

ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ Έλεγχος Ποιότητας & Διαχείριση Περιβάλλοντος



ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΝΤΑΙ ΣΕ ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΙΖΗΜΑΤΑ, ΣΤΗ ΖΩΝΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΝ ΥΔΡΙΤΩΝ ΜΕΘΑΝΙΟΥ

Διδακτορική διατριβή της Αργυρής Γ. Καλλιονάκη Γεωπόνου Βιοτεχνολόγου

XANIA 2012

Χαρακτηρισμός των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται σε θαλάσσια ιζήματα, στη ζώνη κρυστάλλων υδριτών μεθανίου

Φωτογραφία εξωφύλλου: Χαρακτηριστικό συσσωμάτωμα κυττάρων που θεωρείται ότι μεσολαβεί στην αναερόβια οξείδωση του μεθανίου. Μικροσκοπική παρατήρηση: με χρώση DAPI (μπλε) και ταυτόχρονο υβριδισμό με την τεχνική FISH όπου διακρίνονται τα ANME-2 Archaea (κόκκινο) να περιβάλλονται από θειικοαναγωγικά Bacteria της ομάδας Desulfosarcina/Desulfococcus.

Σχεδιασμός εξωφύλλου Εύη Καλλιονάκη

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Νικόλαος Καλογεράκης – Επιβλέπων

Καθηγητής, Τομέας Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Περιβαλλοντικών Διεργασιών, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά

Διονύσιος Μαντζαβίνος - Μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής

Καθηγητής, Τομέας Περιβαλλοντικής Διαχείρισης, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά

Κωνσταντίνος Κορμάς - Μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Γεώργιος Καρατζάς

Καθηγητής, Τομέας Περιβαλλοντικής Υδραυλικής και Γεωπεριβαλλοντικής Μηχανικής, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά

Ελευθερία Ψυλλάκη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Περιβαλλοντικής Υδραυλικής και Γεωπεριβαλλοντικής Μηχανικής, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά

Δανάη Βενιέρη

Λέκτορας, Τομέας Περιβαλλοντικής Διαχείρισης, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά

Εμμανουήλ Τσαπάκης

Ερευνητής, Ινστιτούτο Ωκεανογραφίας, ΕΛΚΕΘΕ, Ηράκλειο Κρήτης

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για την καθοδήγηση και τις συμβουλές τους κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής, καθώς και τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για το ενδιαφέρον τους και τις παρατηρήσεις τους κατά την υποστήριξη της διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον ερευνητή του Ινστιτούτου Ωκεανογραφίας του ΕΛΚΕΘΕ, δρ, Βασίλειο Λυκούση, για τις πολύτιμες πληροφορίες και την άψογη συνεργασία που είχαμε κατά τη διάρκεια της ερευνητικής αποστολής, καθώς και το πλήρωμα και το επιστημονικό προσωπικό του ερευνητικού σκάφους ΑΙΓΑΙΟ για τη σημαντική βοήθεια κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Gert de Lange, από το Τμήμα Γεωεπιστημών του Πανεπιστημίου της Ουλτρέχτης, για την παροχή πληροφοριών σχετικά με τη γεωχημική περιγραφή των πυρήνων ιζήματος που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

Θα ήθελα ιδιαιτέρως να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Κωνσταντίνο Κορμά, του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την αμέριστη υποστήριξη και τη συνεχή καθοδήγησή του στο εργαστηριακό και ερευνητικό κομμάτι και για τις εύστοχες παρατηρήσεις του κατά τη διάρκεια της συγγραφής της διατριβής.

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και τις θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα Καθηγητή Νικόλαο Καλογεράκη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την πολύτιμες συμβουλές του σε όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Θα ήθελα τέλος να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την ανεκτίμητη υποστήριξη, την συμπαράσταση, την υπομονή που έχει δείξει και τις συμβουλές που απλόχερα μου έχει προσφέρει μέχρι σήμερα.

Περιεχόμενα

Περίληψη	5
Abstract	8
Σκοπός και στόχοι	11
<u>Κεφάλαιο 1- Εισαγωγή</u>	13
1. Μεθάνιο	15
2 Οι κυριότερες διεργασίες στα θαλάσσια ιζήματα πλούσια σε μεθάνιο	24
2.1 Μεθανιογένεση	24
2.2 Αναγωγή θειικών ιόντων	25
2.3 Οξείδωση του υδρόθειου	26
2.4 Αερόβια οξείδωση του μεθανίου	27
2.5 Αναερόβια οξείδωση του μεθανίου	27
3. Αναερόβια οξείδωση του μεθανίου συνδεδεμένη με αναγωγή θειικών ιόντων	29
3.1 Μικροοργανισμοί που σχετίζονται με την ΑΟΜ	32
3.2 Το ιδιαίτερο μικροπεριβάλλον των ΑΝΜΕ	35
3.3 Συνθήκες που ελέγχουν την ΑΟΜ	39
3.4 Εναλλακτικοί μηχανισμοί ΑΟΜ	44

<u>Κεφάλαιο 2 – Υλικά και Μέθοδοι</u>

 Περιγραφή της περιοχής που μελετήθηκε 	49
1.1 Υποθαλάσσια όρη Αναξίμανδρου	49
1.2 Γεωμορφολόγια των Ηφαιστείων ιλύος που μελετήθηκαν	52
1.2.1 Ηφαίστειο ιλύος Amsterdam	52
1.2.2 Ηφαίστειο ιλύος Kazan	54
1.2.3 Ηφαίστειο ιλύος Kula	54
1.2.4 Ηφαίστειο ιλύος Thessaloniki	55
2. Δειγματοληψία	57
2.1 Λήψη δειγμάτων	61
3. Ολική κυτταρική αφθονία και εφαρμογή της τεχνικής FISH	67
3.1 In situ υβριδισμός με φθορισμό (FISH), σε φίλτρα μεμβράνης	67
3.1.1 Εξοπλισμός και αναλώσιμα	68
3.1.2 Μεθοδολογία	69
3.1.3 Χρώση DAPI για μέτρηση κυτταρικής αφθονίας	75
4. Αναερόβιες Καλλιέργειες	78
4.1 Εξοπλισμός	78

4.2. Θρεπτικά μέσα	79
4.3 Καλλιέργεια Αναερόβιων Μικροοργανισμών	87
4.4 Δημιουργία καθαρών καλλιεργειών	95

Κεφάλαιο 3 - Αποτελέσματα

1. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΦΘΟΝΙΑ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑΣ	
ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΘΑΝΙΟΥ	99
Α. Ηφαίστειο Ιλύος Amsterdam	
Α.1 Πεδίο ΑΧ02 – Σύντομη γεωχημική περιγραφή	99
Α.1.1 Πυρήνας ΑΧ02ΒC1	100
Α.1.1.1 Αφθονία κυττάρων, μέγεθος και αφθονία συσσωματωμάτων	100
Α.1.1.2 Μορφολογία και δομή των συσσωματωμάτων	102
Α.1.1.3 Ανίχνευση των αναερόβιων μεθανιότροφων ΑΝΜΕ-2	104
Α.1.1.4 Ανίχνευση των αναερόβιων μεθανιότροφων ΑΝΜΕ-1	105
Α.1.2. Σύγκριση μεταξύ ιζημάτων που αποσυμπιέστηκαν σταδιακά και ακαριαία	110
Α.2 Πεδίο ΑΧ09 - Σύντομη γεωχημική περιγραφή	112
Α.2.1 Αφθονία κυττάρων, μέγεθος και αφθονία συσσωματωμάτων	113
Α.2.2 Μορφολογία και δομή των συσσωματωμάτων	115
Α.2.3. Ανίχνευση αναερόβιων μεθανιότροφων ΑΝΜΕ-2	116
Α.2.4 Ανίχνευση των αναερόβιων μεθανιότροφων ΑΝΜΕ-1	116
A.3 Πεδία AX06, AX08 και AX11	119
Α.3.1 Αφθονία κυττάρων, μέγεθος και αφθονία συσσωματωμάτων	119
Β. Ηφαίστειο ιλύος Kazan	122
Γ. Ηφαίστειο ιλύος Kula	124
2. ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟΝ	
ΚΥΚΛΟ ΤΟΥ ΜΕΘΑΝΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΝ ΚΥΚΛΟ ΤΟΥ ΘΕΙΟΥ	126
2.1 Εμπλουτισμός καλλιεργειών	126
2.2 Κυτταρική αύξηση	128
2.2.1 Θρεπτικό μέσο για θειικοαναγωγικά Bacteria	129
2.2.2 Θρεπτικό μέσο για Methanosarcina	130
2.3 Τεχνική FISH	132
2.3.1 Θειικοαναγωγικά Bacteria	132
2.3.2 Θρεπτικό μέσο για Methanosarcina	134
2.4 Καθαρές καλλιέργειες	136

<u>Κεφάλαιο 4 – Συζήτηση</u>

1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΦΘΟΝΙΑ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑΣ ΟΞΕΙΔΩ	ΣΗΣ
TOY MEØANIOY ΣE IZHMATA ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΥΔΡΙΤΕΣ ΜΕΘΑΝΙΟΥ	143
Α. Ηφαίστειο ιλύος Amsterdam	143
Α.1 Ιζήματα από περιοχή χαμηλής ροής εκλυόμενης ιλύος	143
Α.1.1. Ένδειξη αναερόβιας οξείδωσης του μεθανίου (ΑΟΜ)	143
Α.1.2. Συνύπαρξη των αναερόβιων μεθανιότροφων ΑΝΜΕ-1 και ΑΝΜΕ-2	148
Α.2 Ιζήματα από περιοχή υψηλής ροής εκλυόμενης ιλύος	155
A.2.1 Ένδειξη αναερόβιας οξείδωσης του μεθανίου (AOM) –	
ζώνη υδριτών μεθανίου	155
Α.3 Σύγκριση πεδίων από το ηφαίστειο ιλύος Amsterdam	160
Β. Ηφαίστειο ιλύος Kazan	167
Γ. Ηφαίστειο ιλύος Kula	171
Δ. Σύγκριση των τριών ηφαιστείων ιλύος.	172
2 ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟΝ	
ΚΥΚΛΟ ΤΟΥ ΜΕΘΑΝΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΝ ΚΥΚΛΟ ΤΟΥ ΘΕΙΟΥ	175
2.1 Θρεπτικό μέσο για θειικοαναγωγικά Bacteria	177
2.2 Θρεπτικό μέσο για Archaea του γένους Methanosarcina	182
Συμπεράσματα	189
Βιβλιογραφία	193
Ευρετήριο Εικόνων	203
Ευρετήριο Πινάκων	205

Περίληψη

Στην Ανατολική Μεσόγειο, στα υποθαλάσσια όρη Αναξίμανδρου, σε βάθος μεταξύ 1260 - 2030m από την επιφάνεια της θάλασσας, έχουν εντοπιστεί ενεργά ηφαίστεια ιλύος από τα οποία εκλύεται μεθάνιο στην υδάτινη στήλη. Πολύ ρηχά μέσα στο ίζημα, οι συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας που επικρατούν επιτρέπουν το σχηματισμό υδριτών μεθανίου, που αποτελεί μια μορφή συσσώρευσης του εκλυόμενου από τα βαθύτερα στρώματα μεθανίου, αλλά ταυτόχρονα και μια πιθανή πηγή απελευθέρωσης μεθανίου σε περίπτωση αποσταθεροποίησής τους, λόγω μεταβολής των συνθηκών. Υψηλές συγκεντρώσεις μεθανίου έχουν ανιχνευθεί στην υδάτινη στήλη, πάνω από τα ηφαίστεια αυτά. Το μεθάνιο που εκλύεται από το ίζημα διαλύεται στην υδάτινη στήλη, όπου ξεκινάει άμεσα η οξείδωσή του από μεθανιότροφους μικροοργανισμούς. Η ποσότητα που απομένει, διαφεύγει στην ατμόσφαιρα, όπου συνεισφέρει στην αύξηση του παγκόσμιου ατμοσφαιρικού φορτίου σε μεθάνιο, παράγοντας που συμβάλλει στο φαινόμενο του θερμοκηπίου.

Στα πλούσια σε ιζήματα μεθάνιο, μεθανιότροφοι μικροοργανισμοί έχει βρεθεί ότι οξειδώνουν το μεθάνιο αναερόβια, σε μια διεργασία που μέχρι και σήμερα παραμένει αδιευκρίνιστη. Η αναερόβια οξείδωση του μεθανίου (AOM) στα θαλάσσια ιζήματα θεωρείται ότι καταναλώνει περισσότερο από το 80% της ποσότητας του μεθανίου, που διαφορετικά θα διέφευγε στην υδάτινη στήλη. Η ποσότητα του μεθανίου που τελικά εκλύεται στην υδάτινη στήλη, είναι το μεθάνιο το οποίο δεν έχει συσσωρευτεί σε υδρίτες, και δεν έχει καταναλωθεί από τους μεθανιότροφους μικροοργανισμούς.

Η διερεύνηση της AOM στα ηφαίστεια ιλύος Amsterdam και Kazan από προηγούμενες μελέτες, έχει δώσει πληροφορίες για την παρουσία αναερόβιων μεθανιότροφων μικροοργανισμών στα ανώτερα επίπεδα του ιζήματος. Όμως μέχρι σήμερα, δεν είχαν διερευνηθεί οι ιδιαίτερες δομές που σχηματίζουν οι μεθανιότροφοι μικροοργανισμοί και οι οικολογικές τους σχέσεις με άλλους μικροοργανισμούς. Με την παρούσα εργασία, εκτιμήθηκε η κυτταρική αφθονία σε πυρήνες ιζήματος από τα ηφαίστεια ιλύος Amsterdam, Kazan και Kula σε βάθος μέχρι 150 cm και διερευνήθηκε εάν η AOM είναι ενεργή και πως μπορεί να επηρεάζεται από την εκλυόμενη ροή και τους σχηματισμούς υδριτών, ενώ αναγεννήθηκαν καλλιέργειες θειικοαναγωγικών Bacteria, και άγνωστων Bacteria πιθανόν μεθυλιότροφων από τα ηφαίστεια αυτά και το ηφαίστειο ιλύος Thessaloniki.

Στον πυρήνα AX02BC1 από περιοχή χαμηλής ροής έκλυσης ιλύος του ηφαιστείου ιλύος Amsterdam, η δειγματοληψία υψηλής ανάλυσης σε βάθος μέχρι 44cm, αποκάλυψε ότι η κυτταρική αφθονία αυξάνονταν με το βάθος. Δύο τύποι μεθανιότροφων μικροοργανισμών ανιχνεύθηκαν, τα ANME-1 και τα ANME-2 Archaea. Τα ANME-2 βρέθηκαν να σχηματίζουν συσσωματώματα μαζί με θειικοαναγωγικά Bacteria της ομάδας Desulfosarcina/Desulfococcus (DSS). Τα συσσωματώματα αυτά ανιχνεύθηκαν σε όλα τα βάθη του ιζήματος, με μέγιστη αφθονία στα 32 cm, όπου αποτελούσαν το 96% της κυτταρικής αφθονίας (5,19x10⁹ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ.), γεγονός που υποδηλώνει έντονη δραστηριότητα AOM. Στο βάθος αυτό τα ANME-2/DSS συσσωματώματα είχαν μεγάλη διάμετρο (12-15μm), αποτελούμενα από μερικές χιλιάδες κύτταρα. Στα 44cm, βάθος ήταν η δεύτερη ζώνη με υψηλή αφθονία των ANME-2/DSS συσσωματωμάτων, με συσσωματώματα διαμέτρου ~5μm, που συνεισέφεραν σε ποσοστό 41% στην ολική αφθονία. Η ανίχνευση μεγάλων συσσωματωμάτων υποδηλώνει ότι η διεργασία της AOM ήταν ενεργή και συνεχής για μεγάλο χρονικό διάστημα. Τα ΑΝΜΕ-1 κύτταρα, ανιχνεύθηκαν σε βάθος κάτω από τα 14cm, και η συγκέντρωσή τους βρέθηκε ότι αυξάνονταν με το βάθος, με μέγιστη συγκέντρωση στα 38cm $(1,17 \times 10^8 \text{ kúttara} \text{ cm}^{-3} \text{ substar})$ ν.ιζ.). Επομένως, στον πυρήνα AX02BC1, η AOM ήταν εκτεταμένη σε όλα το βάθος του. Υπήρξε όμως μια ζώνη μεταξύ 32 και 44cm που μπορεί να θεωρηθεί ως «ζώνη αυξημένης AOM», ένα μικροβιακό φίλτρο που αποτρέπει την έκλυση μεθανίου προς την υδάτινη στήλη.

Δεν παρατηρήθηκε κάτι αντίστοιχο στον πυρήνα AX09GC1, επίσης από το ηφαίστειο ιλύος Amsterdam, που ανακτήθηκε από περιοχή με υψηλή ροή έκλυσης ιλύος και τα γεωχημικά δεδομένα αποκάλυψαν ότι υπήρχε μεγάλος υδρίτης στο μέσο του. Στον πυρήνα αυτό, η κυτταρική αφθονία ήταν υψηλή στα 2 και στα 95cm (της τάξης του 10⁸ κύτταρα cm⁻³ ν.ιζ.), όπου ανιχνεύθηκαν ANME-1 και ANME-2/DSS συσσωματώματα, ενώ αντίθετα στα δύο παρακείμενα βάθη του επιπέδου που βρέθηκε ο υδρίτης, που μπορεί να θεωρηθεί ως «ζώνη σχηματισμού υδριτών», η κυτταρική αφθονία ήταν μια τάξη μεγέθους χαμηλότερη, ενδεχομένως λόγω της αδυναμίας των μικροοργανισμών να αναπτυχθούν στο εσωτερικό των υδριτών. Η παρουσία των ΑΝΜΕ στα 2 και στα 95cm, αποτελεί ένδειξη ότι συνέβαινε AOM, εκατέρωθεν της «ζώνης υδριτών» με μέτρια δραστηριότητα όμως, καθώς οι μεθανιότροφες αυτές ομάδες αποτελούσαν μόλις το 29% και το 14% της ολικής κυτταρικής αφθονίας αντίστοιχα. Στους υπόλοιπους πυρήνες που ανακτήθηκαν από το ηφαίστειο ιλύος Amsterdam, Kazan και Kula, από περιοχές υψηλής ροής έκλυσης μεθανίου, η κυτταρική αφθονία ήταν υψηλή στα 2cm βάθος και κυμάνθηκε μεταξύ 1,7 και 2,91x10⁸ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ, ενώ βρέθηκε ότι μειώνονταν με το βάθος. Με εξαίρεση δύο ακόμα πυρήνες (AX11GC1 και AX23GC1), στους υπόλοιπους δεν προέκυψαν ενδείξεις ότι μπορεί να συμβαίνει AOM. Στον πυρήνα AX11GC1 από το ηφαίστειο ιλύος Amsterdam, ανιχνεύθηκε χαμηλή συγκέντρωση συσσωματωμάτων σε όλα τα βάθη, που αντιστοιχούσε μόλις στο 3-9% της ολικής κυτταρική αφθονία ήταν υψηλή (4,15x10⁸ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ.) και ανιχνεύθηκαν συσσωματώματα που αποτελούσαν το 78% της ολικής κυτταρικής αφθονία ήταν υψηλή (4,15x10⁸ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ.) και ανιχνεύθηκαν συσσωματώματα που αποτελούσαν το 78% της ολικής κυτταρικής αφθονίας στο 3.9% της ολικής κυταρική αφθονία ήταν υψηλή (4,15x10⁸ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ.) και ανιχνεύθηκαν συσσωματώματα που αποτελούσαν το 78% της ολικής κυτταρικής αφθονίας στο 3.9% της ολικής κυταρική αφθονία ήταν υψηλή (4,15x10⁸ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ.) και ανιχνεύθηκαν συσσωματώματα που αποτελούσαν το 78% της ολικής κυτταρικής αφθονίας που μπορεί να θεωρηθεί ως ένδειξη ΑΟΜ. Αν και σε ιζήματα όπου η εκλυόμενη ροή μεθανίου ήταν χαμηλή παρατηρήθηκε ότι η ΑΟΜ ήταν εκτεταμένη σε μια μεγάλη ζώνη μέσα στο ίζημα, κάτι τέτοιο δεν

διαπιστώθηκε σε ιζήματα από περιοχές με υψηλή εκλυόμενη ροή ή σε ιζήματα που περιείχαν άφθονους κρυστάλλους μεθανίου. Στα ιζήματα αυτά ενδεχομένως οι γεωχημικές συνθήκες είναι ασταθείς επηρεάζοντας την εγκατάσταση των μεθανιότροφων μικροοργανισμών. Εάν συμβαίνει ΑΟΜ πολύ πιθανό εντοπίζεται σε συγκεκριμένους ορίζοντες μέσα στο ίζημα, πάνω ή κάτω από τη ζώνη σχηματισμού υδριτών όπου το ιδιαίτερο γεωχημικό μικροπεριβάλλον ευνοεί την ανάπτυξη των ANME.

Θειικοαναγωγικά Bacteria που ανήκαν στα DSS ανακτήθηκαν σε καλλιέργειες από διάφορα βάθη, ακόμα και από επίπεδα του ιζήματος όπου τα θειικά ιόντα θα έπρεπε να είχαν εξαντληθεί, υποδηλώνοντας ότι η αναγωγή των θειικών ήταν εκτεταμένη κι ενδεχομένως ενεργή και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις θειικών ιόντων. Τα θειικοαναγωγικά Bacteria ανακτήθηκαν και από βάθη ιζήματος όπου δεν προέκυψαν ενδείξεις παρουσίας μεθανιότροφων μικροοργανισμών. Στα βάθη αυτά η παρουσία τους μάλλον συνδέεται με την αναερόβια αποικοδόμηση της οργανικής ύλης. Δεν προέκυψαν ενδείξεις από τις καλλιέργειες ότι η μεθανιογένεση ήταν ενεργή μέσο του μεθυλιοτροφικού μονοπατιού.

7

Abstract

In Anaximander Mountains, in Eastern Mediterranean Sea, at a water depth of 1260-2000m., several active mud volcanoes have been identified that emit methane to the water column. Inside the sediment, in shallow depths, pressure and temperature favor gas hydrate formation, accumulating upward migrating methane, which may at the same time represent a possible source of methane emission, in case of destabilization due to changing conditions. High methane concentrations have been identified in the water column over these mud volcanoes. Methane emitted through the sediment is diluted in the water column, where methane oxidation rapidly occurs by methanotrophs. The remaining amount of methane is released to the atmosphere, increasing atmospheric methane budget, which contributes to the greenhouse effect. In sediments rich in methane, methanotrophs are thought to oxidize methane under anaerobic conditions, through a procedure that remains vague up to date. The Anaerobic Oxidation of Methane (AOM) in marine sediments, is thought to consume more than 80% of methane produced in marine sediments, which otherwise would end up to the water column. Methane that is finally emitted to the water column is

what has not been sequestered in gas hydrates, and has not been consumed by methanotrophs. Previous investigations of AOM in Amsterdam and Kazan MV's have provided

information on the presence of anaerobic methanotrophs in the upper sediment layers. Up to date though, there has not been investigated the particular structures (aggregates) that these microorganism form, and their ecologic relations with other microorganisms. In the present study, the prokaryotic abundance has been estimated in sediment cores from Amsterdam, Kazan and Kula mud volcanoes, in depth up to 150cm. In these sediments, the occurrence of AOM activity was investigated and it was examined how fluid flow and methane hydrate formations affected it. At the same time, vivid cultures of sulfate reducing Bacteria and unknown Bacteria, probably methylotrophs, were generated from sediments retrieved from these mud volcanoes and Thessaloniki mud volcano.

AOM was thoroughly investigated in Amsterdam mud volcano. High resolution sampling up to 44cm sediment depth, in a core retrieved from a low fluid flow site, revealed that cell abundance increased with depth. Two anaerobic methanotrophs were identified, ANME-1 and ANME-2 Archaea. The group of ANME-2 Archaea was found to form aggregates with sulfate reducing Bacteria of the

Desulfosarcina/Desulfococcus cluster (DSS). These aggregates were detected in all examined depths, but a peak in aggregate abundance was detected at 32cm depth, where they accounted for 96% of total cell counts $(5,19x10^9 \text{ cells cm}^{-3} \text{ w.s.})$, implying intense AOM. At this depth, ANME-2/DSS aggregates were very large in size (12-15µm), and comprised of several thousands of cells. At 44cm depth, a second zone with high aggregate abundance was detected, with aggregates up to 5µm in diameter, accounting for 41% to total cell counts. The detection of aggregates of such size implies that AOM is active and constant for a long period of time. ANME-1 cells were detected at 14cm and deeper, and their concentration was found to increase with depth with a maximum at 38cm depth (1,17x10⁸ cells cm⁻³ w.s.). Consequently, in the core AX02BC1, AOM was widespread throughout the length of the core. There was a zone though between 32 and 44cm which may be characterized as "zone of increased AOM", which represents a microbial filter that prevents methane emission to the water column.

Nothing similar occurred in core AX09GC1 also retrieved from Amsterdam MV, but from a high venting side. Geochemical date revealed the presence of a large methane hydrate formation in the middle of the core. In this core, cell abundance was high at 2 and 95cm sediment depth (10⁸ cells cm⁻³ w.s.) where ANME-1 and ANME-2/DSS aggregates were detected, while on the contrary, in the sediment layers adjacent to the layer where the hydrate was detected, the "zone of hydrate formation", cell abundance was one order of magnitude lower, probably because microorganisms are unable to inhabit inside the hydrate formation. The detection of ANME at 2 and 95cm depth, the layers adjacent to the "hydrate zone", is an evidence of AOM occurrence, of low intensity though since these methanotrophs only constituted 29% and 14% of cell abundance at these depths, respectively.

In the other sediment cores retrieved from Amsterdam MV, Kazan MV and Kula MV, from high venting sites, cell abundance was high at 2cm depth, ranging between 1,7 and 2,91x10⁸ cells cm⁻³ w.s., and was decreasing with depth. With the exception of two more cores (AX11GC1 and AX23GC1), there was no evidence of AOM occurrence in the other cores examined. In AX11GC1 from Amsterdam MV, low aggregate concentration was detected in all examined depths, accounting for only 3-9% of total cells, which may be considered as low AOM activity. In all these cores, cell abundance was low at the depths were methane concentration was high or hydrates occurred. In core AX23GC1 from Kazan MV, at 39cm sediment depth, cell

abundance was high $(4,15 \times 10^8 \text{ kúttapa cm}^3 \text{ v.i}\zeta)$ and cell aggregates were detected, accounting for 78% of total counts, which may be considered as evidence of AOM.

Although in sediments above methane hydrates where methane flow is low, AOM was widespread throughout the core, this was not observed in sediments retrieved from high fluid flow sites. In these sediments, the conditions probably do not favor the inhabitance of methanotrophs. If AOM is active, it will most probably be located in narrow zones that create ecological niches inside the sediment, above or below the zone of hydrate formation.

Sulfate reducing Bacteria (SRB) of the DSS cluster were enriched in cultures from various sediment depths, even from depths were sulfate normally should be depleted, implying that sulfate reduction was widespread and might be active at low sulfate concentrations. SRB were also retrieved in cultures from sediment depths were no occurrence of AOM was detected At these depths, SRB probably are involved in the anaerobic degradation of organic matter. There was no evidence of methanogenesis through the methylotrophic pathway.

Σκοπός και στόχοι

Σκοπός της διατριβής ήταν η διερεύνηση των μικροοργανισμών που διαβιούν στη ζώνη υδριτών μεθανίου και πιο συγκεκριμένα εκείνων που εμπλέκονται στην αναερόβια οξείδωση του μεθανίου (AOM). Η διερεύνηση πραγματοποιήθηκε με δύο προσεγγίσεις. Στην πρώτη, διερευνήθηκε η κυτταρική αφθονία στο ίζημα με τεχνικές που δεν απαιτούσαν καλλιέργεια κυττάρων, ενώ στη δεύτερη προσέγγιση χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές αναερόβιων καλλιεργειών.

