



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ
ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΤΑΜΕΙΟ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ



Η ΠΑΙΔΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΡΥΦΗ
Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Εκπαίδευσης και Αρχικής
Επαγγελματικής Κατάρτισης

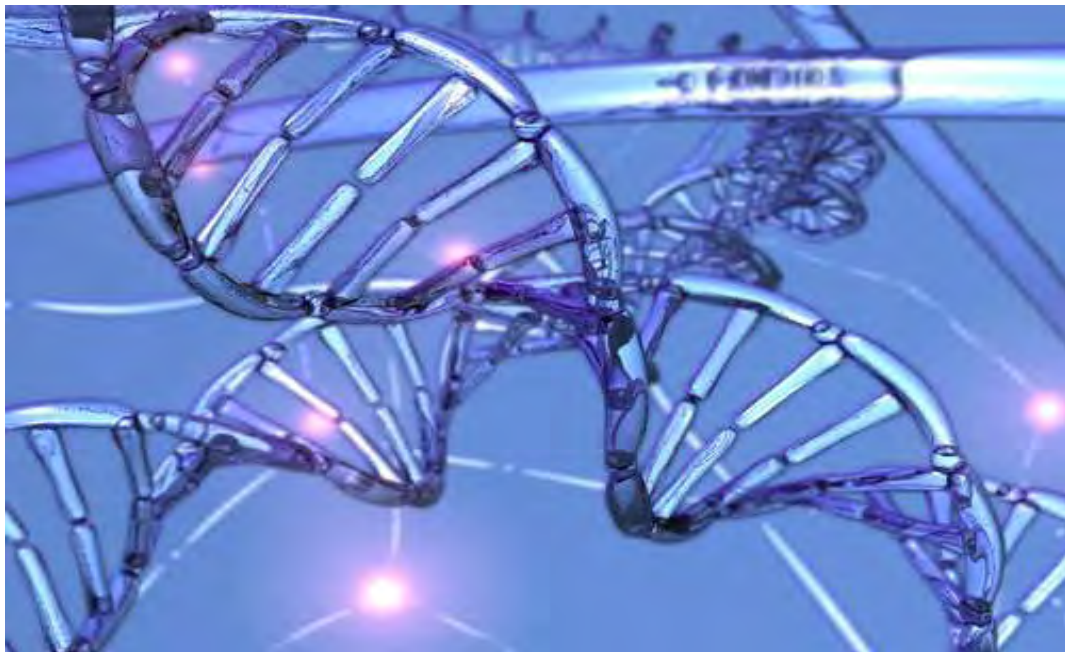
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΥΔΡΟΒΙΩΝ ΖΩΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ανίχνευση λειτουργικών γονιδίων που εμπλέκονται στην
αναερόβια οξείδωση του μεθανίου σε ιζήματα μεθανοϋδριτών
από την Ανατολική Μεσόγειο



ΓΟΥΓΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΒΟΛΟΣ 2008

**Ανίχνευση λειτουργικών γονιδίων που εμπλέκονται στην αναερόβια
οξειδωση του μεθανίου σε ιζήματα μεθανοϋδριτών από την Ανατολική
Μεσόγειο.**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- **Κωνσταντίνος Αρ. Κορμάς**, Επίκουρος Καθηγητής Οικολογίας Υδάτινης Στήλης με Έμφαση στα Μικροβιακά και Τροφικά Είδη, Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπων.
- **Αθανάσιος Εξαδάκτυλος**, Επίκουρος Καθηγητής Γενετικής Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.
- **Βασίλειος Λυκούσης**, Ερευνητής Α, Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών, Μέλος.

Ανίχνευση λειτουργικών γονιδίων που εμπλέκονται στην αναερόβια οξείδωση του μεθανίου σε ιζήματα μεθανοϋδριτών από την Ανατολική Μεσόγειο

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια ανίχνευσης λειτουργικών γονιδίων που εμπλέκονται στην αναερόβια οξειδωση του μεθανίου σε ιζήματα μεθανοϋδριτών από την Ανατολική Μεσόγειο. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στην περιοχή των υποθαλάσσιων ορέων του Αναξίμανδρου και συγκεκριμένα στα υποθαλάσσια ηφαίστεια ιλύος (mud volcanoes) Amsterdam, Kula, Kazan και Thessaloniki. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από διαφορετικά βάθη για το κάθε ηφαίστριο ιλύος. Απομονώθηκε DNA από τα ιζήματα και ακολούθησε ενίσχυση με ειδικούς εκκινητές για τα λειτουργικά γονίδια αναγωγής A του μέθυλο – συνενζύμου M (*methyl coenzyme M reductase, mcrA*), μη αφομοιωτική αναγωγής A θειωδών (*dissimilatory sulfite reductase, dsrA*), σωματιδιακή μονο – οξυγενάση A του μεθανίου (*particulate methane monooxygenase, pmoA*), διαλυμένη μονο – οξυγενάση X του μεθανίου (*soluble methane monooxygenase, mmoX*) και δεϋδρογονάση F της μεθανόλης (*methanol dehydrogenase, mxaF*) των Bacteria και Archaea με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Το γονίδιο *mcrA* ανιχνεύθηκε σε όλα τα προαναφερόμενα υποθαλάσσια ηφαίστεια ιλύος αλλά όχι σε όλα τα βάθη των δειγμάτων. Συγκεκριμένα στο υποθαλάσσιο ηφαίστριο ιλύος Amsterdam ανιχνεύθηκε στα βάθη των 94 cm, 60 cm και 1 cm από την επιφάνεια του πυθμένα. Στο υποθαλάσσιο ηφαίστριο ιλύος Kula ανιχνεύθηκε στα βάθη των 75 cm και 15 cm από την επιφάνεια του πυθμένα. Στο υποθαλάσσιο ηφαίστριο ιλύος Kazan ανιχνεύθηκε μόνο στο βάθος του 1 cm από την επιφάνεια του πυθμένα και τέλος στο υποθαλάσσιο ηφαίστριο ιλύος Thessaloniki ανιχνεύθηκε σε όλα τα βάθη του ιζήματος. Το γονίδιο *dsrA*

Ανίχνευση λειτουργικών γονιδίων που εμπλέκονται στην αναερόβια οξειδωση του μεθανίου σε ιζήματα μεθανοϋδριτών από την Ανατολική Μεσόγειο

ανιχνεύθηκε μόνο στα υποθαλάσσια ηφαίστεια ιλύος Thessaloniki και Kula σε διαφορετικά βάθη για το καθένα και ύστερα από χρήση εσωτερικών εκκινήτων. Συγκεκριμένα στο υποθαλάσσιο ηφαίστριο ιλύος Thessaloniki ανιχνεύθηκε μόνο στο βάθος των 120 cm από την επιφάνεια του πυθμένα, ενώ στο υποθαλάσσιο ηφαίστριο ιλύος Kula ανιχνεύθηκε στα βάθη των 75 cm, 19 cm και 1 cm από την επιφάνεια του πυθμένα. Τέλος τα γονίδια, *pmoA*, *mmoX* και *mxaF* δεν ανιχνεύθηκαν σε κανένα από τα προαναφερόμενα υποθαλάσσια ηφαίστεια ιλύος. Η ανίχνευση του γονιδίου *mcrA* σε όλα τα προαναφερόμενα ηφαίστεια ιλύος δηλώνει ξεκάθαρα ότι σε αυτά λαμβάνει χώρα μεθανογένεση. Επίσης το μεθάνιο που παράγεται οξειδώνεται αναερόβια, άποψη η οποία ενισχύεται από την ανίχνευση του γονιδίου *dsrA*, αλλά πολύ περισσότερο από την αδυναμία ανίχνευσης των γονιδίων *pmoA*, *mmoX* και *mxaF* τα οποία εμπλέκονται στην αερόβια οξείδωση του μεθανίου.

Λέξεις κλειδιά: υποθαλάσσια όρη του Αναξίμανδρου, μεθανοϋδρίτες, αναερόβια οξείδωση του μεθανίου, λειτουργικά γονίδια.

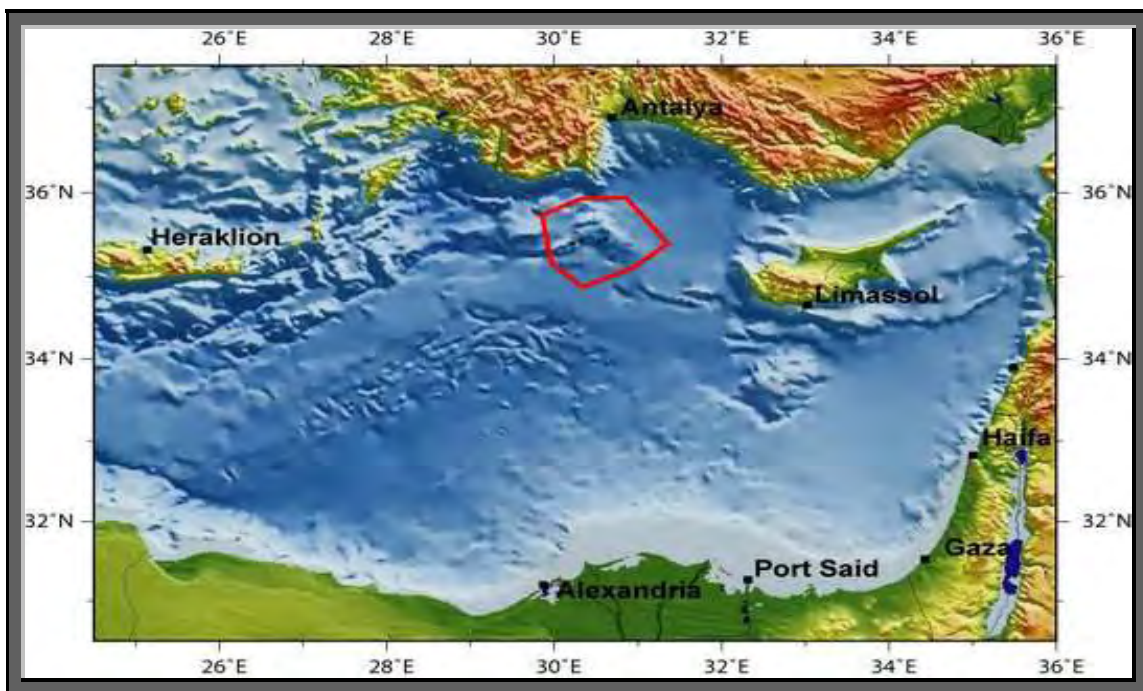
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 Η ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΩΝ ΥΠΟΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΟΡΕΩΝ ΤΟΥ ΑΝΑΞΙΜΑΝΔΡΟΥ ΚΑΙ ΤΑ ΥΠΟΘΑΛΑΣΣΙΑ ΗΦΑΙΣΤΕΙΑ ΙΛΥΟΣ.	6
1.2 ΜΕΘΑΝΟΥΪΔΡΙΤΕΣ.	9
1.2.1 Στερεοχημεία των μεθανοϋδριτών.	9
1.2.2 Χωρική κατανομή μεθανοϋδριτών και η σημασία τους	10
1.3 ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΟΥ ΜΕΘΑΝΙΟΥ ΣΕ ΙΖΗΜΑΤΑ ΜΕΘΑΝΟΥΪΔΡΙΤΩΝ	14
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	18
2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ	18
2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ DNA	22
2.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR)	23
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	28
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	34
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	50
6. ABSTRACT	67

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η περιοχή των υποθαλάσσιων ορέων του Αναξίμανδρου και τα υποθαλάσσια ηφαιστεια ιλύος

Η περιοχή μελέτης της παρούσας εργασίας τοποθετείται 75 ναυτικά μίλια νότια της Αττάλειας και του Καστελλόριζου μεταξύ του Κυπριακού και του Ελληνικού τόξου αποτελώντας τμήμα της Μεσογειακής Ράχης. Στα δυτικά συνορεύει με την βαθιά θαλάσσια λεκάνη της Ρόδου (με μέγιστο βάθος 4485 m) και Ανατολικά με την ρηχότερη θαλάσσια λεκάνη της Αττάλειας (με μέγιστο βάθος 2600 m) (Ten Veen et al., 2004). (Εικόνα. 1).



Εικόνα 1. Η ευρύτερη περιοχή των ορέων του Αναξίμανδρου (σχηματική απεικόνιση με κόκκινη διαγράμμιση).

Πηγή: (http://www.marum.de/English/Meteor_Cruise_M703.html)

Η ευρύτερη προαναφερόμενη περιοχή απαρτίζεται από τρία διακριτά υποθαλάσσια όρη, του Αναξιμανδρου, του Αναξιμένη και του Αναξαγόρα (Zitter et al., 2004). Στην παρούσα εργασία γίνεται αναφορά μόνο για τα όρη του Αναξιμανδρου καθώς και τα υποθαλάσσια ηφαίστεια ιλύος που βρίσκονται σε αυτό.

Ως υποθαλάσσια ηφαίστεια ιλύος χαρακτηρίζονται ιζηματογενείς προεξοχές αποτελούμενες από παχύρρευστο λεπτό επίστρωμα ιζημάτων πολλές φορές συνδυασμένο με θραύσματα μητρικού πετρώματος, τα οποία αποτίθενται στην επιφάνεια του ωκεάνιου πυθμένα της Γης (Cita et al., 1981 ; Barber et al., 1986 ; Staffin et al., 1993 ; Hovland et al., 1997).

Μέχρι σήμερα στα όρη του Αναξιμανδρου έχουν παρατηρηθεί τουλάχιστον επτά ηφαίστεια ιλύος, εκ των οποίων τα Amsterdam, Kula, Kazan και Thessaloniki αποτελούν αντικείμενο της παρούσας εργασίας. Επίσης περισσότεροι από 25 θόλοι που μοιάζουν με ηφαίστεια ιλύος έχουν αναγνωρισθεί (Woodside et al., 1997 ; Lykousis et al., 2004). Τα συγκεκριμένα ηφαίστεια ιλύος είναι αρκετά μικρά σε διαστάσεις (μέσος όρος: λιγότερο από 1 Km διάμετρο και 100 m ύψος) εκτός από το Amsterdam το οποίο έχει διάμετρο 3 Km (Zitter et al., 2005).

Τα ηφαίστεια Amsterdam, Kula, Kazan και Thessaloniki εμφανίζονται αντιστοίχως ως ελλειπτικό (100 m ύψος και 3 Km διάμετρο), ημισφαιρικό (περίπου 80 m ύψος και 1 Km διάμετρο), ακανόνιστου σχήματος (περίπου 50 m ύψος και 800 m διάμετρο) (Zitter et al., 2005) και κυκλικό με διάμετρο 1,5 Km και ύψος 120 m (Lykousis et al., 2004).

Αξιοσημείωτο είναι το ερευνητικό ενδιαφέρον της παγκόσμιας επιστημονικής κοινότητας από τα τέλη της δεκαετίας του 70' στην μελέτη και τον εντοπισμό υποθαλάσσιων ηφαιστειών. Οι λόγοι που οδήγησαν σε αυτή την κούρσα ανακαλύψεων υποθαλάσσιων ηφαιστειών ιλύος είναι οι εξής:

α) Αποτελούν αξιόπιστο δείκτη εύρεσης κοιτασμάτων πετρελαίου (Bagirov and Ierehe, 1999 ; Milkov, 2000).

β) Αποτελούν σημαντική πηγή ροής μεθανίου από την λιθόσφαιρα στην υδρόσφαιρα και στην ατμόσφαιρα προκαλώντας επιπτώσεις στο φαινόμενο του θερμοκηπίου και επιφέροντας κλιματικές αλλαγές (Dimitrov, 2002 ; Milkov et al., 2003).

γ) Τα ιζήματα και τα άλλα ρευστά υλικά που εκχύνονται από τα ηφαίστεια ιλύος, παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για την γεωλογία και την βιοχημεία των περιοχών αυτών καθώς και πληροφορίες για την κατανομή των ιζημάτων (Guiliyev and Geizullayev, 1996)

δ) Τα υποθαλάσσια ηφαίστεια επηρεάζουν τις γεωτρήσεις καθιστώντας αρκετές φορές αδύνατη την εκτέλεση τους (Milkov, 2000) και

ε) Τα εκλυόμενα αέρια (κυρίως μεθάνιο και υδρόθειο) σε συνδυασμό με το υψηλής θερμότητας εκλυόμενο πυθμενικό νερό αποτελούν δυνητικώς αξιόλογες ενεργειακές πηγές (Hovland, 2000).

