

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

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Εποχικές αλλαγές στη σύσταση ειδών μικροσκοπικών ευκαρυωτών  
στην υδάτινη στήλη της λίμνης Κάρλα»**

**Ελένη Α. Νικούλη**

**ΒΟΛΟΣ 2012**

**«Εποχικές αλλαγές στη σύσταση ειδών μικροσκοπικών ευκαρυωτών στην  
υδάτινη στήλη της λίμνης Κάρλα»**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

- 1) **Κωνσταντίνος Κορμάς**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Επιβλέπων***,
- 2) **Ιφιγένεια Κάγκαλου**, Επίκουρη Καθηγήτρια, Υδρολογία, Λιμνολογία και Ποταμολογία, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος***,
- 3) **Ήρα Καραγιάννη**, Λέκτορας, Υδροβιολογία, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Σχολή Επιστημών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, ***Μέλος***.

*Στην οικογένεια μου*

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Για την ολοκλήρωση της εργασίας αυτής συνέβαλαν πολλοί με ποικίλους τρόπους. Καταρχάς θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες ιδιαίτερα στον Επιβλέποντα της παρούσας εργασίας, κ. Κωνσταντίνο Κορμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθώς και για την πολύτιμη βοήθειά και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Επίσης, ευχαριστώ τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τις κυρίες Κάγκαλου και Καραγιάννη, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας. Θερμές είναι επίσης οι ευχαριστίες μου προς την κα Αλεξάνδρα Μεζίτη και τον κ. Ανδρέα Οικονόμου, για τις χρήσιμες υποδείξεις τους, κυρίως στο πειραματικό μέρος της εργασίας μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να απευθύνω στην οικογένεια μου, που όλα αυτά τα χρόνια μου συμπαραστέκεται ηθικά και οικονομικά, δίνοντας μου τη δυνατότητα να συνεχίσω τις σπουδές μου. Κλείνοντας, οφείλω να ευχαριστήσω και τον κ. Κωνσταντίνο Αποστόλου για την διαρκή υποστήριξη και συμπαράσταση του.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία, μελετήθηκε η εποχική ποικιλότητα των μικροσκοπικών ευκαρυωτών, στην υδάτινη στήλη της λίμνης Κάρλα. Η οικολογική διαδοχή των βιοκοινοτήτων της διακόπηκε λόγω της αποξήρανσης της το 1962 και επανεκκινήθηκε τεχνητά τα τελευταία χρόνια, που βρίσκεται υπό καθεστώς πλήρωσης. Ο προσδιορισμός της ποικιλότητας έγινε μέσω μοριακών τεχνικών, που βασίζονται στη δημιουργία βιβλιοθηκών του φυλογενετικού γονιδίου 18S rRNA, από δείγματα νερού που συλλέχθηκαν κατά τους μήνες Μάιο, Αύγουστο και Νοέμβριο 2010.

Ένα σύνολο από 72, 6 και 54 αλληλουχιών που ανακτήθηκαν από τις βιβλιοθήκες, αναλύθηκαν και ομαδοποιήθηκαν με κριτήριο ομοιότητας  $\geq 98\%$  σε 24, 5 και 12 φυλότυπους, αντίστοιχα. Η αφθονία φυλοτύπων, που παρατηρήθηκε στις βιβλιοθήκες του Μαΐου (KRL03E) και του Νοεμβρίου (KRL09E) ήταν υψηλή σε αντίθεση με την βιβλιοθήκη του Αυγούστου (KRL06E). Τα φυλογενετικά δέντρα που απεικονίζουν την εξελικτική σχέση των φυλοτύπων αυτών, κατασκευάστηκαν με τη χρήση των αλληλουχιών του φυλογενετικού γονιδίου 18S rRNA των τριών βιβλιοθηκών και των αλληλουχιών των πλησιέστερων συγγενών τους.

Οι φυλότυποι ομαδοποιήθηκαν σε οκτώ ταξινομικές ομάδες: Cercozoa, Alveolata, Chlorophyta, Fungi, Stramenopiles, Mesomycetozoa, Cryptophyta, Copepoda. Το Μάιο κυριαρχούσαν τα Fungi (6/24 φυλότυπους, 25/72 αλληλουχίες), με τα Chlorophyta (6/24 φυλότυπους, 24/72 αλληλουχίες) να ακολουθούν. Τα αποτελέσματα από το δείγμα του Αυγούστου, υποδηλώνουν μία χαμηλή αφθονία των ευκαρυωτών, που αποτελούνται πρωτίστως από Fungi (2/5 φυλότυπους, 2/6 αλληλουχίες) και Stramenopiles (1/5 φυλότυπους, 2/5 αλληλουχίες). Η τελευταία

ταξινομική ομάδα, κυριαρχούσε (5/12 φυλοτύπους, 29/54 αλληλουχίες) και το φθινόπωρο (βιβλιοθήκη Νοεμβρίου), με τα Alveolata (3/12 φυλοτύπους, 13/54 αλληλουχίες) να αποτελούν τη δεύτερη κυρίαρχη.

Μέσα από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας και τα αποτελέσματα της μοριακής ποικιλότητας των ευκαρυωτών στη λίμνη Κάρλα, για τους μήνες Μάρτιο και Απρίλιο 2010, που παρουσιάζονται σε άλλες εργασίες, η εποχική ποικιλότητά τους, φαίνεται να ακολουθεί το τυπικό πρότυπο που παρατηρείται και σε άλλες ρηχές εύτροφες λίμνες. Τα Chlorophyta κυριαρχούσαν την άνοιξη, το καλοκαίρι υπήρχε χαμηλή αφθονία του γονιδίου 18S rRNA, που πιθανόν ευθύνεται στην άνθιση των Cyanobacteria, ενώ τα Stramenopiles κυριαρχούν το φθινόπωρο που η θερμοκρασία της λίμνης επανέρχεται σε χαμηλότερα επίπεδα. Η μεγάλη αφθονία των Cercozoa στην αρχή της άνοιξης (βιβλιοθήκη Μαρτίου) και των Fungi στις βιβλιοθήκες του Μαΐου και του Νοεμβρίου, οφείλεται στην κυριαρχία των Chlorophyta και των Stramenopiles, στα είδη των οποίων πιθανών παρασιτούν.

Τα είδη που βρέθηκαν να σχετίζονται με τους φυλοτύπους που ανακτήθηκαν από τα δείγματα, απομονώθηκαν από ποικίλα περιβάλλοντα, που περιλαμβάνουν oligότροφες λίμνες, μέχρι υγρά αποβλήτων. Αρκετά από αυτά τα είδη αποτελούν παράσιτα φυκών, σπονδυλωτών και ασπόνδυλων (*Cryothecomonas longipes*, *Lagenidium caudatum*). Είδη που ανήκουν στην ταξινομική ομάδα Alveolata (*Pseudopfiesteria shumwayae*, *Pfiesteria piscicida*), φαίνεται να παράγουν ιχθυοτοξίνες και να συνδέονται με μαζικούς θανάτους ψαριών και ανθρώπινων ασθενειών. Φυλότυποι που ανήκουν στα Fungi, ταξινομήθηκαν κοντά στον κλάδο Chytridiomycota, που αποτελούν παράσιτα των μικροφυκών και των κυανοβακτηρίων. Επίσης, βρέθηκαν φυλότυποι που φαίνεται να ανήκουν στην ταξινομική ομάδα

Mesomycetozoa (*Ichthyophonida fragrantissima*, *Anurofeca richardsi*), τα είδη της οποίας αποτελούν παράσιτα ψαριών, καρκινοειδών και αμφιβίων. Οι υψηλές θερμοκρασίες που καταγράφηκαν κατά τις δειγματοληψίες, πρέπει να σχετίζονται με το μικρό βάθος και την έκταση της λίμνης, ενώ η υψηλή αλατότητα την καθιστά ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη θαλάσσιων ειδών, όπως το *Chaetoceros gracilis*. Συμπερασματικά, θα πρέπει να αναφερθεί ότι αυτό το νεοσχηματιζόμενο, ασταθές και ταυτοχρόνως μοναδικό οικοσύστημα, κατά τους μήνες που μελετήθηκε και σχολιάστηκε στην παρούσα εργασία, με βάση τους φυλοτύπους που ανακτήθηκαν, φαίνεται να είναι εύτροφο, με δείγματα τοξικότητας .

**Λέξεις κλειδιά:** μικροσκοπικοί ευκαρυώτες, 18S rRNA γονίδιο, λίμνη Κάρλα.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Παράγοντες που επηρεάζουν τις εποχικές μεταβολές των φυτοπλακτικών οργανισμών σε λιμναία οικοσυστήματα.....	2
1.2. PEG model (Phytoplankton Ecology Group).....	2
1.3. Ποικιλότητα των φυτοπλακτικών ειδών κατά τις εποχικές μεταβολές.....	4
1.3.1. Μέθοδοι προσδιορισμού της ποιοτικής και ποσοτικής σύστασης των μικροοργανισμών .....	5
1.4. Σκοπός της εργασίας .....	8
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>9</b>
2.1. Περιοχή μελέτης.....	9
2.2. Δειγματοληψία .....	9
2.3. Απομόνωση DNA.....	10
2.4. Ενίσχυση γονιδίου 18S rRNA .....	11
2.5. Κλωνοποίηση και αλληλούχιση .....	13
2.6. Επεξεργασία αλληλουχιών .....	15
2.7. Φυλογενετική ανάλυση .....	16
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>18</b>
3.1. Φυσικοχημικοί παράγοντες .....	18
3.2. Φυλότυποι των βιβλιοθηκών KRL03E, KRL06E, KRL09E.....	18
3.3. Κάλυψη βιβλιοθήκης και δενδρογράμματα .....	20

<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	<b>29</b>
4.1. Εποχικές μεταβολές των ευκαρυωτικών οργανισμών.....	29
4.2. Σύγκριση των βιβλιοθηκών KRL01E, KRL02E, KRL03E, KRL06E, KRL09E - Εμφάνιση κοινών φυλοτύπων .....	32
4.3. Ανάλυση φυλοτύπων .....	36
4.3.1. Mesomycetozoa .....	36
4.3.2. Fungi.....	37
4.3.3. Copepoda.....	38
4.3.4. Alveolata .....	38
4.3.5. Stramenopiles .....	39
4.3.6. Cercozoa.....	40
4.3.7. Chlorophyta .....	41
4.3.8. Cytophyta .....	42
4.4. Σύγκριση των εποχικών μεταβολών των ευκαρυωτικών οργανισμών της λίμνης Κάρλα, με άλλα ελληνικά λιμναία οικοσυστήματα. ....	42
<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>44</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>47</b>
<b>7. ABSTRACT</b> .....	<b>60</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b> .....	<b>62</b>

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι εποχικές αλλαγές των περιβαλλοντικών συνθηκών, είναι ένα συνηθισμένο φαινόμενο στη φύση, που περιλαμβάνει τόσο ποσοτικές, όσο και ποιοτικές διακυμάνσεις (Schmitt & Holbrook 1986, Hu & Tessier 1995). Οι ρηχές λίμνες, ως συνέπεια του μικρού τους όγκου και του συχνά ασταθής υδρολογικού ισοζυγίου τους, επηρεάζονται πιο εύκολα από αυτές (Padisak 2003), αλλά και από την φόρτιση θρεπτικών συστατικών (Mischke & Nixdorf 2003, Elliott *et al.* 2006). Λόγω της χρήσης τους ως δεξαμενές πόσιμου νερού, για άρδευση και ως χώροι αναψυχής, χρήζουν μεγάλης κοινωνιο-οικονομικής σημασίας, και απαιτούν περισσότερη επιστημονική έρευνα (Padisak & Reynolds 2003). Άλλωστε, παγκοσμίως υπάρχουν περισσότερες ρηχές λίμνες, ενώ το 70% των λιμνών στην Ελλάδα συγκαταλέγεται μέσα σε αυτές (Coops *et al.* 2003). Οι αλλαγές που παρατηρούνται σε αυτά τα οικοσυστήματα, επηρεάζουν την ανάπτυξη των ειδών που διαβιούν σε αυτά και κατά συνέπεια τη σύνθεση των κοινοτήτων τους (DuBoway 1988, DeAngelis *et al.* 2009). Στην περίπτωση των φυτοπλαγκτικών ειδών, ένα μοναδικό, επαναλαμβανόμενο φαινόμενο, που ακολουθεί αυτές τις περιβαλλοντικές μεταβολές, είναι οι εποχικές αλλαγές που παρουσιάζουν (Kivrak 2006) και διαπιστώθηκαν για πρώτη φορά από τον Pearsall (1930). Έκτοτε, έχουν πραγματοποιηθεί ποικίλες μελέτες, με στόχο την εύρεση των αιτιών αυτών των μεταβολών. Οι θεωρίες ισορροπίας (μεταβολή ανεξάρτητη από τις περιβαλλοντικές διακυμάνσεις), προβλέπουν ότι κατά τον ανταγωνισμό των ειδών τα αρμοστικότερα είδη κυριαρχούν και προκαλούν τον αποκλεισμό όλων των άλλων (Hardin 1960). Ωστόσο, ο Hutchinson (1961) στη θεωρία του για το «Παράδοξο του πλαγκτού», αναφέρει ότι πολλά είδη συνυπάρχουν χωρίς ανταγωνιστικό αποκλεισμό.

### 1.1. Παράγοντες που επηρεάζουν τις εποχικές μεταβολές των φυτοπλακτικών οργανισμών σε λιμναία οικοσυστήματα

Οι παράγοντες που ρυθμίζουν τις εποχικές μεταβολές των φυτοπλακτικών οργανισμών, είναι πολλοί και πολύπλοκοι. Πέρα από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες (φωτεινή ένταση, θερμοκρασία κ.α.) και τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών στοιχείων (Mischke & Nixdorf 2003, Elliott *et al.* 2006), φαίνεται να υπάρχουν και άλλοι, όπως η θήρευση και ο παρασιτισμός (Nixdorf *et al.* 2003), καθώς και η συχνότητα και η ποσότητα της παροχής νερού που επηρεάζουν την στάθμη της λίμνης (Padisak 2003).

Τα θρεπτικά στοιχεία, που φαίνεται να αποτελούν τους περιοριστικούς παράγοντες ανάπτυξης των φυκών, είναι ο άνθρακας, το άζωτο και ο φώσφορος (Owens & Esaias 1976), ενώ η ανάπτυξη των διατόμων εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα πυριτίου (Lund 1950). Όσον αφορά τη στάθμη του νερού, στις ρηχές λίμνες κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, η χαμηλή στάθμη σε συνδυασμό με τις υψηλές θερμοκρασίες μπορεί να αποβεί καταστροφική για τους υδρόβιους φυτικούς οργανισμούς (Coops *et al.* 2003).

### 1.2. PEG model (Phytoplankton Ecology Group)

Οι Sommer *et al.* (1986) σε μια προσπάθεια τους να προσδιορίσουν τις εποχικές μεταβολές των πλακτικών οργανισμών, πρότειναν ένα μοντέλο (PEG model) που περιγράφει βήμα – βήμα τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των οργανισμών αυτών για εύκρατες λίμνες. Ωστόσο, το μοντέλο αυτό δεν περιελάμβανε τους αυτότροφους οργανισμούς που ανήκουν στο πικοπλαγκτό (Ernst *et al.* 1999). Σύμφωνα με το πρότυπο αυτό:

- Κατά το τέλος του χειμώνα, η μεγάλη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών σε συνδυασμό με την αύξηση της φωτεινής έντασης, οδηγούν σε ταχεία αύξηση του φυτοπλαγκτού. Τα είδη που κυριαρχούν σε αυτό το στάδιο είναι μικρά σε μέγεθος και διαθέτουν γρήγορους ρυθμούς αύξησης (π.χ. Stramenopiles).
- Στη συνέχεια αυτά τα είδη καταναλώνονται από το ζωοπλαγκτό, τα είδη του οποίου κυριαρχούν σε αυτό το στάδιο.
- Την άνοιξη παρατηρείται μία διαυγής φάση, που οφείλεται στη θήρευση του φυτοπλαγκτού από τους ζωοπλαγκτικούς οργανισμούς.
- Οι οργανισμοί αυτοί κατά τους καλοκαιρινούς μήνες μειώνονται, λόγω της περιορισμένης διαθεσιμότητας τροφής και εξαιτίας της θήρευσής τους από τα νεαρά ψάρια, οδηγώντας στη μείωση της αφθονίας τους. Η μείωση αυτή, σε συνεργασία με την αυξημένη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, παρέχουν πλεονέκτημα στους φυτοπλαγκτικούς οργανισμούς, που αναπτύσσουν μια ποικιλόμορφη κοινότητα.
- Καθώς το καλοκαίρι συνεχίζεται, τα θρεπτικά στοιχεία αρχίζουν να εξαντλούνται με την ακόλουθη σειρά: φώσφορος, πυρίτιο και άζωτο, με τα είδη που αποτελούν το φυτοπλαγκτό να αλλάζουν, ανάλογα με τη βιολογική τους ανάγκη σε αυτά.
- Το ζωοπλαγκτό σε αυτό το στάδιο αποτελείται από είδη μικρού μεγέθους, σε αντίθεση με το φθινόπωρο. Αυτό οφείλεται στην περιορισμένη θήρευση από τα ψάρια, λόγω των χαμηλών θερμοκρασιών.
- Οι χαμηλές θερμοκρασίες που συνεχίζονται το χειμώνα, σε συνδυασμό με τη μείωση της φωτεινής έντασης, έχουν σαν αποτέλεσμα τη μείωση των

πληθυσμών του φυτοπλαγκτού. Επίσης μειώνεται η αναπαραγωγή αλλά και η θήρευση των ζωοπλαγκτικών ειδών.

### 1.3. Ποικιλότητα των φυτοπλαγκτικών ειδών κατά τις εποχικές μεταβολές

Η ιδέα του διαχωρισμού των φυτοπλαγκτικών ειδών σε κατηγορίες ανάλογα με τις απαιτήσεις τους προς αύξηση, προήλθε από τον Hutchinson (1967). Ωστόσο, η πρώτη προσπάθεια, έγινε από τον Reynolds (1980) που επινόησε ένα σύστημα ταξινόμησης των πλαγκτικών φυκών, με βάση την ευαισθησία τους στις περιβαλλοντικές αλλαγές, εμπνευσμένο από τις μεθόδους των Tuxen και Braun – Blanquet (Tuxen 1995, Braun – Blanquet 1964). Στις 14 κατηγορίες που δημιουργήθηκαν αρχικά από τον Reynolds (1980), επισημάνθηκαν διάφορες αλλαγές και η λίστα των ειδών έφτασε τις 31 καταχωρήσεις το 2002, διατηρώντας όμως τους λόγους της εποχικής ποικιλότητας τους (Reynolds *et al.* 2002). Οι κατηγορίες αυτές αναφέρουν τα είδη που κυριαρχούν ανά εποχή σε διάφορους τύπους λημνών (ρηχές, με μεγάλα βάθη, ολιγότροφες, μεσότροφες, εύτροφες, υπερέυτροφες). Μέσα από αυτές, φαίνεται ότι καθώς τα περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά μεταβάλλονται με την εποχή, το ίδιο συμβαίνει και με τα φύκη, υποδηλώνοντας την ύπαρξη διαφόρων προσαρμοστικών εξειδικεύσεων μεταξύ αυτών των ειδών (Reynolds 1984). Εν συντομία, ο Reynolds (1984) παρατήρησε ότι:

- Στις ολιγότροφες λίμνες, παρουσιάζεται μία σημαντική αύξηση της βιομάζας, το καλοκαίρι ή αρχές φθινοπώρου. Κατά την εαρινή περίοδο κυριαρχούν ακτινικά κεντρικά διάτομα (centric diatoms), ενώ κατά τους καλοκαιρινούς μήνες δινομαστιγωτά.
- Στις μεσότροφες λιμνές, παρουσιάζεται μεγαλύτερη αύξηση βιομάζας στα τέλη της άνοιξης. Κατά την εαρινή περίοδο κυριαρχούν τα διάτομα, ενώ

αυξημένη βιομάζα παρουσιάζουν και χλωρόφυτα, χρυσομονάδες καθώς και κρυπτομονάδες. Στο τέλος της άνοιξης – αρχές καλοκαιριού, κυριαρχούν τα χρυσοφύκη ή τα χλωροφύκη που δημιουργούν αποικίες. Κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού κυριαρχούν τα διάτομα, ενώ εμφανής είναι και η παρουσία δινομαστιγωτών και κυανοβακτηρίων.

- Στις εύτροφες λίμνες, παρουσιάζονται δύο μεγάλες αυξήσεις της βιομάζας του φυτοπλαγκτού. Η μία παρατηρείται κατά την εαρινή περίοδο (Μάρτιο – Ιούνιο), όπου κυριαρχούν τα διάτομα (με τα κρυπτόφυτα να αποτελούν την δεύτερη σε κυριαρχία ταξινομική ομάδα) και η δεύτερη κατά την καλοκαιρινή περίοδο από δινομαστιγωτά και κυανοβακτήρια. Το φθινόπωρο παρατηρείται ξανά κυριαρχία των διατόμων.
- Στις υπερέυτροφες λίμνες τα διάτομα, τα ευγληνόφυτα καθώς και μερικά είδη χλωροφυκών κυριαρχούν κατά την εαρινή περίοδο, ενώ στη συνέχεια επικρατούν τα κυανοβακτήρια.

### 1.3.1. Μέθοδοι προσδιορισμού της ποιοτικής και ποσοτικής σύστασης των μικροοργανισμών

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της ποιοτικής και ποσοτικής σύστασης των μικροοργανισμών, παρέχουν είτε ταξινομικές ή λειτουργικές πληροφορίες. Μόνο όσες βασίζονται σε μοριακές τεχνικές μπορούν να παρέχουν και τις δύο.

- Ηλεκτρονική μικροσκοπία

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχει αποτελέσει πολύτιμο εργαλείο για την καταμέτρηση περιβαλλοντικών δειγμάτων, ωστόσο εξωτερικές δομές συνήθως απουσιάζουν ή αλλοιώνονται κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας – συντήρησης –

εξέτασης (Caron *et al.* 1999), ενώ διαφορετικά είδη συχνά έχουν ίδια μορφολογικά χαρακτηριστικά (Hillis & Wiens 2000).