Η διερεύνηση των μεθανιότροφων μικροοργανισμών σε ιζήματα από ηφαίστεια ιλύος όπου σχηματίζονται μεθανοϋδρίτες είχε σαν στόχο:

- Να εκτιμηθεί η κυτταρική αφθονία και να δημιουργηθεί προφίλ κάθετης κατανομής της για κάθε ηφαίστειο ιλύος
- Να διερευνηθεί η παρουσία αναερόβιων μεθανιότροφων μικροοργανισμών (ANME) στους ορίζοντες που παρατηρήθηκε αυξημένη κυτταρική αφθονία
- Να αναζητηθούν οι υπεύθυνοι για την ΑΟΜ μικροοργανισμοί, ποια ομάδα επικρατεί, ποιοι μικροοργανισμοί εμπλέκονται στο σχηματισμό συσσωματωμάτων, πως επηρεάζεται η παρουσία τους από τη διαφορετική ροή έκλυσης ή την παρουσία υδριτών μέσα στο ίζημα.
- Να διερευνηθεί εάν η κυτταρική αφθονία και οι ιδιαίτερες δομές των μικροοργανισμών (συσσωματώματα) επηρεάζονται από τη διάρκεια αποσυμπίεσης στην οποία υποβάλλεται ο πυρήνας ιζήματος κατά την ανάκτηση (σύγκριση μεταξύ κλασσικών τεχνικών πυρηνοληψίας και τεχνικών πυρηνοληψίας που διατηρούν την *in situ* πίεση του ιζήματος).
- Να γίνει σύγκριση της κυτταρικής αφθονίας και της παρουσίας των μεθανιότροφων Archaea μεταξύ πυρήνων που ανακτήθηκαν από διαφορετικές περιοχές του ίδιου ηφαιστείου, όπου επικρατεί διαφορετική ροή έκλυσης ιλύος και μεταξύ διαφορετικών ηφαιστείων.

Ο εμπλουτισμός μικροοργανισμών από πλούσια σε μεθάνιο ιζήματα είχε σαν στόχο:

- Να ανακτηθούν σε καλλιέργειες μικροοργανισμοί από δύο κυρίως ομάδες, τα θειοαναγωγικά βακτήρια της ομάδας των Desulfosarcina/Desulfococcus spp.
 και τα μεθανιογενή Archaea του γένους Methanosarcina spp. σε ατμοσφαιρική πίεση και σε in situ πίεση.
- Να διερευνηθεί ποιοι μικροοργανισμοί αναγεννήθηκαν, με την τεχνική FISH Εφόσον ανιχνευθούν θειικοαναγωγικά Bacteria, να διερευνηθεί εάν ανήκουν στις ομάδες που θεωρείται ότι εμπλέκονται στην AOM. Εφόσον ανιχνευθούν Archaea να διερευνηθεί εάν αυτά ανήκουν στην τάξη Methanosarcinales, εάν ανήκουν στα ANME Archaea που σχετίζονται φυλογενετικά με τα μεθανιογόνα της τάξης Methanosarcinales.
- Να διερευνηθεί εάν η αναγωγή των θειικών ιόντων και η μεθανιογένεση είναι δυνατό να συμβαίνουν στο ίζημα.

Κεφάλαιο 1- Εισαγωγή

Εισαγωγή

1. Μεθάνιο

Το μεθάνιο είναι ένα αέριο που συμβάλει στο φαινόμενο του θερμοκηπίου. Ένα μόριο μεθανίου θεωρείται ότι επιδρά ~25 φορές περισσότερο στο φαινόμενο του θερμοκηπίου, σε σχέση με ένα μόριο διοξειδίου του άνθρακα (Lelieveld et al., 1998). Αν και βρίσκεται στην ατμόσφαιρα σε ίχνη, ταυτόχρονα αποτελεί το αφθονότερο οργανικό συστατικό και η συγκέντρωσή του αυξάνεται με το χρόνο (Cicerone and Oremland, 1988, Kvenvolden and Rogers, 2005). Το μεθάνιο, όπως και το μονοξείδιο του αζώτου και η αμμωνία, που υπάρχουν ως ίχνη στην ατμόσφαιρα, θεωρήθηκαν ως αέρια υπεύθυνα για το φαινόμενο του θερμοκηπίου, η αύξηση της συγκέντρωσης των οποίων εξαιτίας της ανθρώπινης δραστηριότητας, προκάλεσε ανησυχία από πολύ νωρίς, για την επίδραση που θα είχε μελλοντικά στην αύξηση της θερμοκρασία της γης (Wang et al., 1976). Σύμφωνα με τη Διακυβερνητική Επιτροπή για την Αλλαγή του Κλίματος (IPCC, 2007), η παγκόσμια συγκέντρωση του μεθανίου στην ατμόσφαιρα αυξήθηκε από τα 715ppb, που ήταν την προ-βιομηχανική εποχή στα 1732 ppb στην αργή της δεκαετίας του '90 και το 2005 έφτασε τα 1.774 ppb. Σε σχέση με τα πρώτα χρόνια του 1990, οι ρυθμοί αύξησης της συγκέντρωσης του μεθανίου μειώθηκαν. Εκτεταμένες μετρήσεις τα χρόνια 1999 μέχρι 2002 αποκάλυψαν, ότι η συγκέντρωση του μεθανίου στην ατμόσφαιρα παρέμεινε σταθερή στα 1751 ppb που υποδηλώνει ισορροπία στο παγκόσμιο φορτίο τα τέσσερα αυτά γρόνια (Dlugokencky et al., 2003).

Το ατμοσφαιρικό μεθάνιο είναι ένα μέτρια ενεργό αέριο του οποίου η διάρκεια ζωής στην ατμόσφαιρα κυμαίνεται μεταξύ 8 και 12 χρόνια (Lelieveld *et al.*, 1998, IPCC 2007). Το μεθάνιο που καταλήγει στην ατμόσφαιρα είναι το αποτέλεσμα του ισοζυγίου των πηγών έκλυσής του και της χημικής και μικροβιακής κατανάλωσής του. Το μεθάνιο καταναλώνεται στην ατμόσφαιρα αντιδρώντας με τη ρίζα του υδροξυλίου. Η μεγαλύτερη κατανάλωση του ατμοσφαιρικού μεθανίου συμβαίνει στην ατμόσφαιρα και κυρίως στην τροπόσφαιρα, σε ένα ποσοστό ~90%. Το μεθάνιο που απομένει διασπάται στη στρατόσφαιρα, ενώ μια πολύ μικρή ποσότητα, που καταλήγει στη μεσόσφαιρα, καταστρέφεται επίσης (Cicerone and Oremland, 1988, Lelieveld *et al.*, 1998). Με τη μεσολάβηση μικροοργανισμών (μεθανιότροφων), το μεθάνιο καταναλώνεται είτε παρουσία οξυγόνου, ή κάτω από ανοξικές συνθήκες. Τα αερόβια μεθανιότροφα Bacteria διαβιούν σε συνθήκες όπου το αερόβιο περιβάλλον Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

μεθάνιο (Cicerone and Oremland 1988). Αναερόβια μεθανιότροφα Archaea οξειδώνουν το μεθάνιο σε ανοξικές συνθήκες σε μια διαδικασία που μέχρι σήμερα παραμένει αδιευκρίνιστη, καθώς δεν ήταν δυνατό να απομονωθούν οι υπεύθυνοι μικροοργανισμοί, αλλά θεωρείται ότι πραγματοποιείται από μεθανιογόνα Archaea σε μια διαδικασία αντίστροφης μεθανιογένεσης, με τη μεσολάβηση θειικοαναγωγικών Bacteria (Hoehler *et al.*, 1994)

Το μεθάνιο προέρχεται από την αποσύνθεση της οργανικής ύλης στη γη με δύο κυρίως διεργασίες. Στην πρώτη, βιολογική διεργασία, το μεθάνιο το οποίο καλείται και βιογενές ή μικροβιακό, παράγεται από μεθανιογόνα Archaea σαν τελικό προϊόν αποσύνθεσης της οργανικής ύλης. Η μεθανιογένεση συμβαίνει κυρίως σε ιζήματα πλούσια σε οργανική ύλη, κάτω από τη ζώνη εισροής θειικών ιόντων μέσα στο ίζημα (Whiticar, 1999, Krüger et al., 2005). Στη δεύτερη, γεωλογικά ελεγγόμενη διεργασία, το μεθάνιο που γαρακτηρίζεται ως «αργαίο» ή «απωλιθωματικό» προέργεται από την θερμική αποσύνθεση της οργανικής ύλης. Το θερμογενές μεθάνιο σχηματίζεται από τη θερμική διάσπαση σύνθετων οργανικών συστατικών, όπως η κηροζίνη κάτω από υψηλές πιέσεις και σε βάθος που ξεπερνάει το 1 km κάτω από την επιφάνεια της γης. Μια τελευταία κατηγορία μεθανίου είναι το αβιογενές, το οποίο παράγεται βαθιά μέσα στο φλοιό της γης από ανόργανες διεργασίες (Judd et al., 2002, Kvenvolden and Rogers, 2005). Το μικροβιακό, το θερμογενές και το αβιογενές μεθάνιο έχουν διακριτά διαφορετική σύσταση σε ισοτοπικό άνθρακα (¹³C). Το θερμογενές μεθάνιο είναι κατά κανόνα περισσότερο εμπλουτισμένο σε 13 C κι έχει μια τιμή δ^{13} CH₄ μεταξύ -50‰ με -20‰ σε σγέση με το βακτηριακό μεθάνιο, όπου το ισοτοπικό κλάσμα του ¹³C έχει μεγαλύτερο εύρος και κυμαίνεται μεταξύ -110‰ και -50‰. Το ισοτοπικό πηλίκο του αβιογενούς μεθανίου κυμαίνεται μεταξύ -5‰ και -45‰ (Whiticar,1999, Kvenvolden and Rogers, 2005).

1.1 Πηγές έκλυσης μεθανίου

Το μεθάνιο εκλύεται στην ατμόσφαιρα τόσο από φυσικά συστήματα όσο και από δραστηριότητες του ανθρώπου. Τα φυσικά συστήματα έκλυσης μεθανίου περιλαμβάνουν τόσο διεργασίες μεθανιογένεσης, όσο και γεωλογικές εκλύσεις απολιθωματικού κυρίως μεθανίου. Η μεθανιογένεση πραγματοποιείται με τη μεσολάβηση μικροοργανισμών, των μεθανιότροφων Archaea που απαντώνται σε ποικίλες ανοξικές συνθήκες. Η μεθανιογένεση συμβαίνει σε φυσικούς υγρότοπους, βάλτους, λιμναία και θαλάσσια συστήματα. Μεγάλες ποσότητες μεθανίου

παράγονται επίσης από μικροοργανισμούς που ενδημούν στο γαστρεντερικό σωλήνα ζώων και εντόμων (πχ μηρυκαστικά, τερμίτες) (Kotelnikova, 2002). Οι φυσικοί υγρότοποι αποτελούν τη μεγαλύτερη φυσική πηγή έκλυσης μεθανίου και υπολογίζεται ότι 70% του εκλυόμενου στην ατμόσφαιρα μεθανίου προέρχεται από υγρότοπους στις νότιες και τροπικές περιοχές (IPCC 2007). Η φυσική έκλυση μεθανίου από γεωλογικές πηγές, αφορά ποικιλία γεωλογικών σχηματισμών, όπως ρήγματα του φλοιού της γης, ηφαίστεια ιλύος, γεωθερμικές πηγές, από τις οποίες εκλύεται κυρίως απολιθωματικό μεθάνιο (Etiope and Klusman 2002).

Στις ανθρώπινες δραστηριότητες από τις οποίες εκλύεται μεθάνιο, περιλαμβάνεται η εξόρυξη, διανομή και χρήση των απολιθωματικών καυσίμων (φυσικό αέριο, πετρέλαιο, άνθρακας), από τις οποίες απελευθερώνεται απολιθωματικό μεθάνιο. Βιογενές μεθάνιο εκλύεται από διάφορες γεωργικές εργασίες, όπως από τις καλλιέργειες ρυζιού, την εκτροφή οικόσιτων ζώων και την επεξεργασία των αγροτικών υπολειμμάτων, όπως επίσης και από τα συστήματα επεξεργασίας αποβλήτων, βιολογικών καθαρισμών κ.α. Επομένως, το απολιθωματικό μεθάνιο που ανιχνεύεται στην ατμόσφαιρα προέρχεται τόσο από ανθρώπινες δραστηριότητες, όσο και από φυσικές γεωλογικές εκλύσεις. Μεγάλες ποσότητες απολιθωματικού μεθανίου, που έχει παραχθεί στο φλοιό της γης εκλύονται φυσικά, διαμέσου διαπερατών ρηγμάτων και θραυσμάτων βράχων (Etiope and Klusman, 2002). Υπολογίζεται ότι περίπου το 30% της παγκόσμιας εκλυόμενης ποσότητας μεθανίου (582±87 Tg) ετησίως, έχει προέλευση απολιθωματική, που οφείλεται τόσο σε φυσική έκλυση όσο και σε ανθρώπινη δραστηριότητα (Etiope et al., 2008). Σύμφωνα με πρόσφατες εκτιμήσεις, η ποσότητα του μεθανίου γεωλογικής προέλευσης που εκλύεται παγκοσμίως από χερσαίες και θαλάσσιες περιοχές διαφυγής (seepage) καθώς και από γεωθερμικές και ηφαιστειακές εκλύσεις από το φλοιό της γης, κυμαίνεται μεταξύ 40 και 60 Tg ετησίως, τοποθετώντας τις γεωλογικές εκλύσεις μεθανίου σαν δεύτερη κατά σειρά φυσική πηγή μεθανίου στην ατμόσφαιρα, μετά από τους φυσικούς υγρότοπους (Kvenvolden and Rogers, 2005, Etiope et al., 2008).

1.2 Γεωλογικές συσσωρεύσεις και πηγές διαφυγής μεθανίου

Το μεθάνιο εκλύεται στην ατμόσφαιρα από φυσικές πηγές διαφυγής ρευστών (αναβλύσεις) μικρής ή μεγάλης κλίμακας (micro-, macro-seeps), από ηφαίστεια ιλύος και από περιοχές όπου υπάρχουν σχηματισμοί υδριτών μεθανίου ή ακόμα και από πιο ετερόκλητες πηγές όπως τα μαγματικά ηφαίστεια, οι παγετώνες, οι υδροθερμικές και

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

γεωθερμικές πηγές (Judd, 2002, Kvenvolden and Rogers, 2005). Το αέριο μεθάνιο κατά την άνοδό του από μεγαλύτερα βάθη, είναι δυνατό να εγκλωβιστεί μέσα στο ίζημα, όταν δεν υπάρχει έξοδος διαφυγής, δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο συσσωρεύσεις αερίου μεθανίου. Οι εμπορικά εκμεταλλεύσιμες συσσωρεύσεις αερίου μεθανίου. Οι εμπορικά εκμεταλλεύσιμες συσσωρεύσεις αερίου μεθανίου βρίσκονται σε μεγάλα βάθη μέσα στο ίζημα, παρόλα αυτά υπάρχουν και ρηχές συσσωρεύσεις σε βάθος ιζήματος μικρότερο του ενός χιλιομέτρου. Μεθάνιο όμως είναι δυνατόν να συσσωρευτεί μέσα στο ίζημα και σε μορφή υδριτών μεθανίου, όταν οι συνθήκες επιτρέπουν το σχηματισμό τους (Judd *et al.*, 2002). Οι συσσωρεύσεις μεθανίου, σε αέρια μορφή ή σε μορφή υδριτών, κάτω από συνθήκες αποσταθεροποίησης, μπορεί να μετατραπούν σε πηγές έκλυσης (αναβλύσεις) μεθανίου.

Υδρίτες μεθανίου - Οι υδρίτες αερίων είναι φυσικά στερεά, που αποτελούνται από κρυσταλλοποιούνται, σχηματίζοντας ένα πλέγμα που μόρια νερού τα οποία περιβάλει ένα μόριο φυσικού αερίου, κυρίως μεθανίου. Δύο δομές υδριτών αναγνωρίζονται στη φύση, η δομή Ι και ΙΙ, όπου η Ι είναι η πιο συνηθισμένη. Στη δομή Ι το πλέγμα που δημιουργείται μπορεί να περιλάβει μεθάνιο, αιθάνιο και αέρια μόρια μικρού μεγέθους όπως το διοξείδιο του άνθρακα. Στη δομή ΙΙ, το πλέγμα που σχηματίζεται είναι αρκετά μεγάλο ώστε να περιλάβει πέρα από το μεθάνιο και το αιθάνιο, μεγαλύτερα μόρια αερίων όπως το προπάνιο και το ισοβουτάνιο (Kvenvolden, 1993b). Ο σχηματισμός των υδριτών στη φύση ελέγχεται από τη σχέση μεταξύ της πίεσης, της θερμοκρασίας και της σύστασης τόσο του αερίου μίγματος όσο και του νερού (Kvenvolden, 1993b). Σε δείγματα υδριτών από διαφορετικές περιοχές, βρέθηκε ότι η αέρια σύστασή τους αποτελείται κατά 99% από μεθάνιο, το οποίο κυρίως προέρχεται από την αναγωγή του διοξειδίου του άνθρακα κατά την αποικοδόμηση της οργανικής ύλης μέσα στο ίζημα, ενώ σε δύο μόνο περιοχές, στον Κόλπο του Μεξικού και στην Κασπία Θάλασσα το εγκλωβισμένο στους υδρίτες μεθάνιο, βρέθηκε ότι ήταν θερμογενές (Kvenvolden, 1995).

Οι υδρίτες μεθανίου αποτελούν τη μεγαλύτερη συσσώρευση φυσικού αερίου στη γη και απαντώνται κυρίως στα ηπειρωτικά κράσπεδα σε βάθος ιζήματος μέχρι ~2000m, στις πολικές περιοχές όπου συνδέονται με παγετώνες και σε χερσαίο περιβάλλον όπου υπάρχουν βαθιά νερά, όπως λίμνες και κλειστές θάλασσες (Kvenvolden, 1988, Kvenvolden, 1993a, Kvenvolden, 1995). Αποτελούν ένα ενδιάμεσο σύστημα συσσώρευσης του μεθανίου, που μεταφέρεται από βαθύτερα στρώματα του ιζήματος

18

(Kvenvolden and Rogers, 2005). Οι υποθαλάσσιοι υδρίτες σχηματίζονται σε βαθιά νερά (>300m βάθος) (Kvenvolden *et al.*, 1993). Ο όγκος του μεθανίου που εκτιμάται ότι βρίσκεται παγιδευμένος σε μορφή υδριτών κυμαίνεται μεταξύ 1 και 21×10^{15} m³ (Milkov 2004, Kvenvolden and Rogers, 2005).

Υδρίτες μεθανίου έχουν ανακτηθεί από διάφορα βάθη ιζήματος τόσο από ρηχά ιζήματα, όσο και από μεγαλύτερα βάθη. Στον Κόλπο του Μεξικού, έχουν εντοπιστεί να βρίσκονται εκτεθειμένοι στον θαλάσσιο πυθμένα, δημιουργώντας ανυψώσεις ιζήματος σε βάθος νερού μόλις 540m (Orcutt *et al.*, 2004). Δείγματα από ρηχές συσσωρεύσεις υδριτών έχουν ανακτηθεί από ιζήματα βαθιάς θάλασσας (~2000m) στην Ανατολική Μεσόγειο από τα ηφαίστεια ιλύος Amsterdam, Kazan και Thessaloniki, σε βάθος ιζήματος κάτω από τα 0,3m (Lykousis *et al.*, 2009). Σε άλλες περιοχές, υδρίτες έχουν ανακτηθεί από μεγαλύτερα βάθη ιζήματος, όπως στην περιοχή Hydrate Ridge στη Βόρεια Αμερική, όπου οι υδρίτες εντοπίστηκαν σε βάθος ιζήματος ~250m (Boetius and Suess 2004) ή σε ιζήματα βαθιάς θάλασσας (~2700m) στην περιοχή Blake Ridge στη Βόρεια Αμερική, όπου εντοπίστηκαν σε μια ζώνη ~190-450m μέσα στο ίζημα (Borowski, 2004).

Πηγές διαφυγής - Οι φυσικές πηγές διαφυγής αερίων μπορεί να είναι μεγάλης κλίμακας (macro-seeps) όπου είναι εμφανείς στην επιφάνεια της γης ή του θαλάσσιου πυθμένα π.χ. με την έκλυση φυσαλίδων στην περίπτωση των θαλάσσιων πηγών. Οι πηγές διαφυγής μικρής κλίμακας (micro-seeps) δεν είναι εμφανείς και είναι αναγνωρίσιμες μετά από χημικές μετρήσεις (Kvenvolden and Rogers, 2005). Στο χερσαίο περιβάλλον, οι πηγές διαφυγής μικρής κλίμακας εκδηλώνονται με τη συνεχή και αργή απώλεια μεθανίου και ελαφρών υδρογονανθράκων από βάθη 2-5km, σε ιζηματογενείς λεκάνες όπου συμβαίνει αποικοδόμηση της οργανικής ύλης που υπάργει εκεί (Etiope and Klusman, 2002). Υπάργουν δεδομένα που υποδηλώνουν, ότι σε ευνοϊκές συνθήκες, με την επίδραση μεθανιότροφων μικροοργανισμών, το μεθάνιο που ανέρχεται από τα βαθύτερα στρώματα καταναλώνεται πριν φτάσει στην επιφάνεια του ιζήματος (Etiope and Klusman, 2002). Οι φυσικές πηγές διαφυγής πετρελαίου και φυσικού αερίου μεγάλης κλίμακας, είναι ευρέως κατανεμημένες σε όλο τον κόσμο. Μαζί με τα αέρια που εκλύονται από αυτές, όπως μεθάνιο, διοξείδιο του άνθρακα, αέριοι υδρογονάνθρακες, συχνά εκλύεται και ακατέργαστο πετρέλαιο. Σε όλες όμως τις πηγές υδρογονανθράκων, το κύριο αέριο που εκλύεται είναι το μεθάνιο (Kvenvolden and Rogers, 2005).

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

Οι πηγές διαφυγής μεθανίου, είναι δυνατό στη διάρκεια των χρόνων να μετατρέπονται διαδοχικά από πηγές σε συσσωρεύσεις, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Μικροβιακές κοινότητες θειοοζειδωτικών Bacteria του γένους Beggiatoa έχουν βρεθεί συχνά πάνω από πηγές διαφυγής μεθανίου (Orphan et al. 2004, Niemann et al., 2006) και είναι δυνατό να εγκλωβίσουν κάτω από τις αποικίες τους, το μεθάνιο, δημιουργώντας συσσωρεύσεις. Αυτή η κατάσταση θεωρείται ότι μπορεί να αποτελεί ένα στάδιο «σφραγίσματος» της πηγής διαφυγής. Σε ιζήματα στη Βόρεια Θάλασσα σε βάθος ύδατος 74m, το «σφράγισμα» της ανάβλυσης υδρογονανθράκων βρέθηκε ότι συμβαίνει σε τρία στάδια. Αρχικά, η περιοχή καλύπτεται από μικροβιακές κοινότητες, του είδους Beggiatoa sp., λίγο κάτω από την επιφάνεια του ιζήματος, στα όρια της οξικής και ανοξικής περιοχής, μειώνοντας την εκλυόμενη ροή των αερίων. Στη συνέχεια όλες οι ρωγμές γεμίζουν με ίζημα και τα βακτήρια γίνονται ορατά στην επιφάνεια του ιζήματος, ενώ η εκλυόμενη ροή είναι πλέον ασυνεχής. Στο τελευταίο στάδιο παρατηρούνται αποθέσεις ανθρακικών αλάτων που καλύπτουν την περιοχή διαφυγής αερίων. Σε αυτό το στάδιο δεν είναι πια ορατή η έκλυση αερίων (Hovland, 2002).

Το μεθάνιο που δεν συσσωρεύεται στο ίζημα σε σχηματισμούς υδριτών και δεν καταναλώνεται πλήρως μέσω της AOM, διαφεύγει προς την υδάτινη στήλη. Αμέσως μετά την απελευθέρωση του μεθανίου από το ίζημα έχει παρατηρηθεί ότι ξεκινάει η μεθανιότροφη δραστηριότητα (Valentine et al., 2001). Έχουν αναφερθεί αρκετές περιπτώσεις διαφυγής μεθανίου από ηφαίστεια ιλύος και περιογές με πηγές διαφυγής ρευστών προς την υδάτινη στήλη. Μεγάλη ροή μεθανίου στην υδάτινη στήλη, έχει καταγραφεί και σε ηφαίστεια ιλύος στην Ανατολική Μεσόγειο. Σε μετρήσεις που έγιναν στην υδάτινη στήλη σε δύο πεδία ηφαιστείων ιλύος, το Olimpi και τα όρη Αναξίμανδρου, παρατηρήθηκαν μεγάλες συγκεντρώσεις μεθανίου (45-892nmol/kg) τόσο πάνω από ηφαίστεια ιλύος όσο και πάνω από πηγές διαφυγής στην ευρύτερη περιοχή. Στην περίπτωση του ηφαιστείου Milano στην περιοχή Olimpi και του ηφαιστείου Amsterdam στην περιοχή του Αναξίμανδρου, η ροή του μεθανίου έφτανε μέχρι και τα 200m πάνω από το ηφαίστεια (Charlou et al., 2003). Στα ανοξικά νερά και ιζήματα, το μεθάνιο καταναλώνεται με ταυτόχρονη κατανάλωση θειικών ιόντων. Στην περιοχή της Τάφρου Cariaco στην Καραϊβική, σε βάθος 1300-1400m, όπου τα νερά ήταν ανοξικά και περιείχαν υδρόθειο σε βάθος κάτω από τα 300m από την επιφάνεια, βρέθηκε ότι το μεθάνιο καταναλώνονταν αναερόβια κυρίως μέσα στο

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

ίζημα, και όσο διέφευγε στην υδάτινη στήλη καταναλώνονταν σε αυτό το βάθος (Reeburgh 1976). Στο ηπειρωτικό κράσπεδο της Cascadia στην Βορειοδυτική Αμερική, σχηματισμοί υδριτών έχουν βρεθεί εκτεθειμένοι στον πυθμένα. Στο ίζημα παρατηρήθηκε ταχύτατη οξείδωση του μεθανίου με ταυτόχρονο σχηματισμό ανθρακικών αποθέσεων στην επιφάνεια, ενώ από τον πυθμένα εκλύονταν μεθάνιο σε μορφή φυσαλίδων από καμινάδες και ρωγμές δημιουργώντας ροές μεθανίου που διαχέονταν εκατοντάδες μέτρα σε ύψος από τον πυθμένα, αλλά σε βάθη κάτω από τα 400m από την επιφάνεια, και αρκετά χιλιόμετρα σε πλάτος. Το μεθάνιο, βρέθηκε ότι οξειδώνονταν στη συνέχεια στην υδάτινη στήλη (Suess *et al.*, 1999).

Από τις παραπάνω περιπτώσεις συμπεραίνεται ότι το μεθάνιο που τελικά διαφεύγει από το ίζημα τόσο από ηφαίστεια ιλύος όσο και από περιοχές διαφυγής αερίων, σε μεγάλα βάθη θαλάσσης, κυρίως οξειδώνεται στη στήλη ύδατος και μάλλον δεν φτάνει μέχρι την επιφάνεια του νερού. Το μεθάνιο που μπορεί να καταλήγει στην ατμόσφαιρα από το θαλάσσιο περιβάλλον, θα πρέπει να προέρχεται από πηγές διαφυγής μεγάλης κλίμακας ή να προέργεται από περιοχές με μικρό βάθος υδάτινης στήλης, όπως οι παράκτιες περιοχές (Etiope and Klusman, 2002). Στις περιπτώσεις αυτές η κύρια οδός διαφυγής του μεθανίου είναι η απελευθέρωση αερίου μεθανίου με τη μορφή φυσαλίδων ή με σχηματισμούς υδριτών που απομακρύνονται από την επιφάνεια του ιζήματος (Krüger et al., 2005). Στις περιοχές που σχηματισμοί υδριτών εκδηλώνονται στην επιφάνεια του ιζήματος, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα το μεθάνιο να φτάνει μέχρι την επιφάνεια της θάλασσας (Judd et al., 2002). Φυσαλίδες αερίου έχει παρατηρηθεί ότι φτάνουν μέχρι την επιφάνεια της θάλασσας σε περιοχή στον Κόλπο του Μεξικού, από πηγές διαφυγής υδρογονανθράκων, όπου αέριο και υδρογονάνθρακες εκλύονται στην υδάτινη στήλη. Στα ιζήματα αυτά, η απελευθέρωση του αερίου ήταν είτε ταχύτατη κι επεισοδιακή, είτε αργή όταν προέργονταν από περιοχή όπου υπήρχαν σχηματισμοί υδριτών. Οι φυσαλίδες του αερίου μόλις απελευθερώνονταν διαλύονταν στην υδάτινη στήλη, όπου το μεθάνιο μπορούσε να οξειδωθεί, αλλά υπήρξαν και παρατηρήσεις για φυσαλίδες καλυμμένες με πετρέλαιο το οποίο εμπόδιζε τη διάλυσή τους στο νερό και κατέληγαν στην επιφάνεια της θάλασσας (MacDonald et al., 2000).