1.2 Μεθανοϋδρίτες

1.2.1 Στερεοχημεία των μεθανοϋδριτών

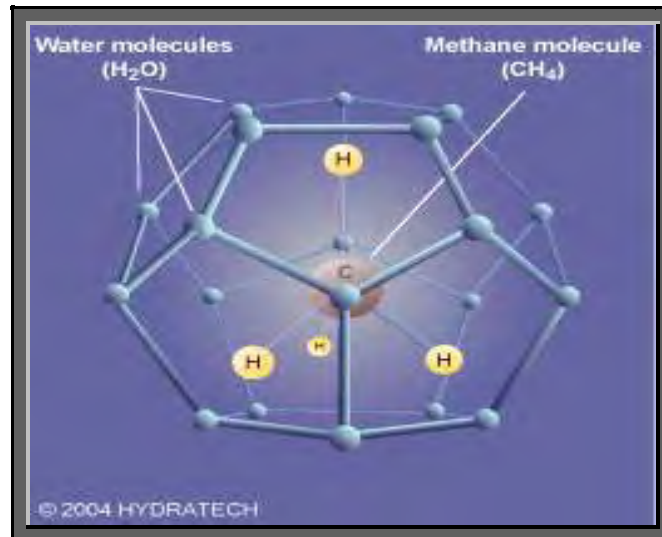
Οι μεθανοϋδρίτες, (*gas hydrates*, GH) είναι στερεές κρυσταλλικές ενώσεις που περιέχουν συμπαγής κρυστάλλους αερίου και νερού (Katz and Lee, 1990 ; McCain, 1990 ; Englezos, 1993 ; Makogon, 1997 ; Sloan, 1997 ; Collett, 2000, 2002 ; Kromah et al., 2003 ; Taylor et al., 2003 ; Pooladi-Darvish, 2004)

Τέτοιες ενώσεις ονομάζονται πλέγματα (Clathrates) και ορίζονται ως μόρια τα οποία αποτελούν τμήμα του κρυσταλλικού πλέγματος άλλων μορίων. Στους μεθανοϋδρίτες τα μόρια του αερίου (δηλαδή του μεθανίου) παγιδεύονται μέσα στο τρισδιάστατο κρυσταλλικό πλέγμα του νερού, δημιουργώντας υπό συνθήκες υψηλών πιέσεων και χαμηλών θερμοκρασιών στερεά τμήματα με μορφή πάγου λευκού χρώματος (σαν χιόνι) (Dawe and Thomsas, 2007). Δύο είναι οι κύριες γεωλογικές τοποθεσίες στις οποίες επικρατούν οι προαναφερόμενες συνθήκες καθιστώντας δυνατό το σχηματισμό μεθανοϋδριτών:

- α) το έδαφος περιοχών καλυμμένων με μόνιμο στρώμα πάγου και
- β) τα ωκεάνια ιζήματα των ηπειρωτικών περιθωρίων (Kvenvolden, 1993)

Το μόριο του νερού σχηματίζει ένα πλέγμα δεσμών με τα μόρια του υδρογόνου προσδίδοντας του δομή τρισδιάστατου κλωβού (Εικόνα. 2) μέσα στο οποίο εγκλωβίζεται κυρίως το αέριο μεθάνιο καθώς και άλλα αέρια μικρού μοριακού βάρους. Καθώς το αέριο εισάγεται στο πλέγμα, οι δεσμοί υδρογόνου αλληλεπιδρούν με τα ηλεκτρόνια του αερίου καθιστώντας τους δεσμούς αυτούς

χαμηλότερης ενέργειας με επακόλουθο το σύμπλοκο νερού – αερίου – υδρογόνου να κατακρημνίζεται ως στερεός κρύσταλλος (Dawe and Thomsas, 2007).



Εικόνα 2. Στερεοχημική διάταξη του μορίου ενός μεθανοϋδρίτη. Ξεχωρίζει το περιφερειακό πλέγμα των μορίων του νερού και στο εσωτερικό τους το εγκλωβισμένο μόριο του μεθανίου.

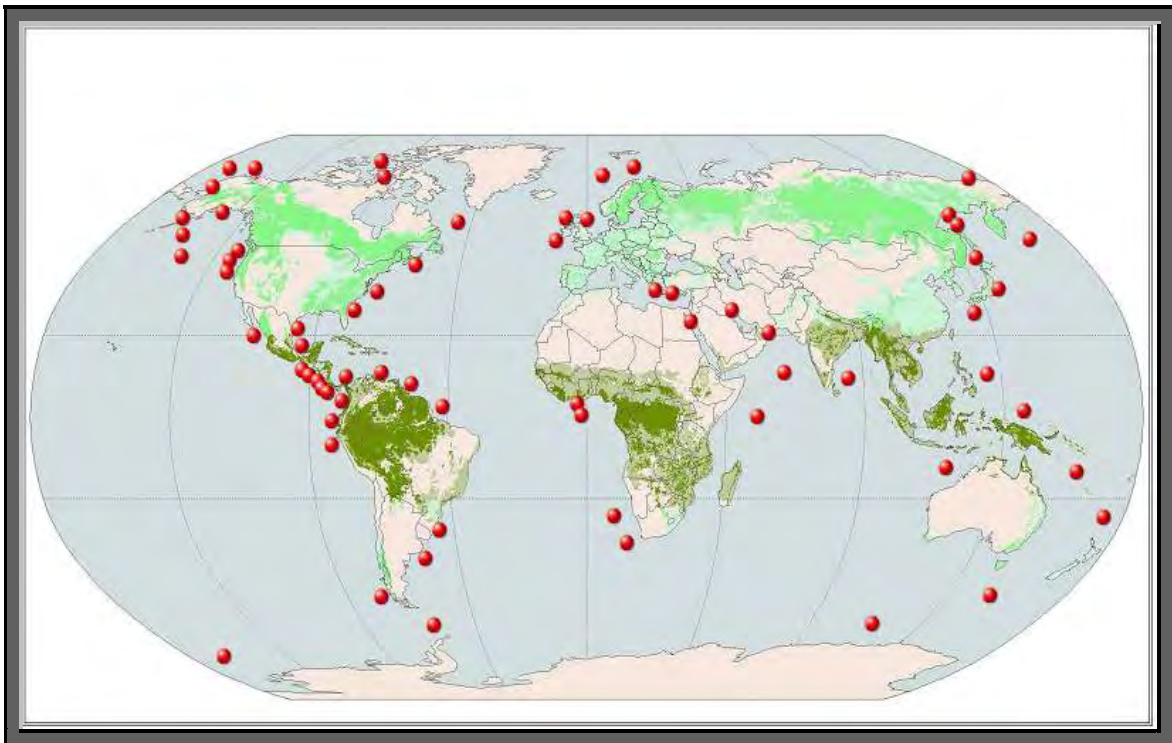
Πηγή: (<http://www.hydratech.bham.ac.uk/>)

1.2.2 Χωρική κατανομή μεθανοϋδριτών και η σημασία τους

Η πρώτη ανακάλυψη μεθανοϋδριτών έγινε στη περιοχή του Messoyakha στη Σιβηρία (Katz and Lee, 1990 ; Englezos, 1993 ; Makogon, 1997 ; Collett and Ginsberg, 1997 ; Max, 2000). Αυξημένο ενδιαφέρον για τον εντοπισμό GH's παρατηρήθηκε αφότου ανακαλύφθηκαν μεγάλες ποσότητες στις παράκτιες περιοχές της Αμερικής και της Ιαπωνίας σε βάθη μεταξύ 500 – 1000 m (Max, 2000).

Στις μέρες μας GH έχουν ανακαλυφθεί στους ωκεανούς σε ιζήματα σχεδόν κοντά σε κάθε ηπειρωτικό περιθώριο αλλά και σε αποστάσεις

μεγαλύτερες των 200 Km από τις ακτές σε βάθη αρκετές φορές μεγαλύτερα των 3000 m (Milkon, 2000). Επίσης GH έχουν βρεθεί σε περιοχές κάτω από την ηπειρωτική επιφάνεια οι οποίες είναι καλυμμένες με μόνιμο στρώμα πάγου (Makogon, 1997 ; Kvenvolden, 2000). Πάνω από 60 μεγάλα πεδία (Εικόνα. 3) έχουν ανακαλυφθεί σε θαλάσσια ιζήματα της Βόρειας Θάλασσας, του Αρκτικού ωκεανού και στον κόλπο του Μεξικού σε μεγάλα βάθη (900 m – 3000 m) (Makogon, 1997 ; Max, 2000). Οι περιοχές αυτές όμως αποτελούν ένα μικρό κομμάτι των GH που υπάρχουν παγκοσμίως.



Εικόνα 3. Παγκόσμια κατανομή μεθανοϋδριτών κυρίως σε θαλάσσια ιζήματα.

Πηγή: ([http://cas.bellarmine.edu/tietjen/ Environmental/Global%20Warming.htm](http://cas.bellarmine.edu/tietjen/Environmental/Global%20Warming.htm))

Η ραγδαία ανακάλυψη ολοένα και περισσότερων περιοχών που περιέχουν GH οφείλεται στην εξέλιξη της τεχνολογίας και των μέσων που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευσή τους. Η άμεση αποτίμηση των GH στα

ιζήματα χρησιμοποιώντας παραδοσιακές γεωλογικές τεχνικές όπως γεωτρήσεις, έχει αντικατασταθεί από σύγχρονες γεωφυσικές έμμεσες μεθόδους μία από τις οποίες είναι και η χρήση αισθητήρων της σεισμικής ανάκλασης (Lee et al., 1993 ; Dillon, 1994).

Οι λόγοι για τους οποίους η παγκόσμια επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει το ενδιαφέρον της στην ανίχνευση και μελέτη των GH είναι οι εξής:

α) οι κλιματικές επιπτώσεις που επιφέρει η έκλυση μεθανίου στην ατμόσφαιρα και

β) ότι οι μεθανουδρίτες αποτελούν τεράστιες ανεκμετάλλευτες πηγές ενέργειας.

Εκτιμάται ότι το μεθάνιο συμμετέχει στην υπερθέρμανση του πλανήτη κατά 15% (Badr, 1991). Για το λόγο αυτό η μείωση των πηγών εκπομπής αυτού του σημαντικού αέριου του θερμοκηπίου του οποίου η συγκέντρωση στην ατμόσφαιρα συνεχώς αυξάνεται επιβάλλεται. Ως μέρος του κύκλου του άνθρακα, τεράστιες ποσότητες μεθανίου υπάρχουν στα ωκεάνια ιζήματα σε μορφή μεθανουδριτών (GH). Οι ποσότητες αυτές εκτιμώνται περίπου στα 10^{10} - 10^{12} m³ CH₄ (Milkon, 2000). Παρόλα αυτά οι εκπομπές CH₄ από τους μεθανουδρίτες (GH) στην ατμόσφαιρα είναι ελάχιστες (περίπου 10 Tg year⁻¹) σε σύγκριση με τις ανθρωπογενείς εκπομπές (περίπου 350 Tg year⁻¹) (Wuebbles and Hayhoe, 2002). Αν και η εκπομπή CH₄ από τους GH είναι μικρή, αρκετοί επιστήμονες εκτιμούν ότι κατά τη διάρκεια ζωής της Γης έχουν γίνει αρκετά μεγάλες μαζικές εκπομπές CH₄ από τους GH με καταστροφικά αποτελέσματα για το κλίμα της Γης (Zachos et al., 1993 ; Dickens et al., 1995 ; Bice and Morotzke, 2002).

Ο Kvenvolden (1993) υπολόγισε ότι η ποσότητα CH₄ που είναι αποθηκευμένη στους GH στις ηπείρους και στους πυθμένες των ωκεανών ισούται κατά προσέγγιση 10¹⁶ Kg άνθρακα (Εικόνα. 4). Εάν η εκτίμηση αυτή είναι σωστή, τότε το ποσό του CH₄ που είναι αποθηκευμένο στους GH είναι περίπου δύο φορές περισσότερο από την ποσότητα άνθρακα που περιέχουν τα μέχρι σήμερα γνωστά αποθέματα φυσικών καυσίμων παγκοσμίως.

Άξια προσοχής επίσης είναι και η εργασία των Dickens et al. 1997, οι οποίοι διατύπωσαν ότι η ποσότητα του CH₄ η που είναι αποθηκευμένη σε μορφή GH στην τοποθεσία Blake Ridge στα παράλια ανοιχτά της Carolina (ΗΠΑ), θα παρείχε αρκετό αέριο ώστε να στηρίξει την κατανάλωση ηλεκτρικού ρεύματος των Ηνωμένων Πολιτειών σε επίπεδα κατανάλωσης της χρονιάς 1996 για 105 χρόνια. Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι είναι αναγκαία η απογραφή και η ποσοτικοποίηση των GH παγκοσμίως, εγχείρημα δύσκολο παρόλο την αλματώδη εξέλιξη της τεχνολογίας.



Εικόνα 4. Κατανομή του παγκόσμιου οργανικού άνθρακα σε μονάδες της τάξης των 10^{12} Kg άνθρακα (στις άλλες πηγές περιλαμβάνεται το ποσοστό άνθρακα στην ατμόσφαιρα, στη θαλάσσια βιομάζα και στη οργανική ύλη ιζημάτων με μεγέθη 3.6, 3 και 60% αντιστοίχως) (Kvenvolden, 1993).

1.3 Αναερόβια οξείδωση του μεθανίου σε ιζήματα μεθανοϋδριτών

Η αναερόβια οξείδωση του μεθανίου (AOM) είναι η διαδικασία μέσω της οποίας ελέγχονται αποτελεσματικά οι εκπομπές μεθανίου στην ατμόσφαιρα από πληθώρα αναερόβιων περιβαλλόντων. Το γεγονός αυτό την καθιστά υψίστης σημασίας διεργασία για τη ρύθμιση των εκπομπών μεθανίου σε παγκόσμια κλίμακα (Alperin and Reeburgh, 1985 ; Reeburgh, 1989)

Οι μεθανότροφες και μεθανογόνες μικροβιακές κοινότητες στα υδάτινα οικοσυστήματα κατέχουν σημαντικό ρόλο στον βιοχημικό κύκλο του μεθανίου. Η πρώτη γεωχημική απόδειξη της AOM προήλθε από την παρατήρηση της

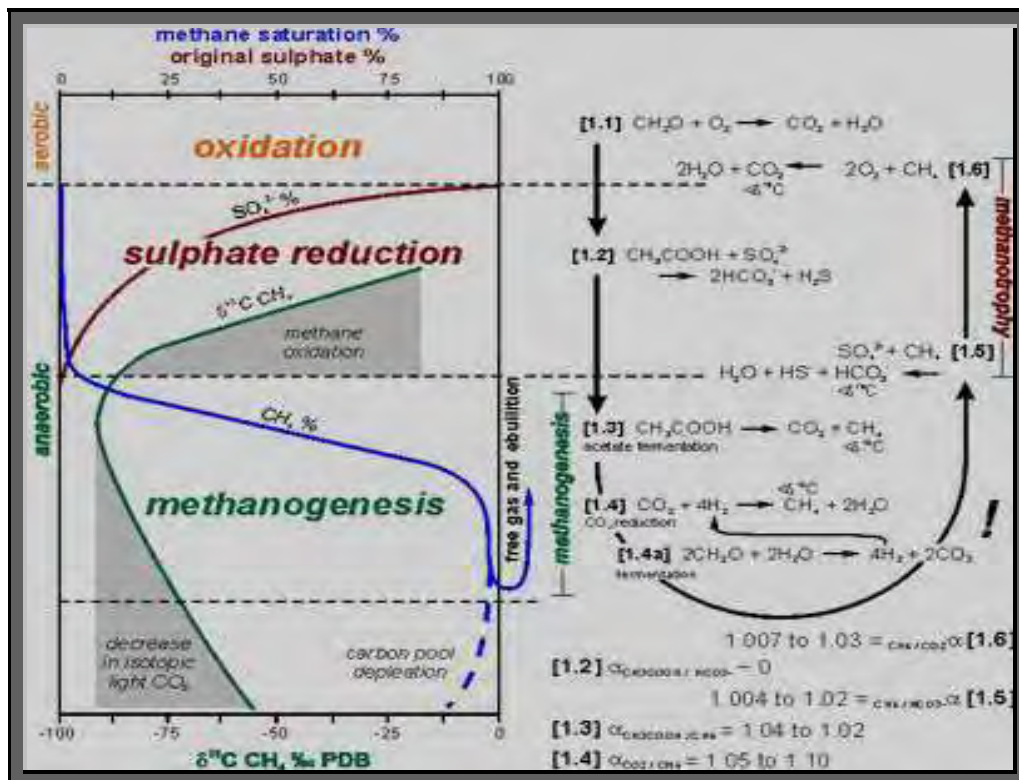
αυξημένης συγκέντρωσης μεθανίου σε ανοξικά ιζήματα πλούσια σε οργανική ύλη (Barnes and Goldberg, 1976 ; Reeburgh, 1976 ; Martens and Berner, 1977). Πληθώρα μελετών επιβεβαιώνουν ότι το μεθάνιο οξειδώνεται αναερόβια στα ιζήματα, ειδικά σε ιζήματα πλούσια σε μεθάνιο σε συνδυασμό με την ύπαρξη μεθανοϋδριτών και αναβλύσεων μεθανίου (Reeburgh et al., 1991 ; Hinrichs and Boetius, 2002).

Οι Zehnder και Brock (1979,1980) πρότειναν για πρώτη φορά ότι η AOM επιτελείται από συνδυασμό διαφορετικών προκαρυωτικών ομάδων. Σήμερα υπάρχουν αρκετές αποδείξεις (βιοδείκτες) ότι η AOM επιτελείται από μέθανο-οξειδωτικά Archaea και θειικό αναγωγικά βακτήρια (Hinrichs et al., 1999 ; Boetius et al., 2000 ; Pancost et al., 2000 ; Michaelis et al., 2002). Παρόλα αυτά μερικά μεθανότροφα Archaea ίσως να οξειδώνουν το μεθάνιο χωρίς την συνεργασία βακτηρίων (Valentine, 2002).

Γενικά στα ιζήματα παρατηρείται ζωνική διαβάθμιση όσων αφορά τα στάδια της AOM τα οποία όμως δεν είναι πάντοτε εύκολα διαχωρίσιμα. Στα βαθύτερα στρώματα λαμβάνει χώρα η ζώνη της μεθανογένεσης, κατά την οποία παράγεται μεθάνιο από μεθανογόνα Archaea κυρίως. Στο αμέσως επόμενο στρώμα άνωθεν της ζώνης της μεθανογένεσης, λαμβάνει χώρα η μεταβατική ζώνη σε άμεση γειτονία με την προηγούμενη, στην οποία η παροχή του μεθανίου από τα κατώτερα στρώματα και η παροχή του θείου από τα ανώτερα στρώματα εξισορροπούνται (Borowski et al., 1996). Καθώς το μεθάνιο διαχέεται από τα βαθύτερα στρώματα των ιζημάτων προς τα ανώτερα στρώματα οξειδώνεται υπό αναερόβιες συνθήκες και διασπάται σε διοξείδιο του άνθρακα

και νερό χάρη στη συμβολή Archaea και θειικό – αναγωγικών βακτηρίων σύμφωνα με την εξής χημική αντίδραση:

$SO_4^{2-} + CH_4 \rightarrow HCO_3^- + HS^- + H_2O$ (Boetius et al., 2000 ; Orphan et al., 2001, 2002). Η μεταβατική ζώνη μπορεί να υπάρχει είτε στα ανώτερα μερικά εκατοστά των ιζημάτων (Martens and Berner, 1977 ; Martens et al., 1999; Boetius et al., 2000) είτε σε μεγαλύτερα βάθη (δεκάδες μέτρα) (Borowski et al., 2000 ; D'Hondt et al., 2002). Οι προαναφερόμενες διεργασίες κατά την AOM καθώς και η ζωνοποίηση που επικρατεί στα ιζήματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 5 όπου απεικονίζεται ο κύκλος του άνθρακα στα ιζήματα αποτελώντας τον πληρέστερο τρόπο περιγραφής των σταδίων που ακολουθεί η AOM.