- Καλλιέργειες εμπλουτισμού

Η μέτρηση της μικροβιακής ποικιλότητας μέσω της ανάπτυξης τους σε καλλιέργειες εμπλουτισμού, δίνει στελέχη μικροοργανισμών για λεπτομερείς ελεγχόμενες εργαστηριακές μελέτες. Όμως υπάρχει πιθανότητα αλλοίωσης της ποικιλότητας, υπερεκτιμώντας μικροοργανισμούς που δεν είναι άφθονοι στο υπό μελέτη περιβάλλον (Amann *et al.* 1995, Lim *et al.* 1999). Επίσης για την επιτυχία μιας καλλιέργειας εμπλουτισμού καθοριστικό ρόλο παίζουν το θρεπτικό μέσο, αλλά και οι συνθήκες επώασης, ωστόσο είναι αδύνατο να καλλιεργηθούν όλοι οι μικροοργανισμοί με τις υπάρχουσες μεθόδους, καθώς σε πολλές περιπτώσεις οι συνθήκες που απαιτούνται είναι άγνωστες (Pace 1997).

- Μοριακές τεχνικές και η χρήση του γονιδίου 18S rRNA στη φυλογενετική ανάλυση ευκαρυωτικών οργανισμών

Η ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών έδωσε τη δυνατότητα προσδιορισμού της ποικιλότητας οργανισμών, με βάση αλληλουχίες DNA. Παρά το μεγάλο κόστος τους, τείνουν να κυριαρχούν, καθώς τα μοριακά δεδομένα φαίνεται να παρέχουν καλύτερη πληροφόρηση από τα μορφολογικά, εξαλείφοντας αρκετούς περιορισμούς των παραδοσιακών μεθόδων. Παρέχουν αντικειμενικές ενδείξεις, που επιτρέπουν τον προσδιορισμό της φυλογένεσης όλων των μορφών ζωής, χωρίς να χρειάζεται ένα λειτουργικό κύτταρο. Επίσης βοηθούν στην ταυτοποίηση οργανισμών, που οι συνθήκες που διαβιούν είναι άγνωστες και επομένως δεν μπορούν να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο για περαιτέρω μελέτη (Pace 1997).



Η κύρια μοριακή τεχνική που χρησιμοποιείται σήμερα, βασίζεται στην ανάλυση του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας, που αποτελεί ένα μοριακό ρολόι που δείχνει βαθύτερα τον εξελικτικό χρόνο και παρέχει διαφωτιστικές πληροφορίες για τους οργανισμούς. Η χρήση της τεχνικής αυτής, στην ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων, οδήγησε στην εύρεση πολυάριθμων νέων οργανισμών από ποικίλα ενδιατήματα (Edgcomb *et al.* 2002, Webster *et al.* 2003, Spear *et al.* 2004, de Wever *et al.* 2009, Jebaraj *et al.* 2010).

Σε αντίθεση με τους προκαρυωτικούς οργανισμούς, η χρήση αυτής της τεχνικής σε μελέτες για την ποικιλότητα των ευκαρυωτικών οργανισμών είναι πολύ πρόσφατη (Diez *et al.* 2001, Lopez-Garcia *et al.* 2001). Το γεγονός αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την έλλειψη rRNA αλληλουχιών ευκαρυωτικών οργανισμών στις βάσεις δεδομένων (Philippe *et al.* 2000). Το γονίδιο που χρησιμοποιείται για τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι το 18S rRNA και μπορεί να ενισχυθεί και να κλωνοποιηθεί από περιβαλλοντικά δείγματα. Το κύριο πλεονέκτημα που το καθιστά κατάλληλο φυλογενετικό δείκτη, είναι το μεγάλο μέγεθος της αλληλουχίας, που υποδηλώνει το μέγεθος πληροφορίας που περιέχει (Olsen & Woese 1993).

Η διαδικασία που ακολουθείται ώστε να επιτευχθεί η φυλογενετική ανάλυση είναι η ακόλουθη: απομόνωση DNA από το περιβαλλοντικό δείγμα → ενίσχυση γονιδίου 18S rRNA μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με χρήση ειδικών εκκινήτων → καθαρισμός προϊόντων PCR & εισαγωγή σε πλασμίδια → μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων & επίστρωση σε θρεπτικό μέσο → έλεγχος αποικιών → απομόνωση & καθαρισμός πλασμιδίων → αλληλούχιση. Στη συνέχεια, οι αλληλουχίες χρησιμοποιούνται για την κατασκευή φυλογενετικού δένδρου, όπου πραγματοποιείται συγκριτική ανάλυση με άλλες αλληλουχίες από τις βάσεις

δεδομένων. Το μειονέκτημα που παρουσιάζει, είναι ότι μπορεί να ανακτήσει αλληλουχίες από νεκρά κύτταρα και κύτταρα αλλόχθονων ειδών που δεν παρουσιάζουν μεγάλη σημασία στο υπό μελέτη περιβάλλον (Epstein & Lopez-Garcia 2007).

#### 1.4. Σκοπός της εργασίας

Η παρούσα εργασία, έχει στόχο την εκτίμηση της ποικιλότητας μικροσκοπικών ευκαρυωτών στη λίμνη Κάρλα, με τη χρήση του γονιδίου 18S rRNA από δείγματα νερού που συλλέχθηκαν κατά τους μήνες Μάιο, Αύγουστο και Νοέμβριο 2010. Σκοπός της, είναι να προσδιορίσει την εποχική ποικιλότητα των οργανισμών αυτών που διαβιούν στη λίμνη.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Περιοχή μελέτης

Περιοχή μελέτης της παρούσας εργασίας ήταν η λίμνη Κάρλα ( $39^{\circ}29'02''\text{N}$ ,  $22^{\circ}51'41''\text{E}$ ). Οι προσπάθειες για τη δημιουργία αντιπλημμυρικών και εγγειοβελτιωτικών έργων, σε συνδυασμό με την ανάγκη που παρουσιάστηκε για περιορισμό των επιδημιών ελονοσίας και την πίεση κατοίκων της περιοχής για εξασφάλιση καλλιεργήσιμων εκτάσεων, οδήγησαν το 1962 σε ολική αποξήρανσή της, με απόφαση της πολιτείας. Σύμφωνα με τον Ananiadi (1956), η λίμνη αποτελούσε ένα υγιή βιότοπο με μεγάλη βιοποικιλότητα. Η αποστράγγισή της όμως, είχε σαν αποτέλεσμα την περιβαλλοντική υποβάθμιση της περιοχής (Zalidis *et al.* 2005). Η ακαταλληλότητα των εδαφών για καλλιέργεια, η αδυναμία υδροδότησης οικισμών, σε συνδυασμό με την ραγδαία πτώση του υδροφόρου ορίζοντα, την εμφάνιση ρηγμάτων και διάφορων άλλων περιβαλλοντικών επιπτώσεων (Zalidis & Gerakis 1999), οδήγησαν στην απόφαση για αποκατάσταση της λίμνης. Σε σύγκριση με την αρχική της έκταση ( $180 \text{ Km}^2$ ), δημιουργήθηκε ένας μικρότερος ταμιευτήρας ( $38 \text{ Km}^2$ ), ο οποίος από το Σεπτέμβριο 2009 τροφοδοτείται με νερό από τον Πηνειό ποταμό. Ωστόσο τα εδάφη της, λόγω της γεωργικής εκμετάλλευσής τους είναι εμπλουτισμένα από λιπάσματα (Triantafyllou *et al.* 2001).

### 2.2. Δειγματοληψία

Τα δείγματα συλλέχθηκαν επιφανειακά σε αποστειρωμένα πλαστικά δοχεία των 5L, από την παρόχθια ζώνη της λίμνης (βάθους 40 – 50 cm) κατά τους μήνες Μάιο, Αύγουστο και Νοέμβριο 2010, στο σημείο βυθομέτρησης (N.A. άκρο). Κατά τις δειγματοληψίες καταγράφηκαν οι τιμές των φυσικοχημικών παραγόντων (pH, Θερμοκρασία, αλατότητα, αγωγιμότητα) με αισθητήρα *in situ* (WTW, Germany). Το

κάθε δείγμα, διηθήθηκε σχεδόν αμέσως μετά τη συλλογή του, στο εργαστήριο Γενετικής του τμήματος «Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος», της σχολής «Γεωπονικών επιστημών» του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, χρησιμοποιώντας συσκευή διήθησης μέσω μεμβρανικού ηθμού 0,2μm. Οι σχετικά μεγάλοι οργανισμοί που τυχόν υπήρχαν στο δείγμα νερού, παρακρατήθηκαν σε προ-διήθηση με ηθμό 180 μm ώστε να αποφευχθεί το φράξιμο των ηθμών με μικρότερους πόρους. Η διαδικασία της διήθησης πραγματοποιήθηκε υπό κενό, του οποίου όμως η πίεση ήταν μικρότερη από 150 mm Hg, ώστε να αποφευχθεί η καταστροφή των κυττάρων που επικάθονταν στο φίλτρο. Τα φίλτρα των 0,2 μm αποθηκεύτηκαν προσωρινά στους -24°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω επεξεργασία.

### 2.3. Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του DNA, τα φίλτρα στα οποία διηθήθηκαν τα δείγματα νερού και είχαν αποθηκευτεί προσωρινά στους -24°C, τεμαχίστηκαν σε λεπτές λωρίδες με αποστειρωμένο νυστέρι. Στη συνέχεια σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, για μέγιστη απόδοση χρησιμοποιήθηκε το Ultra Clean Mega Soil DNA Kit (MoBio, USA). Το πρωτόκολλο απομόνωσης, απομακρύνει αποτελεσματικά αναστολείς της PCR συμπεριλαμβανομένων και των χουμικών οξέων. Η βασική διαδικασία βασίζεται στο συνδυασμό μηχανικής λύσης των κυττάρων με εξειδικευμένα σφαιρίδια, θερμότητα και απορρυπαντικά, με το DNA να δεσμεύεται σε ένα φίλτρο πυριτίου. Στο τελευταίο στάδιο της διαδικασίας, το φίλτρο ξεπλένεται με ένα ειδικό διάλυμα που απελευθερώνει το DNA. Στη συνέχεια ακολούθησε ποσοτικοποίηση του DNA με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου NanoDrop ND-1000 δίνοντας τις τιμές που αναφέρονται στον Πίνακα 1.

**Πίνακας 1:** Η ποσότητα DNA σε κάθε δείγμα μετά την απομόνωση.

Δείγμα	DNA ng/μL
KRL03	10,2
KRL06	5,7
KRL09	2,6

#### 2.4. Ενίσχυση γονιδίου 18S rRNA

Για την ενίσχυση του γονιδίου 18S rRNA στα δείγματα KRL03 και KRL06 χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές EukA (5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') (Medlin *et al.* 1998) και Euk1633 (5'-GGGCGGTGTGTACAARGR-3') (Dawson & Pace 2002), ενώ για το KRL09 πραγματοποιήθηκαν δυο διαδοχικές αντιδράσεις PCR (Nested PCR). Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές EukA και EukB (5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3') (Medlin *et al.* 1998), ενώ στη δεύτερη PCR ο EukB αντικαταστάθηκε από τον Euk1633, ώστε να ενισχυθεί επιλεκτικά το προϊόν της πρώτης PCR. Το μείγμα της PCR, τελικού όγκου 50 μl, περιείχε περίπου 1 μL περιβαλλοντικού DNA, 10 μL buffer 5x (Green GoTaq Flexi buffer, Promega), 5 μL dNTPs (2 mM), 3μL MgCl<sub>2</sub> (25 mM, 1,2 ml), 0,25 μL από κάθε εκκινητή και 0,25 μL Taq πολυμεράσης (GoTaq DNA polymerase, Promega). Τα θερμοκρασιακά πρόγραμμα για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR περιγράφονται στους Πίνακες 2 και 3.

**Πίνακας 2:** Θερμοκρασιακό πρόγραμμα για τους εκκινητές EukA και EukB.

	Βήματα	Θερμοκρασία	Χρονική διάρκεια
1 <sup>ο</sup>	Αρχική αποδιάταξη	95°C	15 λεπτά
2 <sup>ο</sup>	Αποδιάταξη	95°C	45 δευτερόλεπτα
3 <sup>ο</sup>	Υβριδοποίηση εκκινητών	55°C	1 λεπτό
4 <sup>ο</sup>	Επιμήκυνση των θυγατρικών κλώνων	72°C	2 λεπτά και 30 δευτερόλεπτα
5 <sup>ο</sup>	Τελική επιμήκυνση	72°C	7 λεπτά

**Πίνακας 3:** Θερμοκρασιακό πρόγραμμα για τους εκκινητές EukA και Euk1633

	Βήματα	Θερμοκρασία	Χρονική διάρκεια
1 <sup>ο</sup>	Αρχική αποδιάταξη	95°C	2 λεπτά
2 <sup>ο</sup>	Αποδιάταξη	95°C	40 δευτερόλεπτα
3 <sup>ο</sup>	Υβριδοποίηση εκκινητών	50°C	40 δευτερόλεπτα
4 <sup>ο</sup>	Επιμήκυνση των θυγατρικών κλώνων	72°C	2 λεπτά και 15 δευτερόλεπτα
5 <sup>ο</sup>	Τελική επιμήκυνση	72°C	7 λεπτά

Τα βήματα 2 - 4 των θερμοκρασιακών προγραμμάτων της PCR επαναλήφθηκαν για 31 κύκλους. Μετά το πέρας της ενίσχυσης του επιθυμητού γονιδίου, το αποτέλεσμα της όλης αντίδρασης οπτικοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% σε διάλυμα 1x TAE. Το πήκτωμα αφέθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης για 30 λεπτά στα 90 Volts. Η χρώση του πηκτώματος έγινε σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr).

Για τα δείγματα KRL03 και KRL09 στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση κύκλων ώστε να βρεθεί ο μικρότερος αριθμός επαναλήψεων που θα δώσει θετικό αποτέλεσμα (28 και 20 κύκλοι αντίστοιχα) ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι εγγενείς περιορισμοί της PCR (Spiegelman *et al.* 2005). Οι αντιδράσεις PCR που πραγματοποιήθηκαν για το δείγμα KRL06 επαναλήφθηκαν για 30 - 40 κύκλους. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν μαρτυρούν μικρή αφθονία του φυλογενετικού γονιδίου 18S rRNA στο συγκεκριμένο δείγμα.

Στη συνέχεια, ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων της PCR ώστε να αυξηθούν οι πιθανότητες απόδοσης της κλωνοποίησης. Ο καθαρισμός του DNA πραγματοποιήθηκε με το τυποποιημένο PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen Co.) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Είναι σχεδιασμένο για τον καθαρισμό DNA από πήκτωμα αγαρόζης. Το DNA που λήφθηκε στο τέλος της διαδικασίας ήταν απαλλαγμένο από πρωτεΐνες, χρωστικές και αγαρόζη και ήταν έτοιμο

προς χρήση για κλωνοποίηση. Το πήκτωμα αγαρόζης που χρησιμοποιήθηκε ήταν  $\leq$  2%. Στο τέλος έγινε ποσοτικοποίηση του DNA με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου NanoDrop ND-1000 (Πίν. 4).

**Πίνακας 4:** Η ποσότητα DNA μετά τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR.

Δείγμα	DNA ng/ $\mu$ L
KRL03	4,8
KRL06	4,3
KRL09	9,1

## 2.5. Κλωνοποίηση και αλληλούχιση

Για την κλωνοποίηση των γονιδίων που προέκυψαν από τον καθαρισμό των προϊόντων PCR, χρησιμοποιήθηκε το Topo TA Cloning kit for sequencing και το πρωτόκολλο μετασχηματισμού κυττάρων (*Escherichia coli*) με ηλεκτροόσμωση, σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή (Invitrogen Co.). Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση της κλωνοποίησης, δημιουργήθηκε μείγμα που περιείχε φρέσκο προϊόν από αντίδραση PCR, διάλυμα αλάτων και το φορέα κλωνοποίησης (πλασμίδια). Η Taq πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε στην PCR, προσθέτει στα 3'-άκρα του προϊόντος μια δεόξυαδενίνη (A), ενώ ο φορέας κλωνοποίησης, διαθέτει βάση δεόξυθυμίνης (T) στα 3'-άκρα του, ώστε να προκύψει ο επιθυμητός μετασχηματισμός. Το διάλυμα αλάτων επηρεάζει το ποσοστό των μετασχηματισμένων κυττάρων.

Το μείγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min και στη συνέχεια προστέθηκε στα κύτταρα *E. Coli*. Ακολούθησε μετασχηματισμός κυττάρων με την διαδικασία της ηλεκτροόσμωσης και αφού προστέθηκε στα κύτταρα θρεπτικό μέσο ανάρρωσης, επώαστηκαν για 1h στους 37°C. Στη συνέχεια έγινε επίστρωσή τους σε

τροβλία με θρεπτικό μέσο Luria-Bertani agar με καναμυκίνη, που επιτρέπει την ανάπτυξη μόνο των κυττάρων που έχουν δεχτεί το ένθεμα κατά την κλωνοποίηση και επωάστηκαν για 18h στους 37°C.

Μετά την ανάπτυξη των μετασχηματισμένων κυττάρων στα τροβλία, πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την ύπαρξη του σωστού ενθέματος. Η παρουσία του ενθέματος ελέγχθηκε με PCR αποικιών, χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών M13F (5'-GTAAAACGCCCAG-3') και M13R (5'CAGGAAACAGCTATGAC-3'). Οι εκκινητές είναι ειδικοί για το φορέα κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε. Η τεχνική αυτής της PCR διαφέρει, στο ότι αντί να προστεθεί μήτρα DNA προστίθεται μικρή ποσότητα βακτηριακής αποικίας από τα τροβλία. Το μείγμα της, τελικού όγκου 20  $\mu\text{L}$ , περιείχε 4  $\mu\text{L}$  buffer 5x (Green GoTaq Flexi buffer, Promega), 2  $\mu\text{L}$  dNTPs, 1,2  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$ , 0,2  $\mu\text{L}$  από κάθε εκκινητή και 0,08  $\mu\text{L}$  Taq πολυμεράσης (GoTaq DNA polymerase, Promega). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση της αντίδρασης περιγράφεται στον Πίνακα 5.

**Πίνακας 5:** Θερμοκρασιακό πρόγραμμα για τους εκκινητές M13F & M13R

	Βήματα	Θερμοκρασία	Χρονική διάρκεια
1°	Αρχική αποδιάταξη	94°C	5 λεπτά
2°	Αποδιάταξη	94°C	45 δευτερόλεπτα
3°	Υβριδοποίηση εκκινητών	52,5°C	45 δευτερόλεπτα
4°	Επιμήκυνση των θυγατρικών κλώνων	72°C	2 λεπτά
5°	Τελική επιμήκυνση	72°C	10 λεπτά

Τα βήματα 2 - 4 επαναλήφθηκαν για 25 κύκλους. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% σε διάλυμα 1x TAE. Το πήκτωμα αφέθηκε στη συσκευή



ηλεκτροφόρησης για 30 min στα 90 Volts. Η χρώση του πηκτώματος έγινε σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και ο έλεγχος των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Οι κλώνοι, που αποδείχτηκε ότι έχουν το ζητούμενο ένθεμα, εμβολιάστηκαν σε υγρές καλλιέργειες όγκου 1,4 ml η κάθε μία, με θρεπτικό μέσο Luria-Bertani και καναμυκίνη συγκέντρωσης 50μg/ml. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 18 h στις 180 rpm. Μετά την επώαση πραγματοποιήθηκε απομόνωση των πλασμιδίων με το τυποποιημένο Nucleospin Plasmid QuickPure kit (Macherey-Nagel, Germany), σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή. Σύμφωνα με αυτό, το πλασμιδιακό DNA απελευθερώνεται από τα κύτταρα E. Coli και καταλίγει καθαρό και ελεύθερο προσμίξεων. Τα απομονωμένα πλασμίδια φυλάχθηκαν στους -20°C. Η αλληλούχηση των πλασμιδίων πραγματοποιήθηκε σε συσκευή αλληλούχησης τριχοειδούς αγγείου, με τη χρήση του BigDye Terminator kit (Applied Biosystems Inc.).

## 2.6. Επεξεργασία αλληλουχιών

Αρχικά έγινε στοίχιση των αλληλουχιών με το πρόγραμμα πολλαπλής ευθυγράμμισης CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), το οποίο υπολογίζει την καλύτερη αντιστοιχία για τις επιλεγμένες αλληλουχίες και τις οργανώνει έτσι ώστε οι ομοιότητες και οι διαφορές τους να είναι ορατές. Βασιζόμενο στις κατά ζεύγη ευθυγραμμίσεις ζευγών ακολουθιών, έχει υπολογίσει το βαθμό ομοιότητας κάθε ακολουθίας με κάθε μία ξεχωριστά. Χρησιμοποιώντας ως κριτήριο ομοιότητας  $\geq 98\%$  (Stackebrandt & Goebel 1994), οι κλώνοι ομαδοποιήθηκαν και θεωρήθηκαν μέλη του ίδιου φυλότυπου.

Για να διαπιστωθεί αν φυλότυποι και τα επιμέρους δείγματα στις βιβλιοθήκες που δημιουργήθηκαν αντιπροσωπεύουν επαρκώς την ποικιλότητα στην περιοχή

μελέτης, ελέγχθηκε αν το μέγεθος της βιβλιοθήκης είναι αντιπροσωπευτικό. Αυτό επιτυγχάνεται με τη βοήθεια του λογισμικού που πρότειναν οι Kemp & Aller (2004), παρέχοντας μας σταθερές εκτιμήσεις. Αυτή η διαδικασία αξιολόγησης βασίζεται στους δείκτες  $S_{Chao1}$  (Chao 1984) και  $S_{ACE}$  (Chao et al. 1993). Στην παρούσα μελέτη για κάθε βιβλιοθήκη κλώνων ως κύριος δείκτης χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης Good's C (Good 1953) που δίνεται από τον τύπο  $[1 - (n_i/N)]$ , όπου  $n_i$  ο αριθμός των φυλοτύπων που αντιπροσωπεύονται από έναν μοναδικό εκπρόσωπο (Singletons) και  $N$  είναι το σύνολο των κλώνων που υπάρχουν στην βιβλιοθήκη.