1.2.1 Ηφαίστεια ιλύος

Τα ηφαίστεια ιλύος είναι γεωλογικοί σχηματισμοί που σχηματίζονται ως αποτέλεσμα της έκλυσης αερίων, νερού και αργιλικών υλικών στην επιφάνεια της γης ή στον

Εισαγωγή

θαλάσσιο πυθμένα (Dimitrov, 2003a) και θεωρούνται ως ειδική κατηγορία των πηγών διαφυγής μεθανίου μεγάλης κλίμακας, με τη μεγαλύτερη ορατή γεωλογική έκφραση στην επιφάνεια της γης (Etiope and Klusman, 2002, Kvenvolden and Rogers, 2005). Ο σχηματισμός τους εκδηλώνεται όταν μέσα στο λεπτόκοκκο ίζημα ενσωματώνεται επαρκής ποσότητα νερού και αερίων, το οποίο μετατρέπεται τελικά σε ημι-ρευστό ίζημα και ωθείται προς τα πάνω από τα βαθύτερα στρώματα, δια μέσου στενών ανοιγμάτων μεγάλου μήκους, προκαλώντας έκλυση μιας μάζας λατυποπαγούς ιλύος στην επιφάνεια. (Dimitrov, 2003a). Η κατανομή των ηφαιστείων ιλύος παγκοσμίως, σχετίζεται με το γεωλογικό περιβάλλον στο οποίο εμφανίζονται, αφού σχηματίζονται σε ζώνες που σχετίζονται με ενεργές τεκτονικά περιοχές και περιοχές όπου υπάρχει ορογενετική δραστηριότητα. Μεγάλος αριθμός ηφαιστείων ιλύος σχηματίζεται σε συστήματα συσσώρευσης και περιοχές με μεγάλους ρυθμούς ιζηματοποίησης, πιθανότατα σαν αποτέλεσμα ταχύτατων δομικών και τεκτονικών αποθέσεων (Dimitrov, 2002). Παγκοσμίως θεωρείται ότι υπάρχουν περίπου 1950 ηφαίστεια ιλύος, από τα οποία 1100 βρίσκονται στην επιφάνεια της γης ή σε ρηγά ύδατα, ενώ ο αριθμός των υποθαλάσσιων υπολογίζεται ότι ανέργεται στα 700. Περίπου 60-65 ηφαίστεια ιλύος υπολογίζεται ότι εκρήγνυνται κάθε χρόνο (Dimitrov, 2003a).

Τα ηφαίστεια ιλύος εκλύουν σποραδικά ή συνεχώς στην ατμόσφαιρα σημαντικό όγκο αερίων, κυρίως μεθάνιο. Κατά τη διάρκεια ήπιων εκρήξεων, τα ηφαίστεια ιλύος επεκτείνονται με τη σταδιακή έκλυση ρευστής λάσπης, ενώ όταν εκδηλώνονται με βίαιες εκρήξεις, λάσπη και τεμαχίδια βράχων μπορεί να εκτοξευθούν στον αέρα σε ύψος που μπορεί να φτάσει μερικά χιλιόμετρα (Kvenvolden and Rogers, 2005). Εκτιμήσεις της ποσότητας του μεθανίου που εκλύεται ετησίως στην ατμόσφαιρα από ηφαίστεια ιλύος, κυμαίνονται μεταξύ 5 Tg y⁻¹ (Dimitrov 2003a, Kvenvolden and Rogers, 2005), 10,3-12,6 Tg y⁻¹ (Dimitrov, 2002) ακόμα και 33 Tg y⁻¹ (Milkov 2003). Σε ηφαίστεια ιλύος βαθιάς θάλασσας το μεθάνιο βρίσκεται κυρίως με τη μορφή υδριτών (Kvenvolden and Rogers, 2005).

Περισσότερα από 50% των ηφαιστείων ιλύος, τοποθετούνται στην Ενεργή Ζώνη που εκτείνεται από τις Άλπεις μέχρι και τα Ιμαλάια, όπου έχουν αναγνωριστεί και τα μεγαλύτερα ηφαίστεια (Kopf, 2002, Dimitrov, 2002, Dimitrov, 2003a). Η περιοχή αυτή ξεκινάει από τη Μεσογειακή Ράχη, με τους περισσότερους σχηματισμούς να εντοπίζονται στην Ανατολική Μεσόγειο και σε μια ζώνη που εκτείνεται από τα Νότια της Κρήτης στη Μαύρη και την Κασπία Θάλασσα, το Αζερμπαϊτζάν, την Κριμαία, το Ιράν, το Τουρκμενιστάν, μέχρι την ακτή Makran στο Πακιστάν (Kopf, 2002). Η ενεργή αυτή ζώνη περνάει στη συνέχεια από τα Νότια των Ιμαλαΐων. Οι ζώνες των ηφαιστείων ιλύος του Ειρηνικού ωκεανού, κατανέμονται κατά μήκος των ανατολικών και δυτικών ορίων του ωκεανού, ενώ στον Ατλαντικό ωκεανό οι ζώνες βρίσκονται κυρίως στο δυτικό τμήμα του ωκεανού και στη νότια Καραϊβική (Dimitrov, 2002).

Στη Ανατολική Μεσόγειο έχουν αναγνωριστεί πολλά πεδία ηφαιστείων ιλύος. Στο πεδίο Ολυμπία (Olimpi) στην Κεντρική Μεσόγειο, σε μια έκταση 30x30 μίλια, έχουν αναγνωριστεί περίπου 30 ηφαίστεια ιλύος σε βάθος ύδατος 1700-2000m (Charlou *et al.*, 2003). Στην Ανατολική Μεσόγειο, ένα πεδίο ηφαιστείων ιλύος έχει αναγνωριστεί στα όρη Αναξίμανδρου και σε βάθος ~2000m (Charlou *et al.*, 2003, Lykousis *et al.*, 2009), ενώ λίγο νοτιότερα, ένα ακόμα πεδίο έχει εντοπιστεί στις εκβολές του Νείλου (Nile Deep Sea Fan) (Loncke *et al.*, 2004).

2 Οι κυριότερες μικροβιακές διεργασίες στα θαλάσσια ιζήματα πλούσια σε μεθάνιο

2.1 Μεθανιογένεση

Η μεθανιογένεση είναι το τελικό μονοπάτι στην αναερόβια αποικοδόμηση της οργανικής ύλης κάτω από συνθήκες περιορισμένης συγκέντρωσης θειικών ιόντων. Τα μεθανιογόνα Archaea είναι μικροοργανισμοί υποχρεωτικά αναερόβιοι, που αποκτούν την ενέργεια για το μεταβολισμό τους από τη μετατροπή περιορισμένου αριθμού υποστρωμάτων σε μεθάνιο. Η μεθανιογένεση γίνεται κυρίως μέσω τριών μονοπατιών (Deppenmeier *et al.* 1996, Whiticar, 1999):

 μέσω της αναγωγής του διοξειδίου του άνθρακα όπου χρησιμοποιούνται ως δότες ηλεκτρονίων το υδρογόνο ή το μυρμηκικό οξύ

$$CO_2 + 8H^+ + 8e^- \rightarrow CH_4 + 2H_2O$$

 μέσω του μεθυλιοτροφικού μονοπατιού με το οποίο η μεθανόλη και οι μεθυλαμίνες μετατρέπονται σε μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα, και

 $4CH_3\text{-}A + 2H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 4A\text{-}H$

3) μέσω της διάσπασης του οξικού οξέος

$$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$$

Οι μεθανιογόνοι μικροοργανισμοί παράγουν μεγάλες ποσότητες μεθανίου ως κύριο προϊόν του ενεργειακού τους μεταβολισμού (Whitman *et al.*, 2006) και χρησιμοποιούν σχετικά λίγα σε αριθμό και απλά υποστρώματα που μπορεί να είναι ανταγωνιστικά ή μη ανταγωνιστικά. Τα ανταγωνιστικά υποστρώματα (πχ. υδρογόνο, οξικό οξύ), μπορούν να χρησιμοποιηθούν και από άλλους μικροοργανισμούς, όπως τα θειικοαναγωγικά Bacteria με αποτέλεσμα να μην είναι διαθέσιμα για τα μεθανιογόνα. Τα μη ανταγωνιστικά υποστρώματα είναι περισσότερο κατάλληλα για τα μεθανιογόνα Archaea και λιγότερο για άλλους μικροοργανισμούς (Whiticar, 1999). Ως υποστρώματα μπορούν να χρησιμοποιήσουν το διοξείδιο του άνθρακα και άλλα συστατικά με ένα άτομο άνθρακα όπως η μεθανόλη, το μυρμηκικό οξύ και το μονοξείδιο του άνθρακα, αλλά και το οξικό οξύ. Οι μεθυλαμίνες με το γενικό τύπο (CH₃)_x NH₃⁻, όπου το x μπορεί να είναι 1,2,3, θεωρούνται ένα μη ανταγωνιστικό υπόστρωμα (Kirchman, 2012).

2.2 Αναγωγή θειικών ιόντων

Η αναγωγή των θειικών ιόντων από θειικοαναγωγικά Bacteria μπορεί να συνδέεται με την αναερόβια αποικοδόμηση της οργανικής ύλης και την αναερόβια οξείδωση του μεθανίου (Borowski *et al.* 1996). Τα θειικοαναγωγικά Bacteria στα θαλάσσια ιζήματα απαντώνται σε όλο το βάθος του ιζήματος στο οποίο εισχωρεί το θαλασσινό νερό. Η παρουσία θειικοαναγωγικών Bacteria είναι σημαντική τόσο στα τυπικά θαλάσσια ιζήματα, όσο και στα πλούσια σε μεθάνιο ιζήματα, πάνω από πηγές διαφυγής μεθανίου και υδρογονανθράκων, σε ιζήματα όπου σχηματίζονται υδρίτες αλλά και στις υδροθερμικές πηγές.

Στα ανοξικά ιζήματα, τα θειικοαναγωγικά Bacteria χρησιμοποιούν οργανικά συστατικά μικρού μοριακού βάρους, που έχουν προέλθει από τη διάσπαση περισσότερο σύνθετων μορίων της οργανικής ύλης από άλλους μικροοργανισμούς, και κατά τη διαδικασία αυτή παράγεται υδρόθειο. Μια απλοποιημένη μορφή της εξίσωσης αυτής είναι η:

$$2CH_2O + SO_4^{2-} \longrightarrow HS^- + 2HCO_3^- + H^+ \qquad (Morse, 2002)$$

Τα θειικοαναγωγικά Bacteria, έχει βρεθεί ότι μπορούν να χρησιμοποιήσουν μια ποικιλία υποστρωμάτων (δότες ηλεκτρονίων) που περιλαμβάνουν οργανικά οξέα, αλκοόλες, αμινοξέα, σάκχαρα και αρωματικές ενώσεις. Κάποια θειικοαναγωγικά Bacteria μπορούν να οξειδώσουν μερικώς μια ένωση απελευθερώνοντας οργανικά συστατικά στο περιβάλλον (Kirchman, 2012).

Στα θαλάσσια ιζήματα τα θειικοαναγωγικά Bacteria συναντώνται σε αφθονία τόσο σε τυπικά θαλάσσια ιζήματα, σε ιζήματα πλούσια σε μεθάνιο, αλλά και σε ποικίλες θερμοκρασίες από αρκτικά ιζήματα μέχρι υδροθερμικές πηγές. Στα πλούσια σε ιζήματα μεθάνιο τα θειικοαναγωγικά Bacteria παίζουν σημαντικό ρόλο στην AOM, όπως θα περιγραφεί αναλυτικά στις παραγράφους που ακολουθούν, στην οποία έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν η ομάδα *Desulfosarcina/Desulfococcus* καθώς και είδη του γένους *Desulforhopalus*, ενεργά (πχ. Boetius *et al.*, 2000, Orphan *et al.*, 2001, Niemann *et al.*, 2006). Σε θαλάσσια αρκτικά ιζήματα, αλλά και σε πλούσια σε μεθάνιο ιζήματα, η ομάδα *Desulfosarcina/Desulfococcus* βρέθηκε να κυριαρχεί στα θειικοαναγωγικά Bacteria που ανιχνεύθηκαν ως μεμονωμένα κύτταρα, ενώ σε μεγάλο ποσοστό βρέθηκαν τα γένη *Desulforhopalus, Desulfotalea* και *Desulfovibrio* (Ravenschlag *et al.*, 2000, Knittel *et al.*, 2003). Σημαντικό ρόλο έχει βρεθεί ότι παίζουν τα θειικοαναγωγικά Bacteria και σε υδροθερμικά ιζήματα. Σε θαλάσσια

Εισαγωγή

ιζήματα από ρηχές υδροθερμικές πηγές της περιοχής Baia di Levante στην Ιταλία, που επωάστηκαν *in vitro* στους 90°C, κάτω από αναερόβιες συνθήκες διαπιστώθηκε ότι τα θειικοαναγωγικά Bacteria της περιοχής, είχαν την ικανότητα να μεταβολίζουν το οξικό οξύ και το υδρογόνο, δύο συστατικά που αποτελούσαν ενδιάμεσα προϊόντα της αποικοδόμησης της οργανικής ύλης στην περιοχή αυτή (Tor *et al.*, 2003).

2.3 Οξείδωση του υδρόθειου

Η αναγωγή των θειικών ιόντων, που είναι ένα από τα κύρια στάδια στην αναερόβια τροφική αλυσίδα, έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή υδρόθειου, θείου και άλλων ανηγμένων μορφών του θείου. Οι ανηγμένες αυτές μορφές του θείου παράγονται σε μεγάλες ποσότητες σε περιβάλλον πλούσιο σε θειικά ιόντα, αλλά πολύ γρήγορα μετατρέπονται σε λιγότερο ανηγμένες μορφές του θείου, και τελικά σε θειικά ιόντα. Τα συστατικά του θείου μπορεί να οξειδώνονται μέσω δύο μικροβιακών μεταβολισμών. Ο ένας εξαρτάται από την παρουσία του φωτός και είναι φωτοτροφικός. Ο δεύτερος, που συναντάται στα θαλάσσια ιζήματα, δεν εξαρτάται από την παρουσία του φωτός (μη-φωτοτροφική οξείδωση του θείου) και είναι χημειολιθότροφος. Οι δύο αυτοί μικροβιακοί μεταβολισμοί χρησιμοποιούνται από μικροοργανισμούς πολύ διαφορετικούς μεταξύ τους. Η μη-φωτοτροφική οξείδωση του θείου, πραγματοποιείται από άχρωμα θειο-Bacteria, που ανήκουν στα α-, β-, γ-, δ- και ε-Proteobacteria και από Archaea της τάξης Sulfolobales. Οι ιδανικότερες συνθήκες για την οξείδωση του υδρόθειου είναι στην διεπιφάνεια μεταξύ του οξικού περιβάλλοντος όπου η συγκέντρωση του οξυγόνου είναι υψηλή και του ανοξικού περιβάλλοντος όπου παράγονται μεγάλες ποσότητες υδρόθειου από την αναγωγή των θειικών ιόντων (Kirchman et al, 2012). Αποικίες Bacteria του γένους Beggiatoa, τα οποία οξειδώνουν το υδρόθειο σε θειικά ιόντα, έχουν βρεθεί σε ιζήματα πλούσια σε μεθάνιο, σε ηφαίστεια ιλύος (Werne et al., 2004, Niemann et al., 2006). Πέρα από το οξυγόνο, τα νιτρικά ιόντα μπορούν να συμμετέχουν ως δέκτης ηλεκτρονίων στην οξείδωση του υδρόθειου και κατά την αντίδραση αυτή παράγεται αμμώνιο, ή άζωτο (Kirchman et al, 2012).

Τα θειο-οξειδωτικά Bacteria, έχει βρεθεί ότι συμβιώνουν με θαλάσσια ασπόνδυλα, τα οποία έχουν βρεθεί σε θερμές πηγές και σε ιζήματα πάνω από αναβλύσεις μεθανίου. Τέτοια ασπόνδυλα, δίθυρα, σωληνοσκώληκες (πωγωνοφόρα), έχουν εντοπιστεί να σχηματίζουν αποικίες σε ηφαίστεια ιλύος, όπως στο Haakon Mosby, στη θάλασσα

Barents (Lösekann *et al.*, 2008) αλλά και στα ηφαίστεια ιλύος Amsterdam, Kazan και Kula, στην Ανατολική Μεσόγειο (Olu-Le Roy *et al.*, 2004, Werne *et al*, 2004)

2.4 Αερόβια οξείδωση του μεθανίου

Η αερόβια οξείδωση του μεθανίου πραγματοποιείται από μεθανιότροφα Bacteria τα οποία χρησιμοποιούν το οξυγόνο ως μοναδικό δέκτη ηλεκτρονίων. Η αερόβια οξείδωση του μεθανίου πραγματοποιείται με τις μονοοξυγενάσες του μεθανίου, ένζυμα τα οποία διασπούν τους δεσμούς στα μόρια του οξυγόνου. Τα μεθανιότροφα Bacteria τα οποία χρησιμοποιούν αποκλειστικά μεθάνιο ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας, είναι μια κατηγορία των μεθυλιότροφων Bacteria. Τα μεθυλιότροφα Bacteria, χρησιμοποιούν συστατικά με ένα άτομο άνθρακα, περισσότερο ανηγμένα από το μυρμηκικό οξύ, όπως το μεθάνιο, η μεθανόλη, οι μεθυλαμίνες κ.α (Hanson and Hanson, 1996). Τα μεθανιότροφα Bacteria παρόλο που είναι υποχρεωτικά αερόβια, είναι ευαίσθητα στις υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου και θεωρείται ότι προτιμούν συνθήκες μικροαερόφιλες. Για το λόγω αυτό εντοπίζονται σε πολύ στενές ζώνες, στο σημείο που το αναερόβιο περιβάλλον όπου υπάρχει μεθάνιο, συναντά το αερόβιο, όπου υπάρχει οξυγόνο (Kotelnikova, 2002). Η αερόβια οξείδωση του μεθανίου είναι ευρέως διαδεδομένη σε συνθήκες όπου το οξικό περιβάλλον μετατρέπεται σε ανοξικό, σε βάλτους, ορυζώνες, ποτάμια, ωκεανούς κλπ, ενώ μεθανιότροφα Bacteria έχουν βρεθεί να συμβιώνουν με μύδια (Hanson and Hanson, 1996).

2.5 Αναερόβια οξείδωση του μεθανίου

Η αναερόβια οξείδωση του μεθανίου (AOM) αποτελεί το τελευταίο στάδιο κατά την αποικοδόμηση της οργανικής ύλης σε ανοξικά συστήματα. Η AOM που εξαρτάται από την αναγωγή των θειικών ιόντων συμβαίνει σε ποικίλα περιβάλλοντα, που περιλαμβάνουν τα θαλάσσια ιζήματα, τις πηγές διαφυγής μεθανίου, τα ανοξικά ύδατα και τα βαθιά ιζήματα των ηπειρωτικών κράσπεδων και θεωρείται ότι είναι υπεύθυνη για την κατανάλωση μέχρι και 25% της ποσότητας του μεθανίου που παράγεται παγκοσμίως και εκλύεται στην ατμόσφαιρα (Valentine and Reeburgh 2000, Knittel and Boetious, 2009). Είναι μια διεργασία ευρέως διαδεδομένη σε όλο τον πλανήτη. Μέχρι και σήμερα δεν έχουν απομονωθεί οι υπεύθυνοι μικροοργανισμοί και το βιοχημικό μονοπάτι της αντίδρασης αυτής παραμένει άγνωστο (Boetius *et al.*, 2000). Δεδομένα για την ΑΟΜ στα θαλάσσια ιζήματα προέρχονται από γεωχημικές αναλύσεις, δεδομένα ραδιοϊσοτόπων, μοριακές αναλύσεις και μικροσκοπική παρατήρηση με την τεχνική FISH. Πληροφορίες για την AOM, τις συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιείται, καθώς και για τους μικροοργανισμούς που θεωρούνται ότι εμπλέκονται στη διεργασία αυτή, δίνονται αναλυτικά στις παραγράφους που ακολουθούν
3. Αναερόβια οξείδωση του μεθανίου συνδεδεμένη με αναγωγή θειικών ιόντων

Γεωχημικές αναλύσεις σε ανοξικά ιζήματα από διάφορες περιοχές όπου υπάρχει μεθάνιο έδωσαν ισχυρές ενδείξεις ότι συμβαίνει η AOM με ταυτόχρονη κατανάλωση θειικών ιόντων (Reeburgh, 1976, Hoehler, 1994, Boetius *et al.*, 2000, Pancost *et al.*, 2000) και θεωρήθηκε ότι η AOM πραγματοποιείται μέσω της συντροφικής σχέσης μεθανιογόνων Archaea και θειικοαναγωγικών Bacteria σύμφωνα με την εξίσωση:

$$CH_4 + SO_4^{2-} \longrightarrow HCO_3^- + HS^- + H_2O$$
(1)

Σε αυτή τη συντροφική σχέση θεωρείται ότι τα μεθανιογόνα Archaea μεσολαβούν στην χημική μετατροπή του μεθανίου σε μια διαδικασία αντίστροφης μεθανιογένεσης, ενώ τα θειικοαναγωγικά Bacteria παρέχουν τις απαραίτητες συνθήκες για το σκοπό αυτό ελέγχοντας την συγκέντρωση του υδρογόνου στο ίζημα (Hoehler *et al.*, 1994). Αυτή η διεργασία θεωρείται ότι συμβαίνει σε δύο στάδια, στο πρώτο, τα μεθανιογόνα *Archaea*, σε μια διαδικασία αντίστροφης μεθανιογένεσης, οξειδώνουν το μεθάνιο:

$$CH_4 + 2H_2O \longrightarrow CO_2 + 4H_2$$
⁽²⁾

Στο δεύτερο στάδιο τα θειικοαναγωγικά Bacteria χρησιμοποιούν το υδρογόνο που παράγεται σύμφωνα με την αντίδραση:

$$SO_4^{2-} + 4H_2 + H^+ \longrightarrow HS^- + 4H_2O$$
(3)

Η συντροφική αυτή σχέση μεταξύ των θειικοαναγωγικών Bacteria και των μεθανιογόνων Archaea, θεωρείται ότι βασίζεται στο υδρογόνο, το οποίο είναι ένα ανταγωνιστικό υπόστρωμα στο αναερόβιο περιβάλλον. Όσο το υδρογόνο παραμένει σε χαμηλά επίπεδα, τότε συμβαίνει η AOM συνδεδεμένη με την αναγωγή των θειικών ιόντων (Εξίσωση 1) (Hoehler *et al.*, 1994). Επομένως τα θειικοαναγωγικά Bacteria ρυθμίζουν τη συγκέντρωση του υδρογόνου. Σε βαθύτερα στρώματα του ιζήματος που τα θειικά ιόντα έχουν πολύ χαμηλή συγκέντρωση (<1mM) ή έχουν εξαντληθεί, ξεκινάει η μεθανιογένεση, όπου τα μεθανιογόνα Archaea είναι εκείνα που χρησιμοποιούν πλέον το υδρογόνο (μονοπάτι αναγωγής θειικών), που είναι ανταγωνιστικό υπόστρωμα (Hoehler *et al.*, 1994, Whiticar, 1999). Για να είναι δυνατή η συνεργασία των μεθανιογόνων Archaea και των θειικοαναγωγικών Bacteria θα πρέπει τα μεθανιογόνα Archaea να διαθέτουν κατάλληλα ένζυμα για τη μετατροπή του μεθανίου σε διοξείδιο του άνθρακα, να είναι ικανά να αντιστρέφουν το μεταβολισμό τους και να μπορούν να διατηρήσουν την ενέργεια από την οξείδωση

του μεθανίου για την ανάπτυξή τους, ενώ τα θειικοαναγωγικά βακτήρια θα πρέπει να είναι ικανά να ελέγχουν τη συγκέντρωση του υδρογόνου σε επίπεδα τέτοια που η οξείδωση του μεθανίου με το νερό να είναι θερμοδυναμικά ευνοϊκή (Hoehler and Alperin, 1996).

Ως ενδιάμεσο προϊόν που μεταφέρεται μεταξύ των μεθανιότροφων Archaea και των θειικοαναγωγικών Bacteria πέρα από το υδρογόνο έχει προταθεί το μυρμηκικό οξύ, το οξικό οξύ, η μεθανόλη και η μεθυλθιόλη, χωρίς να έχει αποδειχθεί η συμμετοχή τους πειραματικά (Thauer, 2011). Εναλλακτικά του μονοπατιού της αντίστροφης μεθανιογένεσης οι Valentine και Reeburgh (2000) πρότειναν δύο μηχανισμούς όπου το οξικό οξύ λειτουργεί ως ενδιάμεσο προϊόν, το οποίο χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα και από ορισμένα μεθανιογόνα Archaea της τάξης Methanosarcinales. Σύμφωνα με τον πρώτο μηχανισμό, σχηματίζεται οξικό οξύ και υδρογόνο από τα μεθανιογόνα Archaea και ακολούθως το υδρογόνο και το οξικό οξύ καταναλώνονται από τα θειικοαναγωγικά Bacteria. Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει το σχηματισμό οξικού οξέος από το διοξείδιο του άνθρακα και το μεθάνιο, μέσω ενός μηχανισμού αντίστροφης μεθανιογένεσης (μέσω του μονοπατιού διάσπασης του οξικού οξέος), από μεθανιότροφα Archaea, όπου στη συνέχεια το οξικό οξύ καταναλώνεται από θειικοαναγωγικά Bacteria.

Ένας ακόμα προτεινόμενος μηχανισμός για την AOM είναι μέσω του μονοπατιού της μεθυλιογένεσης, όπου μεθυλιωμένα σουλφίδια (H₃CSH) τα οποία παράγονται από Archaea τόσο μέσω της οξείδωσης του μεθανίου όσο και μέσω της αναγωγής του διοξειδίου του άνθρακα καταναλώνονται από θειικοαναγωγικά Bacteria (Moran *et al.*, 2008).

Η κατανάλωση του μεθανίου βρέθηκε ότι συμβαίνει σε μια αναλογία 1:1 ως προς την αναγωγή των θειικών ιόντων, σε δείγματα που ανακτήθηκαν πάνω από ζώνη υδριτών μεθανίου από την περιοχή Hydrate Ridge, τα οποία επωάστηκαν κάτω από αυστηρά αναερόβιες συνθήκες *in vitro* (Nauhaus *et al.*, 2002). Η αναλογία αυτή παρατηρήθηκε και σε δείγματα από μικροβιακές αποικίες στις οποίες κυριαρχούσαν τα ANME-1 κύτταρα και θειικοαναγωγικά Bacteria της ομάδας *Desulfosarcina/ Desulfococcus*. (Michaelis *et al.*, 2002). Η αναλογία αυτή της αναγωγής των θειικών ιόντων με την AOM συμβαίνει όταν το μεθάνιο είναι η κύρια ή η μοναδική πηγή ηλεκτρονίων που τροφοδοτεί την αναγωγή των θειικών ιόντων, υπάρχουν όμως και περιπτώσεις που η αναγωγή των θειικών ιόντων τροφοδοτείται από άλλα συστατικά της εκλυόμενης ροής και η αναλογία αυτή αλλάζει. Σε υδροθερμικά ιζήματα από την Λεκάνη Guyamas βρέθηκε ότι η AOM συνεισέφερε μονάχα κατά 1-5% στην αναγωγή των θειικών ιόντων, που υποδηλώνει ότι τα θειικοαναγωγικά Bacteria μάλλον χρησιμοποιούσαν επιλεκτικά ως υπόστρωμα άλλους υδρογονάνθρακές πέρα του μεθανίου (Kallmeyer and Boetius, 2004). Χαμηλοί ρυθμοί AOM σε σχέση με τους ρυθμούς αναγωγής θειικών παρατηρήθηκαν και σε ιζήματα από πηγές υδρογονανθράκων στον Κόλπο του Μεξικού, που μπορεί να εξηγηθεί με την αναγωγή των θειικών ιόντων από άλλα οργανικά συστατικά που συνδέονται με τις πηγές αυτές, πιθανόν υδρογονάνθρακες και πετρέλαιο, πέρα του μεθανίου (Joye *et al.*, 2004).

Εφόσον υπεύθυνοι μικροοργανισμοί για την ΑΟΜ δεν έχουν απομονωθεί μέχρι και σήμερα, πληροφορίες σχετικά με τους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στη διεργασία αυτή προήλθαν από αναλύσεις λιπιδίων και μοριακές αναλύσεις ενώ η δομή που είχε αυτή η κοινωνία μικροοργανισμών διερευνήθηκε μικροσκοπικά με την τεχνική FISH. Αν και οι πρώτες πληροφορίες σχετικά με τους μικροοργανισμούς αυτούς προέκυψαν πριν από περίπου 10 χρόνια, από τότε δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί πως οι μικροοργανισμοί αυτοί εμπλέκονται στη διεργασία της ΑΟΜ.