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση της στρωματοποίησης των ιζημάτων καθώς και των επιμέρους σταδίων του κύκλου του άνθρακα σε αυτά.
Πηγή:(www.ifm-geomar.de)

Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο την ανίχνευση λειτουργικών γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην αναερόβια οξειδωση του μεθανίου σε ιζήματα μεθανοϋδριτών. Συγκεκριμένα γίνεται προσπάθεια για την ανίχνευση των γονιδίων της σωματιδιακής μονο – οξυγενάσης A μεθανίου, (particulate methane monooxygenase, *pmoA*), της διαλυμένης μονο – οξυγενάσης X μεθανίου (soluble methane monooxygenase, *mmoX*), και της δεϋδρογενάσης F της μεθανόλης (methanol dehydrogenase, *mxaF*) τα οποία συνήθως απαντώνται στα ανώτερα στρώματα των ιζημάτων. Επίσης γίνεται προσπάθεια προς ανίχνευση και των γονιδίων της μη αφομοιωτικής αναγωγής A θειωδών (dissimilatory sulfite reductase, *drsA*) και της αναγωγής A του μέθυλο – συνένζυμου M (methyl coenzyme M reductase, *mcrA*) τα οποία απαντώνται συνήθως στη μεταβατική ζώνη, με το δεύτερο να κατέχει κυρίαρχο ρόλο στη ζώνη της μεθανογένεσης.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δειγματοληψία

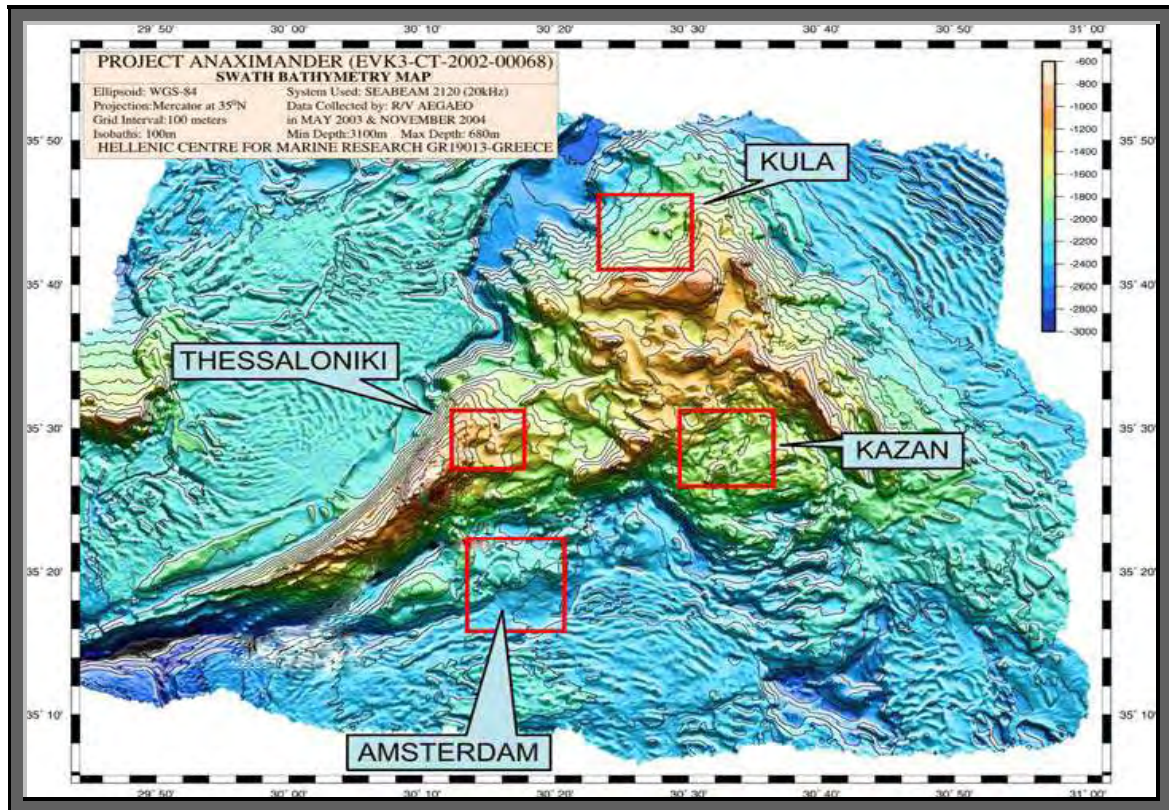
Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στην θαλάσσια περιοχή Νότιο Ανατολικά της νήσου Καστελλόριζο (Εικόνα. 6), συγκεκριμένα στα υποθαλάσσια όρη του Αναξίμανδρου, 75 ναυτικά μίλια νότια της Αττάλειας στα Τουρκικά παράλια, τον Οκτώβριο/Νοέμβριο 2004 με το ωκεανογραφικό σκάφος “ΑΙΓΑΙΟ” του ΕΛΚΕΘΕ.



Εικόνα 6.Περιοχή δειγματοληψίας (Google earth)

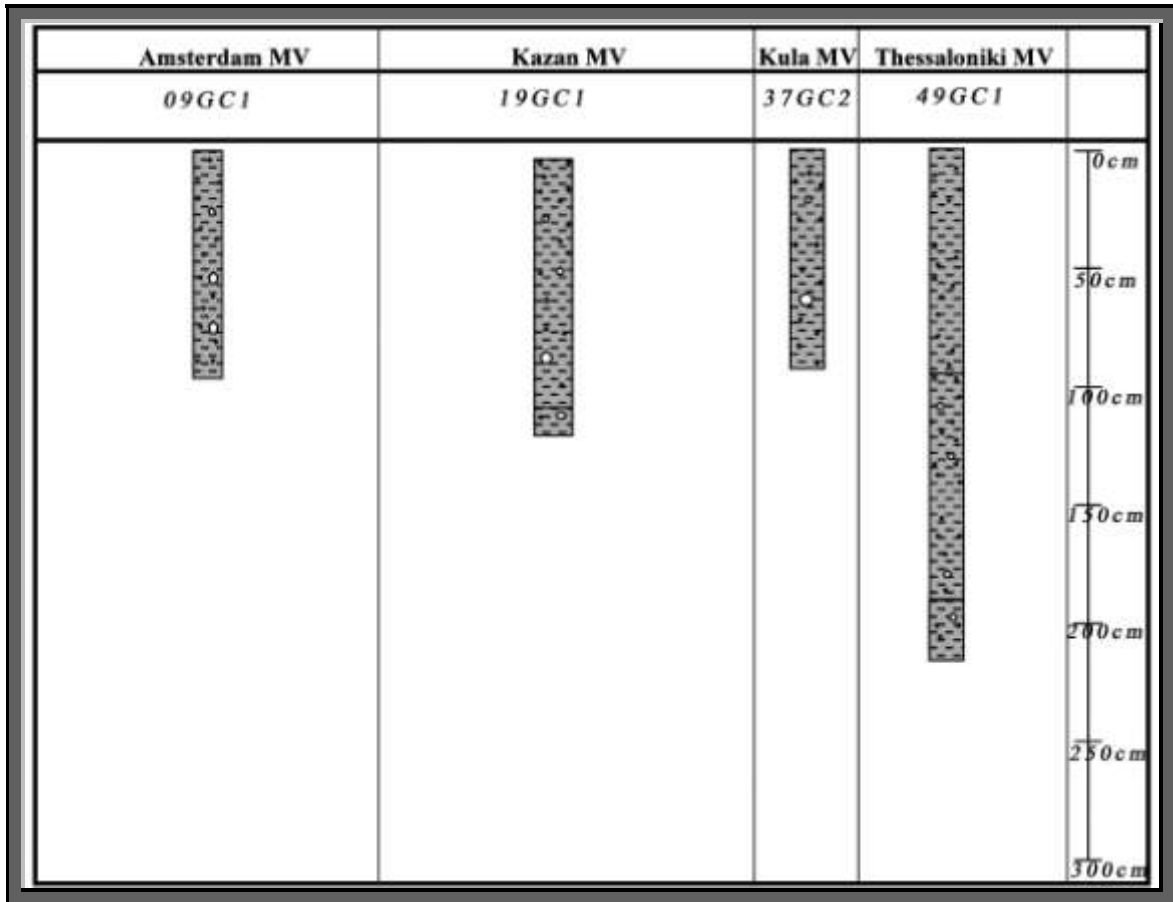
Συνολικά ελήφθησαν τέσσερις πυρήνες πυθμενικού ιζήματος, ένας για κάθε προαναφερόμενο υποθαλάσσιο ηφαίστειο ιλύος από την τοποθεσία των υποθαλάσσιων ορέων Αναξίμανδρος. Αναλυτικότερα, ένας πυρήνας ελήφθει

από το υποθαλάσσιο ηφαίστειο Amsterdam μέχρι το βάθος των 94 cm από την επιφάνεια του πυθμένα και η προσπάθεια ανίχνευσης των εξεταζόμενων λειτουργικών γονιδίων επικεντρώθηκε στα βάθη των 94 cm, 60 cm, 30 cm και 1 cm από την επιφάνεια του πυθμένα. Ένας πυρήνας ελήφθει από το υποθαλάσσιο ηφαίστειο Thessaloniki μέχρι το βάθος των 225 cm από την επιφάνεια του πυθμένα και η ανάλυση της ανίχνευσης έγινε σε πέντε τμήματά του με βάθη 225 cm, 180 cm, 120 cm, 60 cm και 5 cm αντιστοίχως. Επίσης ελήφθει πυρήνας από το υποθαλάσσιο ηφαίστειο Kazan μέχρι το βάθος των 108 cm από την επιφάνεια του πυθμένα ο οποίος και αναλύθηκε για τα βάθη των 108 cm, 65 cm, 30 cm και 1 cm. Τέλος ένας πυρήνας ελήφθει από το υποθαλάσσιο ηφαίστειο Kula μέχρι το βάθος των 75 cm από την επιφάνεια του πυθμένα, ακολουθώντας η ανάλυσή του για τα βάθη των 75 cm, 55 cm, 19 cm και 1 cm αντιστοίχως. Η βυθομετρία της περιοχής δειγματοληψίας καθώς και των προς εξέταση υποθαλάσσιων ηφαιστείων ιλύος Amsterdam, Kula, Kazan και Thessaloniki απεικονίζεται στην Εικόνα 7.



Εικόνα 7. Βαθυμετρικός χάρτης της περιοχής του Αναξίμανδρου καθώς και των υπό μελέτη υποθαλάσσιων ηφαιστείων ιλύος. Πηγή: <http://www.igme.gr/anaximander>

Αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα δείγματα που ελήφθησαν περιείχαν μεθανοϋδρίτες, η χωρική κατανομή των οποίων καθώς και το μέγεθός τους παρουσιάζονται στην Εικόνα 8.



Εικόνα 8. Μορφολογική απεικόνιση των πυρήνων δειγματοληψίας για κάθε ένα ηφαίστειο (τα άσπρα στίγματα αντιστοιχούν στους μεθανοϋδρίτες που περιέχονται στους πυρήνες).

Πηγή: <http://www.igme.gr/anaximander>

Οι ακριβείς συντεταγμένες των τεσσάρων υποθαλάσσιων ηφαιστείων, το μέγιστο βάθος τους καθώς και τα διαφορετικά βάθη στα οποία πραγματοποιήθηκε η ανάλυση των αντίστοιχων πυρήνων αναγράφονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Γενικά στοιχεία των τεσσάρων υποθαλάσσιων ηφαιστείων.

<i>Όνομα Ηφαιστείου</i>	<i>Κωδικός Πορήνα</i>	<i>Μέγιστο Βάθος ηφαιστείων</i>	<i>Βάθος ανάλυσης από την επιφάνεια του πυθμένα</i>	<i>Γεωγραφικές Συντεταγμένες</i>
<i>Amsterdam M.V.</i>	AX09GC01	2022 m	1 cm 30 cm 60 cm 94 cm	Γ.Π: 35 ⁰ 19.999 B Γ.Μ: 30 ⁰ 16.449 A
<i>Thessaloniki M.V.</i>	AX49GC01	1264 m	5 cm 60 cm 120 cm 180 cm 225 cm	Γ.Π: 35 ⁰ 28.728 B Γ.Μ: 30 ⁰ 15.060 A
<i>Kazan M.V.</i>	AX19GC01	1694 m	1 cm 30 cm 65 cm 108 cm	Γ.Π: 35 ⁰ 25.912 B Γ.Μ: 30 ⁰ 33.691 A
<i>Kula M.V.</i>	AX37GC02	1641 m	1 cm 19 cm 55 cm 75 cm	Γ.Π: 35 ⁰ 43.715 B Γ.Μ: 30 ⁰ 27.587 A

Τα δείγματα αμέσως μετά την συλλογή τους τοποθετήθηκαν στους $- 0^{\circ}$ C και μετά την επιστροφή στο εργαστήριο στους $- 80^{\circ}$ C.

2.2 Απομόνωση του DNA

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε το Ultra Clean Soil DNA Kit (Mobio, USA) σύμφωνα με της υποδείξεις του κατασκευαστή. Η ποσότητα του ιζήματος που πάρθηκε από τα διαφορετικά βάθη των τεσσάρων αρχικών πυρήνων προς απομόνωση αναγράφονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Ποσότητα ιζημάτων προς απομόνωση του DNA.

<i>Κωδικός δείγματος</i>	<i>Βάθος ιζήματος</i>	<i>Ποσότητα ιζήματος προς απομόνωση DNA</i>
<i>AX09GC01</i>	1 cm	0.947 g
	30 cm	0.981 g
	60 cm	0.897 g
	94 cm	1.005 g
<i>AX49GC01</i>	5 cm	0.925 g
	60 cm	0.850 g
	120 cm	0.912 g
	180 cm	0.979 g
	225 cm	0.922 g
<i>AX19GC01</i>	1 cm	0.965 g
	30 cm	0.967 g
	65 cm	0.885 g
	108 cm	0.992 g
<i>AX37GC02</i>	1 cm	0.957 g
	19 cm	1.010 g
	55 cm	0.951 g
	75 cm	0.850 g

Μετά το πέρας της απομόνωσης το πλέον απομονωμένο DNA φυλάχτηκε για μελλοντική χρήση στους -24°C .

2.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης *PCR* πραγματοποιήθηκε με την χρήση του θερμοκυκλοποιητή PTC – 200 DNA Engine Cycle, (MJ Research, U.K). Εκτελέστηκαν πέντε διαφορετικές αντιδράσεις *PCR* μία για κάθε ένα από τα παρακάτω λειτουργικά γονίδια, *mcrA*, *dsrA*, *pmoA*, *mmoX* και *mxaF*. Η αναλογία των αντιδραστηρίων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στο μίγμα της *PCR* αναγράφονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Αντιδραστήρια και αναλογίες του μίγματος PCR.

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Ποσότητα για ένα δείγμα</i>	<i>Αρχικές Συγκεντρώσεις Αντιδραστηρίων</i>
<i>Νερό PCR</i>	29,8 μl	
<i>Buffer</i>	10 μl	5X
<i>DNTPs</i>	5 μl	2mM
<i>MgCl₂</i>	3 μl	25mM
<i>Εκκινητής 5' - 3'</i>	0,5 μl	100 pmol/μl
<i>Εκκινητής 3' - 5'</i>	0,5 μl	100 pmol/μl
<i>Taq πολυμεράση</i>	0.2 μl	5u/μl
<i>DNA</i>	1 μl	
Σύνολο	50 μl	

Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων πολλαπλασιάστηκαν κάθε φορά επί τον αντίστοιχο αριθμό των δειγμάτων τα οποία παρασκευάστηκαν για την PCR. Τα προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε λειτουργικό γονίδιο στον θερμοκυκλοποιητή, αναγράφονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή για το κάθε γονίδιο.

Λειτουργικό γονίδιο	Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή			Αναφορά
<i>mcrA</i>	Προ- PCR	94 °C /1:00 min		Hales et al. (1996)
	38 κύκλοι*	94 °C /0:40 min	Αποδιάταξη	
		50 °C /1:30 min	Ισχυροποίηση	
		72 °C /3:00 min	Επιμήκυνση	
	Τελική επιμήκυνση	72 °C /10:00 min		
Μετά - PCR	10 °C / 60:00 min			
<i>drsA</i>	Προ- PCR	94 °C /1:00 min		Dhillon et al. (2003)
	35 κύκλοι*	94 °C /1:00 min	Αποδιάταξη	
		54 °C /1:00 min	Ισχυροποίηση	
		72 °C /3:00 min	Επιμήκυνση	
	Τελική επιμήκυνση	72 °C /10:00 min		
Μετά - PCR	10 °C / 60:00 min			
<i>pmoA</i>	Προ- PCR	94 °C /2:00 min		Inagaki et al. (2004)
	38 κύκλοι	96 °C /0:30 min	Αποδιάταξη	
		47 °C /0:40 min	Ισχυροποίηση	
		72 °C /0:50 min	Επιμήκυνση	
	Τελική επιμήκυνση	72 °C /10:00 min		
Μετά - PCR	10 °C / 60:00 min			
<i>mmoX</i>	Προ- PCR	94 °C /2:00 min		Inagaki et al. (2004)
	38 κύκλοι	96 °C /0:30 min	Αποδιάταξη	
		47 °C /0:40 min	Ισχυροποίηση	
		72 °C /0:50 min	Επιμήκυνση	
	Τελική επιμήκυνση	72 °C /10:00 min		
Μετά - PCR	10 °C / 60:00 min			
<i>mxaF</i>	Προ- PCR	94 °C /2:00 min		Inagaki et al. (2004)
	38 κύκλοι	96 °C /0:30 min	Αποδιάταξη	
		50 °C /0:40 min	Ισχυροποίηση	
		72 °C /0:50 min	Επιμήκυνση	
	Τελική επιμήκυνση	72 °C /10:00 min		
Μετά - PCR	10 °C / 60:00 min			

* : Στην εργασία των Dhillon et al. (2003),όπως και στην εργασία των Hales et al. (1996) χρησιμοποιήθηκαν 30 κύκλοι στον θερμοκυκλοποιητή.