Ο αλγόριθμος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) που χρησιμοποιείται για τη σύγκριση μιας αλληλουχίας με μια βάση δεδομένων, έχει αναπτυχθεί και διατηρείται από το NCBI (National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ώστε κάθε αλληλουχία να συγκριθεί με διαθέσιμες αλληλουχίες στις βάσεις δεδομένων του NCBI, ώστε να βρεθούν οι κοντινότεροι συγγενείς της κάθε αλληλουχίας. Για την εύρεση πιθανών χιμαιρικών αλληλουχιών, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Pintail (Ashelford *et al.* 2005), που συγκρίνει τις εξελικτικές αποστάσεις μεταξύ των αλληλουχιών που προέκυψαν από τη μελέτη, με συγγενικές αξιόπιστες αλληλουχίες.

## 2.7. Φυλογενετική ανάλυση

Τα φυλογενετικά δέντρα χρησιμοποιούνται για να γίνει απεικόνιση της εξελικτικής σχέσης των φυλοτύπων. Για τη δημιουργία φυλογενετικού δένδρου χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MEGA έκδοση 5. Η τοπολογία του δένδρου βασίστηκε στη μέθοδο του κοντινότερου γείτονα (Neighbour-Joining) (Saitou & Nei,

1987) και έγινε διόρθωση κατά Jukes-Cantor (1969). Ο έλεγχος της στατιστικής εγκυρότητας της τοπολογίας του δένδρου έγινε με τη μέθοδο bootstrap.

Για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες του φυλογενετικού γονιδίου 18S rRNA των βιβλιοθηκών KRL03E, KRL06E και KRL09E, που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία, των βιβλιοθηκών KRL01E και KRL02E (Oikonomou *et al.* 2012) και οι αλληλουχίες των πλησιέστερων συγγενών τους. Σε κάθε φυλογενετικό δέντρο χρησιμοποιήθηκε, επίσης, μία μακρινή αλληλουχία ως ρίζα (outgroup), που αποτελεί τον κοινό πρόγονο όλων των αλληλουχιών (*Jakoba libera*) ώστε να προσδιοριστεί η εξελικτική σχέση των ειδών.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Φυσικοχημικοί παράγοντες

Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται οι τιμές των φυσικοχημικών παραγόντων (pH, Θερμοκρασία, αλατότητα, αγωγιμότητα) που καταγράφηκαν κατά τις δειγματοληψίες με αισθητήρα in situ (WTW, Germany). Η υψηλότερη θερμοκρασία καθώς και αλατότητα, παρατηρήθηκαν κατά το μήνα Αύγουστο και οι χαμηλότερες τον Νοέμβριο. Η αγωγιμότητα ακολουθεί τις ίδιες εποχικές αυξομειώσεις, δεδομένου ότι κατά γενικό κανόνα, όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση των αλάτων σε ένα διάλυμα, τόσο μεγαλύτερη είναι η δυνατότητα να άγει το ηλεκτρικό ρεύμα.

**Πίνακας 6:** Φυσικοχημικοί παράμετροι που καταγράφηκαν στις δειγματοληψίες.

Βιβλιοθήκη	Ημερομηνία	pH	Θερμοκρασία (°C)	Αλατότητα (PSU)	Αγωγιμότητα (mS/cm)
KRL03E	28.05.10	8	19,7	9,9	17,01
KRL06E	28.08.10	8,5	31,7	13,2	23,01
KRL09E	25.11.10	8,8	12,2	2,9	5,51

#### 3.2. Φυλότυποι των βιβλιοθηκών KRL03E, KRL06E, KRL09E

Ένα σύνολο από 72, 6 και 54 αλληλουχίες που ανακτήθηκαν από τις βιβλιοθήκες του Μαΐου, του Αυγούστου και του Νοεμβρίου, απέμεινε για ανάλυση μετά την απαλλαγή από τις χμιαϊκές αλληλουχίες. Οι κλώνοι αυτοί ομαδοποιήθηκαν με κριτήριο ομοιότητας  $\geq 98\%$  σε 24, 5 και 12 φυλότυπους αντίστοιχα (Πιν. 7).

Οι φυλότυποι που βρέθηκαν, ανήκαν στις ακόλουθες ταξινομικές ομάδες: Mesomycetozoa, Chlorophyta, Fungi, Alveolata, Cercozoa, Copepoda, Cryptophyta και Stramenopiles. Αυτοί που έχουν έναν αντιπροσωπευτικό εκπρόσωπο, αποτελούν το 56,10 % των φυλοτύπων.

**Πίνακας 7:** Αριθμός φυλοτύπων και αφθονία ανά ταξινομική ομάδα για κάθε βιβλιοθήκη

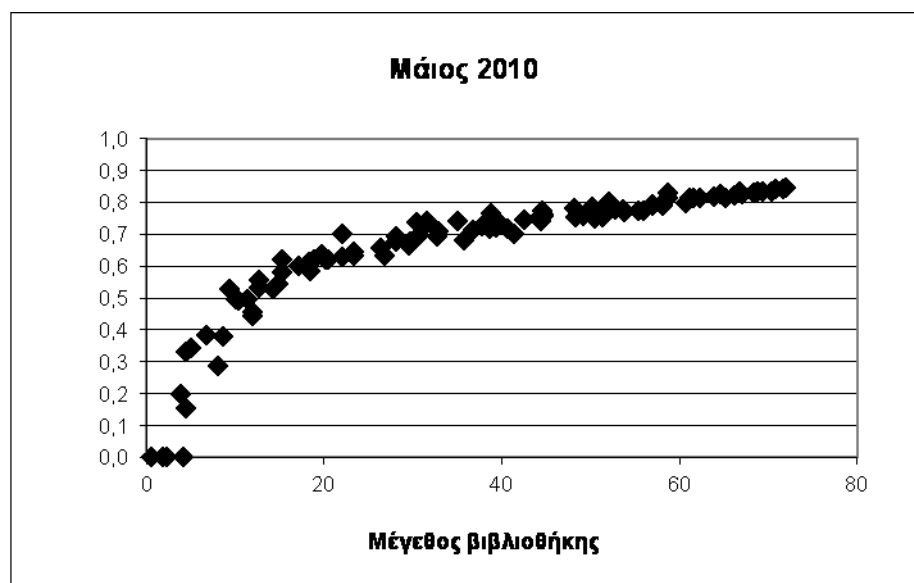
Ταξινομικές ομάδες	KRL03		KRL06		KRL09	
	#φυλοτύπων	Αφθονία	#φυλοτύπων	Αφθονία	#φυλοτύπων	Αφθονία
<b>Chlorophyta</b>	6	24	0	0	2	2
<b>Cryptophyta</b>	0	0	1	1	1	9
<b>Alveolata</b>	3	5	0	0	3	13
<b>Fungi</b>	6	25	2	2	1	1
<b>Mesomycetazoa</b>	2	3	1	1	0	0
<b>Cercozoa</b>	2	4	0	0	0	0
<b>Copepoda</b>	1	1	0	0	0	0
<b>Stramenopiles</b>	4	10	1	2	5	29
<b>Σύνολο</b>	<b>24</b>	<b>72</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>12</b>	<b>54</b>

Στη βιβλιοθήκη Μαΐου (KRL03E), οι πιο άφθονες ταξινομικές ομάδες ήταν τα Fungi και τα Chlorophyta (25/72 και 24/72 αντιπροσωπευτικοί εκπρόσωποι, αντίστοιχα). Οι υπόλοιποι φυλότυποι που βρέθηκαν ανήκουν στις ακόλουθες ταξινομικές ομάδες: Mesomycetazoa, Alveolata, Cercozoa, Stramenopiles και Copepoda. Η βιβλιοθήκη του Αυγούστου (KRL06E), παρουσιάζει πολύ χαμηλή αφθονία φυλοτύπων. Όλοι οι φυλότυποι αυτής της βιβλιοθήκης είχαν έναν αντιπροσωπευτικό εκπρόσωπο, εκτός από το φυλότυπο KRL06E127 που εκπροσωπείται από δύο κλώνους. Οι κυρίαρχοι φυλότυποι των βιβλιοθηκών του Αυγούστου (KRL06E127) και του Νοεμβρίου (KRL09E37, 18/54 κλώνοι), ανήκουν στην ταξινομική ομάδα των Stramenopiles. Οι υπόλοιπες ταξινομικές ομάδες που βρέθηκαν στη βιβλιοθήκη του Αυγούστου είναι τα Fungi, τα Mesomycetazoa και τα Cryptophyta ενώ στη βιβλιοθήκη του Νοεμβρίου βρέθηκαν επίσης Alveolata και Chlorophyta.

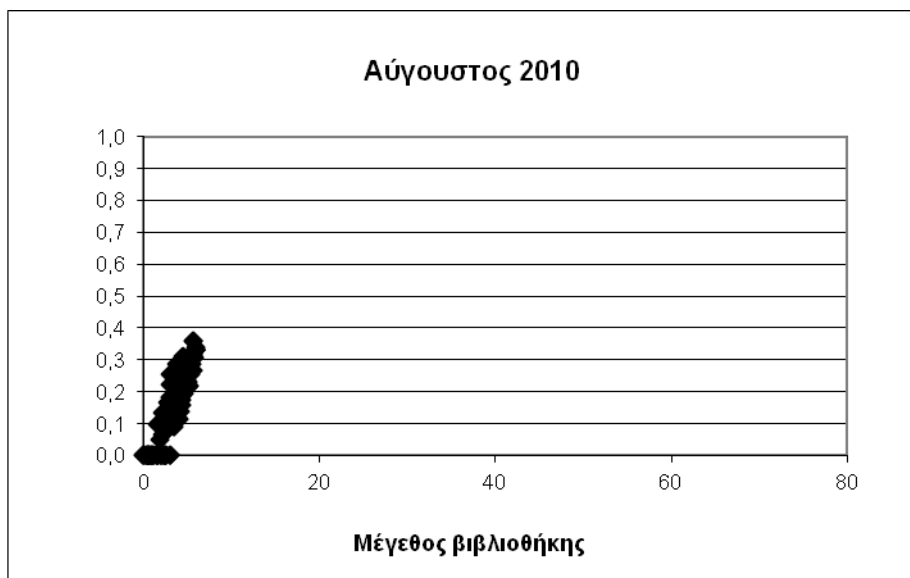
### 3.3. Κάλυψη βιβλιοθήκης και δενδρογράμματα

Με τη βοήθεια του λογισμικού που πρότειναν οι Kemp & Aller (2004) (<http://www.aslo.org/lomethods/free/2004/0114a.html>), ελέγχθηκε το μέγεθος της κάθε βιβλιοθήκης με σκοπό να διαπιστωθεί αν όντως είναι αντιπροσωπευτικό. Οι ασυμπτωτικές ευθείες που σχηματίστηκαν για τις βιβλιοθήκες του Μαΐου και του Νοέμβριου (Σχ. 1 και 3), ξεπέρασαν το 80% υποδηλώνοντας ότι το δείγμα που πάρθηκε κάλυπτε επαρκώς την ποικιλότητα των ευκαρυωτών της περιοχής, σε αντίθεση με την βιβλιοθήκη του Αυγούστου (Σχ. 2).

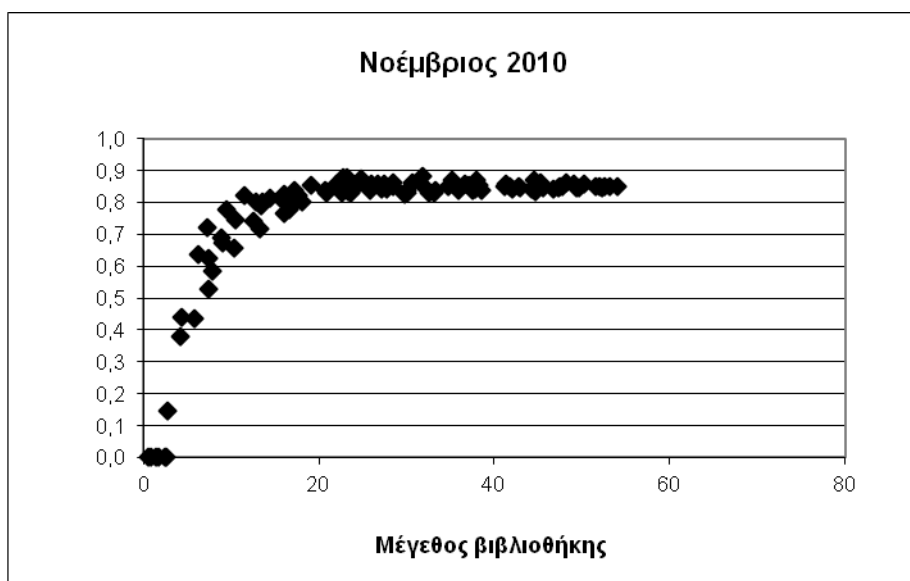
Η απεικόνιση των φυλογενετικών σχέσεων των φυλοτύπων που βρέθηκαν στην παρούσα μελέτη, έγινε ανά ταξινομική ομάδα (Mesomycetozoa, Chlorophyta, Alveolata, Cercozoa, Stramenopiles, Copepoda, Cryptophyta και Fungi). Για βέλτιστη απεικόνιση οι φυλοτυποι των Fungi παρουσιάζονται σε δύο σχήματα (Σχ. 4 & 5) Τα δενδρογράμματα δίνονται υπό κλίμακα 0,02 με το μήκος των κλάδων να αντιπροσωπεύει τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των φυλοτύπων (Σχ. 4 – 12).



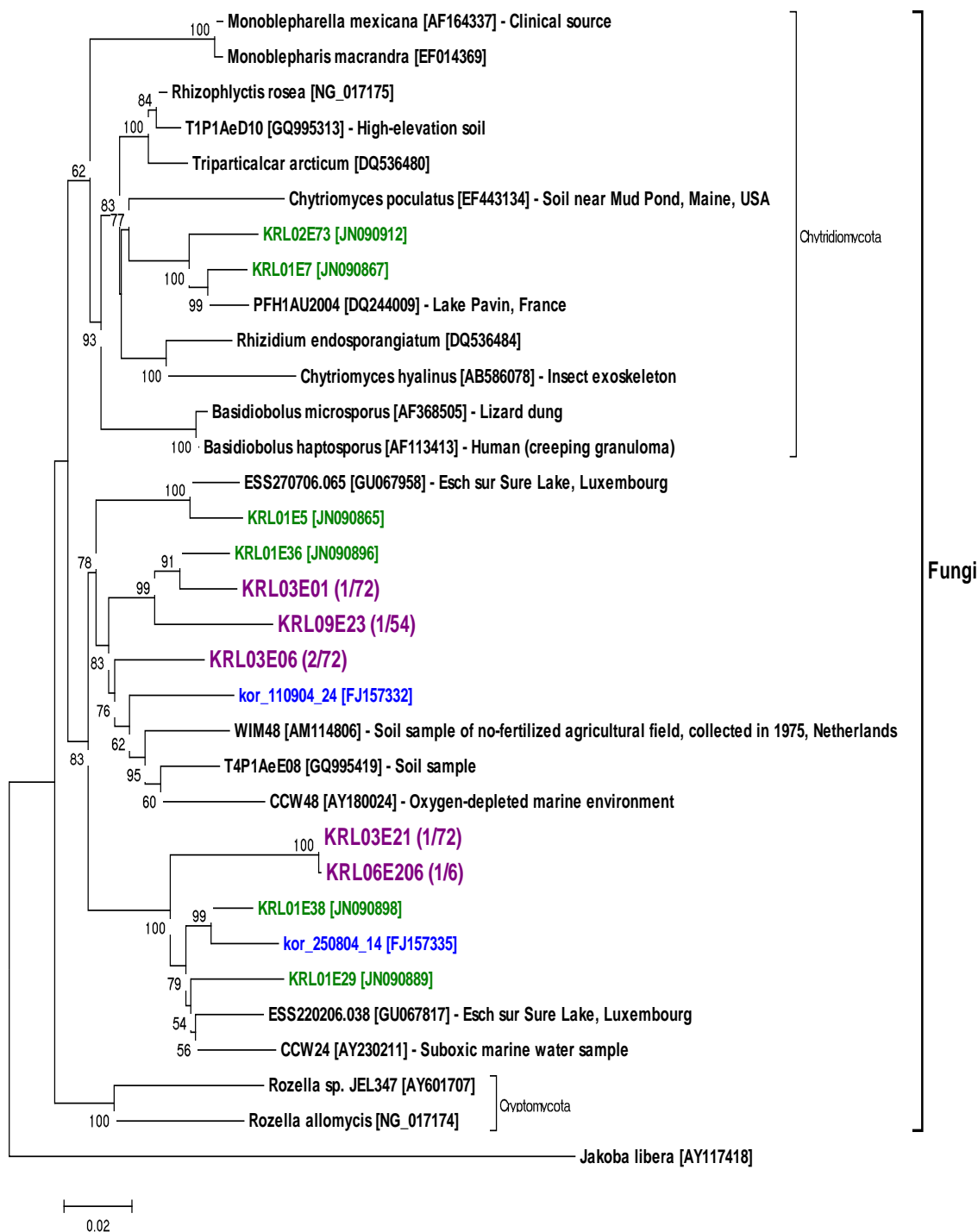
**Σχήμα 1:** Κάλυψη της βιβλιοθήκης κλώνων Μαΐου 2010 με βάση το δείκτη



**Σχήμα 2:** Κάλυψη της βιβλιοθήκης κλώνων Αυγούστου 2010 με βάση το δείκτη Good's C.

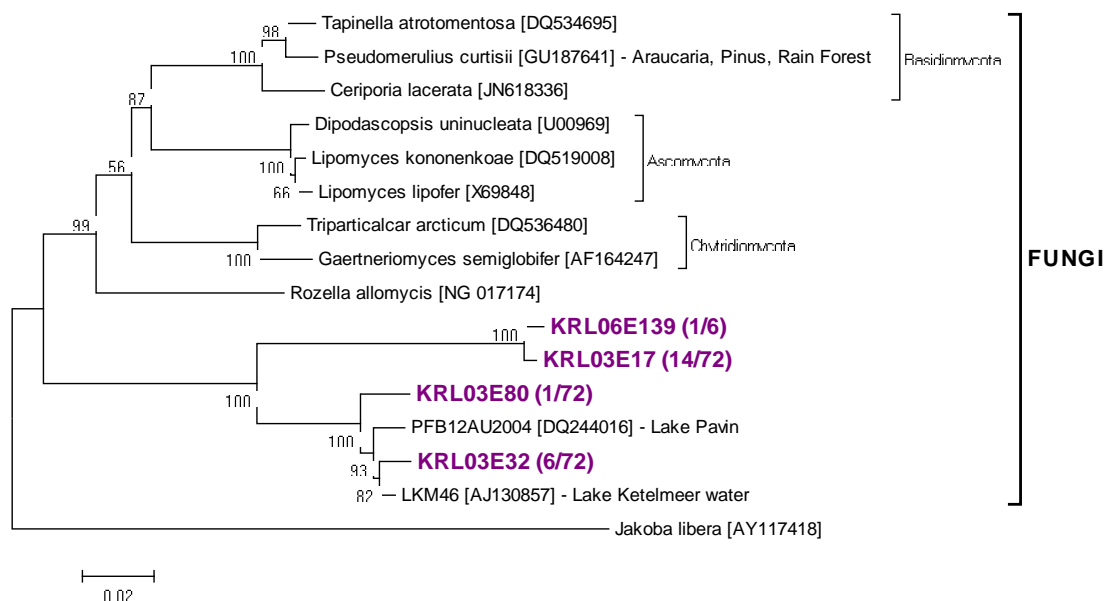


**Σχήμα 3:** Κάλυψη της βιβλιοθήκης κλώνων Νοεμβρίου με βάση το δείκτη Good's C.

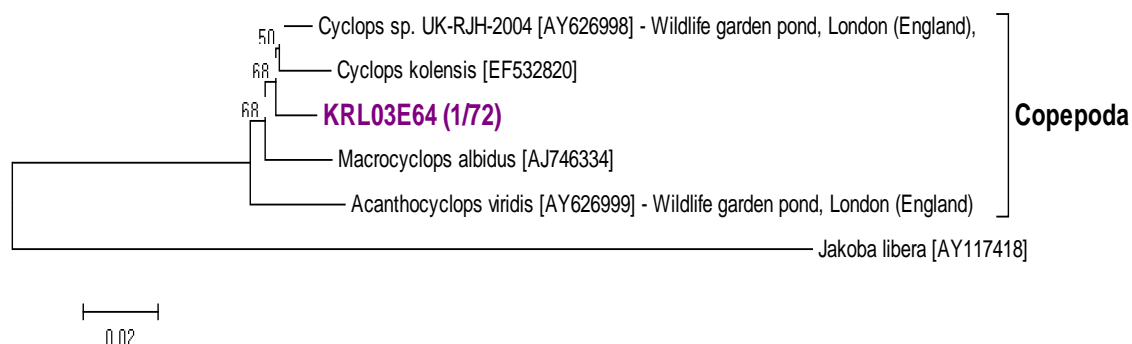


**Σχήμα 4:** Δενδρόγραμμα των φυλοτύπων του 18S rRNA γονιδίου των βιβλιοθηκών KRL03E, KRL06E, KRL09E (με μωβ χρώμα), που ομαδοποιήθηκαν στην ταξινομική ομάδα των Fungi. Με πράσινο χρώμα παρουσιάζονται οι φυλότυποι του 18S rRNA γονιδίου των βιβλιοθηκών KRL01E και KRL02E (Oikonomou *et al.* 2012), ενώ με μπλε χρώμα, φυλότυποι του 18S rRNA γονιδίου των Genitsaris *et al.* (2009). Στις παρενθέσεις αναφέρονται οι κοινοί φυλότυποι ( $\geq 98\%$ ) που βρέθηκαν από το σύνολο των φυλωτύπων σε κάθε βιβλιοθήκη. Οι αγκύλες περιέχουν τον αριθμό της βάσης δεδομένων GenBank που αντιστοιχεί σε κάθε κοντινό συγγενή. Οι πληροφορίες που αναγράφονται αναφέρονται στο περιβάλλον απομόνωσης τους. Το δέντρο δίνεται υπό κλίμακα 2%. Τιμές κάτω του 50% δεν εμφανίζονται.