Μια ιδιότητα που χρησιμοποιήθηκε στις μελέτες λιπιδίων για τη διερεύνηση των μεθανιότροφων μικροοργανισμών, είναι ότι το μεθάνιο που περιέχεται στα θαλάσσια ιζήματα είναι φτωχό σε ¹³C κι επομένως οι μικροοργανισμοί που το καταναλώνουν εμφανίζουν δομικά συστατικά φτωχά σε ¹³C (Hinrichs *et al.*, 1999, Valentine and Reeburgh 2000). Έχει παρατηρηθεί, ότι οι μικροοργανισμοί καταναλώνουν κατά προτίμηση τον ¹²C κι έτσι το ίζημα εμπλουτίζεται σε ¹³C, δημιουργώντας μια διαβάθμιση στην περιεκτικότητα σε ¹³C μέσα στο ίζημα (Hinrichs and Boetius, 2002). Με αυτόν τον τρόπο προέκυψαν ενδείξεις ότι η οξείδωση του μεθανίου συνδέεται με την αναγωγή θειικών ιόντων, από ανάλυση λιπιδίων των δύο αυτών ομάδων μικροοργανισμών από ιζήματα που περιέχουν μεθάνιο, όπου βρέθηκε ότι τόσο τα λιπίδια των μεθανιογόνων Archaea όσο και εκείνα των θειικοαναγωγικών Bacteria ήταν φτωχά σε C¹³ υποδηλώνοντας ότι οι δύο αυτοί μικροοργανισμοί εμπλέκονται στην AOM (Pancost *et al.*, 2000).

Η πρώτη φορά που ανιχνεύθηκαν μικροσκοπικά συσσωματώματα από Archaea και θειικοαναγωγικά Bacteria ήταν σε ιζήματα από τη θαλάσσια περιοχή στο ηπειρωτικό κράσπεδο της Cascadia, όπου υπάρχουν σχηματισμοί υδριτών μεθανίου. Το συσσωματώματα αυτά αποτελούταν από μια εσωτερική σφαίρα 100 περίπου κυττάρων Archaea και περιβάλλονταν εξωτερικά από περίπου 200 κύτταρα Θειικοαναγωγικών Bacteria της ομάδας *Desulfosarcina/Desulfococcus* (Boetius *et*

al., 2000). Η μικροσκοπική αυτή παρατήρηση ήρθε να ενισχύσει την υπόθεση για την ύπαρξη μεθανιογόνων οργανισμών που δρουν αντίστροφα και καταναλώνουν μεθάνιο σε μια διεργασία συνδεδεμένη με την αναγωγή των θειικών ιόντων (Hoehler *et al.*, 1996, Hinrichs *et al.*, 1999).

Μετά από τις πρώτες αυτές προσπάθειες διερεύνησης των εμπλεκόμενων στην AOM μικροοργανισμών, νέες μελέτες, πολλές φορές συνδυάζοντας διαφορετικές τεχνικές, όπως αναλύσεις του 16SrRNA γονιδίου για Bacteria και Archaea, αναλύσεις λιπιδίων και μικροσκοπική παρατήρηση με την τεχνική FISH όπου μαζί και με τα γεωχημικά δεδομένα έδωσαν περισσότερες πληροφορίες για τους εμπλεκόμενους στην AOM μικροοργανισμούς. Η μελέτη των ενζύμων των μεθανιογόνων Archaea που χρησιμοποιούν το μονοπάτι της αναγωγής των θειικών ιόντων με υδρογόνο, έδειξε ότι όλα τα ένζυμα, εκτός από ένα, μπορούν να καταλύσουν και το αντίστροφο μονοπάτι, σε ρυθμούς ικανούς να διατηρηθεί η AOM συνδεδεμένη με αναγωγή θειικών ιόντων στα συσσωματώματα των μεθανιότροφων Archaea με θειικοαναγωγικά Bacteria (Thauer, 2011).

3.1 Μικροοργανισμοί που σχετίζονται με την ΑΟΜ

Οι ομάδες των Archaea που θεωρούνται υπεύθυνες για την αναερόβια κατανάλωση του μεθανίου ονομάστηκαν με το πρόθεμα ANME (Anaerobic Methanotrophs) και μέχρι σήμερα τρεις διακριτές φυλογενετικά ομάδες έχουν αναγνωριστεί, τα ANME-1, ANME-2 και τα ANME-3. Πολλοί ακόμα φυλότυποι των Archaea και Bacteria που έχουν ανακτηθεί από ιζήματα πλούσια σε μεθάνιο θα μπορούσαν να μετέχουν πιθανόν στην AOM, και αυτό μένει να διερευνηθεί στο μέλλον.

Δύο ομάδες μικροοργανισμών που ανήκουν στα Archaea, θεωρήθηκαν αρχικά υπεύθυνες για την κατανάλωση του μεθανίου σε ανοξικά ιζήματα πλούσια σε μεθάνιο όπως προέκυψε με συνδυασμό μοριακών και λιπιδιακών αναλύσεων. Η μια ομάδα (ANME-2), βρέθηκε ότι ήταν φυλογενετικά στενά συνδεδεμένη με καλλιεργούμενα είδη της τάξης Methanosarcinales και η δεύτερη (ANME-1) ήταν φυλογενετικά ξεχωριστή αλλά σχετιζόμενη με μεθανιογόνα Archaea από τις τάξεις Methanomicrobiales και Methanosarcinales (Hinrichs *et al.*, 1999). Η μικροσκοπική ανίχνευση των ANME-1 και τα ANME-2 με την τεχνική FISH σε θαλάσσια ιζήματα πλούσια σε μεθάνιο και η ανάλυση των χαρακτηριστικών λιπιδίων τους, που βρέθηκε ότι ήταν φυωρία ότι είναι μικροοργανισμοί ικανοί να αφομοιώσουν το μεθάνιο κάτω από ανοξικές συνθήκες, (Orphan *et al.*, 2002).

Αργότερα, μια ακόμα ομάδα Archaea, τα ANME-3, θεωρήθηκε ότι εμπλέκεται στη διεργασία της AOM. Η ομάδα αυτή ανιχνεύθηκε μικροσκοπικά με την τεχνική FISH πρώτη φορά στο ενεργό ηφαίστειο ιλύος Haakon Mosby στη Θάλασσα Barents σε ίζημα κάτω από μικροβιακές κοινότητες των υδρόθειο-οξειδωτικών Bacteria Beggiatoa (Niemann *et al.*, 2006), ενώ είχε αναγνωριστεί νωρίτερα σε φυλογενετικές αναλύσεις στο Hydrate Ridge (Knittel *et al.*, 2005). Τα ANME-3 κύτταρα σχετίζονται φυλογενετικά περισσότερο με τα ANME-2,αλλά και με καλλιεργούμενα μεθανιογόνα Archaea των ειδών *Methanococcoides spp.* και *Methanolobus spp.*, με τα οποία δεν σχετίζονται οι άλλες δύο ομάδες ANME (Niemann *et al.*, 2006, Lösekann *et al.*, 2007). Και οι τρεις ομάδες ANME βρέθηκε ότι αυτοφθορίζουν κάτω από υπεριώδες φως εξαιτίας του συνενζύμου F_{420} που περιέχουν, χαρακτηριστικό των μεθανιογόνων Archaea (Michaelis *et al.*, 2002, Lösekann *et al.*, 2007).

Τα θειικοαναγωγικά Bacteria που έχουν αναγνωριστεί με τη μέθοδο FISH σαν συντροφικά Bacteria στα ANME-2 συσσωματώματα (Boetius et al., 2000, Knittel et al., 2003, Orphan et al., 2001) αλλά και συχνά σε μη οργανωμένες συσσωματώσεις μαζί με ANME-1 (Michaelis et al., 2002), ανήκουν στην ομάδα Desulfosarcina/Desulfococcus των δ-Proteobacteria ενώ εκείνα που συμμετέχουν στα ANME-3 συσσωματώματα σχετίζονται με το γένος Desulfobulbus των δ-Proteobacteria (Niemann et al., 2006).

3.1.1 Μορφολογία και οικολογικές σχέσεις των ΑΝΜΕ

ΑΝΜΕ-1 - Η μικροσκοπική παρατήρηση με την τεχνική FISH αποκάλυψε στοιχεία για τη μορφή των ANME-1 και την παρουσία τους μέσα στο ίζημα. Τα ANME-1 κύτταρα έχουν μορφή κυλινδρική με μήκος 1-2μm (Orphan et al., 2002), ενώ έχουν αναφερθεί και μεγαλύτερα με μήκος 1,5-3μm (Knittel et al., 2005) ή 3,5μm και διάμετρο 0,6μm (Michaelis et al. 2002). Μέσα στο ίζημα συναντώνται συνήθως ως μεμονωμένα κύτταρα ή σχηματίζοντας αλυσίδες μερικών κυττάρων (Orphan et al., 2002, Knittel et al., 2005, Treude et al, 2005). Τα ANME-1 όμως, μπορεί να σχηματίζουν και συσσωματώματα (Orphan et al., 2002) ή συσσωματώσεις κυττάρων (Michaelis et al., 2002), όπου συμμετέχουν και θειικοαναγωγικά Bacteria της ομάδας Desulfosarcina/ Desulfococcus. Η μικροσκοπική παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης σε δείγμα από πυκνές αποικίες ANME-1, από περιοχή πλούσια σε μεθάνιο στο Hydrate Ridge, αποκάλυψε άφθονα κύτταρα ANME-1 να είναι βυθισμένα σε ένα εξωκυτταρικό υλικό από πολυσακχαρίτες (Knittel et al.,

Εισαγωγή

2005). Κάποιες φορές βρέθηκαν να σχηματίζουν αποικίες, χωρίς κάποιο αντιπρόσωπο των Bacteria να συμμετέχει σε αυτές. Τα ANME-1, πιθανόν δεν εξαρτώνται από τη δραστηριότητα κάποιου στενά συνδεδεμένου συντρόφου από τα Bacteria και έχει θεωρηθεί ότι είναι πιθανό, να διαθέτουν μηχανισμούς οξείδωσης του μεθανίου, ανεξάρτητα από τη μεσολάβηση θειικοαναγωγικών βακτηρίων (Orpahn *et al.*, 2002).

ANME-2 – Τα ANME-2 Archaea έχουν μορφή κοκκοειδή με διάμετρο ~0,5μm. Συνήθως έχουν βρεθεί ως συσσωματώματα όπου τα ΑΝΜΕ-2 σχηματίζουν ένα κεντρικό πυρήνα που καλύπτεται εξωτερικά από στρώματα θειικοαναγωγικών Bacteria της ομάδας Desulfosarcina/Desulfococcus (Boetius et al., 2000, V.J. Orphan et al 2002). Σε ιζήματα από τη Γερμανική Βαλτική (Κόλπος Eckernförde) ανιχνεύθηκαν κύτταρα ΑΝΜΕ-2 μεγαλύτερα σε μέγεθος (0,7μm), τα οποία σχημάτιζαν συσσωματώματα χωρίς τη συμμετοχή κάποιου θειικοαναγωγικού συντροφικού Bacterium (Treude et al., 2005). Στα ιζήματα αυτά ανιχνεύθηκαν όμως και συσσωματώματα από θειικοαναγωγικά Bacteria της ομάδας Desulfosarcina/ Desulfococcus, γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να μην είναι απαραίτητη η φυσική σύνδεση μεταξύ των δύο διαφορετικών ομάδων κυττάρων για να πραγματοποιηθεί η AOM συνδεδεμένη με την θειικοαναγωγή. Συσσωματώματα αποτελούμενα αποκλειστικά από ANME-2 κύτταρα παρατηρήθηκαν και σε ιζήματα από τη Λεκάνη Eel River. Τα συσσωματώματα αυτά βρέθηκαν να συνυπάρχουν στα ίδια βάθη μαζί με τυπικά συσσωματώματα ANME-2/DSS, ενώ παρατηρήθηκαν και πιο χαλαρές συσσωματώσεις κυττάρων των δύο ομάδων κοντά η μια στην άλλη να περιβάλλονται από εξωκυταρικό υλικό από πολυσακχαρίτες (Orphan et al, 2002). Τα ANME-2 Archaea βρέθηκε ότι διαχωρίζονται σε τρεις διακριτές φυλογενετικά υπόομάδες (a, b, c) (Orphan et al., 2001). Τα ANME-2c/DSS συσσωματώματα βρέθηκε ότι έχουν το τυπικό σχήμα με τα Archaea στο κέντρο να περιβάλλονται από θειικοαναγωγικά Bacteria, ενώ στα ANME-2a/DSS συσσωματώματα, οι δύο ομάδες κυττάρων ήταν πλήρως αναμεμιγμένες, ενώ τα συσσωματώματα που προέκυπταν δεν ήταν πλήρως σφαιρικά (Knittel et al., 2005). Τα συσσωματώματα των ANME-2/DSS κυττάρων μπορεί να έχουν διάμετρο μερικά μm, αλλά έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις όπου έφταναν τα 150μm (Orphan et al, 2002). Τα ANME-2/DSS συσσωματώματα έχουν μελετηθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια και έχουν εντοπιστεί σε υψηλή αφθονία σε περιοχές πλούσιες σε μεθάνιο όπου θεωρούνται ότι αποτελούν το κύριο φίλτρο που καταναλώνει το μεθάνιο στα θαλάσσια ιζήματα, οι ιδιαίτεροι

Εισαγωγή

μηχανισμοί όμως που συνδέουν τα ANME-2 και τα DSS κύτταρα παραμένουν αδιευκρίνιστοι (Dekas *et al.*, 2009).

ANME-3 - Η μικροσκοπική παρατήρηση με την τεχνική FISH σε δείγματα από το ηφαίστειο ιλύος Haakon Mosby, έδωσε πληροφορίες για τη μορφολογία των ANME-3 κυττάρων και την παρουσία τους μέσα στο ίζημα. Τα ΑΝΜΕ-3 κύτταρα βρέθηκε ότι είναι κοκκοειδή με διάμετρο 0,7μm (Lösekann et al., 2007). Σχηματίζουν συσσωματώματα με Bacteria που σχετίζονται στενά με το γένος Desulfobulbus spp. (DBB), το οποίο ανήκει στα δ-Proteobacteria και είναι φυλογενετικά διακριτό από την ομάδα Desulfosarcina/Desulfococcus που συμμετέχει σε συσσωματώματα μαζί με τα ANME-2, ενώ σχετίζεται πιο στενά με φυλότυπους Bacteria που έχουν ανακτηθεί από άλλα θαλάσσια ιζήματα (Niemann et al., 2006). Σε αντίθεση με τα ANME-2/DSS συσσωματώματα, τα ANME-3 Archaea σχηματίζουν πιο χαλαρά συσσωματώματα με τα DBB κύτταρα και η αναλογία DBB προς ANME-3 είναι «1. Τα ΑΝΜΕ-3 κύτταρα ανιχνεύθηκαν επίσης και ως μεμονωμένα κύτταρα, αλλά και ως συσσωματώματα χωρίς τη συμμετοχή θειικοαναγωγικών Bacteria. Τα ANME-3/DBB συσσωματώματα βρέθηκε ότι είχαν μορφή σφαιρική ή κυλινδρική, όπου αποτελούνταν από μερικά σφαιρικά συσσωματώματα στη σειρά, ενώ κάποιες φορές βρέθηκαν να περιβάλλονται από εξωκυτταρικό υλικό από πολυσακχαρίτες (Lösekan et al., 2007).

3.2 Το ιδιαίτερο μικροπεριβάλλον των ΑΝΜΕ

Τα ANME-1 κύτταρα φαίνεται να ευνοούνται από υψηλές ροές μεθανίου σε σχέση με τα ANME-2, που επιβιώνουν καλύτερα σε χαμηλές ροές, όπως προέκυψε από *in vitro* μετρήσεις που έγιναν σε αναερόβιο αντιδραστήρα, σε δείγματα ιζήματος από πηγή έκλυσης υδρογονανθράκων (Girgius *et al.*, 2005). Το μικροπεριβάλλον που μπορεί να σχηματίζεται εντός του ιζήματος λόγω ιδιαίτερων γεωχημικών συνθηκών φαίνεται ότι επηρεάζει την οικολογική προσαρμογή των μικροοργανισμών. Πολύ συχνά μέσα στο ίζημα σε κοντινές αποστάσεις είτε κατά βάθος είτε στο χώρο, έχει παρατηρηθεί ότι επικρατούν διαφορετικές ομάδες μικροοργανισμών. Η κατά βάθος στρωμάτωση των διαφορετικών ομάδων ANME, έχει παρατηρηθεί σε δείγματα ιζήματος από ηφαίστεια ιλύος (Orphan *et al.*, 2002, Knittel *et al.*, 2005, Pachiadaki *et al.*, 2010). Άφθονα ANME-1 και ANME-2 Archaea έχουν εντοπιστεί σε ιζήματα πλούσια σε μεθάνιο, πάνω από στρώματα υδριτών και σε πηγές διαφυγής μεθανίου (Boetius *et al.*, 2000, Orphan *et al*, 2001, Orphan *et al.*, 2004).

Σε πολλές περιπτώσεις, έχει παρατηρηθεί ότι τα ANME-1 και ANME-2 κύτταρα συνυπάρχουν μέσα στο ίζημα αλλά κάποιες φορές παρατηρήθηκε ότι μπορεί να επικρατεί η μια ή η άλλη ομάδα σε βάθος μέσα στον ίδιο πυρήνα και αυτό εξαρτάται από το ιδιαίτερο γεωχημικό μικροπεριβάλλον της περιοχής (Knittel *et al.*, 2005, Treude *et al*, 2005) ενώ σε κάποιες περιπτώσεις ανιχνεύθηκε αποκλειστικά μόνο μια ομάδα ANME (Boetius *et al*, 2000, Michaelis *et al.*, 2002).

Σε ιζήματα από περιοχές με διαφορετική ροή έκλυσης στο Eel River Basin, τα ANME-2 κύτταρα ανιχνεύθηκαν τόσο σε περιοχές με υψηλή όσο και σε περιοχές με χαμηλή εκλυόμενη ροή. Σε περιοχή με χαμηλή εκλυόμενη ροή τα ANME-2 εντοπίστηκαν σε ρηχό βάθος 1-4cm. Τα ANME-1 συνήθως ανιχνεύονταν προς τα βαθύτερα στρώματα του ιζήματος που μελετήθηκαν, μεταξύ 6 και 20cm. Σε μια περιοχή όμως καλυμμένη επιφανειακά από αποικία μυδιών του γένους *Calyptogena pacifica* παρατηρήθηκε διαφορετική κατανομή των ANME κοινοτήτων με το βάθος του ιζήματος. Ενώ στο επιφανειακό στρώμα συνυπήρχαν τα ANME-1 και ANME-2 Archaea, αμέσως βαθύτερα, στα 4-6cm κυριάρχησαν τα ANME-2 συσσωματώματα και κάτω από το βάθος αυτό επικράτησαν πάλι τα ANME-1 Archaea (Orphan *et al.*, 2004). Επομένως, περιοχές με διαφορετική προφίλ βάθους στην κατανομή των μεθανιότροφων Archaea. Τα ANME-1 κύτταρα φαίνεται να «προτιμούν» περιοχές ιζήματος με υψηλότερες συγκεντρώσεις μεθανίου καθώς ανιχνεύθηκαν κυρίως στα βαθύτερα στρώματα του ιζήματος.

Διαφορετική κατά βάθος κατανομή των μεθανιότροφων μικροοργανισμών παρατηρήθηκε και σε προφίλ βάθους που προήλθε από φυλογενετική ανάλυση, σε έναν πυρήνα από το ηφαίστειο ιλύος Kazan, μήκους 30cm (Pachiadaki *et al.*, 2010). Και σε αυτήν την περίπτωση τα ANME-1 Archaea κυρίως ανακτήθηκαν από τα βαθύτερα στρώματα, όπου η συγκέντρωση του μεθανίου ήταν μεγαλύτερη, ενώ γύρω από τη μεταβατική ζώνη θειικών ιόντων/ μεθανίου, στα 13 cm, κυριάρχησαν τα ANME-2 Archaea. Τα ANME-3 κυριάρχησαν τόσο στα 5cm βάθος όπου η συγκέντρωση του μεθανίου ήταν μεγαλύτερη και αυτό δημιουργεί ένα ερώτημα σχετικά με την σχέση που μπορεί να έχουν οι ιδιαίτερες γεωχημικές συνθήκες με την επικράτηση μια ομάδας ANME σε σχέση με τις άλλες δύο.

Σε αρκετές περιπτώσεις, σε ιζήματα πλούσια σε μεθάνιο, με διαφορετικές όμως γεωχημικές συνθήκες, έχει παρατηρηθεί να επικρατεί μόνο μια από τις τρεις ομάδες των μεθανιότροφων Archaea. Στο ηφαίστειο ιλύος Haakon Mosby μελετήθηκαν τρεις διαφορετικές περιοχές, το ενεργό κέντρο με την πρόσφατη έκλυση ιλύος, περιμετρικά την περιοχή με παλαιότερη έκλυση ιλύος, καλυμμένη από υδρόθειοοξειδωτικά Bacteria και έξω από αυτήν και τέλος την περιοχή που καλύπτονταν από πυκνές αποικίες σωληνοσκώληκων στην περιφέρεια του ηφαιστείου τα οποία σχηματίζουν στοές μέχρι και τα 60m βάθος μέσα στο ίζημα. Στο ενεργό κέντρο τα ανώτερα στρώματα του ιζήματος καλύπτονταν από αερόβιους μεθανιότροφους μικροοργανισμούς, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν μικροσκοπικά ΑΝΜΕ κύτταρα. Στην περιφέρεια της περιοχής αυτής, ακριβώς κάτω από τις μικροβιακές αποικίες των υδρόθειο-οξειδωτικών Beggiatoa, σε μια περιοχή χαμηλής εκλυόμενης ροής, στα πρώτα 3cm παρατηρήθηκε μεγάλη κυτταρική αφθονία από ANME-3/DBB συσσωματώματα. Στην περιοχή με τους σωληνοσκώληκες, παρατηρήθηκε μέγιστη AOM σε βάθος μεταξύ 60-90cm, μεταξύ της βάσης των σωληνοσκώληκων και του στρώματος σχηματισμού υδριτών, όπου παρατηρήθηκε μεγάλη αφθονία των ΑΝΜΕ-2/DSS συσσωματωμάτων. Επομένως τόσο τα ΑΝΜΕ-2 όσο και τα ΑΝΜΕ-3 κύτταρα βρέθηκαν σε περιοχές με χαμηλότερη ροή έκλυσης (Niemann et al., 2006).

Έχουν αναφερθεί όμως και περιπτώσεις όπου επικράτησαν τα ΑΝΜΕ-1 κύτταρα. Σε πυρήνα που ανακτήθηκε από ίζημα καλυμμένο επιφανειακά από αποικίες των υδροθειοοξειδωτικών Bacteria Beggiatoa, στην περιοχή Eel River Basin, τα ANME-1 κύτταρα κυριαρχούσαν σε όλα τα βάθη του πυρήνα (Orphan et al., 2004). Φυλότυποι ANME-1 εντοπίστηκαν και μέσα σε ανθρακικές αποθέσεις σχηματισμένες πάνω από ψυχρές πηγές διαφυγής στο ηφαίστειο ιλύος Milano (Aloisi et al., 2002). Αυτή η ομάδα των μικροοργανισμών ήταν και η κυρίαρχη ομάδα που εντοπίστηκε σε πυκνές μικροβιακές κοινότητες που κάλυπταν μεγάλου ύψους σχηματισμούς ανθρακικών αποθέσεων, σχηματίζοντας μικροβιακούς «υφάλους» σε πηγές διαφυγής στα μόνιμα ανοξικά νερά από τη Μαύρη Θάλασσα. Οι μικροβιακές αυτές κοινότητες που ήταν εκτεθειμένες στο θαλασσινό ανοξικό περιβάλλον, αποτελούνταν κατά 50-70% από ANME-1 Archaea, ενώ στα Bacteria που αναγνωρίστηκαν επικρατούσαν τα θειικοαναγωγικά, που σχετίζονταν με την ομάδα Desulfosarcina/Desulfococcus (Michaelis *et al.*, 2002). Σε δείγματα από τους υφάλους στην ίδια περιοχή, παρατηρήθηκε αργότερα, ότι υπήρχε μια στρωμάτωση στην αφθονία των ΑΝΜΕ-1 και ΑΝΜΕ-2 από το εξωτερικό προς το εσωτερικό τμήμα της αποικίας. Έτσι, τα

ANME-1 κυριαρχούσαν και ήταν ενεργά προς το εξωτερικό μέρος της αποικίας, ενώ τα ANME-2 κυριαρχούσαν προς το εσωτερικό της αποικίας, βάθος κάτω από 2,6mm (Treude *et al.*, 2007). Τα ANME-1 κύτταρα και συγκεκριμένα του κλάδου ANME-1b, ανιχνεύθηκαν στη μεταβατική ζώνη θειικών/μεθανίου, από ιζήματα αλατούχου διάπυρου (diapyr) και ήταν η μοναδική ομάδα αναερόβιων μεθανιότροφων που ανιχνεύθηκε στη ζώνη αυτή όπου, η συγκέντρωση των θειικών ιόντων είχε πέσει στα 7mM, ενώ του μεθανίου ήταν ~ 0,22 mM (Loyd *et al.*, 2006). Τα ANME-1 ήταν και η κύρια ομάδα αναερόβιων μεθανιότροφων στη μεταβατική ζώνη θειικών στη μεταβατική ζωνη θεικών στη μεταβατική 2006).

Πέρα από τη ροή και τη συγκέντρωση του μεθανίου καθώς και τη διαθεσιμότητα των θειικών ιόντων, δύο ακόμη παράγοντες που μπορεί να επηρεάζουν την επικράτηση μιας ομάδας ANME σε μια περιοχή έχει βρεθεί ότι είναι η θερμοκρασία και η πίεση. Σε δείγματα ιζήματος από τη Μαύρη Θάλασσα όπου η in situ θερμοκρασία ήταν 8°C και η μεθανιότροφη κοινότητα αποτελούνταν από ANME-1 Archaea και από την περιοχή Hydrate Ridge όπου η in situ θερμοκρασία ήταν κατά τέσσερις βαθμοί γαμηλότερη και η μεθανιότροφη κοινότητα αποτελούνταν από ANME-2/DSS συσσωματώματα, η in vitro επώαση σε διαφορετικές θερμοκρασίες αποκάλυψε ότι υπήρξε διαφοροποίηση στη δραστηριότητα των διαφορετικών μεθανιότροφων οργανισμών. Η κοινότητα ΑΝΜΕ-2 ήταν περισσότερο ενεργή σε χαμηλές θερμοκρασίες (4-16°C) ενώ η κοινότητα των ΑΝΜΕ-1, σε πολύ υψηλότερες που κυμαίνονταν μεταξύ 16 και 24°C (Nauhaus et al., 2005). Αυτή η διαφορά στην ΑΟΜ δραστηριότητα θα μπορούσε να είναι ένας λόγος της στρωμάτωσης των διαφορετικών ομάδων ΑΝΜΕ μέσα στο ίζημα. Στα ίδια δείγματα μελετήθηκε η επίδραση της πίεσης στις δύο αυτές διαφορετικές κοινότητες των ΑΝΜΕ. Η αύξηση της πίεσης από τη 1atm στις 11 atm, στις κοινότητες των ANME-2, βρέθηκε ότι προκάλεσε αύξηση της αναγωγής των θειικών κατά πέντε φορές (Nauhaus et al., 2002), ενώ στις κοινότητες των ANME-1, κατά δύο φορές (Nauhaus et al., 2005). Η αύξηση της πίεσης αυξάνει τη διάλυση του μεθανίου στο νερό, κι επομένως τη συγκέντρωση του διαθέσιμου μεθανίου στο ίζημα και κατά συνέπεια και την AOM. Ειδικά για τα ιζήματα από την περιοχή Hydrate Ridge, με την κοινότατα των ANME-1 έχει βρεθεί ότι η ΑΟΜ είναι συνδεδεμένη με την αναγωγή των θειικών σε μια αναλογία 1:1 (Nauhaus et al, 2002). Επομένως, αντίστοιχη με την αύξηση στο ρυθμό αναγωγής των θειικών αναμένεται να είναι και η αύξηση της AOM, αυξανόμενης της πίεσης.

Ένας ακόμη παράγοντας που ενδέχεται να επηρεάζει την επικράτηση μιας ομάδας ANME σε μια περιοχή, είναι το οξυγόνο. Τα ANME-1 έχει θεωρηθεί ότι είναι πιο ευαίσθητα στο οξυγόνο σε σχέση με τα ANME-2. Στα μόνιμα ανοξικά ύδατα της Μαύρης Θάλασσας, στις αποικίες των μικροοργανισμών που συλλέχθηκαν από τις ανθρακικές αποθέσεις τα ANME-1 Archaea ήταν η αποκλειστική ομάδα αναερόβιων μεθανιότροφων που ανιχνεύθηκε ενώ αντίθετα στα ιζήματα από την περιοχή Hydrate Ridge, όπου στα επιφανειακά στρώματα υπάρχει εισροή οξυγόνου, τα ANME-1 κύτταρα είχαν πολύ χαμηλή συγκέντρωση στην επιφάνεια και η συγκέντρωσή τους βρέθηκε ότι αυξάνονταν με το βάθος (Knittel *et al.*, 2005).

