιαιτήματα τα οποία είναι ενυδρεία, δεξαμενές καθώς διάφορα συστήματα υδατοκαλλιεργειών με τα περισσότερα από αυτά να μην έχουν καταγεγραμμένο τον τόπο προέλευσης (BRAZIL, MEXICO, OTHER SOURCES).

Το γεγονός ότι οι περισσότερες ομάδες συναντώνται σε τεχνητά οικοσυστήματα υποδηλώνει σημαντική ανθρωπογενή επίδραση.

Τέλος βρέθηκαν 6 ομάδες για τις οποίες δεν υπήρχε αναφορά ενδιαιτήματος αλλά μόνο για τον τόπο προέλευσης (JAPAN, OTHER SOURCES).

Σημαντική παρατήρηση επίσης είναι η ύπαρξη μεγάλου αριθμού ομάδων οι οποίες εμφανίζονται σε περιορισμένες περιοχές-πηγές και χαρακτηρίζονται ως στενόοικες.

Συγκεκριμένα οι ομάδες 2^η, 9^η, 21^η, 23^η, 29^η, 31^η, 33^η, 34^η, 35^η, 38^η, 40^η, 51^η, 57^η, 58^η, 60^η, παρουσιάζονται αποκλειστικά σε ενδιαιτήματα γλυκού νερού στις εξής περιοχές αντίστοιχα: CHINA:HUBEI, VENEZUELA:ORINOCO RIVER, JAPAN, JAPAN:LAKE KAYMIGAURA, JAPAN:LAKE SHINJI, ETHIPIA:LAKE CHITU, INDIA:INDUS RIVER, RUSIA;LAKE BAIKAL, USA.

Οι ομάδες 4^η, 5^η, 6^η, 8^η, 10^η έως 20^η, 52^η, 55^η, 56^η, 59^η, 72^η, 74^η παρουσιάζονται αποκλειστικά σε ενδιαιτήματα αλμυρού νερού στις εξής περιοχές αντίστοιχα: KOREA, USA:SAN DIEGO, PALAU, USA;CALIFORNIA, CHINA:NANSHA, VENEZUELA:ORINOCO RIVER, MALASYA:MANGROVE, GERMANY, USA;CONNECTICAT, CHINA:YELLOW SEA, SOUTH CHINA, SOUTH PACIFIC OCEAN, JAPAN, CHINA:XINGHU LAKE, BRAZIL, NORWAY: CAMAU FJORD, SPAIN, CHINA, USA.

Με βάση τα παραπάνω γίνεται η παρατήρηση ότι στην 3^η περιοχή CHINA:HUBEI συναντώνται η 2^η, 29^η, 38^η ομάδα που ανήκουν σε ενδιαιτήματα γλυκού νερού. Στην 9^η περιοχή CHINA συναντώνται η 12^η και 56^η ομάδα που ανήκουν σε ενδιαιτήματα αλμυρού νερού. Στην 16^η περιοχή SOUTH CHINA συναντώνται η 15^η, 16^η,

18^η, 19^η, ομάδα που ανήκουν σε ενδιαιτήματα αλμυρού νερού. Στην 18^η περιοχή JAPAN συναντώνται η 21^η, 23^η ομάδα που ανήκουν σε ενδιαιτήματα γλυκού νερού. Τέλος στην 23^η περιοχή USA συναντώνται η 59^η, 60^η, 72^η ομάδα από τις οποίες οι 59^η και 72^η ανήκουν σε ενδιαίτημα αλμυρού νερού ενώ η 60^η ανήκει σε ενδιαίτημα γλυκού νερού.

Παρατηρούμε ότι οι ομάδες στενόοικων μικροοργανισμών γεωσμίνης συναντώνται κατά κύριο λόγο σε φυσικά ενδιαιτήματα αλμυρού και γλυκού νερού χωρίς ανθρωπογενείς παρεμβάσεις στις πηγές σε σχέση με τις ομάδες που βρέθηκαν επί το πλείστον σε πηγές που βασίζονται και υπάρχουν λόγω ανθρωπογενούς παρέμβασης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη βιβλιογραφία

Andrews J.C. (1983) Deformation of the active space in the low Reynolds number feeding current of Calanoid copepods. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 40(8):1293-1302, doi:10.1139/f83-147