Επίσης, οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν με συγκεκριμένα ζεύγη εκκινητών εξειδικευμένα για το κάθε λειτουργικό γονίδιο. Τα ζεύγη αυτά

(συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων) (*Primers*) αναγράφονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Ζεύγη εκκινητών (*Primers*) για το κάθε γονίδιο.

<i>Λειτουργικά Γονίδια</i>	<i>Εκκινητές</i>	<i>Αλληλουχία νουκλεοτιδίων*</i>	<i>Αναφορά</i>
<i>mcrA</i> <i>Methyl coenzyme M reductase</i>	ME1f ME2r	5'-GCMATGTCARATHGGWATGTC-3' 5'-TCATKGCRTAGTTGDGRTAGT-3'	Inagaki et al. (2004)
<i>dsrA</i> <i>Dissimilatory sulfite reductase</i>	DSR1f DRS4r 1FI 1R1	5'-ACSCACTGGAAGCACG-3' 5'-GTGTAGCAGTTACCGCA-3' 5'-CAGGAYGARCTKCACCG-3' 5'-CCCTGGGTRTGRAYRAT-3'	Dhillon et al. (2003)
<i>pmoA</i> <i>Particulate methane monoxygenase</i>	A189f A682r	5'-GGNGACTGGGACTTCTGG-3' 5'-GAASGCNGAGAAGAASGC-3'	Inagaki et al. (2004)
<i>mmoX</i> <i>Solube methane monoxygenase</i>	mmo882f mmo1403r	5'-GGCTCCAAGTTCAAGGTCGAGC-3' 5'-TGGCACTCGTAGCGCTCCGGCTCG-3'	Inagaki et al. (2004)
<i>mxoF</i> <i>Methanol dehydrogenase</i>	mxo1003f mxo1561r	5'-GCGGCACCAACTGGGGCTGGT-3' 5'-GGCCAGCATGAAGGGCTCCC-3'	Inagaki et al. (2004)

*: D = A, T, ή G; H = A, T, ή C; K= T ή G; N = A, T, C, ή G; M = C ή A; R = A ή G; S = G ή C; W = A ή T; Y= C ή T.

Για το λειτουργικό γονίδιο *dsrA* χρησιμοποιήθηκαν και εσωτερικοί εκκινητές (1FI, 1R1) διότι στα προς εξέταση δείγματα πιθανότατα υπήρχε το συγκεκριμένο γονίδιο αλλά σε μικρή συγκέντρωση, καθιστώντας το αδύνατο να φανεί στο πήκτωμα αγαρόζης κατά την ηλεκτροφόρησή του. Για τον λόγο αυτό μετά την πρώτη PCR ακολούθησε και δεύτερη (Nested PCR) χρησιμοποιώντας τους προαναφερμένους εσωτερικούς εκκινητές η χρήση των οποίων επιτρέπει την ανίχνευση και την ενίσχυση μικρότερου τμήματος της αλληλουχίας του γονιδίου.

Έπειτα ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2% σε διάλυμα TAE 1x και σε συνθήκες 67 V για 45 min. Για όλες τις ηλεκτροφορήσεις χρησιμοποιήθηκε αρνητικός μάρτυρας ο οποίος δεν εμφάνισε ζώνη σε καμία περίπτωση. Με αυτό τον τρόπο η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της PCR αυξάνεται, καθιστώντας αβάσιμη την υπόθεση ότι τα αποτελέσματα οφείλονται σε τυχόν μόλυνση των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν. Μετά την ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε η χρώση σε βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) και η παρατήρηση υπό υπεριώδες φως.

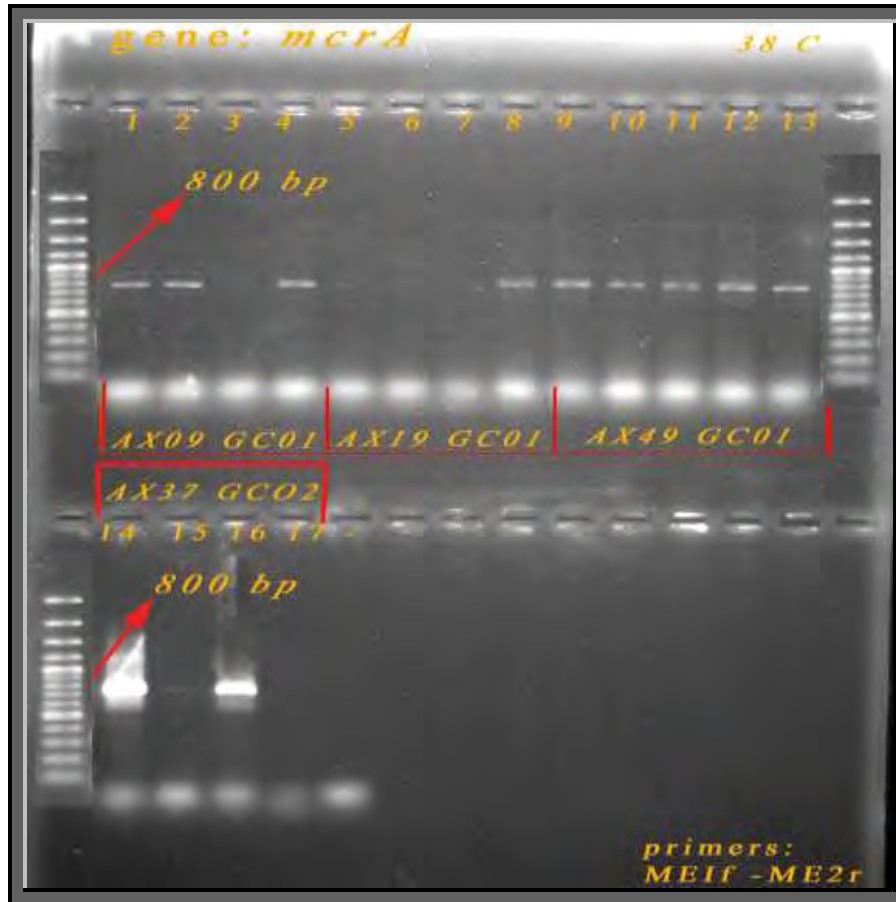
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα λειτουργικά γονίδια που ανιχνεύθηκαν σε κάθε υποθαλάσσιο ηφαιστειο ιλύος καθώς και το βάθος ανίχνευσής τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Κατανομή των λειτουργικών γονιδίων στα διαφορετικά βάθη δειγματοληψίας των υποθαλάσσιων ηφαιστειών ιλύος.

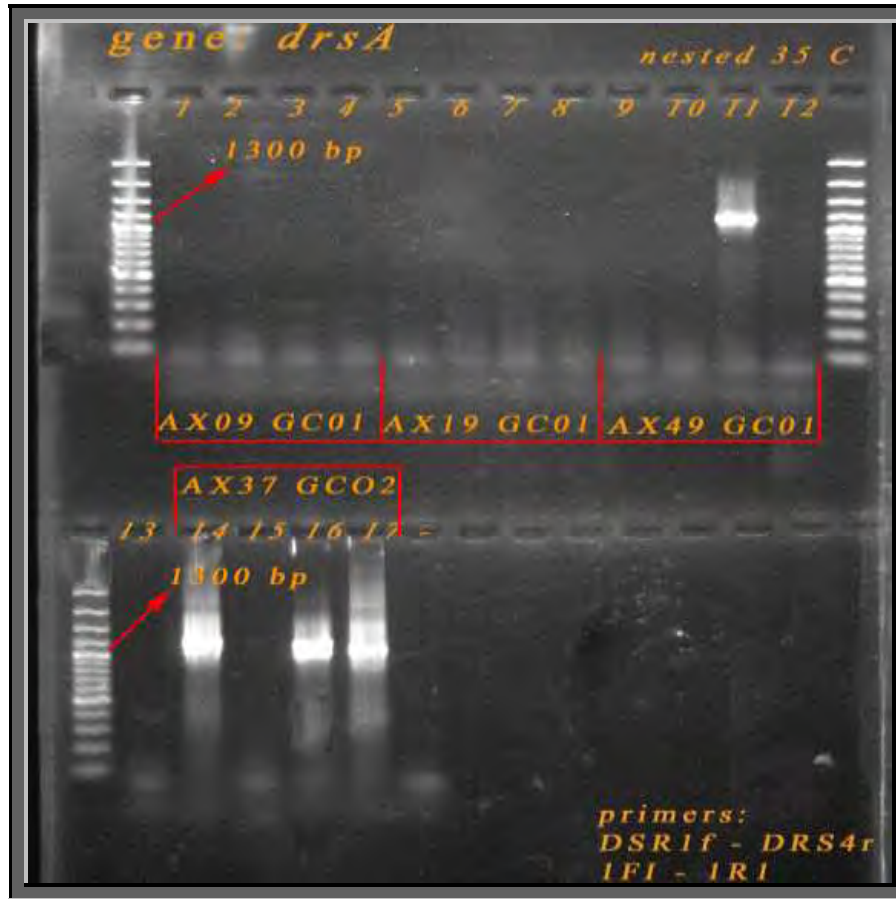
Υποθαλάσσια ηφαιστεια	Βάθος δειγμάτων	<i>mcrA</i>	<i>dsrA</i>	<i>rhoA</i>	<i>mmoX</i>	<i>mxaF</i>
Amsterdam M.V.	1 cm	+	-	-	-	-
	30 cm	-	-	-	-	-
	60 cm	+	-	-	-	-
	94 cm	+	-	-	-	-
Kazan M.V.	1 cm	+	-	-	-	-
	30 cm	-	-	-	-	-
	65 cm	-	-	-	-	-
	108 cm	-	-	-	-	-
Thessaloniki M.V.	5 cm	+	-	-	-	-
	60 cm	+	-	-	-	-
	120 cm	+	+	-	-	-
	180 cm	+	-	-	-	-
	225 cm	+	-	-	-	-
Kula M.V.	1 cm	-	+	-	-	-
	19 cm	+	+	-	-	-
	55 cm	-	-	-	-	-
	75 cm	+	+	-	-	-

Μετά το πέρας της PCR των προς ανίχνευση λειτουργικών γονιδίων, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, της οποίας τα αποτελέσματα για κάθε ένα λειτουργικό γονίδιο παρατίθενται στις επόμενες εικόνες.



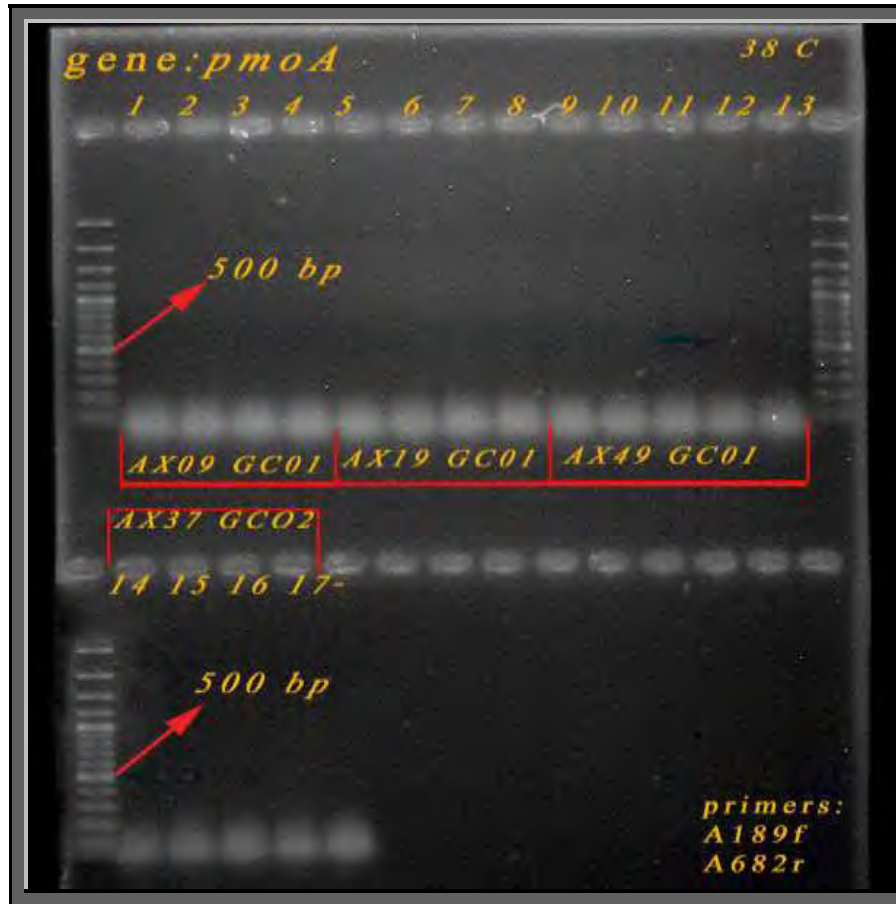
Εικόνα 9. Φωτογραφία ηλεκτροφόρησης υπό συνθήκες φωτισμού UV των προϊόντων PCR του λειτουργικού γονιδίου *mcrA*. Διαδρομές 1-4 : Amsterdam 94, 60, 30 και 1 cm αντιστοίχως. Διαδρομές 5-8 : Kazan 108, 65, 30 και 1 cm αντιστοίχως. Διαδρομές 9-13 : Thessaloniki 225 180, 120, 60 και 1 cm αντιστοίχως. Διαδρομές 14-17 : Kula 75, 55, 19 και 1 cm αντιστοίχως. Διαδρομή - : Αρνητικός μάρτυρας

Οι ζώνες που πάρθηκαν είχαν όλες μέγεθος 800 περίπου βάσεων, πράγμα το οποίο υποδηλώνει ότι όντως το γονίδιο που ανιχνεύθηκε είναι το *mcrA* διότι το μέγεθος της αλληλουχίας του συγκεκριμένου γονιδίου είναι της τάξης των 768 βάσεων.



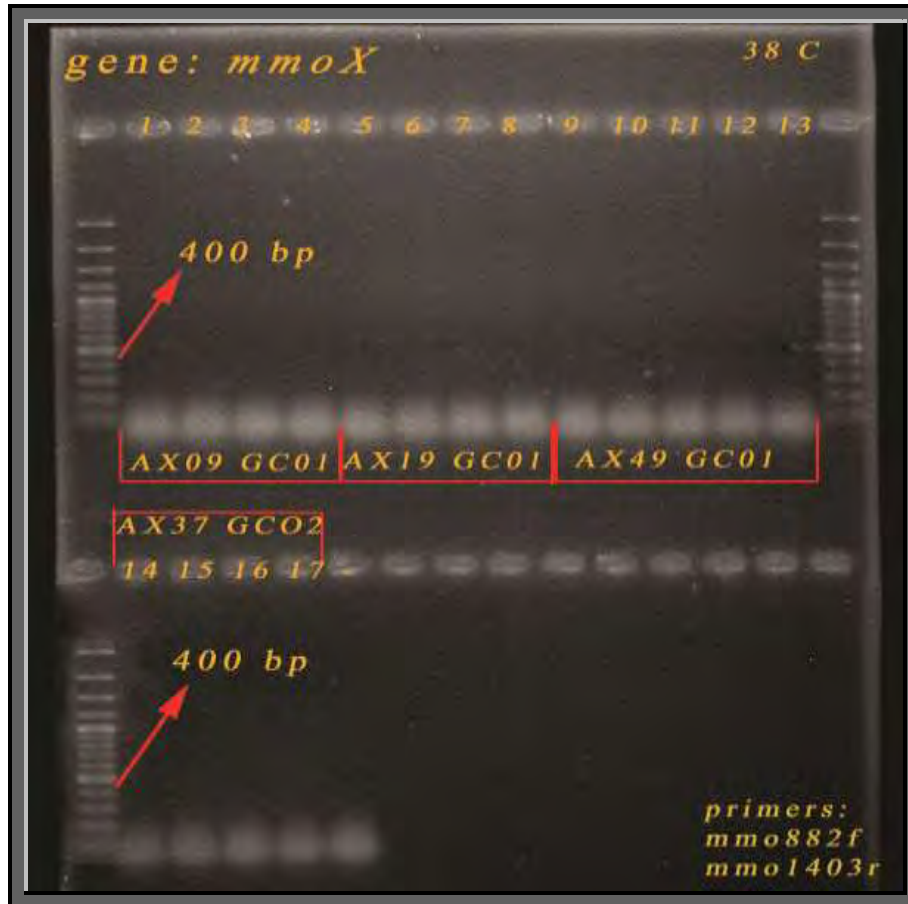
Εικόνα 10. Φωτογραφία ηλεκτροφόρησης υπό συνθήκες φωτισμού UV των προϊόντων PCR του λειτουργικού γονιδίου *dsrA*. Διαδρομές 1-4 : Amsterdam 94, 60, 30 και 1 cm αντιστοίχως. Διαδρομές 5-8 : Kazan 108, 65, 30 και 1 cm αντιστοίχως. Διαδρομές 9-13 : Thessaloniki 225, 180, 120, 60 και 1 cm αντιστοίχως. Διαδρομές 14-17: Kula 75, 55, 19 και 1 cm αντιστοίχως. Διαδρομή - : Αρνητικός μάρτυρας

Οι ζώνες που πάρθηκαν είχαν όλες μέγεθος 1300 βάσεων περίπου, πράγμα το οποίο υποδηλώνει ότι όντως το γονίδιο που ανιχνεύθηκε είναι το *dsrA*.