3.3 Συνθήκες που ελέγχουν την ΑΟΜ

Ο ρυθμός της AOM και το βάθος στο οποίο είναι δυνατόν να συμβαίνει, επηρεάζεται από αρκετούς περιβαλλοντικούς παράγοντες, κυρίως την παροχή μεθανίου από τα βαθύτερα στρώματα, αλλά και την εισροή θειικών ιόντων από την υδάτινη στήλη. Άλλοι παράγοντες μπορεί να είναι η θερμοκρασία και η ενδεχόμενη εισροή οξυγόνου μέσα στο ίζημα.

Παροχή μεθανίου και θειικών ιόντων – Το μεθάνιο ανεβαίνει από τα βαθύτερα στρώματα του ιζήματος προς την επιφάνεια είτε μέσω διάχυσης σαν αποτέλεσμα αποικοδόμησης της οργανικής ύλης στα βαθύτερα στρώματα είτε παρασυρόμενο από την εκλυόμενη ροή, πάνω από αναβλύσεις υδρογονανθράκων και μεθανίου, καθώς και πάνω από ζώνες σχηματισμού υδριτών. Στα περισσότερα θαλάσσια ιζήματα η οξείδωση της οργανικής ύλης είναι η κύρια διεργασία που ελέγχει τη συγκέντρωση των θειικών ιόντων του πορώδους του ιζήματος ενώ στα πλούσια σε μεθάνιο ιζήματα, η AOM είναι η διεργασία που ελέγχει τη διαβάθμιση της συγκέντρωσης των θειικών ιόντων του πορώδους του ιζήματος ενώ στα πλούσια σε μεθάνιο ιζήματα, η AOM είναι η διεργασία που ελέγχει τη διαβάθμιση της συγκέντρωσης των θειικών ιόντων (Borowski *et al.*, 2000) και όταν υπάρχουν διαθέσιμα θειικά ιόντα, η έκλυση του μεθανίου από το ίζημα ελέγχεται από τις μικροβιακές κοινότητες υπεύθυνες για την AOM (Krüger *et al.*, 2005). Στα πλούσια σε μεθάνιο ιζήματα, μεγάλες συγκεντρώσεις μεθανίου που παρασύρονται με την ανοδική ροή, παρέχουν άφθονο μεθάνιο για την AOM και ο ρυθμός AOM σε τέτοια ιζήματα μπορεί να είναι πολλές τάξεις μεγέθους μεγαλύτερος σε σχέση με τα τυπικά θαλάσσια ιζήματα όπου το μεθάνιο μεταφέρεται μέσω διάχυσης (Valentine, 2002).

Η εκλυόμενη ροή, θεωρείται ένας κύριος παράγοντας που ελέγχει τη διαθεσιμότητα των δεκτών ηλεκτρονίων και την κατανομή και δραστηριότητα των μεθανιότροφων

μικροοργανισμών (Niemann *et al.*, 2006). Η κατανάλωση των θειικών ιόντων σε ιζήματα που περιέχουν μεθάνιο επηρεάζεται από το ρυθμό εναπόθεσης της οργανικής ύλης και τη ροή του μεθανίου από τα βαθύτερα επίπεδα του ιζήματος, δημιουργώντας έτσι ποικιλία στην κλίση του προφίλ μείωσης των θειικών σε βάθος, το οποίο μεταφέρει την ζώνη AOM σε βαθύτερα ή ρηχότερα επίπεδα στο ίζημα (Borowski, 1996, Borowski, 1999, Valentine, 2002). Κατά κανόνα, ένα προφίλ βάθους θειικών ιόντων με απότομη κλίση, συνδέεται με υψηλή ροή μεθανίου από τα βαθύτερα επίπεδα, μέχρι το επίπεδο που ιζήματος. Το μεθάνιο ανεβαίνει από τα βαθύτερα επίπεδα, μέχρι το επίπεδο που συναντάει τα θειικά ιόντα. Αν το προφίλ βάθους των θειικών και των άλλων διαλυμένων στοιχείων είναι γραμμικό, τότε υπάρχει μια σταθερή κατάσταση η οποία μπορεί να οφείλεται στο ότι το διαλυμένο μεθάνιο συνδέεται με υδρίτες μεθανίου σε βαθύτερα στρώματα (Εικόνα 1.1) (Borowski *et al.*, 1996).

Το περιεχόμενο σε οργανική ουσία ενός ιζήματος είναι ένας παράγοντας που επηρεάζει το βάθος εμφάνισης της ΑΟΜ, καθώς και την εισροή οξειδωτικών συστατικών από το θαλασσινό νερό. Στα ιζήματα με υψηλό περιεχόμενο σε οργανική ουσία η κατανάλωση των οξειδωτικών συμβαίνει κοντά στην διεπιφάνεια ιζήματοςνερού σε σχέση με εκείνα με χαμηλό περιεχόμενο σε οργανική ουσία (Valentine 2002). Το βάθος μέσα στο ίζημα στο οποίο η αναγωγή των θειικών δίνει τη θέση της στη μεθανιογένεση αναφέρεται ως «μεταβατική ζώνη θειικών ιόντων/μεθανίου» και είναι το βάθος όπου το μεθάνιο από τα βαθύτερα στρώματα συναντά για πρώτη φορά τα θειικά ιόντα. Η μεταβατική ζώνη όπου η αναγωγή των θειικών δίνει τη θέση της στη μεθανιογένεση θεωρείται ότι βρίσκεται στο βάθος που το ίζημα περιέχει < 1mM θειικά ιόντα και είναι το βάθος όπου συμβαίνει η AOM (Hoehler et al., 1996, Borowski et al., 2000). Το βάθος όπου χωρίζεται η μεθανιογένεση από την οξείδωση είναι περισσότερο μια μεταβατική ζώνη παρά μια ξεχωριστή ζώνη, όπου στα θαλάσσια ιζήματα η μέγιστη δραστηριότητα της μεθανιογένεσης και της οξείδωσης μπορεί να βρίσκονται σε απόσταση μερικών δεκάδων εκατοστών μεταξύ τους (Whiticar 1999). Το μεθάνιο καταναλώνεται πλήρως στη μεταβατική ζώνη θειικών ιόντων/μεθανίου η οποία μπορεί να εντοπίζεται λίγα εκατοστά μέχρι και δεκάδες μέτρα κάτω από το θαλάσσιο πυθμένα (Knittel and Boetius, 2009).



Εικόνα 1.1 Σχηματική απεικόνιση όπου φαίνεται πώς η ανοδική ροή του μεθανίου ελέγχει τα προφίλ βάθους των θειικών ιόντων και τη ζώνη εξάντλησης των θειικών ιόντων. Το τυπικό προφίλ βάθους στα ιζήματα είναι καμπύλη με τα κοίλα προς τα πάνω και απεικονίζει την αναγωγή των θειικών της *in situ* οργανικής ύλης του ιζήματος (Α). Τα γραμμικά προφίλ βάθους των θειικών της *in situ* οργανικής ύλης του ιζήματος (Α). Τα γραμμικά προφίλ βάθους των θειικών της *in situ* οργανικής ύλης του ιζήματος (Α). Και προφίλ βάθους των θεικών της *in situ* οργανικής ύλης του ιζήματος (Α). Τα γραμμικά προφίλ βάθους των θεικών (Β και Γ), δηλώνουν ότι η κατανάλωση των θεικών οφείλεται κυρίως στην ανοδική διάχυση του μεθανίου παρά στην ροή της οργανικής ύλης στο ίζημα, και η ζώνη εξάντλησης των θεικών εμφανίζεται σε πιο ρηχό βάθος από ότι στα τυπικά ιζήματα. (Σχήμα προσαρμοσμένο από Borowski *et al.*, 1996)

Η μεταβατική ζώνη θειικών ιόντων/μεθανίου συνδέεται συχνά με την ΑΟΜ που πραγματοποιείται με τη μεσολάβηση της συμβιωτικής σχέσης μεταξύ των Archaea που οξειδώνουν το μεθάνιο και θειικοαναγωγικων Bacteria (Harrison *et al.*, 2009). Η ΑΟΜ μπορεί να εμφανίζει μέγιστη τιμή στη ζώνη αυτή, όπως παρατηρήθηκε σε τυπικά θαλάσσια ιζήματα, όπου μέγιστη ΑΟΜ μετρήθηκε σε βάθος 1-2m μέσα στο ίζημα, όπου κάτω από τη ζώνη εισροής θειικών ιόντων η συγκέντρωση του μεθανίου παρουσίασε αύξηση (>1mM) σε σχέση με τα ανώτερα επίπεδα του ιζήματος (Iversen and Jørgensen 1985). Σε περιοχές με υψηλή ροή έκλυσης μεθανίου και υψηλή συγκέντρωση σε οργανική ουσία η ΑΟΜ μπορεί να είναι εκτεταμένη σε μια μεγάλη ζώνη μέσα στο ίζημα, όπου παράλληλα συμβαίνει και αναγωγή των θειικών ιόντων. Απουσία μεταβατικής ζώνης θειικών ιόντων/ μεθανίου ως αποτέλεσμα της δυναμικής εκλυόμενης ροής παρατηρήθηκε σε ιζήματα πάνω από ενεργές πηγές διαφυγής στην

Καλιφόρνια όπου υψηλές συγκεντρώσεις μεθανίου αλλά και θειικών ιόντων συνυπήρχαν στα ανώτερα 10cm του ιζήματος (Orphan *et al.*, 2001). Εκτεταμένη AOM σε μεγάλο βάθος μέσα στο ίζημα παρατηρήθηκε και σε ιζήματα πλούσια σε οργανική ουσία με πολύ υψηλές συγκεντρώσεις βιογενούς μεθανίου, στον Κολπο Eckernförde, στη Βαλτική (Treude *et al.*, 2005) αλλά και στα μόνιμα ανοξικά ιζήματα από τη Μαύρη Θάλασσα, όπου το μεθάνιο το οποίο προέρχεται από την αποικοδόμηση της οργανικής ύλης σε βαθύτερα στρώματα του ιζήματος μεταφέρεται προς την επιφάνεια με διάχυση (Knab *et al.*, 2009).

Η υψηλή ανοδική ροή από το βάθος του ιζήματος μπορεί να θεωρηθεί ότι εμπλουτίζει το ίζημα με μεθάνιο και επιδρά θετικά στην ανάπτυξη των μικροβιακών κοινοτήτων που χρησιμοποιούν το μεθάνιο. Έχει παρατηρηθεί θετική συσχέτιση μεταξύ της διαθεσιμότητας του μεθανίου και της αφθονίας των υπεύθυνων για την ΑΟΜ συσσωματωμάτων, και συνεπώς και στο ρυθμό της ΑΟΜ. Μεγαλύτερη κυτταρική αφθονία παρατηρήθηκε σε περιοχές με μεγάλη ροή μεθανίου στην μεταβατική ζώνη θειικών ιόντων/μεθανίου (Treude et al, 2005). Υψηλοί ρυθμοί AOM και αναγωγής θειικών παρατηρήθηκαν σε ιζήματα που εμφάνιζαν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μεθανίου σε σχέση με ιζήματα με χαμηλότερες συγκεντρώσεις (Joye et al., 2004). Σε in vitro πειράματα σε ιζήματα που ανακτήθηκαν πάνω από τη ζώνη υδριτών και από πηγές διαφυγής αερίων παρατηρήθηκε ότι ο ρυθμός AOM ήταν υψηλότερος στις ενεργές περιοχές, και 10 με 100 φορές χαμηλότερος στις περιοχές εκτός των πηγών διαφυγής μεθανίου (ανενεργές περιογές) και αυτό θεωρήθηκε ότι οφειλόταν στο γεγονός ότι τα ιζήματα από τις διαφορετικές αυτές περιοχές περιείχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις βιομάζας (Krüger et al., 2005). Στο ίδιο πείραμα, που διεξήχθη σε ατμοσφαιρική πίεση, παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του μεθανίου από 1 στα 15mM αύξησε σημαντικά το ρυθμό AOM σε σχέση με ιζήματα με χαμηλότερες in situ συγκεντρώσεις σε μεθάνιο, ενώ χαμηλή δραστηριότητα της AOM παρατηρήθηκε και σε ιζήματα από περιοχή αναφοράς αλλά μετά από 40 μέρες επώαση σε συγκέντρωση μεθανίου 15mM.

Οι κοινότητες μικροοργανισμών που καλύπτουν συχνά τις εξόδους διαφυγής αερίων, εκμεταλλευόμενες τα θρεπτικά συστατικά που εκλύονται, είναι δυνατό να επηρεάσουν το βάθος εμφάνισης της ΑΟΜ. Σε περιοχές με υψηλή εκλυόμενη ροή καλυμμένες με υδρόθειο-οξειδωτικά Bacteria του γένους *Beggiatoa*, παρατηρήθηκε αυξημένη δραστηριότητα ΑΟΜ πολύ ρηχά μέσα στο ίζημα, σε βάθος 0-3cm, ακριβώς κάτω από τις αποικίες. Στο βάθος αυτό η συγκέντρωση του μεθανίου ήταν πολύ

υψηλή (6,5mM), καθώς οι αποικίες των *Beggiatoa* δημιουργούσαν ένα λιγότερο διαπερατό κάλυμμα του πυθμένα, εγκλωβίζοντας το μεθάνιο (Orphan *et al.*, 2004). Στην ίδια περιοχή, σε δείγματα από ίζημα καλυμμένο με αποικίες των μυδιών *Calyptogena pacifica*, παρατηρήθηκε ότι λόγω της βιοαναμόχλευσης μέχρι και στα 10cm βάθος υπήρχε εισροή θειικών ιόντων βαθύτερα μέσα στο ίζημα και η AOM παρατηρήθηκε αμέσως κάτω από τη ζώνη αυτή.

Όμως, σε πολύ υψηλές ροές αναβλύσεων, είναι δυνατόν να υπάρξει αρνητική επίδραση στις μικροβιακές κοινότητες και κατά συνέπεια στην AOM. Οι φορτισμένες σε μεθάνιο αναβλύσεις υψηλής ροής είναι φτωχές σε δέκτες ηλεκτρονίων και δημιουργούν μια αρνητική σχέση μεταξύ της ροής έκλυσης και της ανάπτυξης των μεθανιότροφων μικροοργανισμών. Επιπλέον, οι αναβλύσεις είναι δυνατό να μεταφέρουν και θερμότητα από τα βαθύτερα στρώματα επηρεάζοντας αρνητικά το σχηματισμό υδριτών. Η περίπτωση αυτή παρατηρήθηκε στο ηφαίστειο ιλύος Haakon Mosby, όπου διαπιστώθηκε ότι η αποτελεσματικότητα των μεθανιότροφων μικροοργανισμών φίλτρο στο εκλυόμενο μεθάνιο, μειώνονταν σημαντικά σε ροές >0,4 m yr⁻¹, προκαλώντας εκροή του μεθανίου στην υδρόσφαιρα (Niemann *et al.*, 2006).

Θερμοκρασία – Οι μεταβολές στη θερμοκρασία έχει βρεθεί ότι επηρεάζουν το βάθος εμφάνισης της AOM, κυρίως στα ιζήματα σε ρηχά ύδατα. Σε ιζήματα πλούσια σε βιογενές μεθάνιο που ανακτήθηκαν από βάθος 28m, από την παράκτια περιοχή Eckernförde, στη Βαλτική, η AOM βρέθηκε ότι συνέβαινε πιο ρηχά μέσα στο ίζημα σε χαμηλές θερμοκρασίες στα τέλη φθινοπώρου σε σχέση με τις ζεστές θερμοκρασίες την Άνοιζη (Treude *et al.*, 2005). Το βάθος της AOM όσο και ο ρυθμός της βρέθηκε ότι επηρεάζεται από την εισροή οζυγόνου, την εισροή θειικών ιόντων που επηρεάζει την κατά βάθος κατανομή της AOM, τη θερμοκρασία που ελέγχει το ρυθμό της AOM και την παροχή μεθανίου λόγω διάχυσης ή μέσω εκλυόμενων φυσαλίδων που μπορεί να προκαλεί σταθερούς ή κυμαινόμενους ρυθμούς κατανάλωσης μεθανίου. Οι περισσότεροι από αυτούς τους παράγοντες, εξαρτώνται από εποχιακές αλλαγές, όπως η θερμοκρασία, η στρωμάτωση του νερού, η πρωτογενής παραγωγή, και οι διεργασίες μικροβιακής αποικοδόμησης, που προκαλούν σε μια ρηχή ζώνη AOM κατά τη διάρκεια του ζεστού, παραγωγικού καλοκαιριού και μια βαθύτερη ζώνη AOM κατά τη διάρκεια του κρύου χειμώνα. Οξυγόνο - Στα επιφανειακά στρώματα του ιζήματος είναι δυνατόν να εισέρχεται οξυγόνο από το θαλασσινό νερό, κι αυτό εξαρτάται από την εκλυόμενη ροή από τα βαθύτερα στρώματα. Σε συνθήκες χαμηλής έκλυσης οξυγόνο είναι δυνατόν να εισέρχεται μέσα στο ίζημα, ενώ αυτό μπορεί να μην συμβαίνει σε μεγαλύτερες ροές. Πολύ μεγάλη όμως ή απότομη εκλυόμενη ροή μπορεί να προκαλέσει αναμόχλευση του ιζήματος. Αναμόγλευση του ιζήματος όμως είναι δυνατό να συμβεί από μακροβενθικές συναθροίσεις ή αποικίες άλλων οργανισμών (μύδια, σωληνοσκώληκες κλπ) που μπορεί να ενδημούν στην επιφάνεια του ιζήματος. Στο ενεργό κέντρο του ηφαιστείου Haakon Mosby, σε ιζήματα από πρόσφατη έκλυση ιλύος, ανιχνεύθηκαν στην επιφάνεια αερόβιοι μεθανιότροφοι μικροοργανισμοί, λόγω εισροής οξυγόνου στο ανώτατο 1cm ενώ δεν ανιχνεύθηκαν αναερόβιοι μεθανιότροφοι μικροοργανισμοί (Niemann et al., 2006). Στο ηφαίστειο ιλύος Kazan στα ανώτερα στρώματα του ιζήματος σε βάθος 0-6cm, ανακτήθηκαν φυλότυποι που σχετίζονται με αερόβιους μεθυλότροφους μικροοργανισμούς, αλλά κανένας φυλότυπος που να σχετίζεται με αναερόβιους μεθανιότροφους μικροοργανισμούς (Heijs et al., 2008). Τόσο τα ANME όσο και τα θειικοαναγωγικά Bacteria που συμβιώνουν με αυτά δεν ανέγονται το οξυγόνο και τα ΑΝΜΕ δεν έχουν ποτέ εντοπιστεί σε ιζήματα όπου υπάρχει εισροή οξυγόνου από το θαλασσινό νερό (Knittel and Boetius, 2009) και μάλιστα έχει παρατηρηθεί ότι τα ANME-1 είναι περισσότερο ευαίσθητα στο οξυγόνο, σε σχέση με τα ANME-2 (Knittel et al., 2005).

3.4 Εναλλακτικοί μηχανισμοί ΑΟΜ

Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις που υποδηλώνουν ότι η AOM συνδέεται με την αναγωγή των θειικών ιόντων και αν και οι υπεύθυνοι μικροοργανισμοί για τη διεργασία αυτή δεν έχουν μέχρι σήμερα απομονωθεί, έχουν προκύψει αρκετά δεδομένα γι αυτούς, τόσο για τις φυλογενετικές τους τη φυλογενετική τους σχέση, όσο και για τις οικολογικές τους απαιτήσεις. Το βιοχημικό μονοπάτι όμως της AOM συνδεδεμένης με την αναγωγή των θειικών παραμένει άγνωστο.

Η ΑΟΜ σε σύνδεση με την αναγωγή θειικών ιόντων έχει μελετηθεί εκτεταμένα εξαιτίας της αφθονίας θειικών ιόντων στο θαλάσσιο περιβάλλον αλλά άλλοι δέκτες ηλεκτρονίων, περισσότερο ευνοϊκοί ενεργειακά από ότι τα θειικά ιόντα, θα μπορούσαν να συμμετέχουν στην AOM (Caldwell *et al.*, 2008). Σε ιζήματα γλυκού νερού κορεσμένα σε μεθάνιο και με υψηλή συγκέντρωση νιτρικών, υπήρξαν ενδείξεις ότι η AOM συμβαίνει απουσία θειικών ιόντων, με τη μεσολάβηση νιτρικών και

Εισαγωγή

νιτρωδών ιόντων (Raghoebarsing et al., 2006). Οι αναλύσεις λιπιδιακών βιοδεικτών σε συνδυασμό με την τεχνική FISH, σε καλλιέργειες εμπλουτισμού από τα ιζήματα αυτά, αποκάλυψαν την ύπαρξη ενός συσσωματώματος αποτελούμενο από Archaea και Bacteria, το οποίο θεωρήθηκε ότι μεσολαβούσε στην οξείδωση του μεθανίου με παράλληλη απονιτροποίηση, κάτω από ανοξικές συνθήκες. Τα Archaea βρέθηκε ότι σχετίζονταν απομακρυσμένα με τα ANME-2 και με είδη του γένους Methanosaeta, ενώ τα Bacteria σχετίζονταν απομακρυσμένα με το Aquiflex pyrophilus και με φυλότυπους μη καλλιεργούμενων Bacteria. Όπως διαπιστώθηκε όμως αργότερα (Ettwig et al., 2008), η μακρά επώαση της ίδιας καλλιέργειας εμπλουτισμού σε αντιδραστήρα συνεχούς καλλιέργειας για 22 μήνες, παρουσία νιτρικών και νιτρωδών ιόντων, είχε σαν αποτέλεσμα τη σταδιακή εξαφάνιση των Archaea τα οποία απουσίαζαν πλήρως από τις μετρήσεις FISH μετά από 15 μήνες, ενώ μετά από διάρκεια 22 μηνών, αποδείχθηκε ότι η κατανάλωση του μεθανίου με ταυτόχρονη αναγωγή νιτρικών και νιτρωδών ιόντων συνέβαινε απουσία οξυγόνου, αποκλειστικά από Bacteria. Η πειραματική απόδειξη της αναερόβιας οξείδωσης του μεθανίου συνδεδεμένης με αναγωγή νιτρικών και νιτρωδών ιόντων είναι σημαντική, καθώς μεγάλες ποσότητες νιτρικών και νιτρωδών ιόντων καταλήγουν από γεωργικές καλλιέργειες σε χερσαία ιζήματα ή ιζήματα γλυκού νερού πλούσια σε μεθάνιο εξαιτίας αναερόβιας αποικοδόμησης.

Η συντροφική σχέση των ANME-2 με τα θειικοαναγωγικά Bacteria *Desulfosarcina/ Desulfococcus* βρέθηκε ότι μπορεί να μεσολαβήσει και στην αζωτοδέσμευση (Dekas *et al.*, 2009). Σε ιζήματα από ενεργές πηγές διαφυγής μεθανίου παρατηρήθηκε μετά από *in vitro* επώαση ότι τα ANME-2 μπορούσαν να οξειδώσουν το μεθάνιο δεσμεύοντας το άζωτο, μόνο όμως μέσω της λειτουργικής συμβίωσης τους με τα DSS κύτταρα.

Δύο ακόμα δέκτες ηλεκτρονίων χρησιμοποιήθηκαν σε *in vitro* πειράματα για τη μελέτη εναλλακτικών μηχανισμών της AOM σε θαλάσσια ιζήματα. Δείγματα ιζήματος πλούσια σε μεθάνιο από την περιοχή Eel River Basin επωάστηκαν σε διαφορετικά πειράματα με οξείδιο του μαγγανίου και υδροξείδιο του σιδήρου και βρέθηκε ότι απουσία θειικών ιόντων συνέβαινε AOM εξαρτώμενη από το μαγγάνιο και το σίδηρο, αλλά συνέβαινε σε πολύ χαμηλότερο ρυθμό από ότι όταν ήταν συνδεδεμένη με την αναγωγή των θειικών ιόντων. Η AOM που εξαρτάται από το μαγγάνιο, βρέθηκε ότι συμβαίνει σε ταχύτερους ρυθμούς από στην Fe-AOM. Οι εμπλεκόμενοι στην Mn-AOM μικροοργανισμοί είτε είναι Archaea που ανήκουν στα

ANME-1 και ANME-3 μαζί με κάποιο σύντροφο που ανήκει στα Bacteria, είτε για τη διεργασία αυτή είναι υπεύθυνα μόνο Bacteria χωρίς την εμπλοκή κάποιου αντιπροσώπου από τα Archaea (Beal *et al.*, 2009). Οι παραπάνω ενδείξεις ανοίγουν ένα παράθυρο για την πιθανή ύπαρξη εναλλακτικών μηχανισμών με τους οποίους μπορεί να πραγματοποιείται η AOM, που μέχρι σήμερα δεν έχουν αναγνωριστεί.

Κεφάλαιο 2 - Υλικά & Μέθοδοι

1. Περιγραφή της περιοχής που μελετήθηκε

1.1 Υποθαλάσσια όρη Αναξίμανδρου

Τα υποθαλάσσια όρη Αναξίμανδρου βρίσκονται στο σημείο συνάντησης του Ελληνικού και του Κυπριακού τόξου και σχηματίζουν ένα έντονο ανάγλυφο στο θαλάσσιο πυθμένα. Στα δυτικά συνορεύουν με την Λεκάνη της Ρόδου με μέγιστο βάθος ~ 4485m, στα βόρεια με τη Λεκάνη της Φοινίκης (~3000m βάθος) και στα ανατολικά με την Λεκάνη της Αντάλια (Antalya Basin) με βάθος ~2600 m (Woodside 1997, ten Veen 2004a). Τα όρη Αναξίμανδρου οριοθετούνται από το Ανατολικό άκρο της Μεσογειακής Ράχης και από την Ανύψωση Florence (Florence Rise) και από την ανατολική συνέχεια της τάφρου Strabo (Strabo Trench) (Woodside *et al.*, 1997) (Εικόνα 2.1.1). Η μελέτη των πετρωμάτων που αναλύθηκαν μετά από δειγματοληψίες ιζήματος από την περιοχή, αποκάλυψαν ότι τα όρη του Αναξίμανδρου σχετίζονται με τα πετρώματα από τις περιοχές Susuz Dag-Bey Daglari και Antalya Nappes Complex της νότιας Τουρκίας (Woodside *et al.*, 1997).



Εικόνα 2.1.1 Γεωτεκτονικός χάρτης της Ανατολικής Μεσογείου. ΑΜ=Όρη Αναξίμανδρου, RB= Λεκάνη της Ρόδου, AB= Λεκάνη Antalya, FR=Ανύψωση Florence. Με τα λευκά βέλη σημειώνονται η σχετική κίνηση των λιθοσφαιρικών πλακών με ρυθμό mm/yr. (Σχήμα από Zitter *et al.* 2005a).

Τα όρη Αναξίμανδρου σχηματίζουν μια ομάδα υπερυψωμένων σχηματισμών που προεξέχουν περίπου 2 km από το τριγύρω θαλάσσιο πυθμένα. Αποτελούνται από τρία διακριτά όρη που ονομάζονται Αναξίμανδρος (sensu stricto) στα δυτικά, Αναξιμένης προς τα νότια-κεντρικά και Αναξαγόρας στα ανατολικά, ενώ υπάρχουν και πολλοί μικρότεροι σχηματισμοί κοντά τους. Το όνομα της ομάδας αυτής των ορέων είναι ίδιο με το όνομα του μεγαλύτερου όρους από τα τρία, που είναι και το πρώτο που ανακαλύφθηκε. (Woodside *et al.*, 1997, ten Veen *et al.*, 2004) (Εικόνα 2.1.2).



Εικόνα 2.1.2 Βαθυμετρικός χάρτης της περιοχής των υποθαλάσσιων ορέων Αναξίμανδρου που ανακτήθηκε κατά τη διάρκεια της πολυδεσμικής σάρωσης (multibeam survey) με το Ερευνητικό σκάφος L'Atalante (Woodside *et al.*, 1997, 1998). Η περιοχή που περικλείεται στο κόκκινο πλαίσιο μελετήθηκε λεπτομερώς με πολυδεσμική επισκόπηση, με το Ερευνητικό Σκάφος ΑΙΓΑΙΟ κατά τη διάρκεια των πλόων που πραγματοποιήθηκαν για το πρόγραμμα Anaximander. (Σχήμα από Lykousis *et al.*, 2009).