Aoyama K. (1990) Studies on the earthy-musty odors in natural water (IV). Mechanism of earthy-musty odor production of actinomycetes. *Journal of Applied Bacteriology*, 68(4):405-410, doi:10.1111/j.1365-2672.1990.tb02891.x

Bentley R., Meganathan R. (1981) Geosmin and methylisoborneol biosynthesis in streptomycetes. Evidence for an isoprenoid pathway and its absence in non-differentiating isolates. *FEBS letters*, 125(2):220-222, doi:10.1016/0014-5793(81)80723-5

Breheret S., Talou T., Rapior S., Besserie J.M. (1999) Geosmin, a sesquiterpenoid compound responsible for the musty-earthy odor of *Cortinarius herculeus*, *Cystoderma amianthinum* and *Cy. carcharias*. *Mycologia*, 91(1):117-120, doi:10.1080/00275514.1999.12060999

Bristow R.L., Young I.S., Pemberton A., Williams J., Macher S. (2018) An extensive review of the extraction techniques and detection methods for the taste and odour compound geosmin (trans-1, 10-dimethyl-trans-9-decalol) in water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, p: 233-248, doi: 10.1016/j.trac.2018.10.032

Cane D.E., He X., Kaboyashi S., Omura S., Ikeda H. (2006) Geosmin Biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. Molecular Cloning, Expression, and Mechanistic Study of the Germacradienol/Geosmin Synthase. *The Journal of Antibiotics*, 59(8): 471-479, doi:10.1038/ja.2006.66

Clerc N.A. (2019) Origin and fate of odorous metabolites, 2-methylisoborneol and geosmin, in a eutrophic reservoir. University of Indiana, Department of Earth Science, p:22

Darriet P., Pons M., Lamy S., Dubourdieu D. (2000) Identification and quantification of geosmin, an earthy odorant contaminating wines. *J. Agric.Food Chem.*,48(10):4385-8, doi:10.1021/jf0007683

DeMott W.R. (1986) The role of taste in food selection by freshwater zooplankton. *Oecologia*, 69(3):334-340

Diongi C.P., Lawlor T.E., McFarland J.E., Johnsen P.B. (1993) Evaluation of geosmin and 2-methylisoborneol on the histidine dependence of TA98 and TA100 Salmonella typhimurium tester strains. *Water Research*, 22(11):1615-1618, doi:10.1016/0043-1354(93)90125-2

EPA (2019) <https://www.epa.gov/indoor-air-quality-iaq/technical-overview-volatile-organic-compounds?fbclid=IwAR2pQQSNQDjk38GAojmrJUc4F8fxBKvu5s6bCQPO-WSQgoAG93o9Ig8gk8g>, πρόσβαση 13-09-2019

Gagne F., Ridal J., Blaise C., Brownlee B. (1999) Toxicological Effects of Geosmin and 2-Methylisoborneol on Rainbow Trout Hepatocytes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 63:174-180, doi:10.1007/s001289900963

Giglio S., Jiang J., Saint C.P., Cane D., Monis P.T. (2008) Isolation and Characterization of the Gene Associated with Geosmin Production in Cyanobacteria. *Environ Sci Technol.*, 42(21): 8027-8032, doi:10.1021/es801465w

Godo T., Saki Y., Nojiri Y., Tsujitani M., Sugahara S., Hayashi S., Kamiya H., Ohtani S., Seik Y. (2017) Geosmin- producing Species of *Coelosphaerium* (Synechococales, Cyanobacteria) in Lake Shinji, Japan. *Nature*, doi:10.1038/srep41928

Gust B., Challis G.L., Fowler K., Kieser T., Chater K.F (2003) PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4): 1541-1546, doi:10.1073/pnas.0337542100

Guttman L., Rijn J. (2008) Identification of conditions underlying production of geosmin and 2-methylisoborneol in a recirculating system. *Aquaculture*, 279:85-91, doi:10/1016/j.aquaculture.2008.03.047

Guttman L., Rijn J. (2012) Isolation of Bacteria Capable of Growth with 2-Methylisoborneol and Geosmin as the Sole Carbon and Energy Sources. *Aquaculture*, 279:85-91, doi:10.1128/AEM.06333-11