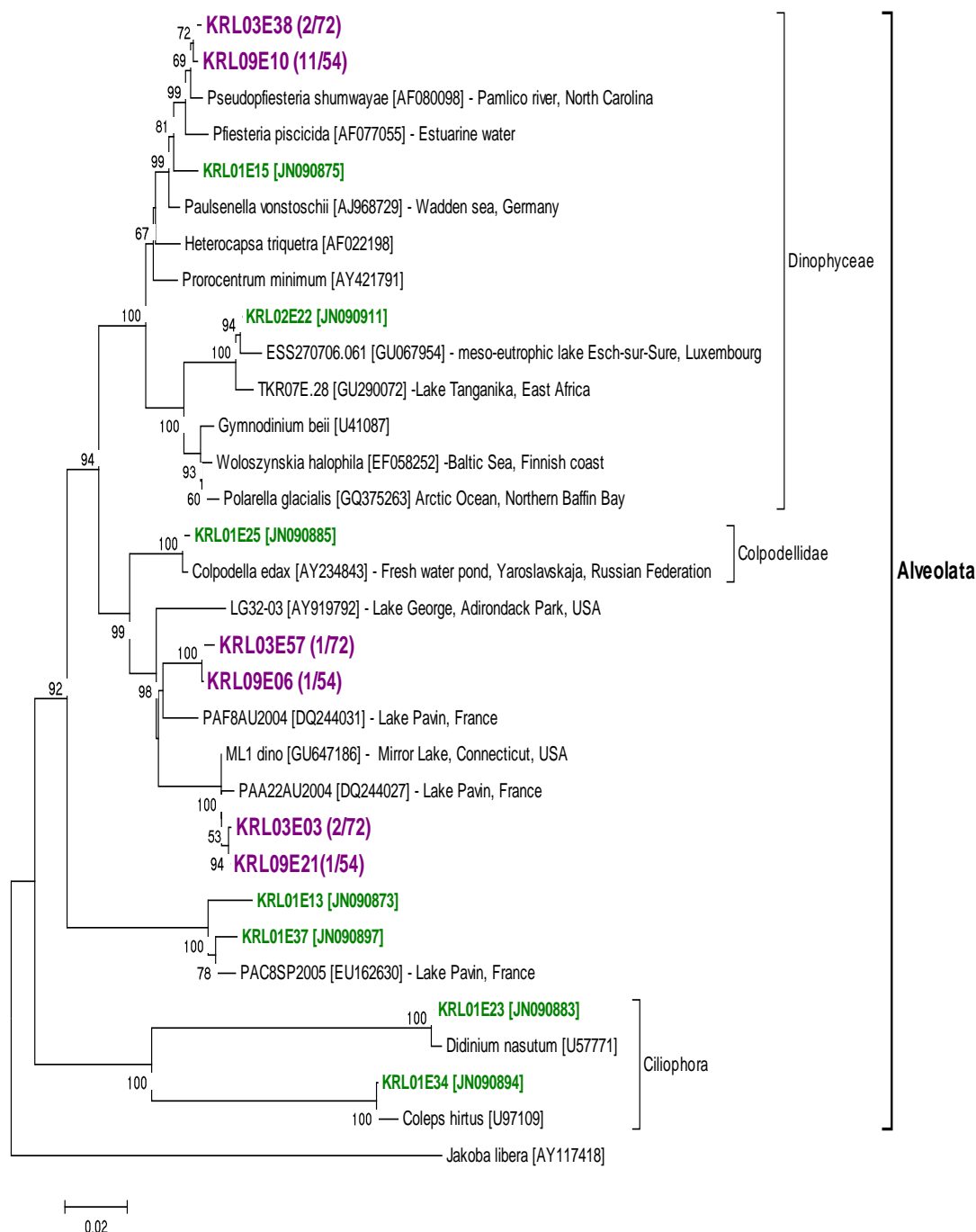




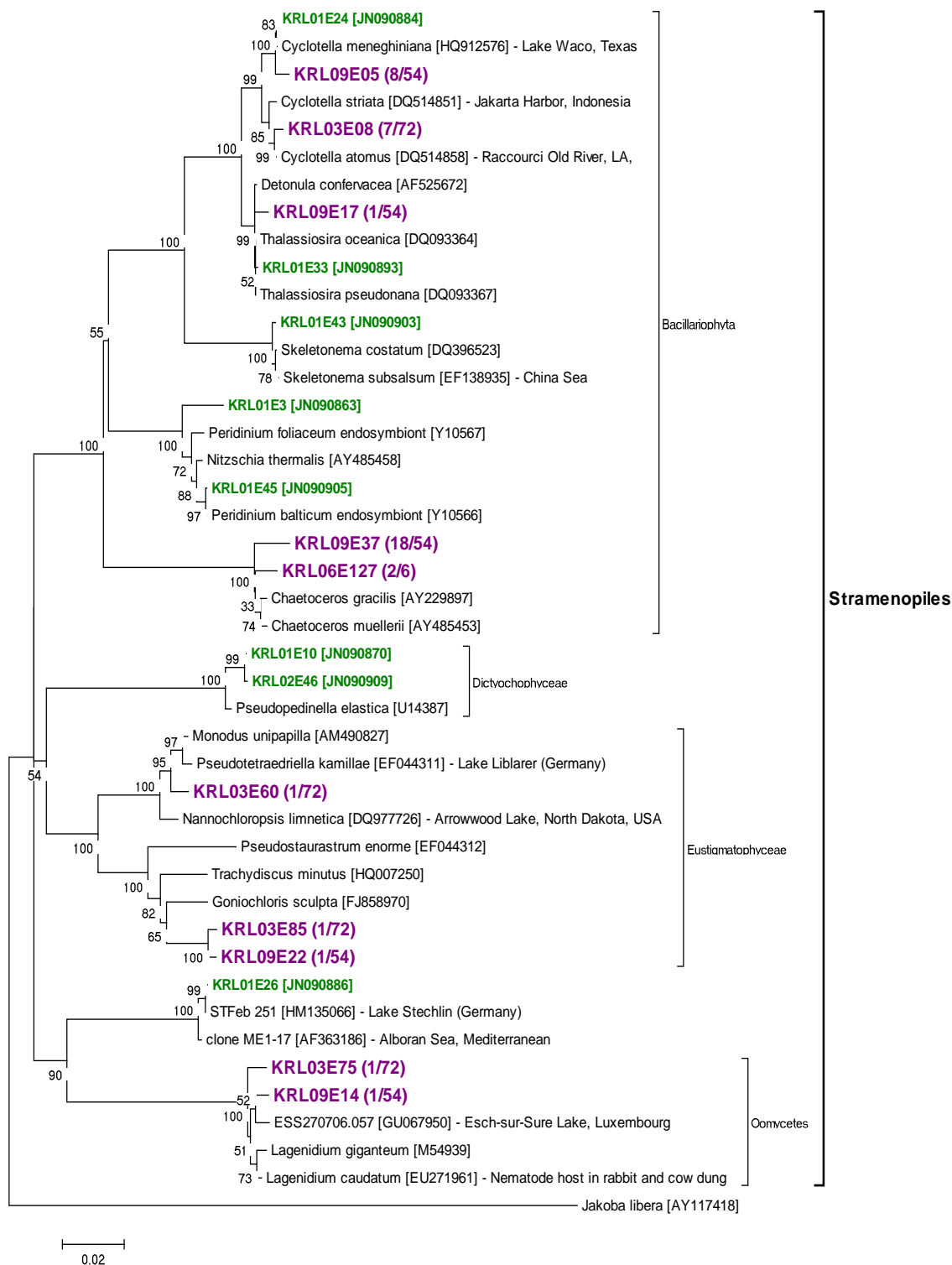
**Σχήμα 5:** Δενδρόγραμμα των φυλωτύπων του 18S rRNA γονιδίου των βιβλιοθηκών KRL03E, KRL06E (με μωβ χρώμα), που ομαδοποιήθηκαν στην ταξινομική ομάδα των Fungi. Στις παρενθέσεις αναφέρονται οι κοινοί φυλότυποι ( $\geq 98\%$ ) που βρέθηκαν από το σύνολο των φυλωτύπων σε κάθε βιβλιοθήκη. Οι αγκύλες περιέχουν τον αριθμό της βάσης δεδομένων GenBank που αντιστοιχεί σε κάθε κοντινό συγγενή. Οι πληροφορίες που αναγράφονται αναφέρονται στο περιβάλλον απομόνωσης τους. Το δέντρο δίνεται υπό κλίμακα 2%. Τιμές κάτω του 50% δεν εμφανίζονται.



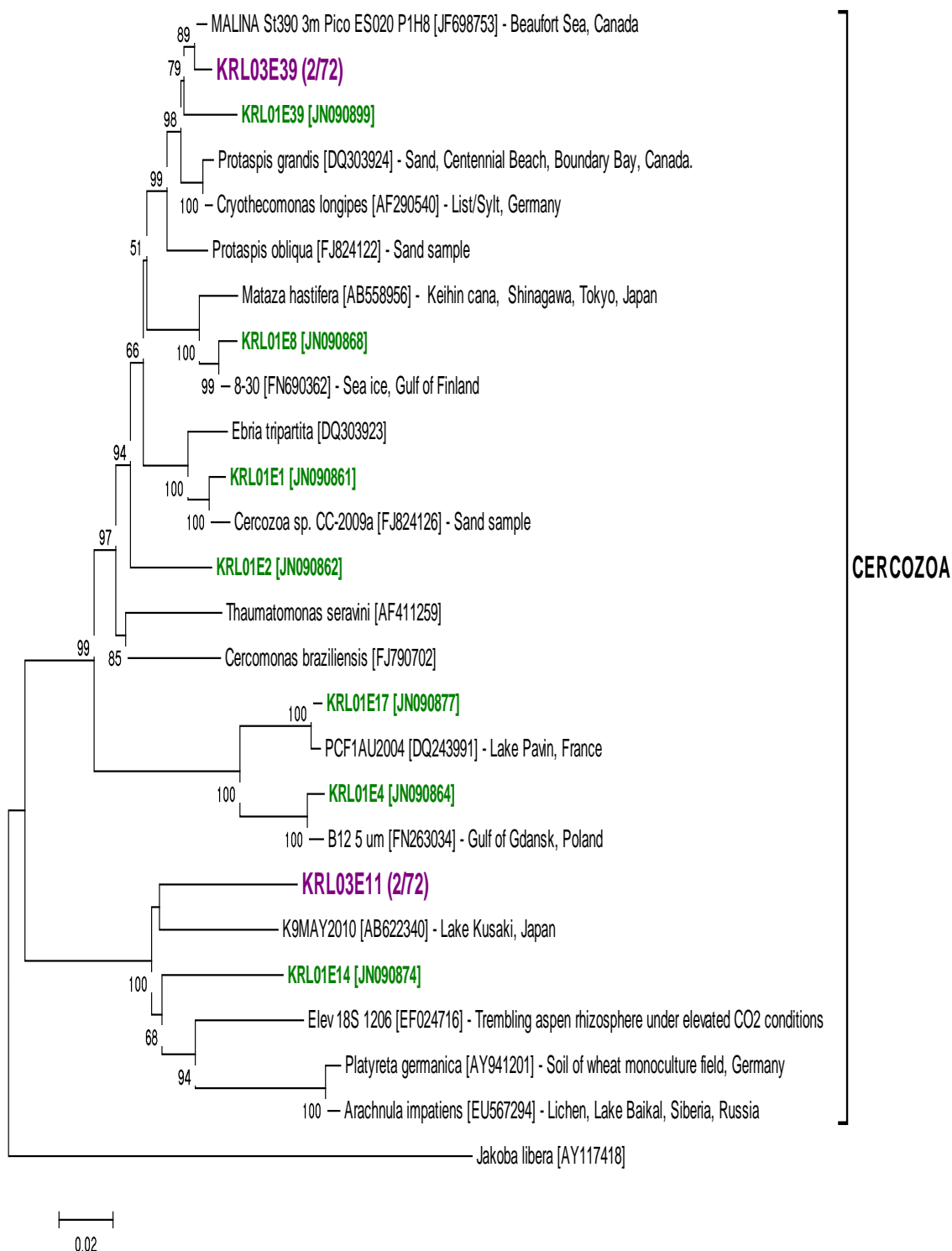
**Σχήμα 6:** Δενδρόγραμμα του φυλωτύπου του 18S rRNA γονιδίου της βιβλιοθήκης KRL03E (με μωβ χρώμα), που ομαδοποιήθηκε στην ταξινομική ομάδα των Copepoda. Στις παρενθέσεις αναφέρονται οι κοινοί φυλότυποι ( $\geq 98\%$ ) που βρέθηκαν από το σύνολο των φυλωτύπων της βιβλιοθήκης. Οι αγκύλες περιέχουν τον αριθμό της βάσης δεδομένων GenBank που αντιστοιχεί σε κάθε κοντινό συγγενή. Οι πληροφορίες που αναγράφονται αναφέρονται στο περιβάλλον απομόνωσης τους. Το δέντρο δίνεται υπό κλίμακα 2%. Τιμές κάτω του 50% δεν εμφανίζονται.



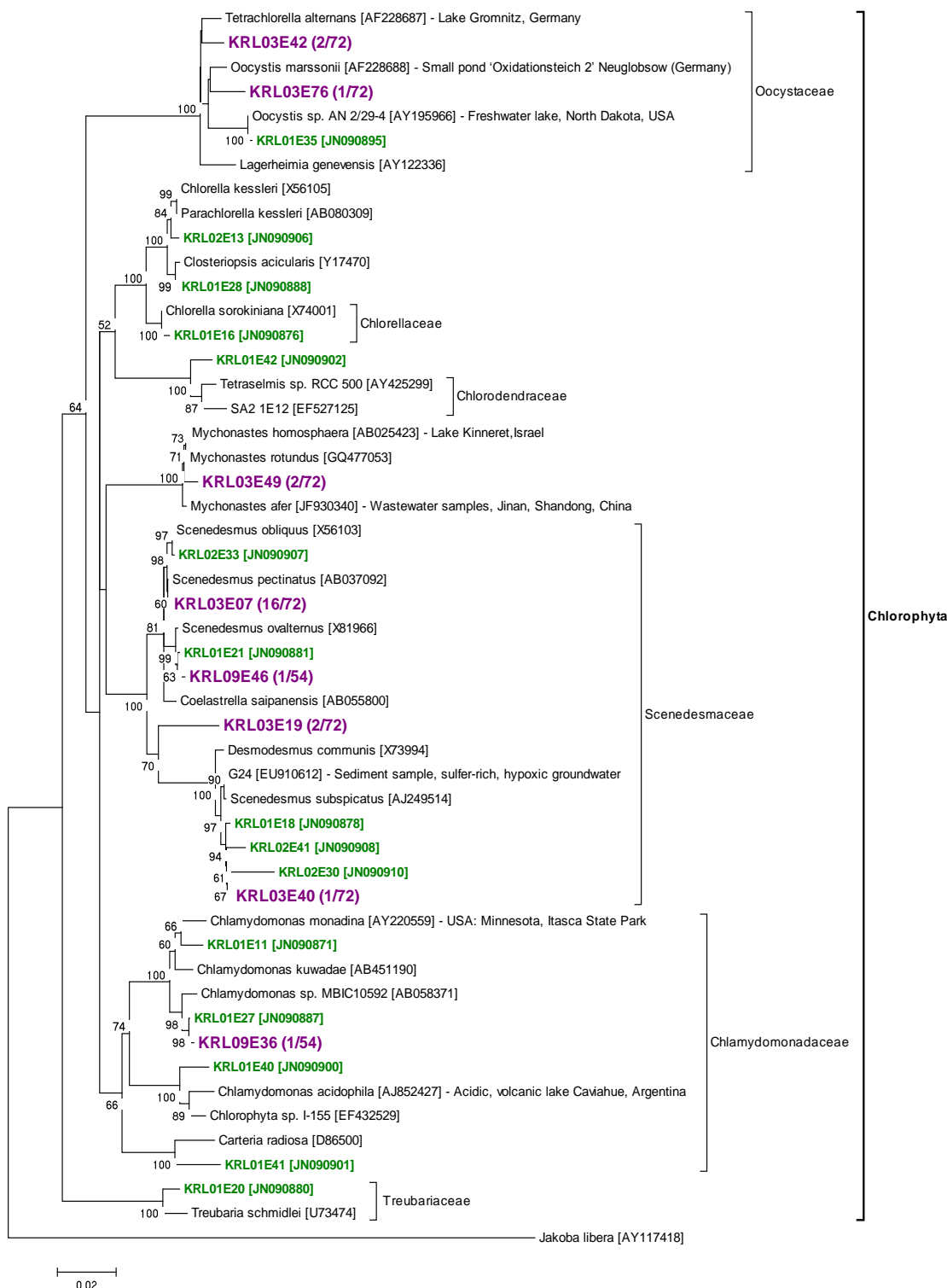
**Σχήμα 7:** Φυλογενετικό δέντρο των φυλωτύπων του 18S rRNA γονιδίου των βιβλιοθηκών KRL03E και KRL09E (με μωβ χρώμα), που ομαδοποιήθηκαν στην ταξινομική ομάδα των Alveolata. Με πράσινο χρώμα παρουσιάζονται φυλώττοι του 18S rRNA γονιδίου της βιβλιοθήκης KRL01E (Οικονομου *et al.* 2012). Στις παρενθέσεις αναφέρονται οι κοινοί φυλώττοι ( $\geq 98\%$ ) που βρέθηκαν από το σύνολο των φυλωτύπων σε κάθε βιβλιοθήκη. Οι αγκύλες περιέχουν τον αριθμό της βάσης δεδομένων GenBank που αντιστοιχεί σε κάθε κοντινό συγγενή. Οι πληροφορίες που αναγράφονται αναφέρονται στο περιβάλλον απομόνωσης τους. Το δέντρο δίνεται υπό κλίμακα 2%. Τιμές κάτω του 50% δεν εμφανίζονται.



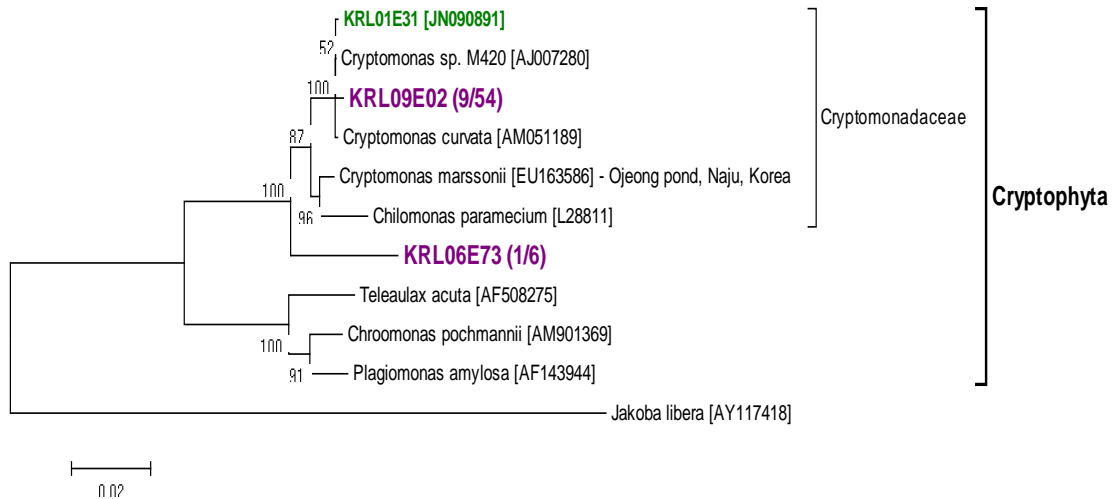
**Σχήμα 8:** Φυλογενετικό δέντρο των φυλοτύπων του 18S rRNA γονιδίου των βιβλιοθηκών KRL03E, KRL06E και KRL09E (με μωβ χρώμα), που ομαδοποιήθηκαν στην ταξινομική ομάδα των Stramenopiles. Με πράσινο χρώμα παρουσιάζονται φυλότυποι του 18S rRNA γονιδίου της βιβλιοθήκης KRL01E (Οικονομου *et al.* 2012). Στις παρενθέσεις αναφέρονται οι κοινοί φυλότυποι ( $\geq 98\%$ ) που βρέθηκαν από το σύνολο των φυλοτύπων σε κάθε βιβλιοθήκη. Οι αγκύλες περιέχουν τον αριθμό της βάσης δεδομένων GenBank που αντιστοιχεί σε κάθε κοντινό συγγενή. Οι πληροφορίες που αναγράφονται αναφέρονται στο περιβάλλον απομόνωσης τους. Το δέντρο δίνεται υπό κλίμακα 2%. Τιμές κάτω του 50% δεν εμφανίζονται.