Το όρος Αναξίμανδρος (sensu stricto), αντιπροσωπεύει μια απότομη ασύμμετρη ανύψωση του θαλάσσιου πυθμένα, με μια κορυφογραμμή κατά μήκος του νότιου σχηματισμού του σε βάθος 1250m από την επιφάνεια της θάλασσας. Το όρος Αναξιμένης καταλαμβάνει τη μικρότερη έκταση, αλλά εμφανίζει εντονότερο ανάγλυφο. Σχηματίζει μια κορυφογραμμή κοίλη, που υψώνεται μέχρι και τα 680m από την επιφάνεια της θάλασσας. Στο όρος Αναξαγόρας, η κορυφή του σχηματίζεται στο βόρειο-κεντρικό τμήμα του όρους, και είναι μια επίπεδη περιοχή σε βάθος 930m από την επιφάνεια της θάλασσας (Woodside *et al.*, 1997) (Εικόνα 2.1.2)

Περισσότερα από 30 ηφαίστεια ιλύος έχουν αναγνωριστεί στην ευρύτερη περιοχή των ορέων Αναξίμανδρου και κατά μήκος της Ανύψωσης Florence και εντοπίζονται κυρίως στο όρος Αναξαγόρας και στα νότια του όρους Αναξιμένης (Zitter 2005a). Τα ηφαίστεια ιλύος που έχουν αναγνωριστεί στα όρη του Αναξίμανδρου παρουσιάζουν μεγάλη γεωλογική και γεωφυσική ποικιλομορφία. Προηγούμενες μελέτες είχαν αναδείξει τα ηφαίστεια ιλύος Amsterdam, Kazan, Kula, Tuzlukush, Saint Ouen l'Aumône και San Remo τα περισσότερα από τα οποία βρίσκονται στο όρος Αναξαγόρας (Woodside *et al.*, 1997, Zitter *et al.*, 2005a, Zitter *et al.*, 2005b).



Εικόνα 2.1.3 Λεπτομερής απεικόνιση της πολυδεσμικής σάρωσης στην περιοχή που διερευνήθηκε για το πρόγραμμα ANAXIMANDER. Προσδιορίζεται η σχετική θέση των τριών γνωστών (Amsterdam, Kazan, Kula) και των δύο νέων ηφαιστείων ιλύος (Athina, Thessaloniki) (Lykousis *et al.*, 2009)

Με εξαίρεση το ηφαίστειο ιλύος Amsterdam, τα υπόλοιπα έχουν περίπου το ίδιο μέγεθος με ύψος μεταξύ 50-100m και περίπου 1km διάμετρο. Εμφανίζουν όμως διαφορετικές μορφολογίες που μπορεί να είναι απόλυτα κυκλικοί σχηματισμοί ή ακανόνιστοι λοφίσκοι, με επίπεδη ή κωνική κορυφή και παρουσιάζουν και διαφορετικές ταυτότητες επανασκέδασης, δηλαδή βρίσκονται σε διαφορετική

Υλικά & Μέθοδοι

κατάσταση ενεργοποίησης (Zitter *et al.*, 2005b). Λεπτομερείς πολυδεσμικές, ιζηματολογικές και γεωφυσικές επισκοπήσεις, παρείχαν επαρκή δεδομένα που επιβεβαιώνουν ότι τα όρη Αναξίμανδρου είναι μια περιοχή με ενεργά ηφαίστεια ιλύος και παρουσία υδριτών υδογονανθράκων. Στη βόρεια, βορειοδυτική πλευρά του ηφαιστείου Amsterdam, σε μια έκταση 15x15km εντοπίστηκαν περισσότερα από 25 λοφίσκοι που πιθανόν είναι ηφαίστεια ιλύος ενώ δύο νέα ηφαίστεια ιλύος εντοπίστηκαν κατά τη διάρκεια ερευνητικών αποστολών το 2003 και το 2004 και ονομάστηκαν αντίστοιχα Athina και Thessaloniki (Εικόνα 2.1.3) (Lykousis *et al.*, 2004, Lykousis *et al.*, 2009).

1.2 Γεωμορφολόγια των Ηφαιστείων ιλύος που μελετήθηκαν

1.2.1 Ηφαίστειο ιλύος Amsterdam

Το ηφαίστειο ιλύος Amsterdam είναι το μεγαλύτερο ηφαίστειο ιλύος στην περιοχή των ορέων Αναξίμανδρου και εντοπίζεται στη νότια πλευρά του όρους Αναξιμένης (Εικόνα 2.1.3). Η επιφάνειά του αποτελείται από μια σειρά ομόκεντρων κορυφογραμμών με ανύψωση περίπου 10m (Woodside *et al.*, 1997), που μεταφράζεται σαν μια μάλλον ομόκεντρη οργάνωση της ηφαιστειακής δραστηριότητας στην κορυφή του (Zitter *et al.*, 2005b).

Έχει σχήμα κυκλικού λόφου, που εκτείνεται σε μια επιφάνεια περίπου 6km². Η κορυφή του είναι επίπεδη και εντοπίζεται σε βάθος 2025m από την επιφάνεια της θάλασσας. Στην περιφέρειά του, σχηματίζεται μια καταβύθιση του θαλάσσιου πυθμένα, σχηματίζοντας μια τάφρο στα βόρεια, βάθους 50m. Δύο ημικυκλικοί κρατήρες διακρίνονται, ο «εξωτερικός», που είναι παλαιότερος και ο «εσωτερικός», που είναι νεώτερος, και ενώνονται στα νοτιοανατολικά, με διαστάσεις 6x5km και 4x3,3km αντίστοιχα. Οι δύο κρατήρες είναι ανοικτοί στο νοτιότερο τμήμα τους και ενώνονται στην πλαγιά στο νοτιότερο τμήμα του ηφαιστείου με ένα φαρδύ φαράγγι (400m) που εκτείνεται σε βάθος 2250m (Εικόνα 2.1.4). Το κέντρο του κρατήρα είναι ενεργό και η εκλυόμενη ιλύς φαίνεται ότι κινήθηκε προς τα κάτω στην νότια πλαγιά μέσω του φαραγγιού, ενώ μια παλαιότερη λατυποπαγής λάσπη (mud breccia) καλυμμένη τώρα με λεπτό στρώμα πελαγικού ιζήματος, φαίνεται ότι είχε εκλυθεί προς τα βορειοανατολικά, αποτέλεσμα πιθανόν μιας παλαιότερης έκρηξης στον εξωτερικό κρατήρα (Lykousis *et al.*, 2009).

Το ηφαίστειο ιλύος Amsterdam είναι μια ενεργή περιοχή μεγάλης ροής έκλυσης μεθανίου. Μεγάλες συγκεντρώσεις μεθανίου έχουν μετρηθεί στην υδάτινη στήλη

Υλικά & Μέθοδοι

πάνω από αυτό, όπου μετρήθηκε συγκέντρωση μεθανίου 2000 nmmol/kg πολύ κοντά στο θαλάσσιο πυθμένα και μεταξύ 56-602 nmol/kg πάνω από το ηφαίστειο. Το νέφος του μεθανίου ανιχνεύθηκε σε ένα ύψος 200m πάνω από το ηφαίστειο (Charlou et al., 2003). Στην επιφάνεια του ηφαιστείου βρέθηκε ότι φιλοξενούνται χημειοσυνθετικοί οργανισμοί που σχετίζονται με περιοχές συσσώρευσης μεθανίου και ιζήματα πλούσια σε υδρόθειο (Olu-Le Roy et al., 2004) και έχει παρατηρηθεί ότι καλύπτεται σε μεγάλη έκταση στην κορυφή του από στρώματα ανθρακίτη που υποδηλώνει εκτεταμένη διάχυση αερίων από την εκλυόμενη λάσπη (Zitter et al., 2005b). Η ύπαρξη των υδριτών έχει βρεθεί ότι είναι εκτεταμένη στο ηφαίστειο αυτό. Οι υδρίτες που έχουν ανακτηθεί, είχαν μορφή συμπαγών κρυστάλλων και εντοπίστηκαν σχετικά ρηχά μέσα στο ίζημα (0,3-1,5m από τον πυθμένα), όπου ήταν τυχαία κατανεμημένοι με διάμετρο από 0,3 μέχρι 0,8cm (~ όσο το μέγεθος της διατομής του σωλήνα δειγματοληψίας). Σε όλους τους πυρήνες που ανακτήθηκαν, σε βάθος κάτω από 10-20 cm, το ίζημα είχε μια τυπική μορφή ιζημάτων που περιέχουν μεγάλες ποσότητες αερίου μεθανίου, καθώς κατά το άνοιγμα των πυρήνων παρατηρήθηκαν κενές κοιλότητες μέσα στο ίζημα, ένδειξη αερίου που απελευθερώθηκε (Lykousis et al., 2009).



Εικόνα 2.1.4 Τρισδιάστατη απεικόνιση του ανάγλυφου των ηφαιστείων ιλύος Amsterdam, Kazan, Kula και Thessaloniki. (Lykousis *et al.*, 2009).

1.2.2 Ηφαίστειο ιλύος Kazan

Το ηφαίστειο ιλύος Kazan, είναι ένας απομονωμένος λόφος ύψους 50m, που εντοπίζεται στο άκρο ενός σγετικά επίπεδου πεδίου, σε μέσο βάθος θαλάσσης περίπου 1750m. Βρίσκεται στη νότια πλευρά του όρους Αναξαγόρας και ανατολικά ενός μεγάλου ρήγματος με προσανατολισμό ΒΔ-ΝΑ που γωρίζει το όρος Αναξιμένης από το όρος Αναξαγόρας (Εικόνα 2.1.3). Είναι ένας ελλειψοειδής σχηματισμός επιφάνειας 0,6x0,9km, που προσανατολίζεται στην κατεύθυνση βορά-νότου. Φαίνεται να περιβάλλεται από μια περιοχή καταβύθισης (Εικόνα 2.1.4). Έντονη επανασκέδαση παρατηρήθηκε στην κορυφή του ηφαιστείου που δηλώνει την ενεργή περιοχή του, ενώ παρατηρήθηκε έκλυση ιλύος από το κέντρο προς τα βόρεια (Lykousis et al., 2009). Το ηφαίστειο αυτό, διανύει μια μακρά περίοδο ενεργοποίησης, όπως φαίνεται από την υποβρύχια παρατήρηση σχηματισμών ανθρακίτη (Aloisi et al., 2000, Aloisi et al., 2002, Zitter et al., 2005b) και από την παρουσία γημειοσυνθετικών οργανισμών (δίθυρα, πωγωνοφόρα) (Olu-Le Roy et al., 2004) ενώ σε δείγματα που ελήφθησαν στη στήλη ύδατος πάνω από το κέντρο του ηφαιστείου Kazan, ανιχνεύθηκε μεθάνιο σε συγκέντρωση (8,9-149 nmol/ kg) (Charlou et al., 2003). Από το ηφαίστειο αυτό, για πρώτη φορά συλλέγθηκαν υδρίτες με τη δειγματοληψία ιζήματος κατά τη διάρκεια της ερευνητικής αποστολής του προγράμματος ANAXIMANDER. Οι κρύσταλλοι που εντοπίστηκαν, είχαν μορφή ρυζιού μεγέθους μερικών χιλιοστών, και ήταν ομοιόμορφα κατανεμημένοι στο ίζημα σε βάθος κάτω από τα 30cm από τον θαλάσσιο πυθμένα. (Lykousis et al., 2009).

1.2.3 Ηφαίστειο ιλύος Kula

Το ηφαίστειο ιλύος Kula βρίσκεται στο βορειότερο τμήμα του όρους Αναξαγόρας σε βάθος ~1650m (Εικόνα 2.1.3). Είναι ένας κυκλικός λόφος ύψους περίπου 100m και διαμέτρου περίπου 1km (Woodside *et al.*, 1997) (Εικόνα 2.1.4). Η διερεύνηση της περιοχής με το σύστημα σεισμικής ανάλυσης τύπου Air-gun αποκάλυψε κάτω από την επιφάνεια του πυθμένα 3-4 κωνικά επίπεδα ανάκλασης που αντιπροσωπεύουν θαμμένα ηφαίστεια ιλύος ή κέντρα έκρηξης (Lykousis *et al.*, 2009) Το ηφαίστειο ιλύος Kula, φαίνεται ότι έχει ενεργοποιηθεί ξανά μετά από μια περίοδο «λήθαργου» και η πρόσφατη ενεργοποίησή του περιορίζεται πολύ στενά στην κορυφή του (Woodside *et al.*, 1997, Zitter *et al.*, 2005b, Lykousis *et al.*, 2009). Η μελέτη των

Υλικά & Μέθοδοι

στρωμάτων του ιζήματος υποδηλώνει μια ενεργοποίηση του ηφαιστείου κάθε 5-10kyrs (Lykousis *et al.*, 2009).

Στην υδάτινη στήλη πάνω από το Kula, καταμετρήθηκαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις μεθανίου σε σχέση με το Amsterdam και το Kazan που κυμαίνονται μεταξύ 1,1-39 nmol/kg, ενώ η συνήθης συγκέντρωση υπόβαθρου (background concentration) μεθανίου στη θαλάσσια περιοχή θεωρείται ότι κυμαίνεται μεταξύ 0,8-0,9 nmol/kg (Charlou *et al.*, 2003). Στον πυθμένα του ηφαιστείου ιλύος Kula δεν έχουν παρατηρηθεί οι τυπικές εκτεταμένες δομές ανθρακιτών (ομόκεντρες πλάκες ή σκουρόχρωμοι συμπαγείς λοφοειδείς σχηματισμοί), που υποδηλώνουν διαχρονικές ζώνες συσσώρευσης μεθανίου και η μόνη πηγή έκλυσης μεθανίου προέρχεται από τη διάχυση μεθανίου μέσω της εκλυόμενης ιλύος όπως υποδηλώνεται από την παρουσία λεπτών στρώσεων ανθρακίτη. Αυτό δε σημαίνει ότι το ηφαίστειο Kula είναι λιγότερο ενεργό αλλά θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι οι συσσωρεύσεις αερίων είναι νεότερες (Zitter *et al.*, 2005b). Εξάλλου, πωγωνοφόρα του γένους *Lamellibranchia* sp., που έχουν βρεθεί σε άλλες περιοχές έκλυσης ή συσσώρευσης μεθανίου, εντοπίστηκαν στην κορυφή του ηφαιστείου αυτού (Olu-Le Roy *et al.*, 2004).

Το ηφαίστειο ιλύος Kula ήταν το πρώτο ηφαίστειο ιλύος της Μεσογείου στο οποίο το 1996 κατά τη δειγματοληψία ιζήματος βρέθηκαν υδρίτες, ενώ δείγματα ιζήματος από την ενεργή περιοχή του βρέθηκαν κορεσμένα σε μεθάνιο (Woodside *et al.*, 1997), οι οποίοι εντοπίστηκαν και κατά τη διάρκεια μεταγενέστερων αποστολών (Olu-Le Roy *et al.*, 2004).

1.2.4 Ηφαίστειο ιλύος Thessaloniki

Το Thessaloniki βρίσκεται στην νοτιοανατολική πλαγιά του όρους Αναξιμένης (Εικόνα 1.4), σε βάθος 1260m, και είναι το ρηχότερο ηφαίστειο ιλύος από τις ενεργές περιοχές της Μεσογείου, στα όρια της ζώνης σταθεροποίησης των υδριτών όπως προκύπτει από την πίεση (12,9Mpa στα 1265m βάθος) και τη θερμοκρασία στον πυθμένα (~ 14°C). Είναι ένας ελλειψοειδής λόφος με ακτίνα περίπου 1,5km, με απότομες πλαγιές στα βόρεια και ανατολικά και καταλαμβάνει μια έκταση 1,67 km². Κοντά στην κορυφή του, γίνεται περισσότερο κυκλικό και αναγνωρίζονται τρεις κορυφές, οι δύο στα δυτικά και σε βάθος 1260m και μια στα ανατολικά, σε βάθος 1265m (Εικόνα 1.5) (Lykousis *et al.*, 2009, Perissoratis 2011). Το Thessaloniki είναι το τέταρτο ηφαίστειο ιλύος στο οποίο εντοπίστηκαν υδρίτες στην Ανατολική Μεσόγειο. Οι υδρίτες ήταν διασκορπισμένοι μέσα στο ίζημα ως μικροί 'βώλοι' ή

νιφάδες. Τα ιζήματα είχαν δομή ρευστοποιημένης ιλύος, με πολύ υψηλό περιεχόμενο σε νερό και ήταν πλούσια σε μεθάνιο και μικρούς κρυστάλλους υδριτών, μια δομή που δεν έχει παρατηρηθεί ξανά στα ηφαίστεια ιλύος εντός της Ευρώπης και υποδηλώνει φρέσκια έκλυση ιλύος και πρόσφατη ενεργοποίηση (Lykousis *et al.*, 2009).

Υλικά & Μέθοδοι

2. Δειγματοληψία

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, ανακτήθηκαν κατά τη διάρκεια της δεύτερης ερευνητικής αποστολής του Ευρωπαϊκού προγράμματος ANAXIMANDER (EC CONTRACT EVK3-CT-2002-00068), στην περιοχή των υποθαλάσσιων ορέων Αναξίμανδρου, που έλαβε χώρα τον Οκτώβριο-Νοέμβριο του 2004 με το ωκεανογραφικό σκάφος ΑΙΓΑΙΟ (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε)

Τα δείγματα ιζήματος που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, συλλέχθηκαν από πυρήνες που ανακτήθηκαν είτε με κλασσικές τεχνικές πυρηνοληψίας (πυρήνας βαρύτητας και κιβώτιο πυρήνας), είτε με τεχνικές πυρηνοληψίας που παρείχαν τη δυνατότητα διατήρησης της *in situ* πίεσης του πυρήνα (APCA-Autoclave Piston Corer Anaximander, MAC-Multi Autoclave Corer) και περιγράφονται αναλυτικά στις παραγράφους που ακολουθούν.

Οι πυρήνες επιλέχθηκαν από τα ηφαίστεια ιλύος Amsterdam, Kazan, Kula και Thessaloniki, από ενεργές περιοχές των ηφαιστείων ιλύος. Η ένδειξη ότι ο πυρήνας προέρχεται από ενεργή περιογή προήλθε από τον εντοπισμό υδριτών, από ένδειξη 'βρασμού' του ιζήματος, λόγω έκλυσης εγκλωβισμένων αερίων ή διάλυσης των υδριτών, από την έντονη μυρωδιά υδρόθειου ή την παρουσία χαρακτηριστικών κενών κοιλοτήτων εντός του ιζήματος, που υποδηλώνουν εγκλωβισμένα αέρια ή υδρίτες που διαλύθηκαν κατά την ανάκτηση του πυρήνα. Συνολικά συλλέχθηκαν δείγματα από 20 πυρήνες. Οι 19 από τους πυρήνες ανακτήθηκαν από περιοχές ηφαιστείων ιλύος, ενώ ένας από αυτούς τους πυρήνες ήταν σαπροπηλός (AX12GC1). Από τους πυρήνες αυτούς συνολικά μελετήθηκαν οι 16, οι 13 πυρήνες με τη μέθοδο DAPI-FISH ενώ από 9 πυρήνες ανακτήθηκαν δείγματα για τις αναερόβιες καλλιέργειες. Οι πυρήνες ονομάστηκαν με το πρόθεμα ΑΧ, και ακολουθεί η συντόμευση GC για τον πυρήνα βαρύτητας (gravity core), BC για το κιβώτιο πυρήνα (box core), AP για τον πυρήνα τύπου APCA και MA για τον πυρήνα τύπου MAC. Ο αριθμός στο τέλος υποδηλώνει τον αριθμό των πυρήνων που ανακτήθηκαν με την ίδια τεχνική από την ίδια περιοχή, πχ AX02GC2 που δηλώνει το δεύτερο πυρήνα βαρύτητας που ανακτήθηκε από την περιογή ΑΧ02.

Οι συνήθεις τεχνικές συλλογής μικρού βάθους πυρήνα ιζήματος (< 2m), είναι ο πυρήνας βαρύτητας και ο πυρήνας τύπου κιβώτιο. Με τους πυρηνοσυλλέκτες αυτούς, το ίζημα που συλλέγεται, αποσυμπιέζεται αργά, όσο διαρκεί η ανάκτηση του πυρηνοσυλλέκτη στο κατάστρωμα. Πέρα από τις δύο αυτές τεχνικές λήψης πυρήνα,

δείγματα ανακτήθηκαν και από πυρηνοσυλλέκτες ειδικά κατασκευασμένους να διατηρούν την *in situ* πίεση του ιζήματος (~200bar), οι οποίοι αποσυμπιέζονται μετά την ανάκτησή τους στο κατάστρωμα.

Πυρηνοσυλλέκτης Βαρύτητας (Gravity core) Πρόκειται για ένα μεταλλικό σωλήνα, που βυθίζεται στο νερό με τη βοήθεια της βαρύτητας και συνήθως με την προσάρτηση κάποιων επιπλέον βοηθητικών βαρών στην περίπτωση που πρέπει να ποντιστεί σε μεγάλα βάθη, ώστε να πέσει όσο το δυνατόν γίνεται κάθετα υπερνικώντας τα ρεύματα του νερού. Το άκρο του πυρηνοσυλλέκτη κλείνει όταν ο πυρήνας τραβηχτεί προς τα πάνω και δεν αφήνει το ίζημα να διαφύγει (Εικόνα 2.2.1α). Το ίζημα αποσυμπιέζεται αργά, και για όσο διαρκεί η ανέλκυση του πυρήνα, όπου για τα βάθη από τα οποία ανακτήθηκαν πυρήνες για την παρούσα εργασία (1260-2030m) η διάρκεια αποσυμπίεσης ήταν ~30-40min.

Κιβώτιο πυρήνας (box core) Πρόκειται για μια μεταλλική κατασκευή κυβικού σχήματος (40x40x60 cm) που στο κάτω άκρο της φέρει κλείστρο, το οποίο παραμένει ανοικτό σε όλη τη διάρκεια της βύθισης του πυρηνοσυλλέκτη στο νερό, εισχωρεί κατόπιν στο ίζημα και όταν ξεκινήσει η ανέλκυσή του, κλείνει παγιδεύοντας το ίζημα εντός του κουτιού (Εικόνα 2.2.1β). Το ίζημα αποσυμπιέζεται αργά, και για όσο διαρκεί η ανέλκυση του πυρήνα, που για τα συγκεκριμένα βάθη ήταν ~30-40min.



Εικόνα 2.2.1 Κλασσικοί πυρηνοσυλλέκτες α. Πυρήνας βαρύτητας και β. Κιβώτιο πυρήνας

Μηχανισμός αυτόματου πυρηνοσυλλέκτη με έμβολο υπό πίεση – Autoclave Piston Corer Anaximander (APCA) Οι εκτιμήσεις της ποσότητας του μεθανίου που υπάρχει στο ίζημα, ελεύθερου, διαλυμένου είτε δεσμευμένου με τη μορφή υδριτών, παρουσιάζουν διακυμάνσεις, καθώς κατά την ανάκτηση των πυρήνων από τον πυθμένα, αυτοί υπόκεινται σε σταδιακή αποσυμπίεση και ποσότητα αερίου χάνεται κατά την ανάκτηση με κλασσικές μεθόδους λήψης πυρήνων. Ο μηχανισμός πυρηνοληψίας APCA (Automatic Piston Corer) είναι μια συσκευή εξοπλισμένη με ένα θάλαμο πίεσης και δίνει τη δυνατότητα λήψης δειγμάτων από την επιφάνεια του ιζήματος και σε βάθος μέχρι 2.3 m, σε βάθος νερού περίπου 2000 m. Με αυτόν τον τρόπο, διατηρώντας την *in situ* πίεση, μπορεί να μετρηθεί η συγκέντρωση του *in situ* μεθανίου καθώς και των αερίων που περικλείονται σε υδρίτες, σε πυρήνες από βάθη ιζήματος που επηρεάζονται από τις αλλαγές πίεσης και θερμοκρασίας (Heeschen et al, 2006).

Ο πυρηνοσυλλέκτης αυτός, διατηρεί την *in situ* πίεση μέχρι να αποφασιστεί η διαδικασία αποσυμπίεσής του, που μπορεί να διαρκέσει αρκετές ώρες, κατά τη διάρκεια της οποίας γίνεται εκτίμηση της ποσότητας των περιεχόμενων αερίων και κατόπιν ανοίγεται, όπου υπάρχει η δυνατότητα λήψης δειγμάτων ιζήματος (Εικόνα 2.2.2α).



Εικόνα 2.2.2 Πυρηνοσυλλέκτες με δυνατότητα διατήρησης της *in situ* πίεσης. α. Πυρηνοσυλλέκτης τύπου APCA και β. Πυρηνοσυλλέκτης τύπου MAC

Υλικά & Μέθοδοι

Πολλαπλός αυτόματος πυρηνοσυλλέκτης υπό πίεση – Multi Autoclave Corer (MAC) Με την ίδια λογική που κατασκευάστηκε ο πυρηνοσυλλέκτης APCA, έχει κατασκευαστεί και ο πυρηνοσυλλέκτης MAC. Ο πολλαπλός μηχανισμός αυτόματης λήψης πυρήνων υπό πίεση MAC (Multy-Autoclave Corer), είναι μια συσκευή ειδικά σχεδιασμένη με δυνατότητα ταυτόχρονης συλλογής 1-4 πυρήνων ιζήματος, ανεξάρτητων μεταξύ τους. Το μέγιστο μήκος κάθε πυρήνα είναι 100 cm. Οι πυρηνοσυλλέκτες που προσαρμόζονται στο μηχανισμό αυτό, είναι κατάλληλα φτιαγμένοι ώστε τη στιγμή της δειγματοληψίας να σφραγίζουν τον πυρήνα με τέτοιο τρόπο ώστε να διατηρείται η *in situ* πίεση που υπάρχει στον πυθμένα. Ο κάθε πυρηνοσυλλέκτης λειτουργεί αυτόνομα και φέρει μανόμετρο που καταδεικνύει την εσωτερική πίεση του ιζήματος (Εικόνα 2.2.2β). Η αποσυμπίεσή του μπορεί να είναι λαμβάνονται άμεσα τα δείγματα.

Προκειμένου να εξασφαλισθεί η λήψη δειγμάτων σε σύντομο χρονικό διάστημα από την ανάκτηση των πυρήνων, χρησιμοποιήθηκε μεγάλη ταχύτητα στον γερανό ανέλκυσης, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η διάρκεια της ανάκτησης. Έτσι ο συνολικός χρόνος από τη στιγμή που ξεκινούσε η είσοδος του πυρηνοσυλλέκτη στο ίζημα μέχρι το άνοιγμα του πυρήνα ιζήματος στο κατάστρωμα διαρκούσε περίπου 35-45 λεπτά για τα συγκεκριμένα βάθη από τα οποία ανακτήθηκαν οι πυρήνες (Lykousis 2009). Με αυτόν τον τρόπο ήταν δυνατό να εντοπιστούν υδρίτες οι οποίοι διαλύονται κατά την ανάκτηση των πυρήνων, λόγω μεταβολής των συνθηκών σχηματισμού τους, αλλά και να ληφθούν δείγματα για τη μικροβιακή μελέτη, σε σύντομο χρονικό διάστημα.

Για τη λήψη πυρήνα ιζήματος από τον πυρηνοσυλλέκτη τύπου κιβώτιο, χρησιμοποιήθηκε πλαστικός σωλήνας διαμέτρου ~10cm. Στον πλαστικό αυτό σωλήνα, είχαν ανοιχθεί προηγουμένως οπές ανά 6 cm απόσταση κατά μήκος του ίδιου άξονα, οι οποίες στη συνέχεια καλύφθηκαν με πλαστική ταινία. Στον ίδιο πυρήνα είχαν ανοιχθεί επίσης οπές σε δύο ακόμα διαφορετικούς άξονες, για λήψη δειγμάτων για γεωχημικές και μοριακές αναλύσεις, από διαφορετικούς ορίζοντες ιζήματος (Εικόνα 2.2.3). Αμέσως μετά την ανάκτηση του κιβωτίου τοποθετήθηκε ο σωλήνας μέσα στο ίζημα και όταν το κιβώτιο άνοιξε και απομακρύνθηκε το ίζημα που περιέβαλε το σωλήνα, παρέμεινε ένας πυρήνας αδιατάρακτου ιζήματος. Μετά την απομάκρυνση του αδιατάρακτου πυρήνα ιζήματος από το δειγματολήπτη τύπου

κιβώτιο, απομακρύνθηκε η ταινία από τις οπές και συλλέχθηκαν τα δείγματα, από διαφορετικά βάθη ιζήματος.



Εικόνα 2.2.3 Σχηματική απεικόνιση του σωλήνα που χρησιμοποιήθηκε για τη δειγματοληψία από τον πυρηνοσυλλέκτη τύπου κιβώτιο. Στο σωλήνα είχαν προηγουμένως ανοιχθεί οπές ανά 5cm βάθος για δειγματοληψία με σύριγγα του 1ml (6cm απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών δειγμάτων) για τα δείγματα ιζήματος που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, ενώ είχαν ανοιχθεί οπές για δειγματοληψία με σύριγγες των 10ml από διαφορετικούς άξονες, για γεωχημικές και μοριακές αναλύσεις.