Harris G.G., Lombardi P.M., Pemberton T.A., Matsui T., Weiss T.M., Cole K.E., Köksal M., Murphy F.V., Vedula L.S., Chou W.K.W., Cane D.E., Christianson D.W. (2015) Structural Studies of Geosmin Synthase, a Bifunctional Sesquiterpene Synthase With Alpha-Alpha Domain Architecture that Catalyzes a Unique Cyclization-Fragmentation Reaction Sequence. *Biochemistry*, 54(48): 7142-7155, doi:10.1021/acs.biochem.5b01143

Howgate P. (2004) Tainting of farmed fish by geosmin and 2-methyl-iso-borneol: a review of sensory aspects and of uptake/depuration. *Aquaculture*, p:155-181, doi:10.1016/j.aquaculture.2003.09.032

Huang W., Lai C., Cheng Y. (2007) Evaluation of extracellular products and mutagenicity in cyanobacteria cultures separated from a eutrophic reservoir. *Science of The Total Environment*, p:214-223, doi:10.1016/j.scitotenv.2007.01.075

- Ikawa M., Sasner J.J., Haney J.F. (2001) Activity of cyanobacterial and algal odor compounds found in lake waters on green alga *Chlorella pyrenoidosa* growth. *Hydrobiologia*, 443(1-3):19-22
- Jackson G.A. (1987) simulating chemosensory responses of marine microorganisms. *Limnology Oceanography*, 32(6):1253-1266, doi:10.4319/lo.1987.32.6.1253
- Jardine C., Gibson N., Hrudehy S.E. (1999) Detection of odour and health risk perception of drinking water. *Water Science and Technology*, 40:91-98, doi:10.1016/s0273-1223(99)00543-0
- Jiang J., He X., Canel D.E. (2007) Biosynthesis of the earthy odorant geosmin by a bifunctional *Streptomyces coelicolor* enzyme. *Nat Chem Biol.*, 3(11): 711-715, doi:10.1038/nchembio.2007.29
- Juttner F. (1988) Biochemistry of Biogenic Off- Flavour Compounds in Surface Waters. *Water Science & Technology*, 20(8-9):107-116, doi:10.2166/wst.1988.0231
- Juttner F., Watson S.B. (2007) Biochemical and Ecological Control of Geosmin and 2-Methylisoborneol in Source Water. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 4395-4406, doi:10.1128/AEM.02250-06
- Karahadia C., Josephson D.B., Lindsay R.C. (1985) Volatile compounds from *Penicillium* sp. contributing musty-earthy notes to Brie and Camembert cheese flavor. *J.Agric.Food Chem.*, 33(3):339-343, doi:10.1021/jf00063a005
- Klausen C., Nicolaisen M.H., Strobel B.W., Warnecke F., Nielsen J.L., Jørgensen N.O.G. (2005) Abundance of actinobacteria and production of geosmin and 2-methylisoborneol in Danish streams and fish ponds. *FEEMS Microbiology Ecology*, 52:265-278, doi:10/1016/j.femsec.2004.11.015
- Lind O.T., Katzif S.D., (1988) Nitrogen and the threshold odor number produced by an actinomycete isolated from lake sediments. *Water Science Technology*, 20(8-9):185-191, doi:10.2166/wst.1988.0241
- Lukassen M.B., Saunders A.M., Sindilariu D.P., Nielsen J.L. (2017) Quantification of novel geosmin-producing bacteria in aquaculture systems. *Aquaculture*, 479:304-310, doi:10.1016/j.aquaculture.2017.06.004
- Lukassen M.B., Podduturi R., Rohaan B., Jørgensen N.O.G., Nielsen J.L. (2019) Dynamics of geosmin-producing bacteria in a full-scale saltwater recirculated aquaculture system. *Aquaculture*, 500:170-177, doi:10.1016/j.aquaculture.2018.10.00
- Liu S., Tang L., Wu M., Fu H., Xu J., Chen W., Ma F. (2017) Parameters influencing elimination of geosmin and 2-methylisoborneol by K_2FeO_4 Separation and Purification Technology, p:128-133, doi:10.1016/j.seppur.2017.03.013
- McGuire M. (1995) Off-flavor as the consumer's measure of drinking water safety. *Water Science and Technology*, 31(11):1-8, doi:10.2166/wst.1995.0386