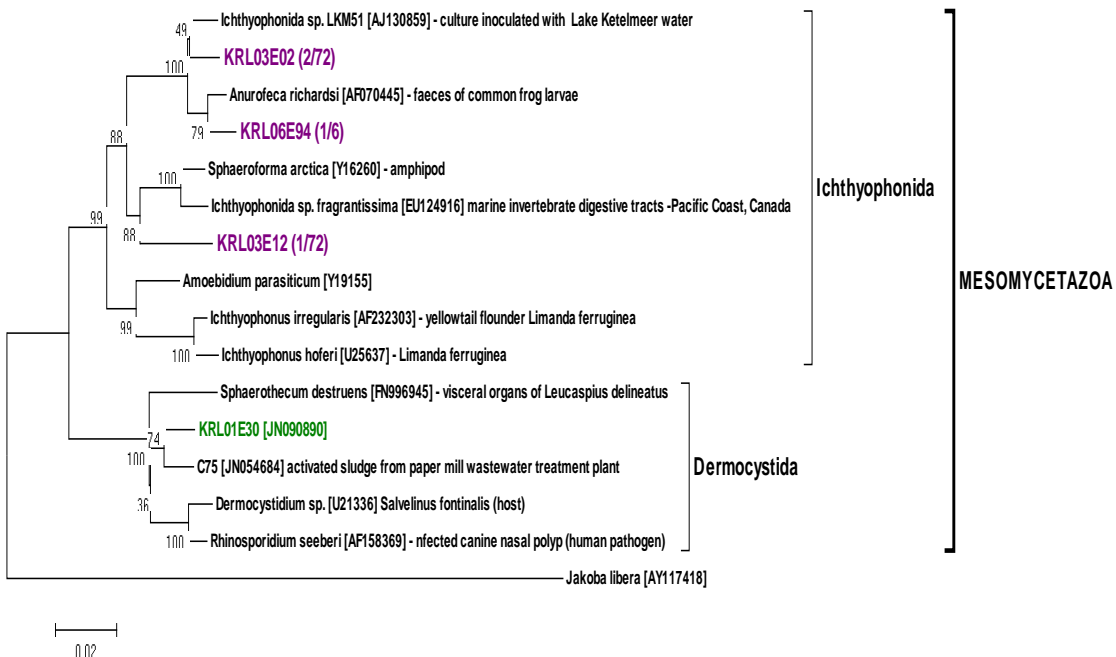
**Σχήμα 9:** Φυλογενετικό δέντρο των φυλοτύπων του 18S rRNA γονιδίου της βιβλιοθήκης KRL03E (με μωβ χρώμα), που ομαδοποιήθηκαν στην ταξινομική ομάδα των Cercozoa. Με πράσινο χρώμα παρουσιάζονται φυλότυπος του 18S rRNA γονιδίου της βιβλιοθήκης KRL01E (Οικονομου *et al.* 2012). Στις παρενθέσεις αναφέρονται οι κοινοί φυλότυποι ( $\geq 98\%$ ) που βρέθηκαν από το σύνολο των φυλοτύπων σε κάθε βιβλιοθήκη. Οι αγκύλες περιέχουν τον αριθμό της βάσης δεδομένων GenBank που αντιστοιχεί σε κάθε κοντινό συγγενή. Οι πληροφορίες που αναγράφονται αναφέρονται στο περιβάλλον απομόνωσης τους. Το δέντρο δίνεται υπό κλίμακα 2%. Τιμές κάτω του 50% δεν εμφανίζονται.



**Σχήμα 10:** Φυλογενετικό δέντρο των φυλοτύπων του 18S rRNA γονιδίου των βιβλιοθηκών KRL03E και KRL09E (με μωβ χρώμα), που ομαδοποιήθηκαν στην ταξινομική ομάδα των Chlorophyta. Με πράσινο χρώμα παρουσιάζεται φυλότυπος του 18S rRNA γονιδίου της βιβλιοθήκης KRL01E (Οικονομου *et al.* 2012). Στις παρενθέσεις αναφέρονται οι κοινοί φυλότυποι ( $\geq 98\%$ ) που βρέθηκαν από το σύνολο των φυλοτύπων σε κάθε βιβλιοθήκη. Οι αγκύλες περιέχουν τον αριθμό της βάσης δεδομένων GenBank που αντιστοιχεί σε κάθε κοντινό συγγενή. Οι πληροφορίες που αναγράφονται αναφέρονται στο περιβάλλον απομόνωσης τους. Το δέντρο δίνεται υπό κλίμακα 2%. Τιμές κάτω του 50% δεν εμφανίζονται.



**Σχήμα 11:** Φυλογενετικό δέντρο των φυλοτύπων του 18S rRNA γονιδίου των βιβλιοθηκών KRL06E και KRL09E (με μωβ χρώμα), που ομαδοποιήθηκαν στην ταξινομική ομάδα των Cryptophyta. Με πράσινο χρώμα παρουσιάζεται φυλότυπος του 18S rRNA γονιδίου της βιβλιοθήκης KRL01E (Οικονομου *et al.* 2012). Στις παρενθέσεις αναφέρονται οι κοινοί φυλότυποι ( $\geq 98\%$ ) που βρέθηκαν από το σύνολο των φυλοτύπων σε κάθε βιβλιοθήκη. Οι αγκύλες περιέχουν τον αριθμό της βάσης δεδομένων GenBank που αντιστοιχεί σε κάθε κοντινό συγγενή. Οι πληροφορίες που αναγράφονται αναφέρονται στο περιβάλλον απομόνωσης τους. Το δέντρο δίνεται υπό κλίμακα 2%. Τιμές κάτω του 50% δεν εμφανίζονται.



**Σχήμα 12:** Φυλογενετικό δέντρο των φυλοτύπων του 18S rRNA γονιδίου των βιβλιοθηκών KRL03E και KRL06E (με μωβ χρώμα), που ομαδοποιήθηκαν στην ταξινομική ομάδα των Mesomycetozoa. Με πράσινο χρώμα παρουσιάζεται φυλότυπος του 18S rRNA γονιδίου της βιβλιοθήκης KRL01E (Οικονομου *et al.* 2012). Στις παρενθέσεις αναφέρονται οι κοινοί φυλότυποι ( $\geq 98\%$ ) που βρέθηκαν από το σύνολο των φυλοτύπων σε κάθε βιβλιοθήκη. Οι αγκύλες περιέχουν τον αριθμό της βάσης δεδομένων GenBank που αντιστοιχεί σε κάθε κοντινό συγγενή. Οι πληροφορίες που αναγράφονται αναφέρονται στο περιβάλλον απομόνωσης τους. Το δέντρο δίνεται υπό κλίμακα 2%. Τιμές κάτω του 50% δεν εμφανίζονται.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.1. Εποχικές μεταβολές των ευκαρυωτικών οργανισμών

Οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί στην υδάτινη στήλη της λίμνης Κάρλα, παρουσιάζουν σημαντικές διακυμάνσεις κατά τους μήνες που ερευνήθηκαν σε αυτήν τη μελέτη (Μάϊος, Αύγουστος και Νοέμβριος 2010). Στο τέλος της άνοιξης τα Fungi (6/24 φυλότυπους, 25/72 αλληλουχίες) με τα Chlorophyta (6/24 φυλότυπους, 24/72 αλληλουχίες) φαίνεται να κυριαρχούν έναντι των άλλων οργανισμών. Τα αποτελέσματα από το δείγμα του Αυγούστου, υποδηλώνουν μία χαμηλή ποικιλότητα των ευκαρυωτών, που αποτελείται πρωτίστως από Fungi (2/5 φυλότυπους, 2/6 αλληλουχίες) και Stramenopiles (1/5 φυλότυπους, 2/5 αλληλουχίες). Η τελευταία ταξινομική ομάδα μάλιστα, κυριαρχεί κατά το φθινόπωρο (5/12 φυλοτύπους, 29/54 αλληλουχίες), με τα Alveolata (3/12 φυλοτύπους, 13/54 αλληλουχίες) να αποτελούν την δεύτερη σε κυριαρχία ταξινομική ομάδα (Πιν. 7).

Σύμφωνα με το Reynolds (1980, 1984, 1987), οι μικρές εύτροφες λίμνες, από την αρχή της άνοιξης (Μάρτιος) μέχρι και το φθινόπωρο, παρουσιάζουν την ακόλουθη σειρά στη διαδοχή των φυτοπλαγκτικών ειδών: Stramenopiles (C) – Chlorophyta (G) – Cyanophyta (M) – Stramenopiles (P). Η εποχική ποικιλότητα των ευκαρυωτικών οργανισμών, στην υπό μελέτη λίμνη, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των βιβλιοθηκών Μαΐου, Αυγούστου και Νοεμβρίου 2010, που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία, και τα αποτελέσματα των Οικονομου *et al.* (2012) για τους μήνες Μάρτιο και Απρίλιο της ίδιας χρονιάς, γενικά ακολουθεί το ίδιο πρότυπο. Αν και σύμφωνα με τα αποτελέσματα μικροσκοπικής ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε φαίνεται να κυριαρχούν είδη του γένους *Cyclotella* (Stramenopiles) το μήνα Μάρτιο 2010 (Οικονομου *et al.* 2012), με βάση την ποικιλότητα του φυλογενετικού γονιδίου 18S

rRNA, δεν παρατηρήθηκε κάτι ανάλογο. Αντίθετα, η ταξινομική ομάδα που φαίνεται να κυριαρχεί κατά την εαρινή περίοδο είναι αυτή των Chlorophyta. Σύμφωνα με τον Tilman (1986) τα Chlorophyta αφθονούν κάτω από συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών και κυριαρχούν σε λίμνες όπου το άζωτο, το πυρίτιο και το φως αποτελούν τους περιοριστικούς παράγοντες αύξησης. Επίσης, τα είδη του γένους *Scenedesmus* και *Chlorella*, έχουν σχετιστεί με ρηχές εύτροφες λίμνες, κατά την εαρινή περίοδο (Seip & Reynolds 1995). Τα Chlorophyta, επίσης, θεωρούνται οι πρώτοι άποικοι τεχνητών λιμνών (Williams *et al.* 1994), ενώ από τους Chrisostomou *et al.* (2009) παρατηρήθηκε η παρουσία τους σε ταμιευτήρες αγροτικών περιοχών. Άλλωστε η πλειοψηφία των αερομεταφερούμενων φυκών, ανήκει στα Chlorophyta (Schlichting 1964, Lopez-Bautista *et al.* 2007, Sharma *et al.* 2007, Genitsaris *et al.* 2011). Η μεγάλη αφθονία των Cercozoa (Oikonomou *et al.* 2012) στην αρχή της άνοιξης (βιβλιοθήκη Μαρτίου) φαίνεται να συνδέεται με την παρουσία των Stramenopiles (Taylor & Cattell 1969, Hargraves 2002). Τα Fungi που βρέθηκαν σε μεγάλη αφθονία στη βιβλιοθήκη Μαΐου, φαίνεται να σχετίζονται με τα Chytridiomycota, εκπρόσωποι των οποίων αποτελούν παράσιτα των Chlorophyceae (Lefranc *et al.* 2005) και των Stramenopiles (Canter & Jaworski 1981). Όταν μία από αυτές τις δύο ταξινομικές ομάδες (Cercozoa και Fungi) κυριαρχεί, η άλλη είτε απουσιάζει, είτε απαντάται σε μικρή αφθονία. Αυτό πιθανό να οφείλεται στο ότι ανταγωνίζονται για τον ίδιο ξενιστή (Lepere *et al.* 2006).

Η μικρή αφθονία που παρατηρείται στη βιβλιοθήκη Αύγουστου, πιθανόν να οφείλεται σε περιορισμένη διαθεσιμότητα των απαιτούμενων θρεπτικών στοιχείων για περαιτέρω αύξηση, ή στην υψηλή αλατότητα που καταγράφηκε και πιθανόν να ξεπέρασε τα όρια ανοχής των ειδών που διαβιούν στη λίμνη. Επίσης, μερικά είδη που ανήκουν στο φυτοπλαγκτό, όπως τα *Alexandrium* sp. (Arzul *et al.* 1999, Fistarol *et al.*

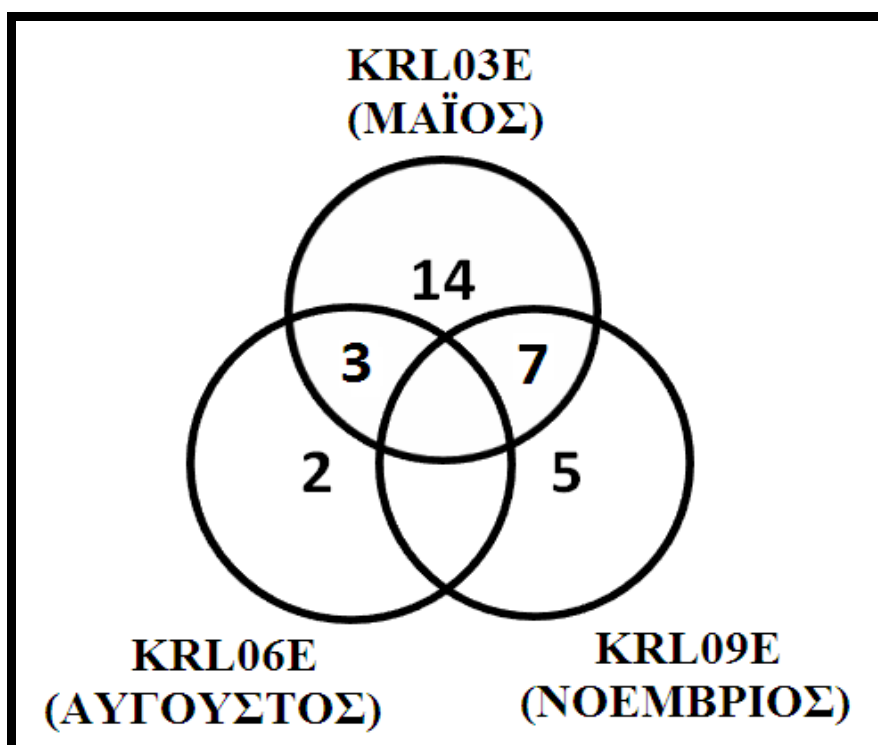


2004), *Peridinium aciculiferum* (Rengefors & Legrand 2001), *Nodularia harveyana* (Pushparaj *et al.* 1998, Pushparaj *et al.* 1999), *Scytonema hofmannii* (Gleason & Baxa 1986), *Oscillatoria* sp. (Chauhan *et al.* 1992, Bagchi *et al.* 1993), *Microcystis aeruginosa* (Lam & Silvester 1979, Ikawa *et al.* 1996, Singh *et al.* 2001), *Planktothrix agardhii*, *Anabaena holsaticum*, *Aphanizomenon elenkinii* (Keating 1987), *Aphanizomenon flexuosum* (Haney *et al.* 1995, Schagerl *et al.* 2002), έχουν τη δυνατότητα να σκοτώνουν άλλα φυτοπλαγκτικά είδη, μέσω της έκκρισης τοξινών, κάτω από συνθήκες περιορισμένης διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών (Edwardsen *et al.* 1990, Graneli & Johansson 2003, Graneli & Flynn 2006). Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται αλληλοπάθεια (Keating 1999). Δεδομένου ότι μικροφύκη και κυανοβακτήρια ευθύνονται για την παρουσία τοξινών στα γλυκά νερά, τα φύκη θεωρούνται λιγότερο επικίνδυνα, καθώς η δραστηριότητα των τοξινών τους, αλλά και η δυνατότητα αύξησης/άνθισης τους, είναι πολύ μικρότερες από αυτές των κυανοβακτηρίων (Smith & Doan 1999, Zaccaroni & Scaravelli 2008). Παρόλο που κύριος σκοπός αυτής της δραστηριότητας είναι, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, να αναστέλλουν την αύξηση άλλων φυτοπλακτικών ειδών, οι μαζικοί θάνατοι ψαριών είναι συνήθως το πρώτο άμεσο αποτέλεσμα που παρατηρείται (Graneli *et al.* 2008). Τρεις ακόμη λόγοι που υποστηρίζουν αυτή την υπόθεση στη συγκεκριμένη περίπτωση, είναι η παρουσία μόλις πέντε ευκαρυωτικών ειδών (κυρίως παρασιτικών), η άνθιση των κυανοβακτηρίων κατά την ίδια χρονική περίοδο (Πετρίδου, αδημοσίευτα δεδομένα) και τα νεκρά ψάρια που βρέθηκαν στην λίμνη Κάρλα τις πρώτες μέρες του Σεπτεμβρίου του 2010. Σαν πιθανή αιτία θα μπορούσαμε να αναφέρουμε και την πίεση των φυτοφάγων οργανισμών (Porter 1973), αλλά κάτι τέτοιο δεν έχει μελετηθεί στην παρούσα λίμνη. Η κυριαρχία των Stramenopiles στην βιβλιοθήκη Νοεμβρίου και η παρουσία ελάχιστων φυλοτύπων

που ανήκουν στην ταξινομική ομάδα Cryptophyceae, συμβαδίζουν με το πρότυπο του Reynolds.

#### 4.2. Σύγκριση των βιβλιοθηκών KRL01E, KRL02E, KRL03E, KRL06E, KRL09E - Εμφάνιση κοινών φυλοτύπων

Κριτήριο ομοιότητας  $\geq 98\%$ , χρησιμοποιήθηκε ώστε να συγκριθούν οι φυλότυποι των βιβλιοθηκών Μαΐου (KRL03E), Αυγούστου (KRL06E) και Νοεμβρίου (KRL09E) μεταξύ τους (Εικ. 1), αλλά και με τους φυλότυπους των βιβλιοθηκών Μαρτίου (KRL01E) και Απριλίου (KRL02E) των Οικονομου et al. (2012) (Πιν. 8).



**Εικόνα 1:** Διάγραμμα Venn κοινών φυλοτύπων ( $\geq 98\%$ ) μεταξύ των βιβλιοθηκών βιβλιοθηκών KRL03E, KRL06E, KRL09E.

Μέσα από αυτή τη σύγκριση, βρέθηκαν τρεις κοινοί φυλότυποι μεταξύ των βιβλιοθηκών KRL03E και KRL06E, που ανήκουν στις ταξινομικές ομάδες των Fungi και των Mesomycetozoa. Οι βιβλιοθήκες KRL03E και KRL09E παρουσιάζουν επτά κοινούς φυλότυπους, που ανήκουν στις ταξινομικές ομάδες των Alveolata,

Stramenopiles και Chlorophyta. Κοινοί φυλότυποι μεταξύ των βιβλιοθηκών KRL06E και KRL09E δεν παρατηρήθηκαν. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα αυτών των βιβλιοθηκών με τα αποτελέσματα των Οικονομου *et al.* (2012), παρατηρήθηκαν κοινοί φυλότυποι κυρίως με αυτούς της βιβλιοθήκης Μαρτίου, ενώ σχεδόν όλοι οι κοινοί φυλότυποι σχετίζονταν με είδη που ανήκουν στις ταξινομικές ομάδες των Chlorophyta και των Stramenopiles.

**Πίνακας 8:** Εμφάνιση κοινών φυλοτύπων ( $\geq 98\%$ ) μεταξύ των βιβλιοθηκών KRL01E, KRL02E των Οικονομου *et al.* (2012) και των βιβλιοθηκών KRL03E, KRL06E, KRL09E, της παρούσας εργασίας. Οι κοινοί φυλότυποι παρουσιάζονται οριζόντια. Με μπλε χρώμα παρουσιάζονται αυτοί που συναντώνται σε δυο βιβλιοθήκες, με ροζ σε τρεις και με κόκκινο σε τέσσερις.

Κοινοί φυλότυποι (2010)					Ταξινομική ομάδα
Μάρτιος	Απρίλιος	Μάιος	Αύγουστος	Νοέμβριος	
		KRL03E17	KRL06E139		Fungi
		KRL03E21	KRL06E206		Fungi
		KRL03E02	KRL06E94		Mesomycetozoa
		KRL03E03		KRL09E21	Alveolata
		KRL03E38		KRL09E10	Alveolata
		KRL03E57		KRL09E06	Alveolata
		KRL03E85		KRL09E22	Stramenopiles
		KRL03E75		KRL09E14	Stramenopiles
KRL01E33				KRL09E17	Stramenopiles
KRL01E11				KRL09E36	Chlorophyta
KRL01E31				KRL09E02	Cryptophyta
KRL01E24		KRL03E08		KRL09E05	Stramenopiles
KRL01E18	KRL02E41	KRL03E40			Chlorophyta
KRL01E21	KRL02E33	KRL03E07		KRL09E46	Chlorophyta

Οι κοινοί φυλότυποι KRL03E17 - KRL06E139 και KRL03E21 – KRL06E206, που ομαδοποιήθηκαν στην ταξινομική ομάδα των Fungi, δεν σχετίζονται με άλλους γνωστούς φυλότυπους από τις βάσεις δεδομένων και αποτελούν καινούργια τάξα. Κοινοί φυλότυποι (KRL03E03 – KRL09E21, KRL03E57 – KRL09E06), που ομαδοποιήθηκαν στην ταξινομική ομάδα των Alveolta και σχετίζονται με ακαλλιέργητους φυλότυπους που φαίνεται να ανήκουν στο γένος *Colpodella* (Lefevre

et al. 2007) καθώς και οι KRL03E38 – KRL09E10, που σχετίζονται με τα είδη *Pseudopfiesteria shumwayae* και *Pfiesteria piscicida*, αποτελούν ετερότροφα είδη και η παρουσία τους φαίνεται να εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα της τροφής τους (Burkholder & Glasgow 1997, Arndt et al. 2000). Περιοριστικός παράγοντας των KRL03E02 - KRL06E94, φαίνεται να αποτελεί η διαθεσιμότητα του κύριου ξενιστή τους (Wong et al. 1994). Κοινοί φυλότυποι (KRL01E21 – KRL02E33 – KRL03E07 – KRL09E46, KRL01E18 – KRL02E41 – KRL03E40) που ομαδοποιήθηκαν στην ταξινομική ομάδα των Chlorophyta και σχετίζονται με είδη του γένους *Scenedesmus*, έχουν βρεθεί να διαβιούν σε ποικίλα περιβάλλοντα, ενώ θεωρούνται συχνά κυρίαρχα είδη σε λίμνες γλυκού νερού και ποτάμια (Borowitzka & Borowitzka 1998). Οι κοινοί φυλότυποι που παρατηρήθηκαν στις τέσσερις από τις πέντε βιβλιοθήκες (KRL01E21, KRL02E33, KRL03E07, KRL09E46), υποδηλώνουν την παρουσία τους στη λίμνη, καθ' όλη την διάρκεια του έτους. Αρκετοί κοινοί φυλότυποι (KRL03E85 – KRL09E22, KRL01E24 – KRL03E08 – KRL09E05, KRL03E75 – KRL09E14, KRL01E33 – KRL09E17), ομαδοποιήθηκαν στην ταξινομική ομάδα των Stramenopiles που κύριος περιοριστικός παράγοντάς τους αποτελεί η διαθεσιμότητα πυριτίου. Ωστόσο τα είδη με τα οποία σχετίζονται οι φυλότυποι αυτοί φαίνεται να παρουσιάζουν και άλλες περιβαλλοντικές προτιμήσεις. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα είδη του γένους *Thalassiosira*, με τα οποία σχετίζονται οι κοινοί φυλότυποι KRL01E33 – KRL09E17, που θεωρούνται ευρύαλα και ευρύθερμα (Baek et al. 2011) και φαίνεται να κυριαρχούν συχνά την άνοιξη και το φθινόπωρο σε ανθίσεις φυτοπλαγκτού (Chan et al. 1991, Waite et al. 1992, Shinada et al. 1999, Harris et al. 2007, Assmy & Smetacek 2012), με περιοριστικό παράγοντα αύξησης τη διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων (Maestrini et al. 1997). Επίσης το είδος *Cyclotella meneghiniana*, με το οποίο

σχετίζονται οι κοινοί φυλότυποι KRL01E24 – KRL03E08 – KRL09E05, παρουσιάζει μικρό ρυθμό αύξησης σε θερμοκρασίες  $\geq 28^{\circ}\text{C}$  (Mitrović *et al.* 2010), δικαιολογώντας πιθανόν την απουσία του από τη βιβλιοθήκη Αυγούστου. Όσον αφορά τους κοινούς φυλότυπους KRL01E33 – KRL09E02, ομαδοποιήθηκαν στην ταξινομική ομάδα των Cryptophyta, τα είδη της οποίας φαίνεται να ευνοούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες (Kugrens & Clay 2010), ενώ παρουσιάζουν αφθονία και κάτω από συνθήκες χαμηλής φωτεινής έντασης (Morgan & Kalff 1979).