(Σχήμα προσαρμοσμένο από Kormas et al., 2008)

Προκειμένου να ληφθεί ο πυρήνας ιζήματος από το εσωτερικό του πυρηνολήπτη βαρύτητας, αλλά και των πυρήνων τύπου APCA και MAC, πλαστικός σωλήνας διαμέτρου ~10 cm και μήκους ~ 3m, είχε τοποθετηθεί στο εσωτερικό τους, πριν τον οπλισμό τους. Ο σωλήνας είχε προηγουμένως διαιρεθεί κατά μήκος στα δύο και επανακολληθεί με πλαστική ταινία. Έτσι μετά την ανάκτηση των πυρήνων, απομακρύνονταν ο πλαστικός σωλήνας και με τη βοήθεια μαχαιριού διαιρούταν κατά μήκος στα δύο. Αμέσως ακολουθούσε η λήψη των δειγμάτων του ιζήματος.

2.1 Λήψη δειγμάτων

Η λήψη των υπό-δειγμάτων ιζήματος έγινε αμέσως μετά το άνοιγμα των πυρήνων στο κατάστρωμα, είτε από τους κλασσικούς πυρηνολήπτες που ανοίγονταν άμεσα μετά την ανάκτησή τους, είτε από τους πυρηνολήπτες υπό πίεση, που ανοίγονταν μετά από αποσυμπίεσή τους. Για τη δειγματοληψία χρησιμοποιήθηκαν σύριγγες μιας χρήσης των 5 ml, στις οποίες είχε απομακρυνθεί το κάτω άκρο. Προκειμένου να αποφευχθεί επιμόλυνση του δείγματος, μετά τη λήψη του δείγματος από τον πυρήνα το άκρο που

είχε έρθει σε επαφή με τον αέρα έπρεπε να απομακρυνθεί. Άμεσα από τη λήψη δείγματος, ακολουθήθηκε η προετοιμασία των δειγμάτων για την τεχνική FISH και η δημιουργία καλλιεργειών εμπλουτισμού.

A. Amsterdam

Από το ηφαίστειο ιλύος Amsterdam, επιλέχθηκαν πυρήνες που ανακτήθηκαν με τις τέσσερις διαφορετικές μεθόδους πυρηνοληψίας που περιγράφηκαν παραπάνω. Συλλέχθηκαν δείγματα από δέκα συνολικά πυρήνες, οι έξι από τους οποίος από την ίδια περιοχή (Πίνακα 2.2.1).

Από την περιοχή ΑΧ02, συλλέχθηκαν δείγματα από 6 πυρήνες, που ανακτήθηκαν με τις τέσσερις διαφορετικές τεχνικές λήψης πυρήνα, ώστε να μελετηθεί εάν υπάρχει επίδραση της διάρκειας αποσυμπίεσης του πυρήνα στην κυτταρική αφθονία, στα συσσωματώματα των κυττάρων και στη βιωσιμότητα των μικροοργανισμών. Ανακτήθηκε, ένας πυρήνας βαρύτητας, ένας πυρήνας κιβώτιο, τρεις πυρήνες τύπου ΑΡCA κι ένας τύπου MAC. Σε όλους τους πυρήνες που ανοίχθηκαν άμεσα μετά την ανάκτησή τους στο κατάστρωμα εντοπίστηκαν υδρίτες. Στον πυρηνοσυλλέκτη τύπου κιβώτιο, όταν ανοίχθηκε στο κατάστρωμα παρατηρήθηκε ότι το ίζημα «έβραζε», απελευθερώνοντας αέριο, ένδειξη εγκλωβισμένου αερίου και διάλυσης των περιεχόμενων υδριτών. Στον πυρήνα βαρύτητας ΑΧ02GC2 μήκους 94cm, κατά το άνοιγμά του εντοπίστηκαν πολλοί μικροί υδρίτες μεγέθους ρυζιού, είχε έντονη οσμή υδρόθειου, και το ίζημα ήταν πολύ υδαρές εξαιτίας της διάλυσης των υδριτών. Συλλέχθηκε ένα δείγμα από βάθος ~35cm, στη ζώνη που εντοπίστηκαν οι υδρίτες.

Τρεις πυρήνες τύπου APCA ανακτήθηκαν. Ο AX02AP1 ανακτήθηκε με χαμηλή πίεση (~10-12bar), αποσυμπιέστηκε και ανοίχθηκε άμεσα, όπου εντοπίστηκε μεγάλος υδρίτης σε μέγεθος αμυγδάλου σε βάθος 40-45cm. Από τον πυρήνα αυτό συλλέχθηκε ένα δείγμα από βάθος ~30cm. Ο AX02AP2, ανακτήθηκε με πίεση 160bar και χρησιμοποιήθηκε για μέτρηση των περιεχόμενων αερίων. Η διαδικασία αυτή κράτησε ~13h, ενώ τα δείγματα συλλέχθηκαν 2h αργότερα, όταν άνοιξε ο πυρήνας. Ο AX02AP4 ανακτήθηκε με πίεση 135bar. Υποβλήθηκε άμεσα σε αποσυμπίεση η οποία είχε διάρκεια 10-15min. Μετά την αποσυμπίεση, κατά το άνοιγμα του πυρήνα λόγω εγκλωβισμένου αερίου, ο πυρήνας αποδιοργανώθηκε κι έτσι συλλέχθηκε δείγμα από απροσδιόριστο βάθος. Περιείχε πολλούς υδρίτες μεγέθους ρυζιού.

Ο πυρήνας τύπου MAC AX02MA2, ανακτήθηκε με χαμηλή πίεση (~15 bar). Συμπιέστηκε στο κατάστρωμα ώστε να διορθωθεί πιθανή διαρροή του μηχανισμού MAC και στη συνέχεια υποβλήθηκε σε απαέρωση διάρκειας ~ 90min. Όταν ανοίχθηκε συλλέχθηκαν δύο δείγματα, από το επιφανειακό και το βαθύτερο στρώμα.

Πίνακας 2.2.1	Δειγματοληψία	από το	ηφαίστειο	ιλύος	Amsterdam,	για	DAPI-FISH	και
καλλιέργειες εμ	πλουτισμού, σε α	ατμοσφα	αρική πίεση	και σε	δοχεία πίεση	ς		

Όνομα πυρήνα	Μήκος	Βάθη υπό-	DAPI-	Καλλιέργειες		
Συντεταγμένες Βάθος υδάτινης στήλης	πυρήνα (cm)	(cm)	ГІЗП	1 atm	Δοχεία πίεσης	
AX02GC2 φ 35 ⁰ 20'002, λ 30 ⁰ 16'265 2030m	94	35	+	+	+	
AX02BC1 φ 35 ⁰ 20'001, λ 30 ⁰ 16'276 2030m	48	2 8 14 20 26 32 38 44	+ + + + + + + + + + + + + + + + + + + +			
AX02AP1 φ 35 ⁰ 20'000, λ 30 ⁰ 16'272, 2030m	70	30	+			
AX02AP2 φ 35 ⁰ 20'000, λ 30 ⁰ 16'275, 2030m	~ 46	άγνωστο (~20??)	+	+	+	
AX02AP4 φ 35 ⁰ 20'000, λ 30 ⁰ 16'273 2024m	άγνωστο	άγνωστο	+	+	+	
AX02MA2 φ 35 ⁰ 20'000, λ 30 ⁰ 16'275 2030m	20	2 20	+ +			
AX06GC1 φ 35 ⁰ 18'113, λ 30 ⁰ 16'693 2236m	152	2 50 100 148	+++++++++++++++++++++++++++++++++++++++	+ + + +		
AX08GC1 φ 35 ⁰ 19'751, λ 30 ⁰ 16'344 2026m	100	2 50 100	+ + +			
AX09GC1 φ 35 ⁰ 19'999, λ 30 ⁰ 16'449 2022m	95	2 32 63 95	++++++			
AX11GC1 φ 35 ⁰ 20'100, λ 30 ⁰ 16'390 2025m	114	2 38 76 114	+ + + + +	++++		

Από το πεδίο AX06 ανακτήθηκε ένας πυρήνας βαρύτητας (AX06GC1) ο οποίος είχε μεγάλο μήκος (1,52m). Στον πυρήνα αυτό, υπήρχε ένδειξη 'βρασμού' στο κάτω μέρος του. Από το πεδίο AX08 ανακτήθηκε ένας πυρήνας βαρύτητας, χωρίς κάποια

ένδειξη παρουσίας υδριτών μεθανίου. Από την περιοχή AX09 του ηφαιστείου Amsterdam ανακτήθηκε ένας πυρήνας βαρύτητας, ο AX09GC1. Ο πυρήνας αυτός όταν ανοίχθηκε στο κατάστρωμα 'έβραζε', ένδειξη αποδιοργάνωσης των περιεχόμενων υδριτών, ενώ εντοπίστηκαν υδρίτες σε μεγέθους ρυζιού.

B. Kazan

Από το ηφαίστειο ιλύος Kazan, μελετήθηκαν τρεις πυρήνες, δύο πυρήνες βαρύτητας κι ένας πυρήνας τύπου APCA. Από τους πυρήνες αυτούς ο πυρήνας βαρύτητας AX19GC1 χρησιμοποιήθηκε για δειγματοληψία τόσο για εκτίμηση της κυτταρικής αφθονίας, όσο και για αναερόβιες καλλιέργειες (Πίνακας 2.2.2):

Όνομα πυρήνα	μήκος	Βάθη υπό- δεινμάτων	DAPI- FISH	Καλλιέργειες		
Συντεταγμένες Βάθος υδάτινης στήλης	πυρήνα (cm)	(cm)	11511	1 atm	Δοχεία πίεσης	
A.V.10001	110	2	+	+		
AX19GC1		37	+	+		
φ 55 25 912, λ 50 55 691		73	+	+		
1095111		110	+	+	+	
	98	2	+			
AX21AP1		34	+			
φ 35°25'902, λ 30°33'659		66	+			
109011		98	+			
	150	2	+			
AX23GC1		39	+			
φ 35 ⁰ 25'874, λ 30 ⁰ 33'640,		76	+			
1692m		93	+			
		150	+			

Πίνακας 2.2.2 Δειγματοληψία από το ηφαίστειο ιλύος Kazan, για DAPI-FISH και καλλιέργειες εμπλουτισμού, σε ατμοσφαιρική πίεση και σε δοχεία πίεσης

Στον πυρήνα βαρύτητας AX19GC1 εντοπίστηκαν μικροί υδρίτες μεγέθους ρυζιού διάσπαρτοι μέσα στο ίζημα και είχε μυρωδιά υδρόθειου. Ο AX23GC1, επιλέχθηκε λόγω του μεγάλου μήκους του (150m) για δημιουργία προφίλ βάθους της κυτταρικής αφθονίας. Όταν ανοίχθηκε, παρατηρήθηκαν διάσπαρτοι μέσα στο ίζημα πολλοί υδρίτες μεγέθους ρυζιού, στα βαθύτερα στρώματά του. Ο πυρήνας τύπου APCA AX21AP1 επιλέχθηκε για σύγκριση με τους πυρήνες βαρύτητας. Ανακτήθηκε με πίεση 150 bar, και η αποσυμπίεσή του διήρκεσε περίπου 5h προκειμένου να εκτιμηθεί η συγκέντρωση των περιεχόμενων αερίων, ενώ τα δείγματα συλλέχθηκαν 12h αργότερα, όταν ανοίχθηκε ο πυρήνας.
Г. Kula

Από το ηφαίστειο ιλύος Kula, δεν ανακτήθηκε κανένας πυρήνας με υδρίτες. Ένας πυρήνας επιλέχθηκε για εκτίμηση της κυτταρικής αφθονίας (Πίνακας 2.2.3).

Πίνακας 2.2.3 Δειγματοληψία από το ηφαίστειο ιλύος Kula, για DAPI-FISH και καλλιέργειες εμπλουτισμού, σε ατμοσφαιρική πίεση και σε δοχεία πίεσης

Όνομα πυρήνα	μήκος	Βάθη υπό- δεινμάτων	DAPI- FISH	Καλλι	έργειες
συντεταγμένες Βάθος υδάτινης στήλης	πυρήνα	ήνα (cm)	TISH	1 atm	Δοχεία πίεσης
		2	+		
AX28GC1		32	+		
φ 35 ⁰ 43'731, λ 30 ⁰ 27'500	128cm	64	+		
1630m		96	+		
		128	+		

Ο πυρήνας βαρύτητας AX28GC1 μήκους 128 είχε έντονη μυρωδιά υδρόθειου όταν ανοίχθηκε στο κατάστρωμα, στα βαθύτερα στρώματά του περίπου >64 cm. Στην επιφάνειά του ήταν καλυμμένος με ανοιχτού χρώματος ίζημα, ένδειξη οξείδωσης. Ο πυρήνας δηλαδή ανακτήθηκε από περιοχή με παλαιότερη έκλυση ιλύος.

∆. Thessaloniki

Από το νέο αυτό ηφαίστειο ιλύος επιλέχθηκαν δύο πυρήνες βαρύτητας για δειγματοληψία για DAPI-FISH και αναερόβιες. Στον παρακάτω Πίνακα 2.2.4 περιγράφεται η περιοχή δειγματοληψίας και τα βάθη δείγματος για τις δύο τεχνικές.

Πίνακας 2.2.4 Δειγματοληψία από το ηφαίστειο ιλύος Thessaloniki, για DAPI-FISH και καλλιέργειες εμπλουτισμού, σε ατμοσφαιρική πίεση και σε δοχεία πίεσης

Όνομα πυρήνα	μήκος	Βάθη υπό- δεινιμάτεον	DAPI- FISH	Καλλιέργειες				
συντεταγμένες Βάθος υδάτινης στήλης	πυρήνα (cm)	(cm)	FISH	1 atm	Δοχεία πίεσης			
AX47GC1 φ 35 ⁰ 28'562, λ 30 ⁰ 15'123 1265m		5	+					
	165	60	+					
	105	100	+	+				
		165	+	+				
AX48GC1 35 ⁰ 28'729, 30 ⁰ 15'052 1264m		5	+					
	120	30	+	+	Δοχεία πίεσης			
	150	80	+	+				
		125	+	+				

Και οι δύο πυρήνες ανακτήθηκαν από περιοχή του ηφαιστείου με ενεργή έκλυση ιλύος. Στον πυρήνα AX47GC1 μια ζώνη γύρω στα 100 cm είχε έντονα μαύρο χρώμα, ενώ η ζώνη κοντά στα 60 cm είχε έντονη οσμή υδρόθειου, ενώ δεν βρέθηκαν υδρίτες. Στον πυρήνα AX48GC1, εντοπίστηκε μεγάλος υδρίτης στο κάτω μέρος. Η επιφάνειά του καλύπτονταν από οξειδωμένο ίζημα, που υποδηλώνει ότι ανακτήθηκε από περιοχή παλαιότερης έκλυσης ιλύος.

Ε. Σαπροπηλός

Ένας πυρήνας ανακτήθηκε με σαπροπηλικό ίζημα, από την ευρύτερη περιοχή του ηφαιστείου Amsterdam από βάθος 2120m. Ο πυρήνας είχε μήκος 263cm (Πίνακας 2.2.5)

Πίνακας	2.2.5	Δειγματοληψία	από	σαπροπηλό,	για	DAPI-FISH	και	καλλιέργειες
εμπλουτισ	μού, σε	: ατμοσφαιρική πί	εση κ	αι σε δοχεία πί	έσης			

Όνομα πυρήνα	μήκος	Βάθη υπό-	Βάθη υπό- DAPI- δεινιμάτων FISH		Καλλιέργειες	
συντεταγμένες Βάθος υδάτινης στήλης	πυρήνα (cm)	$\begin{array}{c c} \pi \upsilon \rho \eta v \alpha \\ (cm) \end{array} \begin{array}{c c} \sigma \upsilon \rho \eta v \alpha \\ (cm) \end{array}$	F 1511	1 atm	Δοχεία πίεσης	
AX12GC1 φ 35 ⁰ 19'545, λ 30 ⁰ 13'885 2120m		5	+			
	263	5-24	+			
		24-39	+			
		39-137	+			
		137-140	-			
		140-200	+	+		
		200-207	+			
		207-234	+			
		234-263	+			

Γεωχημικά δεδομένα

Για τους πυρήνες AX02BC1 και AX09GC1 υπάρχουν διαθέσιμα γεωχημικά δεδομένα μετά από προσωπική επικοινωνία με τον Gert de Lange, υπεύθυνος των γεωχημικών αναλύσεων για το πρόγραμμα ANAXIMANDER (Utrecht University, Faculty of Geosciences – Geochemistry). Για τους υπόλοιπους πυρήνες, πληροφορίες για το γεωχημικό χαρακτήρα των ιζημάτων προέκυψαν από τα αποτελέσματα του προγράμματος ANAXIMANDER (EC CONTRACT EVK3-CT-2002-00068).

3. Ολική κυτταρική αφθονία και εφαρμογή της τεχνικής FISH

3.1 Φθορίζων επιτόπιος υβριδισμός (Fluorescence *in situ* hybridization –FISH), σε φίλτρα μεμβράνης

Ο φθορίζων επιτόπιος υβριδισμός (FISH) με τη χρήση rRNA-ανιχνευτών, είναι μια τεχνική χρώσης, ανεξάρτητη από καλλιεργητικές τεχνικές και επιτρέπει την ταυτοποίηση προκαρυωτικών κυττάρων βάση της αλληλουχίας του 16S rRNA γονιδίου, σε μικτές κοινότητες με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού και/ή συνεστιακής μικροσκοπίας (confocal laser scanning microscopy) ή κυτταρομετρίας ροής (flow cytometry). (Amann *et al.*, 1995, Pernthaler *et al.*, 2001). Σε σύνθετες μικροβιακές κοινότητες, η τεχνική FISH είναι ένα εργαλείο που παρέχει πληροφορίες για το εντοπισμό των κυττάρων στόχων στο φυσικό τους περιβάλλον, παρέχοντας πληροφορίες για τις ιδιαίτερες οικολογικές απαιτήσεις ενός πληθυσμού (Amann *et al.*, 2000).

Οι περιορισμοί που μπορεί να προκύψουν θεωρητικά κατά την εφαρμογή της μεθόδου αφορούν το κύτταρο στόχο. Έτσι, η αλληλουχία του rRNA- μπορεί να είναι πολύ συντηρητική για να διαχωρίσει πληθυσμούς που σχετίζονται στενά. Αντίστροφα, μπορεί κάποιοι άγνωστοι μικροοργανισμοί να ανήκουν στην ομάδα των κυττάρων-στόχων αλλά να μην περιέχει μια περιοχή πρόσδεσης που να ταιριάζει πλήρως με την αλληλουχία του ανιχνευτή (Amann *et al.*, 2000).

Η εφαρμογή της τεχνικής FISH εμφανίζει δυσκολίες στα περιβαλλοντικά δείγματα, με εξαίρεση τα ευτροφικά συστήματα. Στο υδάτινο περιβάλλον, τα Bacteria είναι μικρά σε μέγεθος, με μικρό ρυθμό ανάπτυξης ή το περιβάλλον είναι φτωχό σε θρεπτικά, με αποτέλεσμα η ένταση του σήματος των υβριδισμένων κυττάρων να είναι χαμηλή, ή μη ανιχνεύσιμη, ή το σήμα να χάνεται από το φθορισμό «θόρυβο» που προκύπτει από διάφορα μη έμβια συστατικά του περιβαλλοντικού δείγματος. Σημαντική πρόοδος έχει γίνει με τη χρήση νέων πρωτοκόλλων, φωτεινότερων φθόροχρωμοφόρων, καθώς και τις βελτιώσεις στο σχεδιασμό και τη σήμανση των ανιχνευτών. Η εφαρμογή της τεχνικής CARD-FISH ελάττωσε το φθορισμό «θορύβου» σε θαλάσσια ιζήματα κι έδωσε τη δυνατότητα να μελετηθούν ιζήματα σε ακόμα μεγαλύτερα βάθη (Pernthaler *et al.*, 2002, Ishii *et al.*, 2004).

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της τεχνικής FISH που περιγράφεται από τους Pernthaler *et al.* (2001) με κάποιες διαφοροποιήσεις, και

67

κατάλληλη αραίωση δείγματος, προκειμένου να υπάρχει η μικρότερη δυνατή παρεμβολή από το ίζημα στο μικροσκοπικό πεδίο.

3.1.1 Εξοπλισμός και αναλώσιμα:

- Μικροσκόπιο επιφθορισμού υψηλής ποιότητας (Nikon Eclipse TE-2000S)
- Σετ οπτικών φίλτρων για DAPI (emitter 460/50), FITC και CY3 (HQ Filterset for Cy 3; Alexa 546,) καθώς και φίλτρο για παράλληλη χρώση με FITC και CY3 (Dualband Filterset FITC / Cy 3) (AHF analysentechnik, AG, Germany)
- Κλίβανος ξηρού-τύπου ή θάλαμος υβριδισμού (GFL, Germany)
- Υδατόλουτρο
- Καταψύκτης (-20°C)
- Ψυγείο

Ιδιαίτερος εζοπλισμός

 Ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Canon PowerShot S40, που προσαρμόζεται στον προσοφθάλμιο φακό του μικροσκοπίου μέσω ειδικής βάσης (Leica DC 150 Camera Adapter).

Για τη μονιμοποίηση και προετοιμασία δειγμάτων ιζήματος:

- Φυγόκεντρος για φιαλίδια τύπου eppendorf των 2 ml (Eppendorf)
- Αντλία κενού (GFL)
- Συσκευή υπερήχων με ακροδέκτη (probe) (Ultrasonic processor UP100H, Dr. Hielscher GmbH)
- Λευκά φίλτρα μεμβράνης από polycarbonate (διάμετρος 25mm, μέγεθος πόρων 0,2μm)
- Φίλτρα στήριξης από cellulose nitrate (διαμέτρου 25mm, μέγεθος πόρων ≥ 0,45μm)
- Συσκευή φιλτραρίσματος για φίλτρα διαμέτρου 25mm (απλή ή πολλαπλών θέσεων). (Vacuum Filtration Manifold, Millipore® model 1225)
- 1 x PBS (137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, pH 7,6)
- Αιθανόλη
- 4% w/v διάλυμα φορμαλδεΰδης φιλτραρισμένο σε φίλτρο 0,2μm (particle free).

Για τον υβριδισμό και τη χρώση DAPI

- λάδι φόρτωσης δείγματος CITIFLUOR (Citifluor Ltd, United Kingdom)
- λάδι φόρτωσης δείγματος VECTA SHIELD (Vector Laboratories, USA)
- 1 M Tris/ HCl, pH 7,4

- Φορμαμίδιο (formamide)
- 0,5 M EDTA, pH 8
- 10% (w/v) SDS (sodium dodecyl sulphate)
- Διάλυμα NaCl 5 M
- Νερό MilliQ
- Χρωστική 4΄,6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI), διαλυμένη σε απιονισμένο νερό, τελική συγκέντρωση 1 μg ml⁻¹, ή εναλλακτικά προσθήκη στο ελαιώδες υλικό φόρτωσης δείγματος (Πίνακας 2.3.3)
- Υδατικό διάλυμα αιθανόλης 80% (v/v). Δεν χρησιμοποιείται εάν η χρωστική
 DAPI προστεθεί στο ελαιώδες υλικό φόρτωσης δείγματος
- Στοκ διαλυμάτων μοριακών ανιχνευτών (50 ng/ μl) σημασμένων με κατάλληλα φθοροχρώματα (Πίνακας 2.3.1, Πίνακας 2.3.3)

3.1.2 Μεθοδολογία

Σταθεροποίηση των κυττάρων και προετοιμασία δειγμάτων

Στο στάδιο αυτό, που πρέπει να πραγματοποιείται το συντομότερο δυνατό αμέσως μετά τη δειγματοληψία, τα κύτταρα σταθεροποιούνται και οι μεμβράνες τους γίνονται διαπερατές ώστε να είναι δυνατή η εισαγωγή των ανιχνευτών ή/και των χρωστικών.

Α. ίζημα

- Διαλύονται 0,5 ml φρέσκου ιζήματος σε 1,5 ml διαλύματος φορμαλδεΰδης 4% v/v, σε φιαλίδιο όγκου 2 ml. Το δείγμα αφήνεται να σταθεροποιηθεί για 1 έως 24h.
- Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 10.000 rpm, για 5 min. Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού.
- 3. Προσθήκη 1,5 ml 1xPBS και εναιώρηση του δείγματος.
- 4. Επανάληψη των βημάτων 2 και 3.
- 5. Φυγοκέντρηση στα 10000 rpm για 5 min. Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού.
- Προσθήκη 1,5 ml μίγματος 1:1 PBS/αιθανόλης. Στο στάδιο αυτό υπάρχει δυνατότητα για αποθήκευση στους -20°C μέχρι να γίνει η υπόλοιπη επεξεργασία.
- Εναιώρηση του δείγματος και μια ποσότητα 20-100μl μεταφέρεται σε 500μl μίγματος 1:1 PBS/αιθανόλης σε ένα φιαλίδιο όγκου 2 ml.
- Μεταχείριση του δείγματος με υπερήχους για 20-30sec σε χαμηλή ένταση (50Hz) με παλμούς ανά δευτερόλεπτο. Όπου απαιτείται το δείγμα μπορεί να υποστεί περαιτέρω αραίωση, με τον παραπάνω τρόπο.

- 9. Στη συσκευή φιλτραρίσματος, τοποθετούνται πρώτα τα φίλτρα στήριξης και πάνω από αυτά τοποθετούνται τα φίλτρα μεμβράνης, ώστε να γίνει καλύτερη κατανομή των κυττάρων πάνω στο φίλτρο. Μεταφορά ενός όγκου 15-20μl από το δείγμα που έχει μεταχειριστεί με υπέρηχους σε 2 ml απιονισμένου νερού. Το δείγμα στη συνέχεια φιλτράρεται πάνω στα φίλτρα μεμβράνης.
- Τα φίλτρα αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα. Σε αυτό το στάδιο υπάρχει η δυνατότητα αποθήκευσης των φίλτρων στους -20°C μέχρι να γίνει ο υβριδισμός.

Το παραπάνω πρωτόκολλο τροποποιήθηκε ως εξής:

- 1. Μετά από κάθε στάδιο φυγοκέντρησης και απομάκρυνσης του υπερκείμενου υγρού ακολουθεί εναιώρηση του δείγματος με προσθήκη 1,5 ml 1xPBS. Επειδή το ίζημα που προκύπτει μετά τη φυγοκέντρηση είναι πολύ συμπιεσμένο, μετά την προσθήκη του PBS ακολουθεί μεταχείριση του δείγματος με υπερήχους για 20-30sec σε χαμηλή ένταση (50Hz), με παλμούς ανά δευτερόλεπτο, ώστε να ομογενοποιηθεί καλά και να αποκολληθούν τα κυτταρικά συσσωματώματα από τους κόκκους του ιζήματος. Μετά την τελευταία φυγοκέντρηση προστίθεται 1,5ml 1:1 PBS/ ethanol, και ακολουθεί μια ακόμα μεταχείριση με υπερήχους. Επομένως η μεταχείριση με υπερήχους έγινε σε τρία βήματα αντί για ένα. Αυτή η μεταχείριση δεν βρέθηκε να επηρεάζει τη δομή των κυτταρικών συσσωματωμάτων στο ίζημα, ενώ δημιούργησε ομοιογενή δείγματα ιζήματος.
- Το δείγμα αραιώνεται σε τελική συγκέντρωση 1:100. Ακολουθεί μεταχείριση με υπέρηχους, και ποσότητα 20μl από την αραίωση 1:100, μεταφέρεται σε 2ml φιλτραρισμένο απιονισμένο νερό, και στη συνέχεια στη συσκευή φιλτραρίσματος, όπου φιλτράρεται σε χαμηλή πίεση.

Β. καλλιέργειες κυττάρων

Ακολουθείται παρόμοια διαδικασία όπως και με τα δείγματα ιζήματος. Λαμβάνεται όγκος 0,5 ή 1ml σε φιαλίδιο τύπου eppendorf, όγκου 1,5ml και προστίθεται 4% pf φορμαλδεΰδη (τελική συγκέντρωση 1-2%). Ακολουθούνται τα στάδια 1-10 του αρχικού πρωτοκόλλου όπου η μεταχείριση με υπερήχους πραγματοποιείται στο τελικό ξέπλυμα. Εάν το ίζημα από τις καλλιέργειες δεν διαλύεται ή διαλύεται δύσκολα κατά την ανάδευση στο στάδιο των ξεπλυμάτων, χρησιμοποιείται και ενδιάμεσα μεταχείριση με υπέρηχους, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Σε αρκετά δείγματα ιζήματος, πέρα από τη φορμαλδεύδη ως μέσω για τη σταθεροποίηση των κυττάρων και την εξασφάλιση της διαπερατότητας των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε με παρόμοια αποτελέσματα διάλυμα 1:1 PBS:ethanol.