Naes H., Utkilen H.C., Post A.F., (1988) Factors Influencing Geosmin Production by the Cyanobacterium *Oscillatoria brevis*. *Water Science & Technology*, 20(8-9):125-131, doi:10.2166/wst.1988.0233

Nakajima M., Ogura T., Kusama Y., Iwabuchi N., Imawaka T., Araki A., Sasaki T., Hirose E., Sunairi M. (1996) Inhibitory effects of odor substances, geosmin and 2-methylisoborneol, on early development of sea urchins. *Water Research*, 30(10):2508-2511, doi:10.1016/0043-1354(96)00104-2

Nakamura S., Daishima S. (2005) Simultaneous determination of 22 volatile organic compounds, methyl-tert-butyl ether, 1,4-dioxane, 2-methylisoborneol and geosmin in water by headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Analitica Chimica Acta*, p: 79-85, doi:10.1016/j.aca.2005.05.077

Ogura T., Sunairi M., Nakajima M. (2000) 2-methylisoborneol and geosmin, the main sources of soil odor, inhibit the germination of brassicaceae seeds. *Soil Science and Plant Nutrition*, 46(1):217-227, doi:10.1080/00380768.2000.10408777

Pirbazari M., Borow H.S., Craig S., Ravindran V., McGuire M.J. (1992) Physical Chemical Characterization of Five Early-Musty-Smelling Compounds. *Water Science & Technology*, 25(2):81-88, doi:10.2126/wst.1992.0038

Saito K., Okamura K., Kataoka H. (2008) Determination of musty odorants 2-methylisoborneol and geosmin, in environmental water by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1186:434-437, doi:10.1016/j.chroma.2007.12.078

Schnurer J., Olsson J., Borjesson T (1999) Fungal volatiles as indicators of food and feeds spoilage. *Fungal Genet Biol.*, 27(2-3):209-17, doi:10.1006/fgbi.1999.1139

Sklenar K.S., Horne A.J. (1999) Effect of the cyanobacterial metabolite geosmin on growth of green alga. *Water Science And Technology*, 40(6):225-228, doi:10.1016/S0273-1223(99)00561-2

Thermo Fisher Scientific (2019)
https://www.thermofisher.com/gr/en/home/industrial/environmental/environmental-learning-center/contaminant-analysis-information/semivolatile-organic-compounds-analysis.html?fbclid=IwAR3-GE4SP3U8UuipuC9-jsf9VCvIyLZDp48VqkY82GBa_KtLeaNzaGKv52c, πρόσβαση 21-09-2019

Tosi L., Sola C. (1993) Role of geosmin, a typical inland water odour, in guiding glass eel *Anguilla anguilla* (L.) migration. *Ethology*, 95(3):177-185, doi:10.1111/j.1439-0310.1993.tb00468.x

Ueberbacher B.T., Hall M., Faber K., (2012) Electrophilic and nucleophilic enzymatic cascade reactions in biosynthesis. *Natural Product Reports*, 29(3):337-50, doi:10.1039/c2np00078d

Utkilen H.C., Froshaug M. (1992) Geosmin production and excretion in a planktonic and benthic *Oscillatoria*. *Water Science & Technology*, 25(2):199-206, doi:10.2166/wst.1992.0053

Watson S.B. (2003) Cyanobacterial and eukaryotic algal odour compounds: signals or by-products? A review of their biological activity. *Phylogia*, 42(4):332-350, doi:10.2216/i0031-8884-42-4-332.1

Wnorowski AU. Tastes and odours in the aquatic environment: A review. Division of Water Technology, CSIR, Pretoria, South Africa 1992

Wood S., Williams St., White Wr., Jones F. (1983) Factors influencing geosmin production by streptomycete and their relevance to the occurrence of earthy taints in reservoirs. *Water Science Technology*, 15(6/7)191-198

Xuwei D., Min Q., Ren R., Jiarui L., Xiaoxue S., Ping X., Jun C. (2019) The relationships between odors and environmental factors at bloom and non-bloom area in Lake Taihu, China. *Chemosphere*, 218:569-579, doi:10.1016/j.chemosphere.2018.11.121

Zhang T., Li D., Wang G., Song L., Li L. (2014) Identification and expression analysis of the gene associated with geosmin production in *Lyngbya kuetzingii* UTEX 1547 (cyanobacteria). *Harmful Algae*, 39:127-133, doi:10.1016/j.hal.2014.07.005