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι στη βιβλιοθήκη KRL01E (Oikonomou *et al.* 2012) παρατηρήθηκαν φυλότυποι που φαίνεται να σχετίζονται με είδη που ανήκουν στις ταξινομικές ομάδες Hartophyceae, Katablepharidophyta, Euglenozoa και Choanoflagellata. Ωστόσο στις υπόλοιπες βιβλιοθήκες (KRL02E, KRL03E, KRL06E, KRL09E), δεν ομαδοποιήθηκαν φυλότυποι σε αυτές τις ταξινομικές ομάδες. Η απουσία της κάθε μίας οφείλεται σε διαφορετικούς λόγους. Για παράδειγμα, ο φυλότυπος KRL01E9 (4/143 αλληλουχίες) που ομαδοποιήθηκε στην ταξινομική ομάδα των Hartophyceae, σχετίζεται στενά με το είδος *Prymnesium parvum*, που μπορεί να αναπτυχθεί σε ένα μεγάλο εύρος αλατότητας (Shilo 1971, Edvardsen & Paasche 1998, Baker *et al.* 2007). Ωστόσο, εξαιτίας του σχετικά αργού ρυθμού αύξησής του, κυριαρχεί όταν τα θρεπτικά κυμαίνονται σε χαμηλά επίπεδα, καθώς δεν μπορεί να ανταγωνιστεί τα άλλα είδη, όταν τα επίπεδα των θρεπτικών αυξάνονται (Guo *et al.* 1996). Επίσης ανθίσεις αυτού έχουν παρατηρηθεί στις αρχές της άνοιξης, υποδηλώνοντας ότι η θερμοκρασία αποτελεί σημαντικό παράγοντα αύξησης του (Baker *et al.* 2007). Όσον αφορά το φυλότυπο KRL01E6 (5/143 αλληλουχίες) που ομαδοποιήθηκε στην ταξινομική ομάδα των Katablepharidophyta, αποτελείται από κοσμοπολίτικα ετερότροφα είδη (Vors 1999, Sherr & Sherr 2002). Από ετερότροφα είδη αποτελείται

και η ταξινομική ομάδα των Choanoflagellata, όπου ομαδοποιήθηκαν οι φυλότυποι KRL01E19 (3/143 αλληλουχίες) και KRL01E12 (1/143 αλληλουχίες). Η αφθονία των ειδών αυτής, φαίνεται να εξαρτάται από την παρουσία μικροφυκών (Carrías *et al.* 1998) και από τις συγκεντρώσεις θρεπτικών συστατικών (Lepere *et al.* 2007). Όσον αφορά την ταξινομική ομάδα των Euglenophyta, οι φυλότυποι που ομαδοποιήθηκαν σε αυτή σχετίστηκαν με αυτότροφα είδη (Οικονομου *et al.* 2012), που εξαρτώνται από τη διαθεσιμότητα της βιταμίνης B-12 (Epstein *et al.* 1962) ενώ επηρεάζονται και από την διάρκεια του κύκλου ημέρας – νύχτας, καθώς η φωτεινή ένταση φαίνεται να αναστέλλει τη μίτωση των κυττάρων τους (Cook 1968).

#### 4.3. Ανάλυση φυλοτύπων

Τα φυλογενετικά δέντρα στην ενότητα 3.3, παρουσιάζουν τους φυλότυπους που βρέθηκαν στην παρούσα εργασία, καθώς και αλληλουχίες πλησιέστερων συγγενών. Με βάση αυτά τα στοιχεία, θα γίνει μια προσπάθεια να προσδιοριστούν τα χαρακτηριστικά των μικροσκοπικών ευκαρυωτών που διαβιούν στο υπό μελέτη οικοσύστημα.

##### 4.3.1. Mesomycetozoa

Σύμφωνα με τους Hannen *et al.* (1999) όλα τα είδη που περιλαμβάνονται σε αυτή την ταξινομική ομάδα αποτελούν παράσιτα ψαριών, καρκινοειδών και αμφίβιων. Φυλότυποι που φαίνεται να ανήκουν στην ταξινομική ομάδα των Mesomycetozoa (Herr *et al.* 1999), βρέθηκαν μόνο στις βιβλιοθήκες του Μαΐου και του Αυγούστου (Σχ. 12). Οι φυλότυποι αυτοί, ανήκουν στην τάξη των Ichthyophonida και σχετίζονται στενά με τα είδη *Sphaeroforma arctica*, *Ichthyophonida fragrantissima* και *Anurofeca richardsi*. Το είδος *Ichthyophonida fragrantissima* απομονώθηκε από το πεπτικό σύστημα θαλάσσιων ασπόνδυλων και οφείλει το όνομα του στο γλυκό άρωμα που αναδύεται

από αυτό (Marshall *et al.* 2008), ενώ το *Anurofeca richardsi* αποτελεί παράσιτο των μελών της τάξης Anura (Baker *et al.* 1999).

#### 4.3.2. Fungi

Στην ταξινομική ομάδα των Fungi ομαδοποιήθηκαν συνολικά εννέα φυλότυποι οι οποίοι συναντώνται και από τις τρεις βιβλιοθήκες. Για βέλτιστη απεικόνιση των φυλογενετικών σχέσεων τους, οι φυλότυποι παρουσιάζονται σε δύο φυλογενετικά δέντρα (Σχ. 4 & 5). Όσον αφορά το πρώτο (Σχ. 4), οι φυλότυποι και των τριών βιβλιοθηκών φαίνεται να σχετίζονται με φυλότυπους ακαλλιέργητων μικροοργανισμών που προέρχονται από ίζημα, γλυκό αλλά και θαλασσινό νερό. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με φυλότυπους (kor\_110904\_24, kor\_250804\_14) που προέρχονται από την εύτροφη και εξαιρετικά υποβαθμισμένη λίμνη Κορώνεια, που βρίσκεται σε στάδιο γήρανσης (Genitsaris *et al.* 2009). Επίσης δύο κοντινοί συγγενείς (GU067958, GU067817) σύμφωνα με τους Freeman *et al.* (2009) φαίνεται να ανήκουν στα Chytridiomycota. Οι φυλότυποι που παρουσιάζονται στο δεύτερο φυλογενετικό δέντρο (Σχ. 5), ανήκουν πάλι στους μύκητες. Οι ακαλλιέργητοι μικροοργανισμοί, που φαίνεται να σχετίζονται στενά με τους φυλότυπους KRL03E80 και KRL03E32, προέρχονται από τη βαθιά, ολιγό – μεσότροφη, ηφαιστιακή λίμνη Pavin στη Γαλλία (Lefèvre *et al.* 2007) και από τη λίμνη Ketelmeer (Van Hannen *et al.* 1999), το ίζημα της οποίας είναι εμπλουτισμένο από βαρέα μέταλλα (Hulscher *et al.* 2002). Οι οργανισμοί αυτοί, σύμφωνα με τους Lefèvre *et al.* (2007), είναι ετερότροφοι οργανισμοί που φέρουν μαστίγιο και τρέφονται από βακτήρια και πικοπλαγκτόν. Οι κοινοί φυλότυποι KRL06E139 - KRL03E17 και οι KRL03E21 – KRL06E206, δεν σχετίζονται στενά με άλλους

οργανισμούς από την βάση δεδομένων και αποτελούν καινούργια τάξη στον κλάδο των Fungi.

Και στις δύο περιπτώσεις, τα μόνα γνωστά είδη που βρέθηκαν κοντά στους φυλότυπους της παρούσας εργασίας, φαίνεται να ανήκουν στο φύλο Chytridiomycota. Τα είδη αυτού του φύλου, συναντώνται σε ποικίλα περιβάλλοντα (Powell 1993), παρασιτούν σε φύκη και Cyanobacteria και είναι τα μόνα ανάμεσα στα Fungi, που παράγουν «σπόρια» τα οποία διαθέτουν μαστίγιο για να μετακινούνται (James *et al.* 2006), το οποίο φαίνεται να χάνουν κατά την εξελικτική προσαρμογή τους, από το νερό προς την ξηρά (Liu *et al.* 2006).

#### 4.3.3. Copepoda

Παρόλο που πραγματοποιήθηκε προ-διήθηση του δείγματος σε ηθμό με μέγεθος πόρων 20μm, ένας φυλότυπος της βιβλιοθήκης Μαΐου (KRL03E64) βρέθηκε να ανήκει στην ταξινομική ομάδα των Copepoda (Σχ. 6). Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι τμήμα του σώματος του παρακρατήθηκε στον ηθμό κατά την διήθηση του δείγματος. Ο φυλότυπος αυτός σχετίζεται με είδη της οικογένειας Cyclopidae. Οι εκπρόσωποι αυτής, στα γλυκά νερά, αποτελούν κυρίως παρασιτικούς οργανισμούς για ψάρια και μαλάκια, αλλά και συμβιώτες ασπόνδυλων (Boxshall & Strong 2006, Boxshall & Defage 2008).

#### 4.3.4. Alveolata

Οι έξι φυλότυποι που ομαδοποιήθηκαν στην ταξινομική ομάδα των Alveolata (Σχ. 7), προέρχονται από τις βιβλιοθήκες του Αυγούστου και του Νοεμβρίου. Οι τέσσερις απ' αυτούς (KRL03E57, KRL09E06, KRL03E03, KRL09E21), τοποθετήθηκαν κοντά σε φυλότυπους ακαλλιέργητων μικροοργανισμών, που



απομονώθηκαν επίσης από λίμνες και σχετίζονται με το μαστιγωτό αρπακτικό είδος *Colpodela edax* (Leander *et al.* 2003), που διαβιεί τόσο σε γλυκά όσο και σε θαλάσσια ύδατα (Myl'nikov 1991). Πιθανόν καταναλώνει μικρά πρότιστα (Arndt *et al.* 2000) και διαφέρει από τα άλλα μαστιγωτά αρπακτικά, στο ότι τρέφεται απομυζώντας το περιεχόμενο του κυττάρου (Brugerolle 2002).

Οι άλλοι δύο φυλότυποι (KRL03E38 και KRL09E10), σχετίζονται στενά με τα ετερότροφα δυνομαστιγωτά είδη *Pseudopfiesteria shumwayae* και *Pfiesteria piscicida*. Στα δινομαστιγωτά ανήκουν οργανισμοί που είναι αυτότροφοι, ετερότροφοι, ενδοσυμβιώτες ασπόνδυλων, και έξω- ή ενδοπαράσιτα (Schnepf & Elrachter 1992). Το είδος *Pfiesteria piscicida*, ανακαλύφθηκε στα τέλη του 1980 (Smith *et al.* 1988) και συνδέθηκε με μαζικούς θανάτους ψαριών (Burkholder *et al.* 1992, Noga *et al.* 1996), που φαίνεται να οφείλονται στην απελευθέρωση ισχυρών ιχθυοτοξινών (Smith *et al.* 1988, Burkholder *et al.* 1995). Για τον ίδιο λόγο, θεωρείται υπεύθυνο και για περιστατικά ανθρώπινων ασθενειών, μέσω της κατανάλωσης ψαριών (Steidinger *et al.* 2006) που έχουν εκτεθεί στις ιχθυοτοξίνες, (Burkholder & Glasgow 1997). Όσον αφορά το είδος *Pseudopfiesteria shumwayae*, όπως και για όλα όσα παρουσιάζουν ομοιότητες με το γένος *Pfiesteria*, αν και δεν είναι γνωστή η παθογενετικότητα τους, τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης και προτίμησης στη διατροφή τους, παρουσιάζουν ομοιότητες με το είδος *Pfiesteria piscicida*. Τα είδη αυτά αυξάνονται όταν αυξάνονται και οι εισροές θρεπτικών στοιχείων, γιατί οδηγούν στην αύξηση των φυτοπλαγκτικών ειδών που αποτελούν την λεία τους (Burkholder & Glasgow 1997).

#### 4.3.5. Stramenopiles

Τα Stramenopiles έχουν ιδιαίτερη οικολογική σημασία, καθώς συμβάλλουν σημαντικά στον κύκλο του άνθρακα και του πυριτίου (Treguer *et al.* 1995, Mann 1999).

Θεωρούνται θαλασσινά είδη και παρόλο που η αλατότητα αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για αυτά (Round & Sims, 1980), εκπρόσωποί τους έχουν βρεθεί και σε γλυκά νερά (Weber 1970, Edlund *et al.* 2000). Στη λίμνη Κάρλα, 10 φυλότυποι βρέθηκαν να ανήκουν σε αυτή την ταξινομική ομάδα (Σχ. 8). Επίσης, οι κυρίαρχοι φυλότυποι των βιβλιοθηκών του Αυγούστου (KRL09E37) και του Νοεμβρίου (KRL06E127), ανήκουν σε αυτή και σχετίζονται 99% και 98%, αντίστοιχα, με το θαλάσσιο είδος *Chaetoceros gracilis* (Damste *et al.* 2004). Λαμβάνοντας όλα αυτά υπόψη, η αφθονία αυτή, πιθανόν να οφείλεται στις υψηλές τιμές αλατότητας που παρατηρήθηκαν στη λίμνη. Η απουσία του από τη βιβλιοθήκη Μαΐου πιθανόν να οφείλεται σε χαμηλή διαθεσιμότητα πυριτίου, δεδομένου της χαμηλής αφθονίας των Stramenopiles στην συγκεκριμένη βιβλιοθήκη.

Οι φυλότυποι KRL09E05, KRL09E17 και KRL03E08, βρέθηκαν κοντά σε είδη που η εμφάνιση τους σε γλυκά νερά είναι συχνή (Hasle & Syvertsen 1997, Stoermer & Julius 2003). Οι φυλότυποι KRL03E85 και KRL09E22 παρουσιάζουν ομοιότητα με το είδος *Goniochloris sculpta*. Ο φυλότυπος KRL03E60, σχετίζεται στενά με το είδος *Pseudotetraedriella kamillae* που παρατηρήθηκε στην oligότροφη τεχνητή λίμνη Stechlin στη Γερμανία (Hegewald *et al.* 2007). Σύμφωνα με τους Hegewald *et al.* (2007) είναι ένα είδος που συναντάται σε χαμηλή αφθονία κατά την περίοδο της άνοιξης και του φθινοπώρου. Οι φυλότυποι KRL03E75 και KRL09E14 παρουσιάζουν ομοιότητα με το είδος *Lagenidium caudatum*, που απομονώθηκε από νηματώδη ξενιστή που αναπτυσσόταν σε κόπρανά κουνελιών και αγελάδων (Beakes *et al.* 2006).

#### 4.3.6. Cercozoa

Στη ταξινομική ομάδα των Cercozoa, ομαδοποιήθηκαν δύο φυλότυποι που ανήκουν στη βιβλιοθήκη του Μαΐου (Σχ. 9). Ο KLR03E11, σχετίζεται στενά με

αλληλουχίες ακαλλιέργητων μικροοργανισμών. Στον ίδιο κλάδο ωστόσο βρέθηκαν και τα είδη *Platyreta germanica* και *Arachnula impatiens* που παρασιτούν σε μύκητες, φύκη, νηματώδη και ενδεχομένως σε βακτήρια (Bass *et. al.* 2009). Ο KRL03E39 βρέθηκε κοντά στα είδη *Cryothecomonas longipes* και *Protaspis grandis*, που απομονώθηκαν από θαλάσσιο περιβάλλον. Το *C. longipes* αποτελεί ένα επιλεκτικό παρασιτικό μαστιγωτό είδος, που παρασιτεί κυρίως σε Stramenopiles (Kuhn *et. al.* 2000) και μπορεί να προκαλέσει θνησιμότητες μεταξύ των φυτοπλαγκτικών πληθυσμών (Drebes *et al.* 1996, Kuhn *et al.* 1996, Tillmann *et al.* 1999).

#### 4.3.7. Chlorophyta

Τα Chlorophyta έχουν μεγάλη οικολογική σημασία, καθώς αποτελούν τους κύριους παραγωγούς σε συστήματα γλυκού νερού. Φυλότυποι που ανήκουν στην ταξινομική ομάδα των Chlorophyta (Σχ. 10) συναντώνται μόνο στις βιβλιοθήκες του Μαΐου και του Νοεμβρίου. Ο φυλότυπος KRL03E07, αποτελεί τον κυρίαρχο της βιβλιοθήκης Μαΐου (16/72) και σχετίζεται 99% με το είδος *Scenedesmus pectinatus*. Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει ο φυλότυπος KRL03E49, που σχετίζεται με είδη που απομονώθηκαν από υγρά απόβλητα (Yuan *et al.* 2011) και από τη λίμνη Kinneret (Hanagata *et al.* 1999), που αποτελεί τη μοναδική λίμνη (γλυκού νερού) στον κόσμο που η στάθμη της βρίσκεται γύρω στα 200 μέτρα κάτω από την επιφάνεια της θάλασσας. Με είδη του γένους *Scenedesmus*, σχετίζονται επίσης οι φυλότυποι KRL09E46, KRL03E19 και KRL03E40. Οι υπόλοιπες αλληλουχίες (KRL03E42, KRL03E76) που ομαδοποιήθηκαν στην ταξινομική ομάδα των Chlorophyta σχετίζονται με είδη της οικογένειας *Oocystaceae*. Τα είδη του γένους *Oocystis* έχουν συχνά καταγραφεί σε συστήματα γλυκού νερού (Hepperle *et al.* 2000), ενώ τα είδη του γένους *Scenedesmaceae*, προτιμούν κυρίως τα στάσιμα γλυκά νερά (Bellinger &

Sigee 2010), και παρόλο που έχουν καταγραφεί αρκετές περιστασιακές ανθίσεις τους, δεν θεωρούνται ενοχλητικές.

#### 4.3.8. Cryptophyta

Τα Cryptophyta περιλαμβάνουν αυτότροφα και ετερότροφα είδη (Mignot 1965, McFadden *et al.* 1994). Αν και θεωρούνται υπεύθυνα για ανθίσεις φυτοπλαγκτού (Nishijima 1990, Novarino 2003), στη λίμνη Κάρλα βρέθηκαν σε μικρή αφθονία. Στην ταξινομική ομάδα των Cryptophyta (Σχ. 11) περιλαμβάνονται φυλότυποι μόνο από τις βιβλιοθήκες του Αυγούστου και του Νοεμβρίου. Ο φυλότυπος KRL06E73 φαίνεται να είναι αρκετά απομακρυσμένος από τους κοντινότερους συγγενείς που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του δέντρου. Ωστόσο, φαίνεται να σχετίζεται με το ετερότροφο είδος *Chilomonas paramecium* (Cavalier-Smith *et al.* 1994), εν αντιθέσει με τον φυλότυπο KRL09E02, που παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα (99%) με το φωτοσυνθετικό είδος *Cryptomonas curvata* (Marin *et al.* 1998).

#### 4.4. Σύγκριση των εποχικών μεταβολών των ευκαρυωτικών οργανισμών της λίμνης Κάρλα, με άλλα ελληνικά λιμναία οικοσυστήματα.

Εκτός από τα αποτελέσματα των Οικονομου *et al.* (2012), που χρησιμοποιήθηκαν για να προσδιορισθεί η εποχική ποικιλότητα των ευκαρυωτικών οργανισμών στην λίμνη Κάρλα, καθώς και τα αποτελέσματα των Genitsaris *et al.* (2009) από τη λίμνη Κορώνεια, δεν υπάρχουν άλλες μελέτες για ευκαρυωτικούς οργανισμούς σε ελληνικές λίμνες που να βασίζονται στην ίδια τεχνική. Οι υπάρχουσες μελέτες που αναφέρονται στην εποχική ποικιλότητα των φυτοπλακτικών ειδών, βασίζονται στην μέθοδο Utermöhl (1958) και αφορούν τις λίμνες Βόλβη (Moustaka-Gouni 1993), Παμβώτιδα (Kagalou *et al.* 2001, Romero *et al.* 2002, Kagalou *et al.* 2003,) Κερκίνη (Kamarianos *et al.* 1993), Δοϊράνη (Temponeras *et al.* 2000) και τη λίμνη της Καστοριάς

(Moustaka-Gouni *et al.* 2007). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτών των εργασιών, η εποχική ποικιλότητα των ευκαρυωτικών οργανισμών της λίμνης Κάρλα φαίνεται να παρουσιάζει περισσότερες ομοιότητες με τη ρηχή και εύτροφη λίμνη Παμβώτιδα.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία μελετήθηκε η ποικιλότητα των μικροσκοπικών ευκαρυωτών στην υδάτινη στήλη της λίμνης Κάρλα, όπου η οικολογική διαδοχή των βιοκοινοτήτων διακόπηκε λόγω της αποξήρανσης της το 1962 (αναφέρει το 1962 στην εισαγωγή), και επανεκκινήθηκε τεχνητά τα τελευταία χρόνια, που βρίσκεται υπό συνθήκες πλήρωσης. Ο προσδιορισμός της ποικιλότητας, πραγματοποιήθηκε μέσω της φυλογενετικής ανάλυσης του γονιδίου 18S rRNA, από δείγματα νερού που συλλέχθηκαν κατά τους μήνες Μάιο, Αύγουστο και Νοέμβριο του 2010. Οι αλληλουχίες που ανακτήθηκαν από τις 3 βιβλιοθήκες, ομαδοποιήθηκαν με κριτήριο ομοιότητας  $\geq 98\%$  σε φυλότυπους, που ανήκουν στις ακόλουθες ταξινομικές ομάδες: Cercozoa, Alveolata, Chlorophyta, Fungi, Stramenopiles, Mesomycetozoa, Cryptophyta, Copepoda. Οι δείκτες ποικιλότητας παρουσιάζουν υψηλές τιμές για τις βιβλιοθήκες του Μαΐου και του Νοεμβρίου, σε αντίθεση με την βιβλιοθήκη Αυγούστου.