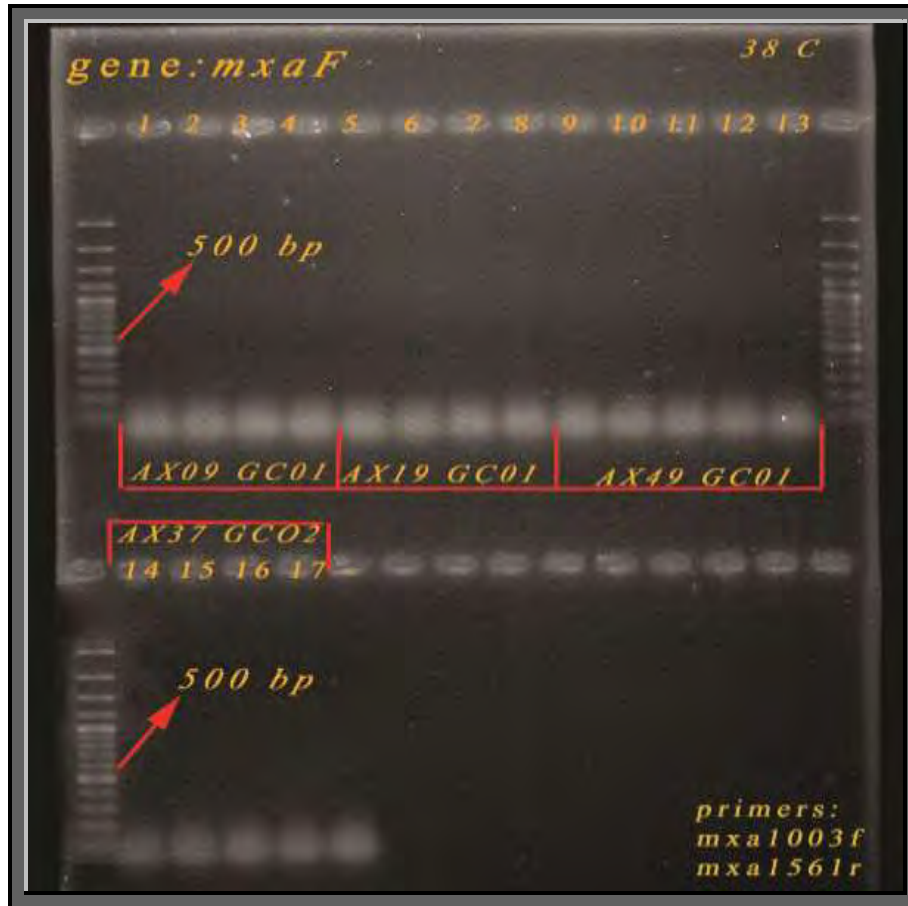
Εικόνα 11. Φωτογραφία ηλεκτροφόρησης υπό συνθήκες φωτισμού UV των προϊόντων PCR του λειτουργικού γονιδίου *pmoA*. Διαδρομές 1-4 : Amsterdam 94, 60, 30 και 1 cm αντιστοίχως. Διαδρομές 5-8 : Kazan 108, 65, 30 και 1 cm αντιστοίχως. Διαδρομές 9-13 : Thessaloniki 225, 180, 120, 60 και 1 cm αντιστοίχως. Διαδρομές 14-17 : Kula 75, 55, 19 και 1 cm αντιστοίχως. Διαδρομή - : Αρνητικός μάρτυρας

Δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση του γονιδίου *pmoA* διότι καμία ζώνη δεν εμφανίστηκε στο μέγεθος των 530 βάσεων περίπου, όπως αναμενόταν.



Εικόνα 12. Φωτογραφία ηλεκτροφόρησης υπό συνθήκες φωτισμού UV των προϊόντων PCR του λειτουργικού γονιδίου *mmoX*. Διαδρομές 1-4 : Amsterdam 94, 60, 30 και 1 cm αντιστοίχως. Διαδρομές 5-8 : Kazan 108, 65, 30 και 1 cm αντιστοίχως. Διαδρομές 9-13 : Thessaloniki 225, 180, 120, 60 και 1 cm αντιστοίχως. Διαδρομές 14-17 : Kula 75, 55, 19 και 1 cm αντιστοίχως. Διαδρομή - : Αρνητικός μάρτυρας

Όπως για το γονίδιο *rhoA* έτσι και για το γονίδιο *mmoX* δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση του διότι καμία ζώνη δεν εμφανίστηκε στο μέγεθος των 450 βάσεων περίπου, όπως αναμενόταν.



Εικόνα 13. Φωτογραφία ηλεκτροφόρησης υπό συνθήκες φωτισμού UV των προϊόντων PCR του λειτουργικού γονιδίου *mxaF*. Διαδρομές 1-4 : Amsterdam 94, 60, 30 και 1 cm αντιστοίχως. Διαδρομές 5-8 : Kazan 108, 65, 30 και 1 cm αντιστοίχως. Διαδρομές 9-13 : Thessaloniki 225, 180, 120, 60 και 1 cm αντιστοίχως. Διαδρομές 14- 17 : Kula 75, 55, 19 και 1 cm αντιστοίχως. Διαδρομή - : Αρνητικός μάρτυρας

Ούτε το γονίδιο *mxaF* ανιχνεύθηκε, μη έχοντας τη δυνατότητα εμφάνισης ζωνών στις 550 βάσεις κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR του.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια ανίχνευσης των λειτουργικών γονιδίων *mcrA*, *dsrA*, *pmoA*, *mmoX* και *mxaF* σε ιζήματα μεθανοϋδριτών, με τα δύο πρώτα να εμπλέκονται κυρίως στην αναερόβια και τα υπόλοιπα τρία να κατέχουν εξέχουσα θέση στην αερόβια οξειδωση του μεθανίου. Τα ιζήματα ελήφθησαν με χρήση πυρήνων βαρύτητας από την ευρύτερη περιοχή του Αναξιμανδρου και συγκεκριμένα από τα υποθαλάσσια ηφαίστεια ιλύος Amsterdam, Kula, Kazan και Thessaloniki. Το αποτέλεσμα της όλης προσπάθειας αποτυπώθηκε στον προαναφερόμενο Πίνακα 6 στον οποίο αναγράφονται τα βάθη στα οποία κατέστη δυνατή η ανίχνευση των λειτουργικών γονιδίων σε κάθε ένα από τα υποθαλάσσια ηφαίστεια.

Στο υποθαλάσσιο ηφαίστριο Amsterdam το γονίδιο *mcrA* ανιχνεύθηκε και ενισχύθηκε επιτυχώς μέσω της διεργασίας της PCR για τα βάθη των 94 cm, 60 cm και 1 cm από την επιφάνεια του πυθμένα, χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές (ME1f, ME2r) για την ανίχνευσή του και συγκεκριμένα για το τμήμα του όπερον που κωδικοποιεί την α υποομάδα του ενζύμου MCR (Springer et al., 1995 ; Hales et al., 1996 ; Luton et al., 2002). Το γονίδιο *mcrA* απαντάται σχεδόν σε όλους τους μεθανογόνους οργανισμούς (Galandet al., 2002) οι οποίοι κατά την πλειοψηφία τους ανήκουν στην επικράτεια των Archaea. Αυτό το καθιστά ως διαγνωστικό παράγοντα της μεθανογένεσης στα ιζήματα (Reeve et al., 1997 ; Thauer, 1998 ; Ferry, 1999 ; Lueders et al., 2001 ; Luton et al., 2002). Συγκεκριμένα, το γονίδιο *mcrA* κωδικοποιεί την υποομάδα α του ενζύμου MCR το οποίο καταλύει το τελευταίο στάδιο της μεθανογένεσης (Luton et al., 2002 ; Martens et al., 1999). Κατά το στάδιο αυτό μία μέθυλο ομάδα δεσμεύεται

από το συνένζυμο M και ανάγεται, παράγοντας μεθάνιο ως τελικό προϊόν της αντίδρασης. Η αυξημένη ποσότητα μεθανίου γίνεται περισσότερο αντιληπτή από την παρατήρηση της Εικόνας 8, στην οποία φαίνεται η ύπαρξη μεθανοϋδριτών στους πυρήνες των ιζημάτων κάτι το οποίο αποτελεί σημαντικό στοιχείο ότι στα βάθη των 94 και 60 εκατοστών από την επιφάνεια του πυθμένα είναι δυνατό να συμβαίνει μεθανογένεση.

Στο βάθος των 30 cm από την επιφάνεια του πυθμένα του ηφαιστείου Amsterdam δεν ανιχνεύθηκε το γονίδιο *mcrA*. Αυτή η αδυναμία ανίχνευσης του γονιδίου μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι στο συγκεκριμένο βάθος του ιζήματος δεν επικρατούν κατάλληλες συνθήκες που θα το καταστήσουν κατάλληλο υπόστρωμα για την ανάπτυξη και διαβίωση μεθανογόνων οργανισμών. Οι συνθήκες αυτές επιφέρουν μείωση στην αφθονία των μεθανογόνων οργανισμών καθιστώντας αδύνατη την ανίχνευσή τους καθώς και την ενίσχυσή του γονιδίου *mcrA* που φέρουν μέσω της διεργασίας της PCR.

Αξιοπερίεργο είναι το γεγονός ανίχνευσης του γονιδίου *mcrA* το οποίο απαντάται σε αναερόβια περιβάλλοντα σχεδόν στην επιφάνεια του πυθμένα και συγκεκριμένα ένα εκατοστό από αυτή. Η παρατήρηση αυτή αντιτίθεται στα αποτελέσματα των εργασιών του Inagaki et al. (2004), Upton et al. (2000) και πληθώρα άλλων επιστημών. Όμως από την άλλη μεριά, υπάρχει πλήθος μελετών οι οποίες εξηγούν την εμφάνιση αναερόβιων οργανισμών και κατά συνέπεια αναερόβιων γονιδίων σε αερόβια περιβάλλοντα. Εκτός από την ανίχνευση του γονιδίου στην επιφάνεια του πυθμένα του ηφαιστείου Amsterdam, τρανταχτό παράδειγμα αποτελεί και η ανίχνευσή του στην επιφάνεια του πυθμένα στο ηφαίστειο Kazan και όχι στα βαθύτερα στρώματα

όπως και αναμενόταν. Ο σχετικά μεγάλος αριθμός γονιδίων *mcrA* κάτω από την επιφάνεια του πυθμένα, μπορεί να είναι αποτέλεσμα της ύπαρξης υψηλών ποσοτήτων οργανικής ύλης προς ανοργανοποίηση. Το βραχυπρόθεσμο πλεόνασμα οργανικής ύλης σε αυτά τα βάθη ίσως αποτελεί κατάλληλο υπόστρωμα για τους μεθανότροφους οργανισμούς, απαλλάσσοντας τους από τον άμεσο ανταγωνισμό με άλλους μικροοργανισμούς όπως θειϊκό – αναγωγικά βακτήρια τα οποία δρουν πλησίον των επιφανειών των πυθμενικών ιζημάτων (Oremland and Pollin, 1982 ; Fitzimons et al., 2005). Για τον παραπάνω λόγο το ανώτερο ένα εκατοστό του πυθμένα στα υποθαλάσσια ηφαίστεια ιλύος Amsterdam και Kazan αποτελεί ευνοϊκό υπόστρωμα για τους μεθανότροφους οργανισμούς, οι οποίοι ενδεχομένως φέρουν το συγκεκριμένο γονίδιο, εξηγώντας κατά συνέπεια την ανίχνευση του. Επίσης μια άλλη παράμετρος η οποία μπορεί να εξηγήσει την εμφάνιση του γονιδίου *mcrA* στην επιφάνεια του πυθμένα του ηφαιστείου Kazan είναι η αυξημένη συγκέντρωση μεθανίου στα επιφανειακά στρώματα του πυρήνα δειγματοληψίας (www.igme.gr/anaximander). Στην εργασία των Juottonen et al. (2005) παρατηρήθηκε ότι υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ του μεθανίου και της αφθονίας των μεθανότροφων οργανισμών. Η αυξημένη συγκέντρωση οφείλεται στο ότι οι μεθανοϋδρίτες στο εσωτερικό του πυρήνα δειγματοληψίας είναι μικρού μεγέθους (μερικών mm) και διάσπαρτοι γεγονός που τους επιτρέπει να διαλύονται εύκολα αυξάνοντας έτσι την ποσότητα του μεθανίου. Για τα βάθη των 108 cm, 65 cm και 30 cm από την επιφάνεια του πυθμένα όπως και στο δείγμα από το υποθαλάσσιο ηφαίστριο Amsteradam για το βάθος των 30 cm έτσι και για το ηφαίστριο Kazan δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση του γονιδίου

mcrA. Ο λόγος για τον οποίο δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω είναι ίσως η περιορισμένη αφθονία των μεθανογόνων οργανισμών που περιέχουν το συγκεκριμένο γονίδιο σε αυτά τα βάθη. Η περιορισμένη αφθονία των συγκεκριμένων οργανισμών μπορεί να οφείλεται στην έλλειψη κατάλληλου υποστρώματος ή στην παρουσία ενός λιγότερου ευνοϊκού υποστρώματος για την επίτευξη μεθανογένεσης σε αυτά τα βάθη (Svensson and Sundh, 1992 ; Valentine et al., 1994). Επίσης μπορεί να εξηγηθεί και από την παρουσία μικροοργανισμών που δρουν ανταγωνιστικά με τους μεθανογόνους προκαλώντας μείωση της αφθονίας τους (Abram and Nedwell, 1978 ; Kotsyurbenko et al., 2001).

Στον πυρήνα που ελήφθει από το υποθαλάσσιο ηφαίστειο ιλύος Thessaloniki, το γονίδιο *mcrA* ανιχνεύθηκε σε όλα τα βάθη του δείγματος, φανερώνοντας πιθανός την αυξημένη αφθονία των μεθανότροφων οργανισμών αλλά και τα αυξημένα ποσοστά μεθανίου. Αυτή η πιθανότητα βασίζεται και στη δομή του ιζήματος το οποίο χαρακτηρίζεται με μεγάλο πορώδες, με μεγάλη συγκέντρωση μεθανίου και μεθανοϋδριτών σε όλο το μήκος του πυρήνα (www.igme.gr/anaximander). Τα παραπάνω στοιχεία συμφωνούν με τα αποτελέσματα της εργασίας των Nunoura et al. (2006) στην οποία το γονίδιο *mcrA* επίσης ανιχνεύθηκε σε όλα τα βάθη των προς εξέταση ιζημάτων.

Το γεγονός ότι το γονίδιο *mcrA* ανιχνεύθηκε σε όλα τα βάθη του ιζήματος μας κινεί υποψίες ότι δεν οφείλεται μόνο στην αφθονία των μεθανογόνων οργανισμών. Πράγματι είναι αρκετά σπάνιο φαινόμενο σε ιζήματα παρόμοιων περιβαλλόντων να υπάρχουν μόνο μεθανογόνοι οργανισμοί. Πρόσφατα το γονίδιο *mcrA* εντοπίστηκε και σε μεθανότροφους οργανισμούς όπως επίσης και

θειϊκό – αναγωγικά βακτήρια (Hallam et al., 2003 ; Kruger et al., 2003 ; Hallam et al., 2004) οι οποίοι απαντώνται σε περιβάλλοντα όπου η αναερόβια οξειδωση του μεθανίου λαμβάνει χώρα (Kruger et al., 2003). Οι μεθανότροφοι οργανισμοί οξειδώνουν το μεθάνιο είτε αερόβια είτε αναερόβια αποκτώντας έτσι την ενέργεια που τους χρειάζεται για τον μεταβολισμό τους.

Στα βάθη των 5 και 60 εκατοστών από την επιφάνεια του πυθμένα είτε υπάρχουν μόνο μεθανογόνοι οργανισμοί, είτε υπάρχουν μόνο μεθανότροφοι οργανισμοί οι οποίοι οξειδώνουν το μεθάνιο που παράγεται στα βαθύτερα στρώματα καθώς αυτό ανέρχεται στα ανώτερα στρώματα, ή υπάρχει συνδυασμός των δύο ομάδων οργανισμών αποτελώντας και την πιο λογική εξήγηση. Στην παρούσα εργασία δεν έχει γίνει φυλογενετική μελέτη ώστε να γνωστοποιείται με ακρίβεια το είδος των οργανισμών που απαντώνται σε κάθε βάθος των υπό εξέταση ιζημάτων με αποτέλεσμα να πιθανολογούμε για το ποιοι οργανισμοί μπορεί να περιέχουν το γονίδιο *mcrA*.

Στο βάθος των 120 cm από την επιφάνεια του πυθμένα κατέστη δυνατή η ανίχνευση του γονιδίου *mcrA*. Στο συγκεκριμένο βάθος απαντάται η μεταβατική ζώνη, στην οποία λαμβάνει μέρος η αναερόβια οξειδωση του μεθανίου (AOM) από την δράση θειϊκό – αναγωγικών βακτηρίων (SRB's) αλλά και η μεθανογένεση (Thomsen et al., 2001). Η ύπαρξη SRB's σε αυτό το βάθος γίνεται αντιληπτή από το γεγονός ότι ανιχνεύθηκε το γονίδιο *drsA* το οποίο απαντάται σε όλα σχεδόν τα SRB's (Klein et al., 2001) καταλύοντας το τελικό στάδιο της θειϊκής αναγωγής (Karr et al., 2005). Εκτενής ανάλυση για το γονίδιο *drsA* καθώς και για την μεταβατική ζώνη ακολουθεί σε επόμενη παράγραφο. Από τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι η AOM και η μεθανογένεση συνυπάρχουν

μέσα στα όρια της μεταβατικής ζώνης (συγκεκριμένα του θείου) (Tsunogai et al., 2003) με αποτέλεσμα στη ζώνη αυτή να υπάρχει πληθώρα μεθανογόνων και μεθανότροφων οργανισμών οι οποίοι φέρουν το γονίδιο. *mcrA* καθιστώντας το ανιχνεύσιμο.

Στο βάθος των 180 cm και 225 cm η ανίχνευση του γονιδίου *mcrA* υποδηλώνει ξεκάθαρα ότι λαμβάνει χώρα η διεργασία της μεθανογένεσης. Η άποψη αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι σε αυτό το βάθος δεν ανιχνεύθηκαν τα γονίδια *dsrA*, *pmoA*, *mmoX* και *mxaF* αλλά μόνο το *mcrA*.