Ελληνική βιβλιογραφία

ΘΕΡΜΟΓΙΑΝΝΗ ΕΙΡΗΝΗ (2016) Φυλογεωγραφική ανάλυση του γονιδίου της μεθανιογένεσης *mrcA*, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ, Προπτυχική Διπλωματική Εργασία, Βόλος, 2016

ΜΑΡΙΑ-ΛΗΤΩ ΓΛΥΚΙΩΤΗ (2015) Προσδιορισμός Geosmin και 2-Methylisoborneol με χρήση καινοτόμου τεχνικής μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού, Πολυτεχνίο Κρήτης Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Χανιά, 2015

ΤΟΠΑΛΗ ΓΕΩΡΓΙΑ (2015) Μοριακή Ποικιλότητα φυλοτύπων *Pseudomonas* spp. από ιχθείς ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ, Προπτυχική Διπλωματική Εργασία, Βόλος, 2015

« Phylogeography of geosmin synthase genes in aquatic environments »

ABSTRACT

The present study investigates the phylogeographic analysis of the genes of the geosmin synthase that are found in a variety of bacteria including cyanobacteria, actinobacteria and proteobacteria. Initially, the concept of geosmin, the way genes are expressed by different micro-organisms, its chemical structure and biosynthesis, the way it is determined and its effects on ecosystems and thus on humans. Using the Genbank and ClustalW sites, 1777 *geoA* gene sequences were collected, from which 560 corresponding to aquatic ecosystems were studied and all sequences were compared for grouping. With a similarity rate of over 97% we ended up in 116 final teams. Finally, they were separated according to the species and habitat found. Of the species in which the *geoA* gene was found out of the 560 total genes studied, 10 belong to proteobacteria, 70 to actinobacteria, 62 to cyanobacteria, and 418 to unidentified microorganisms. Of the habitat showing 44 were found in freshwater areas, 72 in saline areas, 416 in artificial ecosystems and there were 28 sequences for which no habitat was found. These results indicate that the organisms carrying the geosmin genes are species diverse and require ongoing research to understand their expression mechanisms in different ecosystems, and that they occur in different habitats with the majority of species found in freshwater areas and mainly in China and America.

Keywords: geosmin, phylogeography, *geoA*

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 2. Αντιστοιχία ομάδων στα διάφορα υδάτινα οικοσυστήματα.

ΟΜΑΔΕΣ	FRESH WATER	SEA WATER	ARTIFICIAL	UKNOWN
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				

16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				
31				
32				

33				
34				
35				
36				
37				
38				
39				
40				
41				
42				
43				
44				
45				
46				
47				
48				
49				

50				
51				
52				
53				
54				
55				
56				
57				
58				
59				
60				
61				
62				
63				
64				
65				
66				

67				
68				
69				
70				
71				
72				
73				
74				
75				
76				
77				
78				
79				
80				
81				
82				
83				

84				
85				
86				
87				
88				
89				
90				
91				
92				
93				
94				
95				
96				
97				
98				
99				
100				

101				
102				
103				
104				
105				
106				
107				
108				
109				
110				
111				
112				
113				
114				
115				
116				

Πίνακας 3. Διαχωρισμός περιοχών- τόπων ανά ομάδα.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
7	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
13	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37

29	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
30	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
31	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
32	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
33	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
34	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
35	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
36	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
37	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
38	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
39	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
40	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
41	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
42	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
43	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37

59	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
60	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
61	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
62	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
63	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
64	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
65	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
66	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
67	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
68	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
69	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
70	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
71	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
72	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
73	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37

74	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
75	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
76	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
77	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
78	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
79	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
80	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
81	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
82	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
83	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
84	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
85	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
86	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
87	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
88	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37

89	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
90	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
91	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
92	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
93	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
94	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
95	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
96	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
97	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
98	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
99	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
100	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
101	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
102	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37

15	CHINA, YELLOW SEA	34	INDIA, INDUS RIVER
16	SOUTH CHINA	35	RUSSIA, LAKE BAIKAL
17	SOUTH PACIFIC OCEAN	36	OTHER SOURCES
18	JAPAN	37	INDIA, BAY OF BENGAL
19	CHINA, XINGHU LAKE		