Στο τέλος της άνοιξης (βιβλιοθήκη Μαΐου), τα Fungi (6/24 φυλότυπους, 25/72 αλληλουχίες) με τα Chlorophyta (6/24 φυλότυπους, 24/72 αλληλουχίες) φαίνεται να κυριαρχούν έναντι των άλλων οργανισμών. Η βιβλιοθήκη του Αυγούστου, αποτελείται πρωτίστως από Fungi (2/5 φυλότυπους, 2/6 αλληλουχίες) και Stramenopiles (1/5 φυλότυπους, 2/5 αλληλουχίες). Τα Stramenopiles κυριαρχούν και κατά το φθινόπωρο (βιβλιοθήκη Νοεμβρίου, 5/12 φυλότυπους, 29/54 αλληλουχίες), με τα Alveolata (3/12 φυλότυπους, 13/54 αλληλουχίες) να αποτελούν τη δεύτερη σε κυριαρχία ταξινομική ομάδα.

Με κριτήριο ομοιότητας  $\geq 98\%$ , φυλότυποι της βιβλιοθήκης KRL03E βρέθηκαν να είναι όμοιοι με φυλότυπους των βιβλιοθηκών KRL06E και KRL09E. Οι τελευταίες δύο δεν παρουσιάζουν όμοιους φυλότυπους μεταξύ τους. Σε σύγκριση με τα

αποτελέσματα των βιβλιοθηκών των Οικονομου *et al.* (2012), φυλότυποι που σχετίζονται με δύο είδη του γένους *Scenedemus*, παρατηρήθηκαν στις τέσσερις από τις πέντε βιβλιοθήκες, υποδηλώνοντας την παρουσία τους στη λίμνη, καθ' όλη την διάρκεια του έτους. Επίσης τρεις φυλότυποι της βιβλιοθήκης Μαρτίου, παρουσιάζουν ομοιότητες μόνο με φυλοτύπους της βιβλιοθήκης Νοεμβρίου, που πιθανόν να οφείλεται στην προτίμηση αυτών των ειδών στις συνθήκες που δημιουργούνται κατά τους ψυχρότερους μήνες (φθινοπώρου - αρχές άνοιξης).

Μέσα από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας και τα αποτελέσματα για τους μήνες Μάρτιο και Απρίλιο που παρουσιάζονται από τους Οικονομου *et al.* (2012), η εποχική ποικιλότητα των ευκαρυωτικών οργανισμών στην λίμνη Κάρλα, σύμφωνα με τον Reynolds (1984) φαίνεται να ακολουθεί το τυπικό πρότυπο που παρατηρείται στις ρηχές εύτροφες λίμνες, από την αρχή της άνοιξης (Μάρτιος), μέχρι και το φθινόπωρο. Τα Cerozoa κυριαρχούν (το χειμώνα;), με τα Chlorophyta να ακολουθούν κατά την εαρινή περίοδο. Τα τελευταία αντικαθίστανται από τα Cyanobacteria το καλοκαίρι, ενώ τα Fungi με τα Stramenopiles κυριαρχούν το φθινόπωρο που η θερμοκρασία της λίμνης επανέρχεται σε χαμηλότερα επίπεδα. Η παρουσία των Cerozoa φαίνεται να συνδέεται με την παρουσία των Stramenopiles, (Taylor & Cattell 1969, Hargraves 2002) ενώ τα Fungi που βρέθηκαν σχετίζονται με Chytridiomycota, εκπρόσωποι των οποίων αποτελούν παράσιτα των Chlorophyceae (Lefranc *et al.* 2005) και των Stramenopiles.

Τα είδη που σχετίζονται με τους φυλοτύπους που βρέθηκαν, απομονώθηκαν από ποικίλα περιβάλλοντα, που περιλαμβάνουν ολιγότροφες λίμνες, μέχρι υγρά αποβλήτων. Αρκετά από αυτά τα είδη, αποτελούν παράσιτα φυκών, σπονδυλωτών και ασπόνδυλων (*Cryothecomonas longipes*, *Lagenidium caudatum*). Είδη που ανήκουν στην ταξινομική

ομάδα των Alveolata (*Pseudopfiesteria shumwayae*, *Pfiesteria piscicida*), φαίνεται να παράγουν ιχθυοτοξίνες και να συνδέονται με μαζικούς θανάτους ψαριών και ανθρώπινων ασθενειών. Φυλότυποι που ανήκουν στα Fungi, ταξινομήθηκαν κοντά στον κλάδο των Chytridiomycota, που αποτελούν παράσιτα των μικροφυκών και των κυανοβακτηρίων. Επίσης βρεθήκαν φυλότυποι που φαίνεται να ανήκουν στην ταξινομική ομάδα των Mesomycetozoa (*Ichthyophonida fragrantissima*, *Anurofeca richardsi*), όλα τα είδη της οποίας αποτελούν παράσιτα ψαριών, καρκινοειδών και αμφίβιων. Οι υψηλές θερμοκρασίες που καταγράφηκαν κατά τις δειγματοληψίες, πρέπει να σχετίζονται με το μικρό βάθος και την έκταση της λίμνης (Seip & Reynolds 1995), ενώ η υψηλή αλατότητα την καθιστά ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη θαλάσσιων ειδών όπως το *Chaetoceros gracilis*. Συμπερασματικά, θα πρέπει να αναφερθεί ότι αυτό το νεοσχηματιζόμενο, ασταθές και ταυτοχρόνως μοναδικό οικοσύστημα, κατά τους μήνες που μελετήθηκαν και σχολιάστηκαν στην παρούσα εργασία, φαίνεται να είναι εύτροφο με δείγματα τοξικότητας .



## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59:143-16
- Ananiadis C.I. (1956) Limnological study of lake Karla. *Bulletin de l' Institute Oceanographic*, 1083:1-19
- Arndt H., Dietrich D., Auer B., Cleven E.J., Gräfenhan T., Weitere M., Mylnikov A.P., (2000) Functional diversity of heterotrophic flagellates in aquatic ecosystems. In: Leadbeater, B.s.C. & Green, J.C. (eds.): *the Flagellates*. Taylor & Francis, London, p 240-268
- Ashelford K.E., Chuzhanova N.A., Fry J.C., Antonia J.J. (2005) At least 1 in 20 16S RRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Applied environmental microbiology*, 71(12):7724-7736
- Assmy P., Smetacek V. (2012) Algal blooms. In: Schaechter M. (eds) *Eukaryotic microbes*. Elsevier, California, p 435-450
- Arzul G., Seguel M., Guzman L., Denn E.E.-L. (1999) Comparison of allelopathic properties in three toxic *Alexandrium* species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 232:285-295
- Baek S.B., Jung S.W., Shin K., (2011) Effects of temperature and salinity on growth of *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae) isolated from ballast water. *Journal of freshwater ecology*, 26(4):547-552
- Bagchi S.N., Chauhan V.S., Marwah J.B. (1993) Effect of an antibiotic from *Oscillatoria laete virens* on growth, photosynthesis and toxicity of *Microcystis aeruginosa*. *Current Microbiology*, 26: 223-228
- Baker G.C., Beebee T.J., Ragan M.A. (1999) *Prototheca richardsi*, a pathogen of anuran larvae, is related to a clade of protistan parasites near the animal-fungi divergence. *Microbiology*, 145(7):1777-1784
- Baker J.W., Grover J.P., Brooks B.W., Uren-Boeck F., Roelke D.L., Errera R., Kiesling R.L. (2007) Growth and toxicity of *Prymnesium Parvum* (Haptophyta) as a function of salinity, light, and temperature. *Journal of Phycology*, 43: 219-227
- Bass D., Chao E.E., Nikolaev S., Yabuki A., Ishida K., Berney C., Pakzad U., Wylezich C., Cavalier-Smith T. (2009) Phylogeny of novel naked Filose and Reticulose Cercozoa: Granofilosea cl. n. and Proteomyxidea revised. *Protist*, 160(1): 75-109
- Beakes G.W., Glockling S.L., James T.Y. (2006) The phylogeny of oomycete nematode pathogens. In Meyer W., Price C., (eds) *Proceedings of the 8<sup>th</sup> international mycological congress*. Medimond International, Bologna, p 7-14

- Bellinger E.G., Sigeo D.C. (2010) *Freshwater Algae*. Wiley-Blackwell, Great Britain, pp 19
- Borowitzka M.A., Borowitzka L.J. (1998) *Scenedesmus* In: Borowitzka M.A. & Borowitzka L.J. (eds) *Micro-Algal Biotechnology*, Cambridge University Press, Cambridge, p. 57–84
- Boxshall G.A., Defage D. (2008) Global diversity of copepods (Crustacea: Copepoda) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595:195-207
- Boxshall G.A., Strong E.E. (2006) An extraordinary shift in life habit in a genus of cyclopoid copepods from Lake Tanganyika. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 146:275-285
- Braun-Blanquet J. (1964) *Pflanzensoziologie*. Springer, Wien. pp 885
- Brugerolle G. (2002) *Colpodella vorax*: Ultrastructure, Predation, Life-Cycle, Mitosis, and Phylogenetic Relationships. *European Journal of Protistology*, 38: 113–125.
- Burkholder J.M., Noga E.J., Hobbs C.H., Glasgow H.B.Jr., Smith S.A. (1992) New ‘phantom’ dinoflagellate is the causative agent of major estuarine fish kills. *Nature*, 358:407–10
- Burkholder J.M., Glasgow H.B.Jr. (1995) Interactions of a toxic estuarine dinoflagellate with microbial predators and prey. *Archiv für Protistenkunde*, 145:177-188
- Burkholder J.M., Glasgow H.B.Jr. (1997) *Pfiesteria piscicida* and other *Pfiestria*-like dinoflagellates: behavior, impacts and environmental controls. *Limnology and Oceanography*, 42:1052-1075
- Canter H.M., Jaworski G.H. (1981) The effect of light and darkness upon infection of *Asterionella formosa* Hassall by the chytrid *Rhizophyidium planktonicum* Canter emend. *Annals of botany*, 47:13–30
- Carrias J., Amblard C., Quiblier-Lloberas C., Bourdier G. (1998) Seasonal dynamics of free and attached heterotrophic nanoflagellates in an oligomesotrophic lake. *Freshwater Biology*, 39:91 – 101
- Caron D., Gast R.J., Lim E.L., Dennett M. (1999) Protistan community structure: molecular approaches for answering ecological questions. *Hydrobiologia*, 401:215-227
- Cavalier-Smith T., Allsopp M.T., Chao E.E. (1994) Chimeric conundra: are nucleomorphs and chromists monophyletic or polyphyletic? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(24): 11368–11372
- Chan B.S.S, Chiu M.C., Hodgkiss I.J. (1991) Plankton dynamics and primary productivity of Tai Tam Bay, Hong Kong. *Asian Marine Biology*, 8:169-192
- Chao A. (1984) Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 11:265-270

- Chao A., Ma C.M., Yang M. C.K. (1993) Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates. *Biometrika*, 80:193-201
- Chauhan V.S., Marwah J.B., Bagchi S.N. (1992) Effect of an antibiotic from *Oscillatoria* sp. on phytoplankters, higher plants and mice. *New Phytologist*, 120: 251-257
- Chrisostomou A., Moustaka-Gouni M., Sgardelis S., Lanaras T. (2009) Air-dispersed phytoplankton in a Mediterranean river-reservoir system (Aliakmon-Polyphytos, Greece). *Journal of Plankton Research*, 31:877–884
- Cook J.R. (1968) Photo-inhibition of cell division and growth in euglenoid flagellates. *Journal of Cellular Physiology*, 71:177 – 184
- Coops H., Beklioglu M., Crisman T.L. (2003) The role of water-level fluctuations in shallow lake ecosystems – workshop Conclusions. *Hydrobiologia*, 506–509: 23–27
- Damste J.S., Muyzer G., Abbas B., Rampen S.W., Masse G., Barbanti S.M., Fago F.J. Denisevich P., Dahl J., Trindade L.A., Schouten S. (2004) The rise of the rhizosolenid diatoms. *Science*, 304(5670): 584-587
- Dawson S.C., Pace N.R. (2002) Novel kingdom-level eukaryotic diversity in anoxic environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99:8324–8329
- DeAngelis D.L., Trexler J.C., Donalson D.D. (2009) Competition dynamics in a seasonally varying wetland. In: Cantrell S, Cosener C, Ruan S (eds) *Spatial ecology*, chap 1. CRC Press/Chapman and Hall, London, pp 1–13
- Díez B., Pedrós-Alió C., Massana R. (2001) Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:2932–2941
- Drebes G., Kuhn S.F., Gmelch A., Schnepf E. (1996) *Cryothecomonas aestivalis* sp. Nov., a colourless nanoflagellate feeding on the marine centric diatom *Guinardia delicatula* (Cleve) Hasle. *Helgol Wiss Meeresunters*, 50:497-515
- De Wever A., Leliaert F., Verleyen E., Vanormelingen P., Van der Gucht K., Hodgson D.A., Sabbe K., Vyverman W. (2009) Hidden levels of phylodiversity in Antarctic green algae further evidence for the existence of glacial refugia. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276: 3591-3599
- DuBoway P.J. (1988) Waterfowl communities and seasonal environments: temporal variability in interspecific competition. *Ecology*, 69:1439–1453
- Edgcomb V.P., Kysela D.T., Teske A., de Vera Gomez A., Sogin M.L. (2002) Benthic eukaryotic diversity in the Guaymas Basin hydrothermal vent environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(11):7658-7662.

- Edlund M.B., Taylor C.M., Schelske C.L., Stoermer E.F. (2000) *Thalassiosira baltica* (Grunow) Ostensfeld (Bacillariophyta), a new exotic species in the Great Lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57: 610–615
- Edwardsen B., Moy F., Paasche E. (1990) Hemolytic activity in extracts of *Chrysochromulina polylepis* grown at different levels of selenite and phosphate. In: Granéli E., Sundstöm B., Edler L., Anderson D. M., (eds) *Toxic marine phytoplankton*. Elsevier, New York, p. 284–289
- Edwardsen B., Paasche E. (1998) Bloom Dynamics and physiology of *Prymnesium* and *Chrysochromulina*. In: *Physiological Ecology of harmful algae blooms*. (Eds) Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M. Springer-Verlag, Berlin pp 193-208.
- Elliott J.A., Jones I.D., Thackeray S.J. (2006) Testing the sensitivity of phytoplankton communities to changes in water temperature and nutrient load, in a temperate lake. *Hydrobiologia*, 559: 401-411
- Epstein S., Lopez-Garcia P. (2007) “Missing” protists: a molecular perspective. *Biodiversity and Conservation*, 17(2):261-276
- Epstein S.S., Weiss J.B., Causeley D., Bush P. (1962) Influence of vitamin B12 on the size and growth of *Euglena gracilis*. *Journal of Protozoology*, 9(3):336 – 339
- Ernst A., Becker S., Hennes K., Postius C. (1999) *Microbial Biosystems: New frontiers* proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P (eds) Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada
- Fistarol G.O., Legrand C., Selander E., Hummert C., Stolte W., Granéli E. (2004) Allelopathy in *Alexandrium* spp.: effect on a natural plankton community and on algal monocultures. *Aquatic microbial ecology*, 35: 45–56.
- Freeman K.R., Martina A.P., Karkib D., Lynch R.C., Mittera M.S., Meyera A.F., Longcore J.E., Simmons D.R., Schmidta S.K. (2009) Evidence that chytrids dominate fungal communities in high-elevation soils. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106:18315–18320
- Genitsaris S., Kormas K.Ar., Moustaka-Gouni M. (2009) Microscopic eukaryotes living in a dying lake (Lake Koronia, Greece) *Federation of European Microbiological Societies*, 69:75–83
- Genitsaris S., Kormas K.Ar., Moustaka-Gouni M. (2011) Airborne algae and Cyanobacteria: Occurrence and related health effects. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 1(3): 772 – 787
- Gleason F.K., Baxa C.A. (1986) Activity of the natural algicide, cyanobacterin, on eukaryotic microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 33: 85-88.

Good I.J. (1953) The population frequencies of species and the estimation of the population parameters. *Biometrika*, 40:237-264

Graneli E., Flynn K. (2006) Chemical and Physical Factors Influencing Toxin Content. In: Graneli E., Turner J.T. (eds) *Ecology of harmful algae*. Springer, Berlin, p 229-239

Graneli E., Johansson N. (2003) Effects of the toxic haptophyte *Prymnesium parvum* on the survival and feeding of a ciliate: the influence of different nutrient conditions. *Marine Ecology Progress Series*, 254:49–56

Graneli E., Salomon P.S., Fistarol O. (2008) The Role of Allelopathy for Harmful Algae Bloom Formation. In: Evangelista V., Barsanti L., Frassanito A.M., Passarelli V., Gualtieri P. (eds) *Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection*. Springer, p 159-178

Guo M., Harrison P.J., Taylor F.J. (1996) Fish kills related to *Prymnesium parvum* Carter (Haptophyta) in the People's Republic of China. *Journal of Applied Phycology*, 8(2): 111-117

Hanagata N., Malinsky – Rushansky N., Dubinsky Z. (1999) Eukaryotic picoplankton, *Mychonastes homosphaeta* (Chlorophyceae, Chlorophyta), in Lake Kinneret, Israel. *Phycological Research*, 47:263-269

Haney J.F., Sasner J.J., Ikawa M. (1995) Effects of products released by *Aphanizomenon flosaquae* and purified saxitoxin on the movements of *Daphnia carinata* feeding appendages. *Limnology and Oceanography*, 40: 263–272.

Hardin G. (1960) The competitive exclusion theory. *Science*, 131: 1292-1297.

Hargraves P.E. (2002) The ebridian flagellates *Ebria* and *Hermesium*. *Plankton Biology and Ecology*, 49: 9—16.

Harris A.S.D, Medlin L.K., Lewis J., Jones K.J. (2007) *Thalassiosira* species (Bacillariophyceae) from a Scottish sea-loch. *European Journal of Phycology*, 30(2):117-131.

Hasle G.R., Syvertsen E.E. (1997) Marine diatoms. In: Tomas, C.R. (Ed.), *Identifying Marine Phytoplankton*. Academic Press, San Diego, p. 5–386.

Hegewald E., Padisak J., Friedl T. (2007) *Pseudotetraedriella kamillae*: taxonomy and ecology of a new member of the algal class Eustigmatophyceae (Stramenopiles) *Hydrobiologia*, 586:107–116

Hepperle D., Hegewald E., Krienitz L. (2002) Phylogenetic position of the Oocystaceae (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 36: 590-595

Herr R.A., Ajello L., Taylor J.W., Arseculeratne S.N., Mendoza L. (1999) Phylogenetic analysis of *Rhinosporidium seeberi*'s 18S small-subunit ribosomal DNA groups this pathogen among members of the protocistan Mesomycetozoa clade. *Journal of Clinical Microbiology*, 37:2750–2754

Hillis D.M. Wiens J.J. (2000) Molecular versus morphological systematics: Conflicts, artifacts and misconceptions. In Wiens, J.J. (eds) *Phylogenetic analysis of morphological data*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., p. 1-19.

Hu S.S., Tessier A.J. (1995) Seasonal succession and the strength of intra- and interspecific competition in a *Daphnia* assemblage. *Ecology*, 76:2278–2294

Hulscher T.E., Vrind B.A., van Noort P.C., Govers H.A. (2002) Resistant sorption of in situ chlorobenzenes and a polychlorinated biphenyl in river Rhine suspended matter. *Chemosphere*, 49(10):1231-8

Hutchinson G.E. (1961) The paradox of plankton. *The American Naturalist*, 95: 137-147

Hutchinson G.E. (1967) *A Treatise on Limnology. Volume II: Introduction to Lake Biology and the Limnoplankton*. Wiley, New York, p. 1115

Ikawa M., Haney J.F., Sasner J.J. (1996) Inhibition of *Chlorella* growth by the lipids of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Hydrobiologia*, 331: 167–170.

James T.Y., Letcher P.M., Longcore J.Y., Mozley-Standridge S.E., Powell M.J., Griffith G.W., Vilgalys R. (2006) A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia*, 98(6): 860–871

Jebaraj C.S., Raghukumar C., Behnke A., Stoeck T. (2010) Fungal diversity in oxygen-depleted regions of the Arabian Sea revealed by targeted environmental sequencing combined with cultivation. *FEMS Microbiology Ecology*, 71(3):399-412

Jukes T.H., Cantor C.R. (1969) *Evolution of Protein Molecules*. New York: Academic Press, p. 21–132.

Kagalou I., Papastergiadou E., Tsimarakis G., Petridis D. (2003) Evaluation of the trophic state of Lake Pamvotis Greece, a shallow urban lake. *Hydrobiologia*, 506-509: 745-752

Kagalou I., Tsimarakis G., Paschos I. (2001) Water chemistry and biology in a shallow lake (Lake Pamvotis – Greece). Present state and perspectives. *GLOBAL NEST: the International Journal*, 3(2): 85-94

Kamarianos A., Karamanlis X., Kousouris Th., Fotis G., Dellis S., Kilikidis S. (1993) Ecological studies on the Kerkini reservoir (N Greece). *GeoJournal*, 29(4):365-370

Keating K.I. (1987) Exploring allelochemistry in aquatic systems. – In: Waller, G.R. (Ed.), *Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry*. American Chemical Society, Washington, D.C., p. 136–146.