Τα ευρήματα των γονιδίων στον πυρήνα του ηφαιστείου Thessaloniki δίνουν μία χαρακτηριστική εικόνα της στρωμάτωσης η οποία μπορεί να υπάρξει στα ιζήματα μεθανουδριτών όπως έχει αναφερθεί στην εισαγωγή της παρούσας εργασίας. Εν συντομία η στρωμάτωση για το συγκεκριμένο ηφαίστειο μπορεί να διατυπωθεί χοντρικά ως εξής: στα πρώτα 60 cm επικρατεί η θειικό – αναγωγική ζώνη. Κατόπιν ακολουθεί η μεταβατική ζώνη και από τα 180 cm μέχρι τα 225 cm επικρατεί η ζώνη της μεθανογένεσης.

Όσον αφορά το ηφαίστειο Kula το γονίδιο *mcrA* δεν ανιχνεύθηκε σε βάθος 1 cm και 55 cm από την επιφάνεια του πυθμένα. Όπως αναφέρθηκε για τα προηγούμενα ηφαίστεια έτσι και για το ηφαίστειο Kula η αδυναμία ανίχνευσης του γονιδίου *mcrA* σε αυτά τα βάθη μπορεί να οφείλεται στους εξής λόγους:

A) Στα βάθη αυτά και κυρίως στην επιφάνεια των πυθμένων δεν επικρατούν κατάλληλες συνθήκες που να επιτρέπουν την ύπαρξη μικροοργανισμών οι οποίοι φέρουν το συγκεκριμένο γονίδιο.

Β) Η μη ύπαρξη κατάλληλου υποστρώματος (μικρή περιεκτικότητα σε οργανική ύλη) (Svensson and Sundh, 1992 ; Valentine et al., 1994) καθιστά προβληματική την ανάπτυξη κάποιων ομάδων μικροοργανισμών (μεθανότροφοι) έναντι σε κάποιους πλεονεκτικότερους, (SRB's) οδηγώντας στην αύξηση της ανταγωνιστικότητας μεταξύ (Abram and Nedwell, 1978 ; Kotsyurbenko et al., 2001) τους με επακόλουθο την μείωση αφθονίας των πρώτων.

Όμως, παρόλα αυτά η αφθονία των μικροοργανισμών που φέρουν το συγκεκριμένο γονίδιο ήταν τέτοια ώστε κατέστη δυνατή η ανίχνευσή τους στα βάθη 19 cm και 75 cm από την επιφάνεια του πυθμένα κάτι το οποίο συμφωνεί και με τα αποτελέσματα της εργασίας των Upton et al. (2000) σύμφωνα με την οποία το γονίδιο ανιχνεύθηκε στα βαθύτερα στρώματα του πυθμενικού ιζήματος και όχι στα επιφανειακά. Στο βάθος των 19 cm εκτός από το γονίδιο *mcrA* ανιχνεύθηκε και το γονίδιο *dsrA* δείχνοντας μας ότι πιθανότατα αυτή η περιοχή αποτελεί την μεταβατική ζώνη ή μάλλον το κατώτερο όριο αυτής διότι από τα 19 cm μέχρι τα 75 cm δεν ανιχνεύθηκε κανένα από τα εξεταζόμενα γονίδια. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως για το ηφαίστειο Thessaloniki και συγκεκριμένα στο βάθος των 120 cm έτσι και εδώ στο βάθος των 19 cm λαμβάνει χώρα η αναερόβια οξειδωση του μεθανίου (AOM) υπό την δράση θειϊκό – αναγωγικών βακτηρίων (SRB's) αλλά και η μεθανογένεση (Thomsen et al., 2001), με επακόλουθο την αυξημένη αφθονία μικροοργανισμών που φέρουν το γονίδιο *mcrA* κάνοντας δυνατή την ανίχνευσή του.

Τέλος, στο βάθος των 75 cm λαμβάνει χώρα η διεργασία της μεθανογένεσης όπως και στα ηφαίστεια Amsteradam και Thessaloniki με την

μόνη διαφορά ότι στο παρόν ηφαιστείο στο ίδιο βάθος ανιχνεύθηκε και το γονίδιο *dsrA* αποδεικνύοντας ότι στο συγκεκριμένο βάθος του ηφαιστείου Kula εκτός από την μεθανογένεση λαμβάνει χώρα και η AOM.

Όσον αφορά το γονίδιο *dsrA* δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση του σε κανένα από τα δείγματα των ιζημάτων μας. Οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση και ενίσχυση του γονιδίου μέσω της διεργασίας της PCR είναι οι ίδιοι με αυτούς που χρησιμοποίησαν στην εργασία τους οι Dhillon et al. 2003 με θετικά αποτελέσματα. Η ανίχνευση του γονιδίου επιτευχθεί μόνο ύστερα από την χρήση των εσωτερικών εκκινήτων 1FI, 1R1 (Dhillon et al., 2003) και μόνο στα ιζήματα των ηφαιστείων Thessaloniki και Kula.

Το γονίδιο *dsrA* κωδικοποιεί την α - υποομάδα του ενζύμου DSR, το οποίο έχει χαρακτηριστεί ως το ένζυμο κλειδί της θειϊκής αναγωγής. Καταλύει το τελικό στάδιο της αναπνοής του θείου και συγκριμένα καταλύει την αναγωγή των έξη ηλεκτρονίων του θειϊκού οξέος κατά τη μετατροπή του σε σουλφίδιο (Ryuji and Butani, 2007). Το γεγονός αυτό το καταστεί θεμελιώδες ένζυμο στον παγκόσμιο κύκλο του θείου (Nealson, 1997 ; Widdel and Hansen, 1999 ; Wagner et al., 2005). Η διεργασία της θειϊκής αναγωγής επιτελείται σχεδόν εξολοκλήρου από διαφορετικές φυλογενετικές ομάδες μικροοργανισμών που στο σύνολό τους ονομάζονται θειϊκό αναγωγικοί προκαρυώτες (SRB's) και λαμβάνει χώρα σε μεγάλο ποσοστό στη μεταβατική ζώνη των ιζημάτων (Wagner et al., 2005). Εξέχουσα θέση σε αυτές τις ομάδες κατέχουν τα θειϊκό αναγωγικά βακτήρια (SRB's) φέροντας σε μεγάλο ποσοστό το γονίδιο *dsrA* (Klein et al., 2001).

Παρόλα αυτά οι μικροοργανισμοί που ευθύνονται για την αναερόβια οξείδωση του μεθανίου στα θαλάσσια ιζήματα δεν έχει καταστεί δυνατό να απομονωθούν σε καθαρή καλλιέργεια και βάση γονιδιωματικών μελετών σε περιβαλλοντικά δείγματα έχει αποδειχτεί ότι η διεργασία της AOM οφείλεται σε Archaea τα οποία συμβάλουν στην ανάστροφη πορεία της μεθανογένεσης και τα οποία διαβιούν πλησίον των SRB's (Hoehler and Alperin, 1996 ; Boetius et al., 2000 ; Hallam et al., 2003 ; Girguis et al., 2005).

Η συχνότητα εμφάνισης του ενζύμου DSR (κατά συνέπεια τις περισσότερες φορές και του γονιδίου *dsrA*) στους SRB's καθώς και ο υψηλός βαθμός συντηρητικότητας της αλληλουχίας του, καταστούν το ένζυμο ιδανικό για την αποτίμηση της ποικιλότητας των SRB's σε διάφορα περιβάλλοντα (Wagner et al., 1998 ; Zverlov et al., 2005) κυρίως σε ανοξικά ιζήματα (Wagner et al., 1998). Τα παραπάνω επιβεβαιώνονται από το γεγονός ότι πληθώρα εργαστηρίων γενετικής παγκοσμίως χρησιμοποιούν το γονίδιο *dsrA* για να μελετήσουν την ποικιλότητα και τη διασπορά των SRB's στα υδατικά οικοσυστήματα (Chang et al., 2001 ; Joulian et al., 2001 ; Perez-Jimenez et al., 2001 ; Thomsen et al., 2001).

Το ότι δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση του γονιδίου *dsrA* στα ιζήματα των ηφαιστειών Amsterdam και Kazan παρόλο την χρήση εσωτερικών εκκινητών, μπορεί να οφείλεται σε δύο κυρίους λόγους: είτε στο ότι οι θεϊκό αναγωγικοί μικροοργανισμοί δεν απαντώνται σε αυτά τα ιζήματα διότι δεν υπάρχουν οι κατάλληλες συνθήκες για την διαβίωση και την ανάπτυξή τους, είτε γιατί υπάρχουν, αλλά σε τέτοιους αριθμούς ώστε να μην μπορούν να

ανιχνευθούν με την χρήση της τεχνικής της PCR με επακόλουθο αποτέλεσμα να μην μπορεί να ενισχυθούν και τα προς εξέταση γονίδια που φέρουν.

Στο ηφαίστειο Thessaloniki το γονίδιο *dsrA* ανιχνεύθηκε μόνο στο βάθος των 120 cm από την επιφάνεια του πυθμένα. Το γεγονός ότι η ανίχνευση του γονιδίου δεν ήταν εφικτή για τα υπόλοιπα βάθη του ιζήματος οφείλεται στους ίδιους λόγους οι οποίοι αναφέρθηκαν σε προηγούμενη παράγραφο για τα ηφαίστεια Amsterdam και Kazan. Στο βάθος των 120 cm πιθανότατα λαμβάνει χώρα η μεταβατική ζώνη (όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο καθώς και στην εισαγωγή της παρούσας εργασίας) στα πλαίσια της οποίας η αφθονία των SRB's είναι μεγάλη. Η άποψη αυτή ενισχύεται λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της εργασίας των Thomsen et al. (2001) στην οποία αναφέρεται ότι μεταξύ των 140 cm και 160 cm του ιζήματος που αναλύθηκε απαντάται η μεταβατική ζώνη από την οποία ενισχύθηκε ο μέγιστος αριθμός του γονιδίου *dsrA*.

Στο ηφαίστειο Kula το γονίδιο *dsrA* ανιχνεύθηκε στο βάθος των 75 cm, 19 cm και 1 cm από την επιφάνεια του πυθμένα, αλλά όχι στα 55 cm. Οι λόγοι για τους οποίους δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση του γονιδίου *dsrA* στα 55 cm από την επιφάνεια του πυθμένα ταιριάζουν απόλυτα με τα όσα έχουν αναφερθεί προηγουμένως για τα υπόλοιπα ηφαίστεια. Η ανίχνευση του γονιδίου στο πρώτο εκατοστό του ιζήματος συμφωνεί με τα αποτελέσματα της εργασίας των Ryuji and Butani (2007) κατά την οποία ανιχνεύθηκαν υψηλά ποσοστά του γονιδίου *dsrA* στο επιφανειακό στρώμα θαλάσσιων ιζημάτων καθώς και με τα αποτελέσματα της εργασίας των Schippers and Neretin (2006) κατά την οποία στα πρώτα 10 εκατοστά του θαλάσσιου ιζήματος ανιχνεύθηκαν 10^8 γονίδια

dsrA. Παρόλα αυτά η εμφάνιση του γονιδίου *dsrA* στο επιφανειακό στρώμα εκπλήσσει αρκετούς ερευνητές όπως τους Barton and Tomei (1995) και Hansen (1994) στις εργασίες των οποίων αναφέρεται ότι η θειικό αναγωγική δραστηριότητα και η παρουσία θειικό αναγωγικών οργανισμών (SRM) που φέρουν το γονίδιο φαίνεται να είναι συμβατές στην παρουσία οξυγόνου, κάτι το οποίο αντιτίθεται στον γενικό χαρακτηρισμό των SRM ως αναερόβιων οργανισμών. Η ύπαρξη μεγάλης αφθονίας SRM σε περιοχές των ιζημάτων με αυξημένα ποσοστά οξυγόνου μπορεί να εξηγηθεί από την πιθανή δημιουργία ανοξικού μικροπεριβάλλοντος στο ίζημα καθιστώντας δυνατή τη θειική αναγωγή (Moeslund et al., 1994 ; Thamdrup et al., 1994).

Το ότι ανιχνεύθηκε το γονίδιο *dsrA* στα 19 cm αποτελεί πιθανότατα ένδειξη ότι σε αυτό το βάθος βρίσκεται η μεταβατική ζώνη, στην οποία οι SRM απαντώνται σε μεγάλη αφθονία. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται και από το αποτέλεσμα της εργασίας των Leloup et al. (2005) βάση της οποίας σε όλους τους πυρήνες ιζήματος που μελετήθηκαν η μέγιστη τιμή των SRM βρέθηκε γύρω στα 15 cm από την επιφάνεια του πυθμένα. Η υψηλές τιμές των SRM αιτιολογούνται και από τον μέγιστο ρυθμό θειικής αναγωγής SRR που παρατηρήθηκε σε αυτό το βάθος (Bottcher et al., 2000) για τη συγκεκριμένη εργασία. Επίσης παρατηρήθηκε ότι ο μέγιστος ρυθμός θειικής αναγωγής σχετίζεται γραμμικά με τον μέγιστο ρυθμό της AOM μέσα στα πλαίσια της μεταβατικής ζώνης (Thomsen et al., 2001). Η παρατήρηση αυτή βασίζεται στην υπόθεση ότι η AOM επιτελείται από SRB's σε συνδυασμό με την δράση αρχαίων μεθανότροφων οργανισμών τα οποία φέρουν το προς εξέταση γονίδιο καθιστώντας το ανιχνεύσιμο.

Για το βάθος των 75 cm δεν μπορεί να ειπωθεί με βεβαιότητα ότι σε αυτό το βάθος συνεχίζει να εκτίνεται η μεταβατική ζώνη, διότι στην παρούσα εργασία δεν έχει γίνει φυλογενετική ανάλυση των οργανισμών που υπάρχουν στο ίζημα ώστε να καταστεί εφικτή η οριοθέτηση της ζωνοποίησης που επικρατεί. Έτσι πιθανολογείται ότι στο βάθος των 75 cm επικρατεί η ζώνη της μεθανογένεσης στην οποία μπορεί να ενυπάρχουν SRB's επιτελώντας την διεργασία της AOM καθιστώντας με τον τρόπο αυτό δυνατή την ανίχνευση του γονιδίου *dsrA* στο συγκεκριμένο βάθος.

Όσον αφορά τα γονίδια *pmoA*, *mmoX* και *mxaF*, δεν ανιχνεύθηκαν σε κανένα δείγμα ιζήματος που πάρθηκε από τα εξεταζόμενα υποθαλάσσια ηφαίστεια ιλύος.

Το πρώτο στάδιο της οξειδωσης του μεθανίου είτε σε αερόβια είτε σε αναερόβια περιβάλλοντα (Hanson and Hanson, 1996 ; Pancost et al., 2000 ; Orphan et al., 2001 ; Hondt et al., 2002) επιτελείται μέσω της δράσης μεθανότροφων βακτηρίων. Σε αυτό το στάδιο λαμβάνει χώρα η μετατροπή του μεθανίου σε φορμαλδεΰδη με ενδιάμεσο προϊόν τη μεθανόλη και εκτελείται από τα ένζυμα της μέθανο – μονοξειγενάσης (methane monooxygenase, MMO) (Tchawa et al., 2003) και της δεϋδρογονάσης της μεθανόλης (methane dehydrogenase, MDH) (McDonald et al., 1995) το οποίο απαντάται σε όλα σχεδόν τα γνωστά μέχρι σήμερα gram αρνητικά μεθανότροφα βακτήρια (Hanson and Hanson, 1996 ; McDonald and Murrell, 1997). Το ενεργό τμήμα της υποομάδας του ενζύμου MDH κωδικοποιείται από το γονίδιο *mxaF* (McDonald et al., 1995 ; McDonald and Murrell, 1997).

Το ένζυμο MMO υπάρχει σε όλους τους γνωστούς μεθανότροφους οργανισμούς και απαντάται σε δύο τύπους: είτε ως δεσμευμένο μεμβρανικό τμήμα (pMMO), είτε ως διαλυτό κυτοπλασματικό τμήμα (sMMO). Τα υδροξυλιωμένα συστατικά των pMMO και sMMO κωδικοποιούνται αντίστοιχα από τα γονίδια *pmoA* και *mmoX* (Hanson and Hanson, 1996.; Murrell and Radajewski, 2000). Η μεθανόλη που παράγεται μέσω του ενζύμου MMO οξειδώνεται από το ένζυμο MDH (Kolb et al., 2005) σε φορμαλδεΐδη, και αφομοιώνεται από τα κύτταρα των μικροοργανισμών ή οξειδώνεται σε CO₂ αποδίδοντας την κατάλληλη ενέργεια για την βιοσύνθεση και την υδροξυλίωση του μεθανίου (Theisen et al., 2005), αποτελώντας ενδιάμεσο στάδιο του μεταβολισμού των μεθυλότροφων οργανισμών (Lidstrom, 2001). Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό το πόσο σημαντικό ρόλο κατέχουν τα γονίδια *pmoA*, *mmoX* και *mxaF* στην AOM αλλά και στον μεταβολισμό των μεθανότροφων / μεθυλότροφων οργανισμών και κατ'επέκταση στον κύκλο του άνθρακα.

Τα πιο κοινώς διαδεδομένα γονίδια που χρησιμοποιούνται ως δείκτες της ποικιλότητας των μεθανότροφων οργανισμών είναι τα *pmoA*, και *mxaF* (McDonald and Murrell, 1997 ; Bourne et al., 2001). Συγκεκριμένα το γονίδιο *pmoA* χρησιμοποιείται για την μελέτη της ποικιλότητας των μεθανότροφων βακτηρίων τα οποία διαβιούν σε θαλάσσια ιζήματα μεγάλων βαθών (Henckel et al., 1999 ; Hertz et al., 2001 ; Hosam et al., 2005). Παρόλα αυτά μέχρι σήμερα περιορισμένος αριθμός μελετών έχει πραγματοποιηθεί για την έρευνα της μικροβιακής ποικιλότητας από ιζήματα μεγάλων βαθών με την χρήση του γονιδίου *pmoA* ως δείκτη. Οι μελέτες αυτές εστιάζονται κυρίως σε περιοχές που

απαντώνται μεθανοϋδρίτες και υδροθερμικά φρεάτια (Moyer et al., 1995 ; Bidle, 1999 ; Takai, 1999). Επίσης ο συνδυασμός των γονιδίων *pmoA*, και *mxaF* ως δείκτες βοηθά στο να διαπιστωθεί ο ρόλος που κατέχουν οι μεθανότροφοι οργανισμοί στον κύκλο του άνθρακα (Wang et al., 2004).