Keating K.I. (1999), Allelochemistry in plankton communities. In: Inderjit, KMM Dakshini, CL Foy (eds) *Principles and practices in plant ecology: Allelochemical interactions*. CRC Press, LLC, p. 165–178

- Kemp F.P., Aller Y.J. (2004) Estimating prokaryotic diversity: When are 16S rDNA libraries large enough? *Limnology and Oceanography: Methods*, 2:114–125
- Kivrak E. (2006) Seasonal and long term changes of the phytoplankton in the lake Tortum in relation to environmental factors, Erzurum, Turkey. *Biologia*, 61(4): 339-345
- Kuhn S., Drebes G., Schnepf E. (1996) five species of the nanoflagellate *Pirsonia* in the German Bight, North Sea, feeding on planktic diatoms. *Helgolander Meeresunters*, 50:205-222
- Kuhn S., Lange M., Medlin L.K. (2000) Phylogenetic position of *Cryothecomonas* inferred from nuclear-encoded small subunit ribosomal RNA. *Protist*, 151(4): 337-45
- Kugrens P., Clay B. (2010) Cryptophyta. In: American Water Works Association (eds) *Algae: Source to treatment. Manual of water supply practices – M57*. American Water Works Association, Denver, p. 187 – 206
- Lam C.W.Y., Silvester W.B. (1979) Growth interactions among blue-green *Anabaena oscillarioides*, *Microcystis aeruginosa*) and green (*Chlorella* sp.) algae. *Hydrobiologia* 63: 135–143.
- Leander B.S., Kuvardina O.N., Aleshin V.V., Mylnikov A.P., Keeling P.J. (2003) Molecular phylogeny and surface morphology of *Colpodella edax* (Alveolata): insights into the phagotrophic ancestry of apicomplexans. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50(5):334-340
- Lefèvre E., Bardot C., Noël C., Carrias J.F., Viscogliosi E., Amblard C., Sime-Ngando T. (2007) Unveiling fungal zooflagellates as members of freshwater picoeukaryotes: evidence from a molecular diversity study in a deep meromictic lake. *Environmental Microbiology*, 9:61–71
- Lefranc M., Thenot A., Lepere C., Debroas D. (2005) Genetic diversity of small eukaryotes in lakes differing by their trophic status. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:5935–5942
- Lepere C., Boucher D., Jardillier L., Domaizon I., Debroas D. (2006) Succession and regulation factors of small eukaryote community composition in a lacustrine ecosystem (Lake Pavin). *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4):2971-2981
- Lim E., Dennet M., Caron D. (1999) The ecology of *Paraphysomonas imperforate* based on studies employing oligonucleotide probe identification in coastal water samples and enrichment cultures. *Limnology and Oceanography*, 44:37-51
- Liu Y.J., Hodson M.C., Hall B.D. (2006) Loss of the flagellum happened only once in the fungal lineage: phylogenetic structure of Kingdom Fungi inferred from RNA polymerase II subunit genes. *Bio Med Central Evolutionary Biology*, 6(74): 1471-2148
- Lopez-Bautista J.M., Rindi F., Casamatta D. (2007) The systematic of subaerial algae. In: Seckbach J (ed) *Algae and cyanobacteria in extreme environments*. Springer, Dordrecht, p. 600–617

- López-García P, Rodríguez-Valera F, Pedrós-Alió C., Moreira D. (2001) Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature* 409:603–607
- Lund J.W.G. (1950) Studies of *Asterionelta formosa* Hass. II. Nutrient depletion and the spring maxima. *Journal of Ecology*, 38: 1-35
- Maestrini S.Y., Berland B.R., Breret M., Bechemin C., Poletti R., Rinaldi A. (1997) Nutrients limiting the algal growth potential (AGP) in the Po River plume and an adjacent area, Northwest Adriatic sea: Enrichment bioassays with the test algae *Nitzschia closterium* and *Thalassiosira pseudonana*. *Estuaries and Coasts*, 20(2):416-429
- Mann D. G. (1999) The species concept in diatoms. *Phycologia*, 38:437–95
- Marin B., Klingberg M., Melkonian M. (1998) Phylogenetic relationships among the Cryptophyta: Analyses of nuclear- encoded SSU rRNA sequences support the monophyly of extant plastid-containing lineages. *Protist*, 149:265-276
- Marshall W.L., Celio G., McLaughlin D.J., Berbee M.L. (2008) Multiple Isolations of a Culturable, Motile Ichthyosporean (Mesomycetozoa, Opisthokonta), *Creolimax fragrantissima* n. gen., n. sp., from Marine Invertebrate Digestive Tracts. *Protist*, 159: 415—433
- McFadden G.I., Gilson P.R., Hill D.R.A (1994) *Goniomonas*: rRNA sequences indicate that this phagotrophic flagellate is a close relative of the host component of cryptomonads. *European Journal of Phycology* 29: 29-32
- Medlin L., Elwood H.J., Stickel S., Sogin M.L. (1988) The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA coding regions. *Gene*, 71:491-499
- Mignot J.P. (1965) Etude ultrastructurale de *Cyathomonas truncata* From. (Flagelle Cryptomonadine). *Journal of Microscopy*, 4: 239-252
- Mischke U., Nixdorf B. (2003) Equilibrium phase conditions in shallow German lakes: How Cyanoprokaryota species establish a steady state phase in late summer. *Hydrobiologia*, 502: 123–132
- Mitrovic S.M., Hitchcock J.N., Davie A.W., Ryan D.A. (2010) Growth responses of *Cyclotella menghiniana* (Bacillariophyceae) to various temperatures. *Journal of plankton research*, 32(8):1217-1221
- Morgan K.C., Kalff J. (1979) Effect of light and temperature interactions on growth of *Cryptomonas erosa* (Cryptophyceae). *Journal of Phycology*, 15:127-134
- Moustaka-Gouni M. (1993) Phytoplankton succession and diversity in warm monomictic, relatively shallow lake: Lake Volvi, Macedonia, Greece. *Hydrobiologia*, 249: 33-42



- Moustaka-Gouni M., Vardaka E., Tryfon E. (2007) Phytoplankton species succession in a shallow Mediterranean lake (L. Kastoria, Greece): steady-state dominance of *Limnothrix redekei*, *Microcystis aeruginosa* and *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Hydrobiologia*, 575:129 – 140
- Myl'nikov A.P. (1991) Ultrastructure and Biology of Some Representatives of the Order Spiromonadida (Protozoa). *Zoologicheskii Zhurnal*, 70(7): 5–15.
- Nishijima T. (1990) Growth characteristics of *Plagioselmis* sp. (strain 87) causing freshwater red tide in the lower part of the Nakasuji River, Japan. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, 111: 3-21
- Nixdorf B., Mischke U., Rucker J. (2003) Phytoplankton assemblages and steady state in deep and shallow eutrophic lakes - an approach to differentiate the habitat properties of Oscillatoriales. *Hydrobiologia*, 502:111–121
- Noga E.J., Khoo L., Stevens J.B., Fan Z., Burkholder, J.M. (1996) Novel toxic dinoflagellate caused epidemic disease in estuarine fish. *Marine Pollution Bulletin*. 32: 219-24
- Novarino G. (2003) A companion to the identification of cryptomonad flagellates Cryptophyceae (= Cryptomonadea). *Hydrobiologia*, 502: 225-270
- Oikonomou A., Katsiapi M., Kormas Ar. K , Moustaka-Gouni M. (2012) Microbial communities during a fish kill event in the first year of the Lake Karla, Greece, reconstruction. *The Scientific World Journal*, [DOI:10.1100/2012/504135](https://doi.org/10.1100/2012/504135)
- Olsen G.J., Woese C.R. (1993) Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *Federation of American Societies for experimental biology*, 7:113-123
- Owens O.v.H., Esaias WE. (1976) Physiological responses of phytoplankton to major environmental factors. *Annual Review of Plant Physiology*, 27: 461-483
- Pace N.R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276:734-740
- Padisak J. (2003) Phytoplankton. *Limnology and Limnetic Ecology*. In: O'Sullivan P. E. and Reynolds C. S. (eds) *The Lakes Handbook*. Blackwell Science Ltd, Oxford, p. 251-308
- Padisak J., Reynolds C.S. (2003) Shallow lakes: the absolute, the relative, the functional and the pragmatic. *Hydrobiologia*, 506–509:1–11
- Pearsall W. H. (1930) Phytoplankton of English lakes. The proportion in the water of some dissolved sub-stances of biological importance. *Journal of Ecology*, 18(2), 306-320
- Philippe H., Lopez P., Brinkmann H., Budin K., Germot A., Laurent J., Moreira D., Müller M., Le Guyader H. (2000) Early-branching or fast-evolving eukaryotes? An

- answer based on slowly evolving positions. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267:1213–1221
- Porter K.G., (1973) Selective Grazing and Differential Digestion of Algae by zooplankton. *Nature*, 244:179–180
- Powell M.J. (1993) Looking at mycology with a Janus face: a glimpse of Chytridiomycetes active in the environment. *Mycologia*, 85:1–20.
- Pushparaj B., Pelosi E., Jüttner F. (1998) Toxicological analysis of the marine cyanobacterium *Nodularia harveyana*. *Journal of Applied Phycology*, 10: 527-530.
- Pushparaj B., Pelosi E., Jüttner F. (1999) Toxicological analysis of the marine cyanobacterium *Nodularia harveyana*. *Journal of Applied Phycology*, 10: 527–530.
- Rengefors K., Legrand C. (2001) Toxicity in *Peridinium aciculiferum* – an adaptive strategy to outcompete other winter phytoplankton? *Limnology and Oceanography*, 46: 1990–1997
- Reynolds C.S. (1980) Phytoplankton assemblages and their periodicity in stratifying lake systems. *Holarctic Ecology*, 3: 141–159
- Reynolds C.S. (1984) Phytoplankton periodicity: the interactions of form, function and environmental variability. *Freshwater Biology*, 14: 111-142
- Reynolds C.S. (1987) The response of phytoplankton communities to changing lake environments. *Journal of Hydrology*, 49(2): 220-236
- Reynolds C.S., Huszar V., Kruk C., Naselli-Flores L., Melo S. (2002) Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of plankton research*, 24(5): 417-428
- Romero J.R., Kagalou I., Imberger J., Hela D., Kotti M., Bartzokas A., Albanis T., Evmirides N., Karkabounas S., Papagiannis J., Bithava A. (2002) Seasonal water quality of shallow and eutrophic Lake Pamvotis, Greece: implications for restoration. *Hydrobiologia*, 474: 91 – 105
- Round F.E., Sims P.A., (1980) The distribution of diatom genera in marine and freshwater environments and some evolutionary considerations. In: Ross, R. (ed.), *Proceedings of the Sixth Symposium on Recent and Fossil Diatoms*. Otto Koeltz Science Publishers, Hirschberg, p. 301–320.
- Saitou N., Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4:406-425
- Schagerl M., Unterrieder I., Angeler, D.G. (2002) Allelopathy among Cyanoprokaryota and other algae originating from Lake Neusiedlersee (Austria). *International Review of Hydrobiology*, 87: 365–374

- Schlichting H.E. Jr (1964) Meteorological conditions affecting the dispersal of airborne algae and protozoa. *Lloydia* 27:64–78
- Schmitt R.J., Holbrook S.J. (1986) Seasonally fluctuating resources and temporal variability of interspecific competition. *Oecologia* 69:1–11
- Schnepf E., Elbrachter M. 1992. Nutritional strategies in dinoflagellates - a review with emphasis on cell biological aspects. *European Journal of Protistology*, 28:3–24
- Seip K.L., Reynolds C.S., (1995) Phytoplankton functional attributes along trophic gradient and season. *Limnology and Oceanography*, 40(3): 589- 597
- Sharma N.K., Rai A.K., Singh S., Brown R.M. Jr. (2007) Airborne algae: their present status and relevance. *Journal of Phycology*, 43: 615–627
- Shilo M. (1971) Toxins of Chrysophyceae. In: *Microbial Toxins Vol. VII Algal and fungal toxins* (eds) Kadis S., Ciegler A., Ajl S.J), pp. 67-103. Academic Press, London.
- Shinada A., Shiga N, Ban S. (1999) Origin of *Thalassiosira* diatoms that cause the spring phytoplankton bloom in Funka Bay, southwestern Hokkaido, Japan. *The Plankton Society of Japan - plankton biology and ecology*, 46(2):89-93
- Singh, D.P., Tyagi M.B., Kumar A., Thakur J.K., Kumar A. (2001) Antialgal activity of a hepatotoxin-producing cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17: 15–22
- Smith G.D., Doan N.T. (1999) Cyanobacterial metabolites with bioactivity against photosynthesis in cyanobacteria, algae and higher plants. *Journal of Applied Phycology*, 11: 337-344.
- Smith S.A., Noga E.J., Bullis, R.A. (1988) Mortality in *Tilapia aurea* due to a toxic dinoflagellate bloom. *Proceedings of the Third International Symposium on Pathology of Marine Aquaculture*, Gloucester Point, Virginia, p. 167–68.
- Sommer U., Gliwicz Z.M., Lampert W., Duncan A. (1986) The PEG-model of seasonal succession of planktonic events in fresh waters. *Archives of Hydrobiology*, 106:433–471
- Spear J.R., Walker J.J., McCollom T.M., Pace N.R. (2004) Hydrogen and bioenergetics in the Yellowstone geothermal ecosystem. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 10(7):2555–2560
- Spiegelman D, Whissell G., Greer C.W (2005) A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. *Canadian Journal of Microbiology*, 51:355–386.
- Stackebrandt E., Goebel B. (1994) Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44:846-849

- Steidinger K.A., Landsberg J.H., Mason P.L., Vogelbein W.K., Tester P.A., Litaker R.W. (2006) *Cryptoperidiniopsis brodyi* gen. et. Sp. Nov. (Dinophyceae), a small lightly armored dinoflagellate in the pfiesteriaceae. *Journal of Phycology*, 42:951-926
- Steidinger K.A., Landsberg J.H., Truby E.W., Blakesley B.A. (1996) The use of scanning electron microscopy in identifying small “gymnodinioid” dinoflagellates. *Nova Hedwigia*, 112:415-422
- Stoermer E.F., Julius M.L. (2003) Centric Diatoms. In: Wehr, J.D., Sheath, R.G. (Eds.), *Freshwater Algae of North America*. Academic Press, Amsterdam, p. 559–594.
- Taylor F.J.R., Cattell S.A. (1969) *Discroerisma psilonereiella* gen. et sp. n., a new dinoflagellate from British Columbia coastal waters. *Protistologica*, 5: 169—172
- Temponeras M., Kristiansen J., Moustaka-Gouni M. (2000) Seasonal variation in phytoplankton composition and physical-chemical features of the shallow Lake Doirani, Macedonia, Greece. *Hydrobiologia*, 424: 109 – 122
- Tillmann U., Hesse K.J., Tillmann A. (1999) Large-scale parasitic infection of diatoms in the Northfrisian Waden Sea. *Journal of Sea Research*, 42:255-261
- Tilman D., Kiesling R., Sterner R., Kilham S.S., Johnson F.A. (1986) Green, bluegreen and diatom algae: Taxonomic differences in competitive ability for phosphorous, silicon and nitrogen. *Archiv für Hydrobiologie*, 106: 473–485.
- Treguer P., Nelson, D.M., van Bennekom A.J., DeMaster, D.J., Leinert A., Queguiner B. (1995) The silica balance in the world ocean: a reestimate. *Science*, 268:375–9
- Triantafyllou G., Petihakis G., Dounas C., Theodorou A. (2001) Assessing marine ecosystem response to nutrient inputs. *Marine Pollution Bulletin*, 43:175–186
- Tüxen R. (1955) Das Systeme der nordwestdeutschen Pflanzengesellschaft. *Mitt. Florist-soziol. Arbeitsgemeinschaft.*, 5: 1–119
- Utermohl H. (1958) Zur Vervollkommnung der Quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitteilung Internationale Vereinigung fuer Theoretische und Angewandte Limnologie*, 9:1–38.
- Van Hannen. J., Mooij W., Van Agterveld M.P., Gons H.J., Laanbroek H. J. (1999) Detritus-Dependent Development of the Microbial Community in an Experimental System: Qualitative Analysis by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and environmental microbiology*, p. 2478–2484
- Waite A., Bienfang P.K., Harrison P.J. (1992) Spring bloom sedimentation in s Sub-Arctic ecosystem .2. Succession and sedimentation. *Marine Biology*, 114(1):131-138
- Weber C.I. (1970) A new freshwater centric diatom *Microsiphona potamos* gen. et sp. nov. *Journal of Phycology*, 6: 149–153

Webster G., Newberry C.J., Fry J.C., Weightman A.J. (2003) Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale. *Journal of Microbiological Methods*, 55(1):155-164.

Williams D.D, Tavares-Cromar A., Coleman J.R., Kushner DJ, Happey-Wood C.M (1994) Colonization dynamics of algae in small artificial ponds. *Canadian Journal of Botany*, 72:1654–1665

Wong A.L.C., Beebee T.J.C., Griffiths R.A. (1994) Factors affecting the distribution and abundance of an unpigmented heterotrophic alga *Prototheca ricardsi*. *Freshwater biology*, 32:33-38

Yuan C., Liu J., Fan Y., Ren X., Hu G., Li F. (2011) *Mychonastes afer* HSO-3-1 as a potential new source of biodiesel. *Biotechnology for Biofuels*, 4(1): 47

Zaccaroni A., Scaravelli D. (2008) Toxicity of fresh water algal toxins to humans and animals. In: Evangelista V., Barsanti L., Frassanito M.A., Passarelli V., Gualtieri P. (eds) *Algal toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection*, p. 45 – 89

Zalidis G., and Gerakis A. (1999) Evaluating sustainability of watershed resources management through wetland functional analysis. *Environmental Management*, 24:193–207.

Zalidis C. G., Takavakoglou V., Panoras A., Bilas G., Katsavouni S. (2005) Re-establishing a sustainable wetland at former lake Karla, Greece, using Ramsar restoration guidelines. *Environmental Management*, 34:875-886

## 7. ABSTRACT

The seasonal succession of microscopic eukaryotes in the water column of Lake Karla was studied. The ecological succession of communities was stopped in 1962 because it was drained and has been restarted in recent years artificially, when the reservoir began refilled. The investigation of the diversity was made with molecular techniques, based on clone libraries of 18S rRNA gene diversity, from water samples that had been collected in May, August and November 2010.

A total of 72, 6 and 54 sequences from the respective libraries was identified, and these were clustered with  $\geq 98\%$  similarity level in 24, 5 and 12 unique phylotypes, respectively. In the May (KRL03E) and November (KRL09E) libraries, high abundance of phylotypes was observed in contrast with the August library (KRL06E). The phylotypes were grouped into eight taxonomic groups: Cercozoa, Alveolata, Chlorophyta, Fungi, Stramenopiles, Mesomycetozoa, Cryptophyta and Copepoda. In May, Fungi (34,7%) dominated, followed by the Chlorophyta (33,3%). The results from the August sample showed low eukaryotic abundance, consisting primarily of Fungi (33,3%) and Stramenopiles (33,3%). The last taxon was dominant (53,7%) in autumn, too (November), followed by the Alveolata (24%).

Based on the results of this study along with those from March and April 2010, presented elsewhere, the seasonal succession of eukaryotic diversity in Lake Karla, seemed to follow the typical model observed in other shallow eutrophic lakes. Chlorophyta dominated in spring. In summer, there was low abundance, possibly because of the Cyanobacteria bloom, while Stramenopiles dominated in autumn when the lake temperature drops. The high abundance of Cercozoa in early spring (March's

library) and of Fungi in the May and November clone libraries was due to the dominance of Chlorophyta and Stramenopiles, on which they probably parasitize.

The recovered phylotypes from this study, were found to be associated with species which originate from various environments, from oligotrophic lakes to waste waters. Several of these species are parasites of algae, invertebrates and vertebrates (*Cryothecomonas longipes*, *Lagenidium caudatum*). Species belonging to the taxonomic group of Alveolata (*Pseudopfiesteria shumwayae*, *Pfiesteria piscicida*), are capable of producing ichthyotoxins and have been linked with mass fish deaths and human diseases. Phylotypes belonging to Fungi, grouped near the clade of Chytridiomycota, which are known parasites of microalgae and cyanobacteria. In addition, phylotypes have been found belonging to the taxonomic group of Mesomycetozoa (*Ichthyophonida fragrantissima*, *Anurofeca richardsi*). All the species of this group are parasites of fish, crustaceans and amphibians. The high salinity of the lake makes it a favorable environment for marine species like *Chaetoceros gracilis*. In conclusion, this newly formed, unstable and unique ecosystem, during the first year of its refilling appears to be highly eutrophic and hosting several parasitic/toxic species.

**Keywords:** microscopic eukaryotes, 18S rRNA gene, lake Karla.

# **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**



<b>ΦΥΛΟΤΥΠΟΙ</b>	<b>ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ</b>	<b>ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗ ΟΜΑΔΑ</b>
KRL03E01	1/72	FUNGI
KRL03E02	2/72	MESOMYCETAZOA
KRL03E03	2/72	ALVEOLATA
KRL03E06	2/72	FUNGI
KRL03E07	16/72	CHLOROPHYTA
KRL03E08	7/72	STRAMENOPILES
KRL03E11	2/72	CERCOZOA
KRL03E12	1/72	MESOMYCETAZOA
KRL03E17	14/72	FUNGI
KRL03E19	2/72	CHLOROPHYTA
KRL03E21	1/72	FUNGI
KRL03E32	6/72	FUNGI
KRL03E38	2/72	ALVEOLATA
KRL03E39	2/72	CERCOZOA
KRL03E40	1/72	CHLOROPHYTA
KRL03E42	2/72	CHLOROPHYTA
KRL03E49	2/72	CHLOROPHYTA
KRL03E57	1/72	ALVEOLATA
KRL03E60	1/72	STRAMENOPILES
KRL03E64	1/72	COPEPODA
KRL03E75	1/72	STRAMENOPILES
KRL03E76	1/72	CHLOROPHYTA
KRL03E80	1/72	FUNGI
KRL03E85	1/72	STRAMENOPILES
KRL06E73	1/6	CRYPTOPHYTA
KRL06E94	1/6	MESOMYCETAZOA
KRL06E127	2/6	STRAMENOPILES
KRL06E139	1/6	FUNGI
KRL06E206	1/6	FUNGI
KRL09E02	9/54	CRYPTOPHYTA
KRL09E05	8/54	STRAMENOPILES
KRL09E06	1/54	ALVEOLATA
KRL09E10	11/54	ALVEOLATA
KRL09E14	1/54	STRAMENOPILES
KRL09E17	1/54	STRAMENOPILES
KRL09E21	1/54	ALVEOLATA
KRL09E22	1/54	STRAMENOPILES
KRL09E23	1/54	FUNGI
KRL09E36	1/54	CHLOROPHYTA
KRL09E37	18/54	STRAMENOPILES
KRL09E46	1/54	CHLOROPHYTA