Όμως αρκετές φορές το γονίδιο *pmoA* εμφανίζεται ανίκανο στην ανάλυση της ποικιλότητας των μεθανότροφων. Αυτή η αδυναμία του *pmoA* αντισταθμίζεται από τη χρήση του γονιδίου *mxaF* ως δείκτη το οποίο απαντάται σχεδόν σε όλα τα μεθανότροφα βακτήρια καθιστώντας το περισσότερο ευαίσθητο δείκτη ποικιλότητας έναντι του *pmoA*. (Horz et al., 2001). Η άποψη αυτή ενισχύεται και από τα αποτελέσματα της εργασίας των Wang et al. (2004) κατά την οποία αποδεικνύεται ότι η αποτελεσματικότητα των γονιδίων *pmoA*, και *mxaF* στον εντοπισμό και την ανάλυση της ποικιλότητας των μεθανότροφων εξαρτάται από τα περιβάλλοντα στα οποία διαβιούν. Έτσι το *pmoA* φαίνεται να είναι περισσότερο κατάλληλο σε περιβάλλοντα πλούσια σε μεθάνιο με υψηλό ποσοστό μέθανο – οξειδωτικών διεργασιών, ενώ το *mxaF* είναι πιο αποτελεσματικό σε φτωχά περιβάλλοντα όπως θαλάσσια ιζήματα μεγάλων βαθών με μικρούς αριθμούς βιολογικής δραστηριότητας.

Το γεγονός ότι δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση των γονιδίων *pmoA*, *mmoX* και *mxaF* αντικρούεται με τα αποτελέσματα της εργασίας των Inagaki et al. (2004) βάση της οποίας τα γονίδια *pmoA* και *mxaF* ανιχνεύθηκαν επιτυχώς, κάτι το οποίο οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στα υψηλά ποσοστά εύρεσης μεθανότροφων οργανισμών στα προς εξέταση δείγματα. Δεν συνέβη όμως το ίδιο και για το γονίδιο *mmoX* το οποίο δεν ανιχνεύθηκε. Οι λόγοι για τους οποίους δεν ανιχνεύθηκαν τα συγκεκριμένα γονίδια βασίζονται σε δύο κύριες

υποθέσεις, είτε γιατί η αφθονία των μεθανότροφων οργανισμών οι οποίοι φέρουν τα συγκεκριμένα γονίδια είναι μικρή στα προς εξέταση δείγματα καθιστώντας αδύνατη την ενίσχυση τους μέσω της PCR, είτε γιατί οι μεθανότροφοι οργανισμοί που υπάρχουν δε φέρουν τα συγκεκριμένα γονίδια.

Όμως, εκτός από τους παραπάνω λόγους η αδυναμία ανίχνευσης των γονιδίων *pmoA*, *mmoX* και *mxaF* στα προς εξέταση δείγματα και κυρίως στα επιφανειακά στρώματά τους όπως και αναμενόταν, μπορεί να αιτιολογηθεί βάση των αποτελεσμάτων των εργασιών των Boetius et al. (2000, 2004). Σύμφωνα με τις προαναφερόμενες εργασίες το μεθάνιο που έχει παραχθεί μέσω της διεργασίας της μεθανογένεσης στα βαθύτερα στρώματα των ιζημάτων, έχει ήδη οξειδωθεί αναερόβια καθώς ανέρχεται προς την επιφάνεια τους με επακόλουθο να μην υπάρχει αρκετή ποσότητα μεθανίου ώστε να οξειδωθεί αερόβια από τους μεθανότροφους οργανισμούς που φέρουν τα γονίδια *pmoA*, *mmoX* και *mxaF* καθιστώντας αδύνατη και την ανίχνευσή τους. Μάλιστα το ποσοστό του μεθανίου το οποίο οξειδώνεται αναερόβια, σε μερικές περιπτώσεις φθάνει το 95 % του συνολικού παραγόμενου μεθανίου μέσω της διεργασίας της μεθανογένεσης Losekann et al. (2007).

Σε καμία περίπτωση η παρούσα εργασία δεν αποτελεί ολοκληρωμένη απεικόνιση των μικροοργανισμών καθώς και των λειτουργικών γονιδίων που εμπλέκονται στην αναερόβια οξείδωση του μεθανίου από ιζήματα μεθανοϋδριτών σε υποθαλάσσια ηφαίστεια ιλύος. Η παρούσα εργασία αποτελεί ένα αντιπροσωπευτικό ψήγμα της όλης προσπάθειας η οποία γίνεται στα πλαίσια του εντοπισμού και της μελέτης τέτοιων υποθαλάσσιων περιοχών τόσο σε παγκόσμιο επίπεδο όσο και σε μεμονωμένες περιοχές, όπως είναι και η

περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου στην οποία αναφέρεται η παρούσα εργασία. Ευελπιστούμε στο μέλλον ο αριθμός των εργασιών αυτού του είδους να αυξηθεί επιφέροντας θετικά αποτελέσματα και λύσεις στα πολύ σοβαρά προβλήματα της εξάντλησης των κοιτασμάτων των μη ανανεώσιμων πηγών ενέργειας καθώς και της αλλαγής του παγκόσμιου κλίματος.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ❖ **Abram J.W., and Nedwell D.B.** (1978). Inhibition of methanogenesis by sulfate reducing bacteria competing for transferred hydrogen. *Arch. Microbiol*, 117: 89 -92.
- ❖ **Alperin M.J., and Reeburgh W.S.** (1985). Inhibition experiments on anaerobic methane oxidation. *App. Environ. Microbiol*, 50: 940–945.
- ❖ **Badr O., Probert S.D., O'Callaghan P.W.** (1991). Atmospheric methane: its contribution to global warming. *Appl. Energy*, 40: 273–313.
- ❖ **Bagirov E., Lerche I.** (1999). *Impact of Natural Hazards on Oil and Gas Extraction: The South Caspian Basin*. Kluwer Academic Publishing, New York
- ❖ **Barber A.J., Tjokrosapoetro S., Charlton T.R.** (1986). Mud volcanoes, shale diapirs, wrench fault and melanges in accretionary complexes, eastern Indonesia. *Bulletin of the American Association of Petroleum Geologists*, 70: 1729–1741.
- ❖ **Barnes R.O., Goldberg E.D.** (1976). Methane production and consumption in anoxic marine sediments. *Geology*, 4: 297–300.
- ❖ **Barton L.L., Tomei F.A.** (1995). Characteristics and activities of sulfate-reducing bacteria. In: Barton LL (eds). *Sulfate-reducing Bacteria*, vol 8. Plenum Press New York, pp 1–32.
- ❖ **Bice K.L., Marotzke J.** (2002). Could changing ocean circulation have destabilized methane hydrate at the Paleocene / Eocene boundary? *Paleoceanography*, 17: 10.1029/2001PA000678

- ❖ **Bidle K.A.**, Kastner M., and Bartlett D.H. (1999). A phylogenetic analysis of microbial communities associated with methane hydrate containing marine fluids and sediments in the Cascadia margin (ODP site 892B). *FEMS Microl. Lett*, 177: 101.- 108.
- ❖ **Boetius A.**, Ravensschlag K., Schubert C.J., Rickert D., Widdel F., Gieseke A., *et al.* (2000). A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature*, 407: 623–626.
- ❖ **Boetius A.**, Suess E. (2004). Hydrate Ridge: a natural laboratory for the study of microbial life fueled by methane from near-surface gas hydrates. *Chemical Geology*, 205: 291– 310.
- ❖ **Bottcher M.E.**, Hespensheide B., Llobet-Brossa E., Beardsley C., Larsen O., Schramm A., Wieland A., Bottcher G., Berninger U.G., Amann R. (2000). The biogeochemistry, stable isotope geochemistry, and microbial community structure of a temperate intertidal mudflat: an integrated study. *Cont Shelf Res*, 20: 1749– 1769.
- ❖ **Borowski W.S.**, Paull C.K., Ussler W. (1996). Marine pore fluid sulphate profiles indicate in situ methane flux from underlying gas hydrate. *Geology*, 24: 655–658.
- ❖ **Borowski W.S.**, Cagatay N., Ternois Y., Paull C.K. (2000). Data report: carbon isotopic composition of dissolved CO₂, CO₂ gas, and methane, Blake-Bahama Ridge and northeast Bermuda Rise, ODP Leg 172. *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results*, 172. http://www-odp.tamu.edu/publications/172_SR/chap_03/chap_03.htm

- ❖ **Bourne D.B.**, McDonald, I.R., and Murrell J.C. (2001). Comparison of pmoA PCR primer sets as tools for investigating methanotroph diversity in three Danish soils. *Appl. Environ. Microbiol*, 67: 3802 - 3809.
- ❖ **Chang Y.J.**, Peacock A.D., Long P.E., Stephen J.R., Mackinley J.P., Macnaughton S.J., Hussain AKMA., Saxton A.M., White D.C. (2001). Diversity and characterization of sulfate-reducing bacteria in groundwater at a uranium mill tailings site. *Appl Environ Microbiol*, 67: 3149–3160.
- ❖ **Cita M.B.**, Ryan, W.B.F., Paggi, L. (1981). Prometheus mud breccia. An example of shale diapirism in the Western Mediterranean Ridge. *Annales Geologiques des Pays He´lle´niques*, 30: 543–569.
- ❖ **Collett T.S.**, and Ginsberg G.D. (1997). Gas hydrates in the Messoyakha gas field of the West-Siberian basin: A re-examination of the geologic evidence. *Proc. Seventh Intl. Offshore and Polar Conference*, Honolulu, Hawaii, May
- ❖ **Collett T.S.** (2000). Natural gas hydrate as a potential energy resource. In *Natural Gas Hydrate in Oceanic and Permafrost Environments*, chap. 10, pp.123–136, Max, M. D. (Ed.). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- ❖ **Collett T.S.** (2002). Energy resource potential of natural gas hydrates. *AAPG Bull*, 86:1971–1992.
- ❖ **Dawe R.A.**, and Thomas S. (2007). A large potential Methane source – Natural Gas Hydrates. *Energy Sources, Part A*, 29: 217-229.
- ❖ **D’Hondt S.**, Rutherford S, Spivack, A.J. (2002). Metabolic activity of subsurface life in deep-sea sediments. *Science*, 295: 2067–2070.

- ❖ **Dhillon A.**, Teske A., Dillon J., Stahl D.A., Sogin M.L. (2003). Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas Basin. *Appl Environ Microbiol*, 69: 2765–2772.
- ❖ **Dickens G.R.**, O’Neil J.R., Rea D.K., Owen R.M. (1995). Dissociation of oceanic methane hydrate as a cause of the carbon isotope excursion at the end of the Paleocene. *Paleoceanography*, 10: 965–971.
- ❖ **Dickens G.R.**, Paull K.P., Wallace C., and the ODP Leg 164 Scientific Party. (1997). Direct measurement of in situ methane quantities in a large gas-hydrate reservoir. *Nature*, 385:426-428.
- ❖ **Dillon W.P.**, Lee M.W., Coleman D.F. (1994). Identification of marine hydrates in situ and their distribution off the Atlantic coast of the United States. *Annals New York Academy of Sciences*, 715: 364–380.
- ❖ **Dimitrov L.I.** (2002). Mud volcanoes the most important pathway for degassing deeply buried sediments. *Earth-Sci. Rev*, 59: 49– 76.
- ❖ **Engelezos P.** (1993). Clathrate hydrates. *Ind. Eng. Chem. Res*, 32:1251–1274.
- ❖ **Ferry J.G.** (1999). Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways. *FEMS Microbiol. Rev*, 23:13–38.
- ❖ **Fitzsimons M.F.**, Dawit M., Revitt D.M & Rocha C. (2005). Effects of early tidal inundation on the cycling of methylamines in intertidal sediments. *Mar Ecol Prog Ser*, 294: 51–61.
- ❖ **Galand P.E.**, Saarnio S., Fritze H., and Yrjälä K. (2002). Depth related diversity of methanogen Archaea in Finnish oligotrophic fen. *FEMS Microbiol Ecol*, 42: 441–449.

- ❖ **Girguis P.R.**, Orphan J.V., Hallam S.J., and DeLong E.F. (2003). Growth and methane oxidation rates of anaerobic methanotrophic archaea in a continuous-flow bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol*, 69:5472–5482.
- ❖ **Guliyev I.S.**, Feizullayev A.A. (1996). All About Mud Volcanoes. Azerbaijan, Baku.
- ❖ **Hales B.A.**, Edwards C., Ritchie D.A., Hall G., Pickup R.W., Saunders J.R. (1996). Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis, *Appl. Environ. Microbiol*, 62 : 668–675.
- ❖ **Hallam S.J.**, Girguis P.R., Preston C.M., Richardson P.M., DeLong E.F. (2003). Identification of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes associated with methane-oxidizing Archaea. *Appl. Environ. Microbiol*, 69 : 5483–5491.
- ❖ **Hallam S.J.**, Putnam N., Preston C.M., Detter J.C., Rokhsar D., Richardson P.M., DeLong. E.F. (2004). Reverse methanogenesis: testing the hypothesis with environmental genomics. *Science*, 305 : 1457–1462.
- ❖ **Hansen T.A.** (1994). Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 66: 165–185.
- ❖ **Hanson R.S., and Hanson T.E.** (1996). Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev*, 60: 439-471.
- ❖ **Henckel T.**, Friedrich M., and Conrad R. (1999). Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol*, 65: 1980 - 1990.

- ❖ **Hinrichs K.U.**, Hayes J.M., Sylva S.P., Brewer P.G., and DeLong E.F. (1999). Methane-consuming archae bacteria in marine sediments. *Nature*, 398: 802–805.
- ❖ **Hinrichs K.U.**, and **Boetius A.** (2002). The anaerobic oxidation of methane: New insights in microbial ecology and biogeochemistry. In: Wefer G., Billett D., Hebbeln D., Jørgensen B.B., Schlüter M., and van Weering T.C.E., Editors. *Ocean Margin Systems*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 457–477.
- ❖ **Hoehler T.M.**, and **Alperin M.J.** (1996). Anaerobic methane oxidation by a methanogen-sulfate reducer consortium: geochemical evidence and biochemical considerations, p. 326–333. In Lidstrom M.E., and Tabita F.R., (ed.), *Microbial growth on C1 compounds*. Kluwer Academic Publishers, Boston, Mass.
- ❖ **Hondt D.S.**, Rutherford S., and Spivack A.J. (2002). Metabolic activity of subsurface life in deep-sea sediments. *Science*, 295: 2067- 2070.
- ❖ **Horz H.P.**, Yimga M.T., and Liesack W., (2001). Detection of methanotroph diversity on roots of submerged rice plants by molecular retrieval of *pmoA*, *mmoX*, *mxαF*, and 16S rRNA and ribosomal DNA, including *pmoA*-based terminal restriction fragment length polymorphism pro.ling. *Appl. Environ. Microbiol*, 67: 4177 - 4185.
- ❖ **Hosam Easa Elsaied**, Toru Hayashi, and Takeshi Naganuma. (2005). Molecular Analysis of Deep-Sea Hydrothermal Vent Aerobic Methanotrophs by Targeting Genes of 16S rRNA and Particulate Methane Monooxygenase. *Marine. Biotechnology*, 6: 503–509.

- ❖ **Hovland M.**, Hill A., Stokes D., (1997). The structure and geomorphology of the Dashgil mud volcano, Azerbaijan. *Geomorphology*, 21: 1–15.
- ❖ **Hovland M.** (2000). Are there commercial deposits of marine hydrates in ocean sediments? *Energy Explor. Exploit*, 18: 339–347.
- ❖ **Inagaki F.**, Tsunogai U., Suzuki M., Kosaka A., Machiyama H., Takai K., Nunoura T., Neelson K.H., & Horikoshi K. (2004). Characterization of C1-metabolizing prokaryotic communities in methane seep habitats at the Kuroshima Knoll, southern Ryukyu Arc, by analyzing *pmoA*, *mmoX*, *mxoF*, *mcrA*, and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol*, 70: 7445–7455.
- ❖ **Joulian C.**, Ramsing N.B., Ingvorsen K. (2001). Congruent phylogenies of most common small-subunit rRNA and dissimilatory sulfite reductase gene sequences retrieved from estuarine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 67: 3314–3318.
- ❖ **Juottonen H.**, Galand P.E., Tuittila E.S., Laine J., Fritze H., Yrjälä K. (2005). Methanogen communities and *Bacteria* along an ecohydrological gradient in a northern raised bog complex, *Environ. Microbiol*, 7: 1547– 1557.
- ❖ **Karr E.A.**, Matthew S.W., Melissa R.R., Deborah O.J., Michael T.M., and Laurie A.A. (2005). Diversity and Distribution of Sulfate-Reducing Bacteria in Permanently Frozen Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Applied And Environmental Microbiology*, 71: 6353–6359.
- ❖ **Katz, D. L.**, and Lee, R. E. (1990). *Natural Gas Engineering*. New York: McGraw-Hill.
- ❖ **Klein M.**, Friedrich M., Roger A.J., Hugenholtz P., Fishbain S., Abicht H., *et al.* (2001). Multiple lateral transfers of dissimilatory sulfite reductase genes

between major lineages of sulfate-reducing prokaryotes. *J Bacteriol*, 183: 6028–6035.

❖ **Kolb S.**, Knief C., Peter F., Dunfield and Ralf Conrad. (2005). Abundance and activity of uncultured methanotrophic bacteria involved in the consumption of atmospheric methane in two forest soils. *Environmental Microbiology*, 7 (8): 1150–1161.

❖ **Kotsyurbenko O.R.**, Glagolev M.V., Nozhevnikova A.N., and Conrad R. (2001) Competition between homoacetogenic bacteria and methanogenic archaea for hydrogen at low temperature. *FEMS Microbiol. Ecol*, 38: 153 -159.

❖ **Kromah M.**, Thomas S., and Dawe R.A. (2003). Transporting Natural Gas around the Caribbean. *West Indian J. Engineering*, 25:18–32.

❖ **Kruger M.**, Meyerdierks A., Glockner F.O., Amann R., Widdel F., Kube M., Reinhardt R., Kahnt R., Bocher R., Thauer R.K., Shima S. (2003). A conspicuous nickel protein in microbial mats that oxidize methane anaerobically. *Nature*, 426 : 878–881.

❖ **Kvenvolden K.A.** (1993). A primer on gas hydrate. 279-291. In: Howell, D.G. et al. (eds). *The Future of Energy Gases*. US Geological Survey Professional Paper 1570.

❖ **Kvenvolden K.A.** (2000). Natural gas hydrate: Introduction and history of discovery. In *Natural Gas Hydrate in Oceanic and Permafrost Environments*, chap. 2, pp. 9–16, Max M.D., (Ed.). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

- ❖ **Lee M.W.**, Hutchinson D.R., Dillon W.P., Miller J.J., Agena W.F., Swift B.A. (1993). Method of estimating the amount of in situ gas hydrates in deep marine sediments. *Marine Petroleum Geology*, 10: 493–506.
- ❖ **Leloup J.**, Petit F., Boust D., Deloffre J., Bally G., Clarisse O & Quillet L. (2005). Dynamic of sulfate-reducing microorganisms (*dsrAB* genes) in two contrasting mudflats of the Seine Estuary (France). *Microb Ecol*, 50: 307-314.
- ❖ **Lidstrom M.E.** (2001). Aerobic methylotrophic prokaryotes. In: Dworkin, M., et al. (Eds.), *The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, third ed., (release 3.7). Springer-Verlag, New York <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>
- ❖ **Losekann T.**, Knittel K., Nadalig T., Fuchs B., Niemann H., Boetius A., and Amann R. (2007). Diversity and Abundance of Aerobic and Anaerobic Methane Oxidizers at the Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea. *Applied And Environmental Microbiology*, 73 (10): 3348–3362.
- ❖ **Lykousis V.**, Alexandri S., Woodside J., Nomikou P., Ioakim Chr., Sakellariou D., de Lange G., Daehlgren A., Casas D., Rousakis G., Ballas D., and Perissoratis C. (2004). New evidence of extensive active mud volcanism in the Anaximander Mountains (Eastern Mediterranean): The ATHINA mud volcano. *Environ. Geol*, 46 (8): 1030-1037.
- ❖ **Lueders T.**, Chin K.J., Conrad R., and Friedrich M. (2001). Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase alpha-subunit (*mcrA*) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage. *Environ. Microbiol*, 3:194–204.

- ❖ **Luton P.E.**, Wayne J.M., Sharp R.J., Riley P.W. (2002). The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology*, 148 : 3521–3530.
- ❖ **Makogon Y. F.** (1997). *Hydrates of Hydrocarbons*. Tulsa, OK: PennWell
- ❖ **Martens C.S., Berner R.A.** (1977). Interstitial water chemistry of anoxic Long Island Sound sediments, I, dissolved gases. *Limnology and Oceanography*, 22 : 10–25.
- ❖ **Martens C.S.**, Albert D.B., Alperin M.J (1999). Stable isotope tracing of anaerobic methane oxidation in the gassy sediments of Eckernforde Bay, German Baltic Sea. *American Journal of Science*, 299 : 589–610.
- ❖ **Max M.D.** (2000). Hydrate resource, methane fuel and a gas-based economy? In *Natural Gas Hydrate in Oceanic and Permafrost Environments*, chap. 27, pp. 361–374, Max, M. D. (Ed.). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- ❖ **McCain W.D.** (1990). *The Properties of Petroleum Fluids*. Tulsa, OK: PennWell
- ❖ **McDonald I.R.**, Kenna E.M., and Murrell J.C. (1995). Detection of methanotrophic bacteria in environmental samples with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol*, 61:116–121.
- ❖ **McDonald I.R., and Murrell J.C.** (1997). The methanol dehydrogenase structural gene *mxoF* and its use as a functional gene probe for methanotrophs and methylotrophs. *Appl. Environ. Microbiol*, 63: 3218-3224.

- ❖ **Michaelis W.**, Seifert R., Nauhaus K., Treude T., Thiel V., Blumenberg M., *et al.* (2002). Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science*, 297: 1013–1015.
- ❖ **Milkov A.V.** (2000). Worldwide distribution of submarine mud volcanoes and associated gas hydrates. *Marine Geology*, 167: 29–42.
- ❖ **Milkov A.V.**, Sassen R., Apanasovich T.V., Dadashev F.G. (2003). Global gas flux from mud volcanoes: a significant source of fossil methane in the atmosphere and the ocean. *Geophys. Res, Lett.* 30(2): 1037 (doi:10.1029/2002GL016358).
- ❖ **Moeslund L.**, Thamdrup B., Jørgensen B.B., (1994). Sulfur and iron cycling in coastal sediment: radiotracer studies and seasonal dynamics. *Biogeochemistry*, 27: 129–152.
- ❖ **Moyer C.L.**, Dobbs F.C., and Karl D.M. (1995). Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi seamount, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol*, 61: 1555 - 1562.
- ❖ **Murrell J.C., and Radajewski S.** (2000). Cultivation-independent techniques for studying methanotroph ecology [review]. *Res Microbiol*, 151: 807–814.
- ❖ **Nealson K.H.** (1997). Sediment bacteria: who's there, what are they doing and what's new? *Annu. Rev. Earth Planet, Sci.* 25:403–434.
- ❖ **Nunoura Takuro.**, Hanako Oida., Tomohiro Toki., Juichiro Ashi., Ken Takai., & Koki Horikoshi. (2006). Quantification of *mcrA* by quantitative fluorescent PCR in sediments from methane seep of the Nankai Trough. *FEMS Microbiol Ecol*, 57: 149–157.

- ❖ **Oremland R.S.**, & Polcin S. (1982). Methanogenesis and sulphate reduction: competitive and noncompetitive substrates in estuarine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 44: 1270–1276.
- ❖ **Orphan V.J.**, House C.H., Hinrichs K.U., McKeegan K.D., DeLong E.F. (2001). Methane-consuming archaea revealed by direct coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science*, 293: 484–487.
- ❖ **Orphan V.J.**, Hinrichs K.U., Ussler W., Paull C.K., Taylor L.T., Sylva S.P., Hayes J.M., and DeLong E.F. (2001). Comparative analysis of methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol*, 67: 1922-1934.
- ❖ **Orphan V.J.**, House C.H., Hinrichs K.U., Mc Keegan K.D., DeLong E.F. (2002). Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 99 (11): 7663–7668.
- ❖ **Pancost R.D.**, Sinninghe Damste, J.S., de Lint S., van der Maarel M., and Gottschal J.C. (2000). Biomarker evidence for widespread anaerobic methane oxidation in Mediterranean sediments by a consortium of methanogenic archaea and bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 66: 1126–1132.
- ❖ **Peng Wang.**, Fengping Wang., Meixiang X.u, Xiang Xiao.(2004). Molecular phylogeny of methylophs in a deep-sea sediment from a tropical west Pacific Warm Pool. *FEMS Microbiology Ecology*, 47: 77-84.
- ❖ **Pérez-Jiménez J.R.**, Young L.Y., Kerkhof L.J. (2001). Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in anaerobic hydrocarbondegrading

and pure cultures using the dissimilatory sulfite reductase (*dsrAB*) genes. *FEMS Microbiol Ecol*, 35: 145–150.

- ❖ **Pooladi-Darvish M.** (2004). Gas production from hydrate reservoirs and its modeling. *J. Petroleum Technology*, 61: 65–71.
- ❖ **Reeburgh W.S** (1976). Methane consumption in Cariaco Trench waters and sediments. *Earth and Planetary Science Letters*, 28: 337–344.
- ❖ **Reeburgh W.** (1989). Coupling of the carbon and sulphur cycles through anaerobe methane oxidation. John Wiley & Sons, New York, N.Y.
- ❖ **Reeburgh W.S.,** Ward B.B., Whalen S.C., Sandbeck K.A., Kilpatrick K.A., and Kerkhof L.J. (1991). Black Sea methane geochemistry. *Deep-Sea Res*, 38 (Suppl. 2): S1189–S1210.
- ❖ **Reeve J.N.,** Nolling J., Morgan R.M., and Smith D.R. (1997). Methanogenesis: genes, genomes, and who's on first? *J. Bacteriol*, 179:5975–5986.
- ❖ **Ryuji Kondo., Junki Butani.** (2007). Comparison of the diversity of sulfate-reducing bacterial communities in the water column and the surface sediments of a Japanese meromictic lake. *Limnology*, 8:131–141.
- ❖ **Schippers Axel., Lev N. Neretin.** (2006). Quantification of microbial communities in near-surface and deeply buried marine sediments on the Peru continental margin using real-time PCR. *Environmental Microbiology*, 8(7): 1251–1260.
- ❖ **Sloan E.D.** (1997). *Clathrate Hydrates of Natural Gases*. New York: Marcel Dekker, Inc

- ❖ **Springer E.**, Sachs M.S., Woese C.R., Boone D.R. (1995). Partial gene-sequences for the A subunit of methyl-coenzyme M reductase (*mcrI*) as a phylogenetic tool for the family *Methanosarcinaceae*, *Int. J. Syst. Bacteriol*, 45 : 554–559.
- ❖ **Staffini F.**, Spezzaferri S., Aghib F. (1993). Mud diapirs of the Mediterranean Ridge: sedimentological and paleontological study of the mud breccia. *Rivista Italiana di Paleontologia e Stratigrafia*, 99 (2): 225–254.
- ❖ **Svensson B.H., and Sundh I.** (1992). Factors affecting methane production in peat soils. *Suo*, 43: 183 -190.
- ❖ **Takai K.**, and Horikoshi K. (1999). Genetic diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics*, 152: 1285.-.1297.
- ❖ **Taylor M.**, Dawe R.A., and Thomas S. (2003). Fire and ice: Gas hydrate transportation—a possibility for the Caribbean region. SPE 81022. *Eighth Latin American and Caribbean Petroleum Engineering Conference*, Port of Spain, Trinidad, April.
- ❖ **Tchawa Merlin Yimga**, Peter F. Dunfield, Peter Ricke, Jurgen Heyer, and Werner Liesack. (2003). Wide Distribution of a Novel *pmoA*-Like Gene Copy among Type II Methanotrophs, and Its Expression in *Methylocystis* Strain SC2. *Applied And Environmental Microbiology*, 69: 5593–5602.
- ❖ **Ten Veen J.H.**, Woodside J., Zitter T.A.C., Dumont J., Mascleand J.A.Volkonskaia. (2004). Neotectonic evolution of the Anaximander Mountains at the junction of the Hellenic and Cyprus arcs. *Tectonophysics*, 391: 1-4, 35-65

- ❖ **Thamdrup B.**, Fossing H., Jørgensen B.B. (1994). Manganese, iron, and sulphur cycling in coastal marine sediment Aarhus Bay, Denmark. *Geochim Cosmochim Acta*, 58: 5115–5129.
- ❖ **Thauer R.K.** (1998). Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. 1998 Marjory Stephenson Prize Lecture. *Microbiology*, 144: 2377–2406.
- ❖ **Theisen A.R.**, Hanif M.A., Radajewski S., Dumont M.G., Dunfield P.F., McDonald I.R., Dedysh S.N., Miguez C.B., and Murrell C.J. (2005). Regulation of methane oxidation in the facultative methanotroph *Methylocella silvestris* BL2. *Molecular Microbiology*, 58 (3): 682–692.
- ❖ **Thomsen T.R.**, Finster K., and Ramsing N.B. (2001). Biochemical and molecular signatures of anaerobic methane oxidation in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol*, 67:1646–1656.
- ❖ **Tsunogai U.**, Yoshida N., and Gamo T. (2002). Carbon isotopic evidence of methane oxidation through sulfate reduction in sediment beneath seafloor cold seep vents on the seafloor at Nankai Trough. *Mar. Geol*, 187:145–160.
- ❖ **Upton M.**, Hill B., Edwards C., Saunders J.R., Ritchie D.A., Lloyd D. (2000). Combined molecular ecological and confocal laser scanning microscopic analysis of peat bog methanogen populations. *FEMS Microbiol Lett*, 193:275–281
- ❖ **Valentine D.W.**, Holland E.A., and Schimel D.S. (1994). Ecosystem and physiological controls over methane production in northern wetlands. *J. Geophys. Res*, 99: 1563-1571.

- ❖ **Valentine D.L.** (2002). Biogeochemistry and microbial ecology of methane oxidation in anoxic environments: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81: 271–282.
- ❖ **Wagner M.**, Roger A.J., Flax J.L., Brusseau G.A., Stahl D.A. (1998). Phylogeny of dissimilatory sulfate reductases supports an early origin of sulfate respiration. *J Bacteriol*, 180:2975–2982.
- ❖ **Wagner M.**, Loy A., Klein M., Lee N., Ramsing N.B., Stahl D.A., and Friedrich M.W. (2005). Functional marker genes for identification of sulfate-reducing prokaryotes. *Methods Enzymol*, 397: 469–489.
- ❖ **Widdel F., and Hansen T.A.** (1999). The dissimilatory sulfate- and sulfurreducing bacteria. *In* M. Dworkin, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (ed.), *The prokaryotes: an evolving electronic database for the microbiological community*, 3rd ed., release 3.0. [Online.]. Springer-Verlag, New York, N.Y. <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125>
- ❖ **Woodside J.M.**, Ivanov M.K., and Limonov A.F. (1997). Neotectonics and fluid flow through the seafloor sediments in the Eastern Mediterranean and Black Seas. Part I: Eastern Mediterranean Sea. *IOC Technical Series*, 48: 1-128.
- ❖ **Woodside J.M.**, Ivanov M.K., Limonov A.F., and Shipboard Scientists of the Anaxiprobe expeditions. (1998). Shallow gas and gas hydrates in the Anaximander Mountains region, eastern Mediterranean Sea. *In*: J.-P. Henriot and Mienert J (eds.), *Gas Hydrates: Relevance to World Margin Stability and Climate Change*. Geological Society, London, Special Publications,137: 177-193.

- ❖ **Wuebbles D.J.**, Hayhoe K. (2002). Atmospheric methane and global change. *Earth-Science Review*, 57 : 177–210.
- ❖ **Zachos J.C.**, Lohmann K.C., Walker J.C.G., Wise S.W. (1993). Abrupt climate change and transient climates in the Paleocene: a marine perspective. *Journal of Geology* 100, 191–213.
- ❖ **Zehnder A.J.B.**, and **Brock T.D.** (1979). Methane formation and methane oxidation by methanogenic bacteria. *J Bacteriol*, 137: 420–432.
- ❖ **Zehnder A.J.B.**, and **Brock T.D.** (1980). Anaerobic methane oxidation occurrence and ecology. *Appl Environ Microbiol*, 39 : 194–204.
- ❖ **Zitter T.A.**, Huguen C., ten Veen J.H., Woodside J.M. (2004). Seafloor evidence for tectonic control of mud volcanoes in the Anaximander Mountains. *Mar. Geol.* (in press)
- ❖ **Zitter T.A.**, Huguen C., and Woodside J.M. (2005). Geology of mud volcanoes in the Eastern Mediterranean from combined sidescan and submersible surveys. *Deep Sea Res. Part I. Oceanogr. Res. Papers*, 52(3): 457-475.
- ❖ **Zverlov V.**, Klein M., Lücker S., Friedrich M.W., Kellermann J., Stahl DA., Loy A., Wagner M. (2005). Lateral gene transfer of dissimilatory (bi)sulfite reductase revisited. *J Bacteriol*, 187:2203–2208.

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ❖ <http://www.igme.gr/anaximander>
- ❖ http://www.marum.de/English/Meteor_Cruise_M703.html

6. ABSTRACT

In the current research the occurrence of functional genes, which are responsible for the anaerobe oxidation of methane onto sediments from the East Mediterranean, were investigated. The samples were taken from the Anaximandros Mountains and more specifically, from the mud volcanoes Amsterdam, Kula, Kazan and Thessaloniki. The samples were collected from various depths for each volcano and DNA was extracted from the sediments. I used PCR amplification of this DNA with specific primers for the functional genes, that came up from bacterial and prokaryote organisms with the method of the polymerase chain reaction (PCR). The functional genes are the following ones: methyl coenzyme M reductase (*mcrA*), dissimilatory sulfite reductase (*dsrA*), particulate methane monooxygenase (*pmoA*), soluble methane monooxygenase (*mmoX*) and methanol dehydrogenase (*mxhF*). The *mcrA* gene was found in all of the volcanoes, but not in all the depths from where the sample was taken. Specifically in the mud volcano Amsterdam, gene *mcrA* was detected in depths of 94 cm, 60 cm and 1 cm from the surface of sediment. In the mud volcano Kula it was detected in depths of 75 cm and 15 cm from the surface of sediment. In the mud volcano Kazan it was detected only in the depth of 1cm from the surface of sediment and finally in the mud volcano Thessaloniki it was detected in all depths of sediment. The gene *dsrA* was detected only in the mud volcanoes Thessaloniki and Kula in different depths for each one and after use of internal primers. Specifically in the mud volcano Thessaloniki, gene *dsrA* was detected only in the depth of 120 cm from the surface of sediment,

while in the mud volcano Kula it was detected in depths of 75 cm, 19 cm and 1 cm from the surface of sediment. Finally, the *pmoA*, *mmoX* and *mxoF* genes were not detected in no one of the mentioned before mud volcanoes. The detection of gene *mcrA* in all the mentioned before volcanoes declares evidently that in them it takes place methanogenesis. Also the methane that is produced by methanogenesis oxidizing anaerobic, opinion which is strengthened by the detection of gene *dsrA*, but much more by the weakness of detection of genes *pmoA*, *mmoX* and *mxoF* which is involved in the aerobic oxidation of methane.

Keywords: gas hydrates, anaerobic oxidation of methane, functional genes, sub sea mud volcanoes.