Υβριδισμός των κυττάρων σε φίλτρα μεμβράνης

Στο στάδιο αυτό, τα σημασμένα με το κατάλληλο φθορόχρωμα μόρια του ανιχνευτή, εισέρχονται στα κύτταρα που είναι πλέον διαπερατά και υβριδίζουν μονάχα με το RNA που βρίσκεται στα κύτταρα-στόχο του ανιχνευτή, σε κορεσμένη ατμόσφαιρα ατμών φορμαμιδίου συγκεκριμένης συγκέντρωσης και στην κατάλληλη θερμοκρασία υβριδισμού (Πίνακας 2.3.1). Ακολουθεί το στάδιο του ξεπλύματος, με το οποίο απομακρύνεται η περίσσεια των σημασμένων ανιχνευτών.

 Προετοιμάζονται 2 ml διαλύματος (buffer) υβριδισμού σε ένα φιαλίδιο φυγοκέντρου των 2 ml ως εξής:

Αντιδραστήριο στοκ	Όγκος	Τελική συγκέντρωση στο διάλυμα (buffer) υβοιδισμού
5M NaCl	360 µl	900 mM
1 M Tris/HCl	40 µl	20 mM
Formamide	% ανάλογα με τον ανιχνευτή (Πίνακας 2.2.1)	(Πίνακας 2.2.1)
Απιονισμένο νερό	Μέχρι τα 2 ml	
10% SDS (προστίθεται τελευταίο ώστε αποφευχθεί η δημιουργία ιζήματος)	2 µl	0,01%

2. Για τα μίγματα υβριδισμού προστίθενται 2 μl από το διάλυμα εργασίας του ανιχνευτή (50ng DNA/ μl) σε 20μl διαλύματος υβριδισμού, σε ένα φιαλίδιο των 0,5ml. Τα διαλύματα του ανιχνευτή κατά τη διάρκεια των χειρισμών πρέπει να διατηρούνται στο σκοτάδι, σε πάγο. Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ταυτόχρονα δύο ανιχνευτές, προστέθηκαν 2 μl από το διάλυμα εργασίας του κάθε ενός. Στις περιπτώσεις που έγινε ταυτόχρονος υβριδισμός με ανιχνευτές για τους οποίους η βιβλιογραφία πρότεινε διαφορετικές συγκεντρώσεις φορμαμιδίου ως ιδανικές για τον υβριδισμό, επιλέχθηκε η χαμηλότερη % συγκέντρωση από τις δύο, με ικανοποιητικά αποτελέσματα. π.χ. για τον ταυτόχρονο υβριδισμό με τους ανιχνευτές ANME-2 (40% φορμαμίδιο) και DSS658 (60% φορμαμίδιο) χρησιμοποιήθηκε φορμαμίδιο σε συγκέντρωση 40% (Πίνακας 2.3.1)

Υλικά & Μέθοδοι

- Κόβονται τμήματα (κυκλικοί τομείς) από τη μεμβράνη με ξυράφι ή ψαλίδι, τα οποία αριθμούνται με μολύβι στο άκρο τους. Από τα διαμέτρου 25mm φίλτρα, μπορεί να προκύψουν 8 τμήματα.
- 4. Τα φίλτρα τοποθετούνται πάνω σε μια γυάλινη αντικειμενοφόρο, με την πλευρά που φέρει τα κύτταρα να κοιτάζει προς τα πάνω. Πολλά τμήματα φίλτρων μπορούν να τοποθετηθούν ταυτόχρονα στην ίδια αντικειμενοφόρο ώστε να γίνει υβριδισμός με τον ίδιο ανιχνευτή ταυτόχρονα.
- 5. Σε ένα φιαλίδιο από πολυαιθυλένιο των 50 ml, τοποθετείται ένα κομμάτι διηθητικό χαρτί το οποίο διαποτίζεται με το υπόλοιπο από το διάλυμα υβριδισμού που δεν χρησιμοποιήθηκε.
- 6. Πάνω από κάθε τμήμα μεμβράνης προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα του μίγματος υβριδισμού. Η αντικειμενοφόρος τοποθετείται μέσα στο φιαλίδιο πολυαιθυλενίου σε οριζόντια θέση, το οποίο πωματίζεται καλά. Για κάθε ένα τμήμα μεμβράνης, η ποσότητα που προστίθεται από το μίγμα υβριδισμού είναι 20μl + 2 μl για κάθε ανιχνευτή. Έτσι, για έναν ανιχνευτή προστίθενται 22μl, για δύο ανιχνευτές 24μl, κλπ.
- Ακολουθεί επώαση στους 46°C για τουλάχιστον 90 λεπτά (μέγιστη διάρκεια 3 ώρες), ενώ η ατμόσφαιρα στο εσωτερικό του φιαλιδίου είναι κορεσμένη σε υδρατμούς και ατμούς φορμαμίδιου από το διάλυμα υβριδισμού.

8.	Προετοιμάζονται	50 ml	διαλύματος	ξεπλύματος	ως εξής:
----	-----------------	-------	------------	------------	----------

Αντιδραστήριο στοκ	Όγκος	Τελική συγκέντρωση στο διάλυμα ξεπλύματος
5M NaCl	% ανάλογα με τη συγκέντρωση φορμαμιδίου στο διάλυμα υβριδισμού	(Πίνακας 2.2.2)
1 M Tris/HCl	1 ml	20 mM
0,5M EDTA	500 μl	5 mM
Απιονισμένο νερό	Προσθήκη μέχρι τα 50 ml	
10% SDS (προστίθεται τελευταίο ώστε αποφευχθεί η δημιουργία ιζήματος)	50 µl	0,01%

Μετά την επώαση, τα τμήματα των φίλτρων μεταφέρονται στο φιαλίδιο με το διάλυμα ξεπλύματος που έχει προθερμανθεί στους 48°C και επωάζονται για 15 λεπτά στους 48°C, σε υδατόλουτρο.

10. Το διάλυμα ξεπλύματος που περιέχει τα φίλτρα μεταφέρεται μέσα σε ένα τριβλύο Petri. Τα τμήματα φίλτρων μεταφέρονται με λαβίδα προσεχτικά σε ένα νέο τριβλύο Petri που περιέχει απιονισμένο νερό, ή σε φιαλίδιο πολυαιθυλενίου των 50 ml το οποίο σκεπάζεται και ανακινείται ελαφρά ώστε τα τμήματα φίλτρων να παραμένουν αιωρούμενα μέσα σε αυτό και ξεπλένονται για αρκετά δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια τα φίλτρα μεταφέρονται σε διηθητικό χαρτί και αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα.

Αντίθετη χρώση DAPI στην τεχνική FISH

Η τεχνική χρώσης DAPI, χρησιμοποιείται παράλληλα με την τεχνική FISH προκειμένου να εντοπιστούν όλα τα κύτταρα στο πεδίο του μικροσκοπίου και να αναγνωριστεί τυχόν ψευδές σήμα που προκύπτει από την τεχνική FISH και δεν αντιστοιχεί σε κύτταρα. Δηλαδή στη διαδικασία της τεχνικής FISH, η χρώση DAPI χρησιμεύει ως «αντίθετη χρώση». Είναι μια χρωστική που συνδέεται εξειδικευμένα με το μόριο του DNA. Με την DAPI δηλαδή, σημαίνονται όλα τα κύτταρα σε αντίθεση με τους σημασμένους ανιχνευτές που στοχεύουν συγκεκριμένα κύτταρα στόχους. Έτσι, κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση, γίνεται πρώτα παρατήρηση του πεδίου με το κατάλληλο σετ φίλτρων για DAPI, και στη συνέχεια ακολουθεί παρατήρηση του ίδιο πεδίου με άλλο σετ φίλτρων ανάλογα με το φθορόχωμα που χρησιμοποιήθηκε (CY3, fluorescein, κ.α.), ώστε να διαπιστωθεί ποια από τα κύτταρα είναι τα κύτταρα στόχος.

A. Χρώση DAPI με ξέπλυμα

- Τα φίλτρα ή τα τμήματα των φίλτρων μεταφέρονται σε γυάλινη πλάκα (ή τριβλύο Petri), καλύπτονται με 50μl διαλύματος DAPI (1µg/ml) και επωάζονται για 3 λεπτά στο σκοτάδι. Η πλευρά που περιέχει τα Bacteria θα πρέπει να κοιτάζει προς τα πάνω. Μετά τα τμήματα των φίλτρων ξεπλένονται για αρκετά δευτερόλεπτα σε 80% αιθανόλη για να απομακρυνθεί η μη επιλεκτική χρώση και μετά μεταφέρονται σε ένα τριβλύο με απιονισμένο νερό για να ξεπλυθούν. Στη συνέχεια αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα πάνω σε διηθητικό χαρτί.
- 2. Τα δείγματα φορτώνονται σε αντικειμενοφόρο πλάκα με ένα μίγμα 4:1 Citifluor και Vecta Shield, ελαιώδη υλικά φόρτωσης δείγματος τα οποία αποτρέπουν το ξεθώριασμα του φθορισμού με το χρόνο. Το Vecta Shield μειώνει όμως τον φθορισμό της DAPI. Τα τμήματα των φίλτρων θα πρέπει να έχουν αφεθεί να

στεγνώσουν καλά πριν την φόρτωσή τους στην αντικειμενοφόρο πλάκα, διαφορετικά κάποια κύτταρα ενδέχεται να αποκολληθούν κατά την μικροσκοπική παρατήρηση του δείγματος.

- Τα τμήματα φίλτρων μετά τη διπλή χρώση και το στέγνωμα καθώς και τα φίλτρα που έχουν φορτωθεί στις αντικειμενοφόρους μπορούν να αποθηκευθούν στο σκοτάδι στους -20°C χωρίς σημαντική απώλεια του φθορισμού για αρκετές ημέρες.
- 4. Ο φθορισμός που οφείλεται στους ανιχνευτές εξασθενεί γρηγορότερα από ότι ο φθορισμός που οφείλεται στη χρωστική DAPI κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση και η UV ακτινοβολία εξασθενεί επίσης και το σήμα της CY3. Έτσι για την καταμέτρηση, είναι ασφαλέστερο να προσδιορίζονται πρώτα τα υβριδισμένα κύτταρα και επακολούθως τα ολικά κύτταρα στην UV ακτινοβολία.

Η τεχνική αυτή της χρώσης DAPI με ξέπλυμα, βρέθηκε ότι προκαλεί υπερφωτισμένο πεδίο στο μικροσκόπιο στα δείγματα ιζήματος, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται ο εντοπισμός και η καταμέτρηση των κυττάρων.

Β. Χρώση **DAPI** με προσθήκη χρωστικής στο ελαιώδες υλικό φόρτωσης του δείγματος

Εναλλακτικά της παραπάνω τεχνικής, χρησιμοποιήθηκε μια διαφορετική διαδικασία χρώσης. Μετά το τελευταίο στάδιο του υβριδισμού, αφού τα φίλτρα στεγνώσουν καλά στον αέρα, τα τμήματα των μεμβρανών φορτώνονται σε αντικειμενοφόρο πλάκα με ένα μίγμα 4:1 Citifluor και Vecta Shield, στο οποίο έχει προστεθεί η χρωστική DAPI σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml. Στη συνέχεια τοποθετείται καλυπτρίδα και το δείγμα είναι έτοιμο για μικροσκοπική παρατήρηση ή μπορεί να αποθηκευτεί στους -20°C. Η τεχνική αύξησε σημαντικά το φθορισμό των κυττάρων και μείωσε το θόρυβο που προκαλούσε το ίζημα.

Στα δείγματα ιζήματος, χρησιμοποιήθηκε μεγάλη αραίωση (1:100) του δείγματος, ώστε να μην παρεμβάλλονται τα συστατικά του ιζήματος στην παρατήρηση των κυττάρων και η καταμέτρηση των κυττάρων έγινε σε όσο το δυνατόν περισσότερα πεδία (>100 πεδία ανά δείγμα) ώστε ο αριθμός των κυττάρων να είναι ~500-1000.

3.1.3 Χρώση DAPI για μέτρηση κυτταρικής αφθονίας

Η προετοιμασία του δείγματος (μονιμοποίηση και φιλτράρισμα), έχει περιγραφεί στην παράγραφο 2.1.2.1

Α. Ίζημα

Ολική κυτταρική αφθονία

Για την εκτίμηση της ολικής κυτταρικής αφθονίας, ανεξάρτητα από την τεχνική FISH, χρησιμοποιήθηκε η τεχνικής χρώσης DAPI με προσθήκη της στο μίγμα Citifluor/VectaShield, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Κατά την μικροσκοπική παρατήρηση αριθμούνται τα μεμονωμένα κύτταρα καθώς και τα κύτταρα που συμμετέχουν σε συσσωματώματα. Η ολική κυτταρική αφθονία προκύπτει ως άθροισμα των μεμονωμένων κυττάρων και των κυττάρων σε συσσωματώματα.

Κύτταρα σε συσσωματώματα

Ό αριθμός των κυττάρων στα συσσωματώματα υπολογίστηκε όπως έχει προηγουμένως περιγραφεί. (Boetius *et al.*, 2000, Knittel *et al.*, 2003). Τα κύτταρα στα συσσωματώματα θεωρούνται ότι έχουν σχήμα σφαιρικό. Τα κύτταρα των ANME-2 που συμμετέχουν στα συσσωματώματα έχουν μια μέση διάμετρο 0,5μm ενώ τα κύτταρα των θειικοαναγωγικών Bacteria μια διάμετρο 0,4μm. Μια μέση διάμετρος 0,45μm χρησιμοποιήθηκε και για κάθε συσσωμάτωμα, μετρήθηκε ο αριθμός κυττάρων ανά διάμετρο θεωρώντας το σαν σφαίρα και υπολογίστηκε ο αριθμός κυττάρων ανά συσσωμάτωμα.

Β. Καλλιέργειες

Τόσο η τεχνική χρώσης DAPI με ξέπλυμα όσο και η χρώση DAPI με προσθήκη στο ελαιώδες υλικό φόρτωσης του δείγματος. Οι δύο διαφορετικές μεθοδολογίες για τη χρώση DAPI έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα όταν εφαρμόστηκαν στις καλλιέργειες. Προτιμήθηκε όμως η τεχνική χρώσης DAPI με προσθήκη της DAPI στο μίγμα 4:1 Citifluor και Vecta Shield, σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml, διότι με αυτόν τον τρόπο αποφεύχθηκε ο υπερφωτισμός του πεδίου. Έτσι, τα κύτταρα είχαν έντονο σήμα σε σκουρόχρωμο υπόβαθρο. Η τεχνική αυτή συντομεύει αρκετά το χρόνο χρώσης.

Όνομα	Στόχος	Αλληλουχία (5'-3')	% formamide	Βιβλ/κή αναφορά
EUB338I	Eubacteria	GCT GCC TCC CGT AGG AGT		Daims, 1999
EUB338II	Eubacteria - Planctomycetales	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	35	
EUB338III	Eubacteria - Verrucomicrobiales	GCT GCC ACC CGT AGG TGT		
NON338	Ανιχνευτής συμπληρωματικός του	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	ND	Wallner, 1993
	EUB338		10	
DSS658	Θειικοαναγωγικά Bacteria Desulfosarcina /Desulfococcus, Desulfofrigus Desulfofaba spp. κλπ	TCC ACT TCC CTC TCC CAT	60	Manz, 1998
DSV698	Αλληλουχίες σχετιζόμενες με το γένος Desulfovibrio sp.	GTT CCT CCA GAT ATC TAC GG	35	Manz, 1998
DBB305	Αλληλουχίες σχετιζόμενες με το γένος <i>Desulfobulbus</i> sp	AGT GCC AGT GTG ACG GAT	25	Niemann, 2006
ARC915	Archaea (εξειδικευμένος ανιχνευτής για τις περισσότερες αλληλουχίες των Archaea)	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	35	Stahl, 1991
ANME-I	Euryarchaeota: ANME-1	AGT TTT CGC GCC TGA TGC	40	Boetius, 2000
ANME-II	<i>Euryarchaeota</i> : ANME-2	AGC TCC ACC CGT TGT AGT	40	Boetius, 2000
ANME-III	Euryarchaeota: ANME-3	TCG GAG TAG GGA CCC ATT	20	Niemann, 2006
ANME-3-1249 H3*	Βοηθητικός ανιχνευτής για τον ANME-3-1249	GTC CCA ATC ATT GTA GCC GGC	-	Lösekann, 2007
ANME-3-1249 H5*	Βοηθητικός ανιχνευτής για τον ANME-3-1249	TTA TGA GAT TAC CAT CTC CTT	-	Lösekann, 2007

Πίνακας 2.3.1 Ποσοστό % φορμαμιδίου που χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική FISH για κάθε ανιχνευτή.

* Οι μη σημασμένοι βοηθητικοί ανιχνευτές Η3 και Η5 χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να ενισχυθεί το σήμα του ανιχνευτή ΑΝΜΕ-3 το οποίο ήταν ασθενές.

% φορμαμίδιο	mM NaCl
στο διάλυμα υβριδισμού	στο διάλυμα ξεπλύματος
0	900
5	636
10	450
15	318
20	225
25	159
30	112
35	80
40	56
45	40
50	28
55	20
60	14
65	10
70	7
75	5
80	3,5

Πίνακας 2.3.2 Συγκεντρώσεις NaCl στο διάλυμα ξεπλύματος (48°C) για διαφορετικές συγκεντρώσεις φορμαμιδίου που χρησιμοποιήθηκαν στο διάλυμα υβριδισμού (46°C)

Πίνακας 2.3.3 Χαρακτηριστικά της χρωστικής DAPI και των φθοροχρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για σήμανση των ανιχνευτών. Χρησιμοποιήθηκαν η φλουορεσκεΐνη (flurescein), η κυανίνη-3 (CY3) και η Alexa488.

φθορόχρωμα	Μήκος κύματος διέργερσης (nm)	Μήκος κύματος εκπομπής (nm)	Χρώμα φθορι σ μού
DAPI	345	455	μπλε-ιώδες
Φλουορεσκεΐνη	495	519	πράσινο
Κυανίνη Cy3	512 (550)	570 (670)	κόκκινο-πορτοκαλί
Alexa 488	495	519	πράσινο

4. Αναερόβιες Καλλιέργειες

4.1 Εξοπλισμός

Πέρα από τον εξοπλισμό που πρέπει να διαθέτει ένα εργαστήριο μικροβιολογίας, για τις αναερόβιες καλλιέργειες είναι απαραίτητη η χρήση επιπλέον εξειδικευμένου εξοπλισμου:

1. Θάλαμος αναερόβιων συνθηκών (SGC20 modified, Iteco Engineering, Italy)

Ο θάλαμος αυτός, από διάφανο ακριλικό, είναι κατάλληλα κατασκευασμένος ώστε όταν δημιουργείται στο εσωτερικό του ατμόσφαιρα αναερόβιων συνθηκών να τη διατηρεί, καθώς κλείνει ερμητικά από όλα τα ανοίγματα. Στην αριστερή πλευρά του φέρει πόρτα (300x400H mm), η οποία ασφαλίζει κι έχει προσαρμοσμένο λάστιχο ώστε να κλείνει αεροστεγώς. Στο μπροστινό μέρος προσαρμόζονται γάντια λάτεξ με μήκος μέχρι τον ώμο (πάχος 0,5mm), τα οποία προσαρμόζονται στο θάλαμο με φλάντζες ώστε να μην επιτρέπουν διαρροή αερίου. Στο δεξιό πλάι υπάρχει προσαρμοσμένος ένας κυλινδρικό θαλαμίσκος (Ø186 x L280), που επικοινωνεί με τον κύριο θάλαμο με ένα πώμα πλαστικό που φέρει φλάντζα ώστε να κλείνει ερμητικά. Το ίδιο πώμα φέρει ο θαλαμίσκος και στην εξωτερική του πλευρά ώστε να απομονώνεται από το περιβάλλον. Ο προθάλαμος χρησιμοποιείται στην περίπτωση που χρειάζεται να εισαχθούν στον κεντρικό θάλαμο αντικείμενα, γωρίς να επηρεαστεί η ατμόσφαιρα στο εσωτερικό του. Για το σκοπό αυτό, φέρει είσοδο με βαλβίδα όπου συνδέεται με φιάλη αερίου Ν2, βαλβίδα για την έξοδο του αερίου κατά το γέμισμα του θαλαμίσκου, μανόμετρο για να ελέγχεται η πίεση στο εσωτερικό του, ενώ συνδέεται με τον κύριο θάλαμο με σωληνάκι που επίσης φέρει χειροκίνητη βαλβίδα ώστε να είναι δυνατή η εξισορρόπηση της πίεσης μεταξύ των δύο θαλάμων. Ο κύριος θάλαμος φέρει επίσης μανόμετρο, δύο εισόδους για εισαγωγή αερίων από φιάλη. Για τον έλεγχο της πίεσης στο εσωτερικό του, φέρει μια αυτόματη ηλεκτροβαλβίδα εκτόνωσης για λόγους ασφαλείας. Το όλο σύστημα ηλεκτροδοτείται με τη βοήθεια πίνακα ελέγχου ενώ στο εσωτερικό του θαλάμου υπάρχει παροχή ηλεκτρικού ρεύματος. Στις εισόδους αερίων του θαλάμου συνδέονται με τη βοήθεια εύκαμπτων σωλήνων σιλικόνης οι φιάλες αερίων:

Φιάλη Ν₂

- Φιάλη μίγματος αερίου 80% N_2 και 20% CO_2

78

- 2. Επωαστικός θάλαμος με δυνατότητα ρύθμισης θερμοκρασίας στους 11°C.
- 3. Δοχεία πίεσης κατασκευασμένα από ειδικό ανοξείδωτο υλικό.
- 4. Αντλία HPLC για την αύξηση της πίεσης στο εσωτερικό των δοχείων.

Για την προετοιμασία και την επώαση αναερόβιων καλλιεργειών χρησιμοποιούνται ειδικά δοχεία και πώματα τα οποία αποτρέπουν την εισροή οξυγόνου:

- σωληνάκια καλλιέργειας (16x125 mm) τύπου Hungate, για αναερόβιες
 καλλιέργειες με σπειρωτό πώμα με οπή και διαχωριστικό πώμα από βουτίλιο.
- Διαχωριστικά πώματα βουτιλίου διαμέτρου GL45 για φιάλες εργαστηρίου Schott-Duran, ειδικά για διατήρηση αναερόβιων συνθηκών.
- Καπάκια με σπείρωμα και οπή για φιάλες εργαστηρίου Schott-Duran διαμέτρου GL45 (45mm)
- Πώματα suba-seal κατάλληλης διαμέτρου για σύριγγες των 5ml για τις καλλιέργειες σε σύριγγες εντός των δοχείων πίεσης

4.2. Θρεπτικά μέσα

4.2.1 Θρεπτικό διάλυμα για απομόνωση θειικοαναγωγικών Bacteria

Για την απομόνωση θειικοαναγωγικών Bacteria χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό διάλυμα 861-θρεπτικό διάλυμα για ψυχρόφιλα θειικοαναγωγικά Bacteria, που προτείνεται από τη Συλλογή Καλλιεργειών DSMZ, με μερικές τροποποιήσεις ως προς τη διαδικασία παρασκευής του. Το θρεπτικό αυτό μέσο βασίζεται στο μέσο των Widdel και Pfennig (Widdel and Bak, 1992) το οποίο είναι θρεπτικό μέσο καθορισμένης σύστασης έχει χρησιμοποιηθεί για κι την απομόνωση θειικοαναγωγικών Bacteria. Όλα τα θειικοαναγωγικά Bacteria που έχουν καλλιεργηθεί μέχρι σήμερα, μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό μέσο που αποτελεί παραλλαγή του συγκεκριμένου θρεπτικού, όπου ανάλογα με το περιβάλλον απομόνωσης τους, γλυκό, υφάλμυρο ή θαλασσινό περιβάλλον, μπορεί να ρυθμιστεί και η αλατότητα του βασικού διαλύματος αλάτων όσον αφορά το NaCl, το MgCl₂x6H₂O και το CaCl₂ (Hines *et al.*, 1997). Για την καλλιέργεια αντιπροσώπων των θειικοαναγωγικών Bacteria χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικά οργανικά υποστρώματα μικρού μοριακού βάρους, το γαλακτικό οξύ, το οξικό οξύ, το ηλεκτρικό οξύ και αιθανόλη, δηλαδή, χρησιμοποιήθηκαν τελικά τέσσερα διαφορετικά θρεπτικά μέσα, ώστε να υπάρχει κατά το δυνατόν μεγαλύτερο εύρος στην αναγέννηση μικροοργανισμών.

Διαδικασία παρασκευής

Αρχικά παρασκευάζεται το βασικό διάλυμα αλάτων, χωρίς τις πηγές άνθρακα, τους οργανικούς δότες ηλεκτρονίων και τα διάφορα συμπληρωματικά συστατικά. Τα συστατικά αυτά καταστρέφονται με τη θερμότητα, δημιουργούν ίζημα ή είναι πτητικά και αποστειρώνονται με τη βοήθεια φίλτρου (0,2μm) και προστίθενται στο βασικό διάλυμα αλάτων μετά την αποστείρωσή του. Το Βασικό διάλυμα αλάτων παρασκευάζεται με την προσθήκη των αλάτων ή των διαλυμάτων αλάτων κατά σειρά, στις ποσότητες που περιγράφονται παρακάτω, για ένα λίτρο διαλύματος.

20	g
4	γ
3	g
0,5	g
10	ml
0,5	ml
898	ml
	20 4 3 0,5 10 10 10 10 10 10 5 898

Α. <u>Βασικό διάλυμα αλάτων</u>

Προστίθεται το διάλυμα ρεσαζουρίνης (1mg/ml) και συμπληρώνεται ο όγκος με απιονισμένο νερό, αφού αφαιρεθούν οι ποσότητες των διαλυμάτων που θα προστεθούν σε αυτό μετά την αποστείρωση. Αφού παρασκευαστεί, το βασικό διάλυμα μεταφέρεται στο θάλαμο αναερόβιων συνθηκών σε ατμόσφαιρα μίγματος αερίου αζώτου και διοξειδίου του άνθρακα (80N₂: 20CO₂). Το μίγμα αερίων διοχετεύεται και εντός του διαλύματος για αρκετή ώρα, ώστε να απομακρυνθεί το περιεχόμενο οξυγόνο. Η φιάλη με το μέσο πωματίζεται κατάλληλα και αποστειρώνεται (120°C, 15 λεπτά).

Μετά το πέρας της αποστείρωσης, το βασικό διάλυμα αλάτων, μεταφέρεται για λίγα λεπτά σε λεκάνη με πάγο και αφού πέσει λίγο η θερμοκρασία, η φιάλη μεταφέρεται στο θάλαμο αναερόβιων συνθηκών όπου αφήνεται να κρυώσει σε ατμόσφαιρα μίγματος αζώτου και διοξειδίου του άνθρακα (80N₂: 20CO₂). Όταν η θερμοκρασία πλησιάζει τη θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται ανά λίτρο διαλύματος κατά σειρά τα παρακάτω συμπληρωματικά συστατικά στις ποσότητες που αναγράφονται παρακάτω. Η παρασκευή τους περιγράφεται στην παράγραφο που ακολουθεί.

Διάλυμα ιχνοστοιχείων SL-10	1	ml
Διάλυμα σεληνίου βολφραμίου	1	ml
NaHCO ₃ 10%	30	ml
Διάλυμα βιταμινών	10	ml
Διάλυμα υποστρώματος	10	ml
Na ₂ Sx9H ₂ O 3%	10	ml
Na-dithionite	25	mg

Το pH του θρεπτικού μέσου, θα πρέπει να είναι μεταξύ 7.0 και 7.3.

Μετά την προσθήκη και των αναγωγικών παραγόντων και αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση, το διάλυμα έχει γίνει διάφανο και είναι έτοιμο να μεταφερθεί στα σωληνάκια τύπου Hungate ειδικά για αναερόβιες καλλιέργειες. Ο εμβολιασμός του θρεπτικού μέσου θα πρέπει να γίνει το συντομότερο δυνατό.

Β. Συμπληρωματικά συστατικά

Τα συμπληρωματικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου, παρασκευάζονται ως ξεχωριστά διαλύματα, τα οποία είτε αποστειρώνονται, είτε φιλτράρονται.

HCl (25%, 7,7M)	10	ml
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	1,5	g
ZnCl ₂	70	mg
MnCl ₂ x 4H ₂ O	100	mg
H ₃ BO ₃	6	mg
$CoCl_2 x 6 H_2O$	190	mg
$CuCl_2 \ge 2 H_2O$	2	mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	24	mg
$Na_2MoO_4 \ge 2 H_2O$	36	mg
Απιονισμένο νερό	990	ml

Διάλυμα ιχνοστοιχείων SL-10

Αρχικά διαλύεται ο χλωριούχος σίδηρος στο υδροχλωρικό οξύ και στη συνέχεια στο απιονισμένο νερό. Προστίθενται τα υπόλοιπα ιχνοστοιχεία από πυκνά στοκ διαλύματα και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τον απαιτούμενο όγκο με απιονισμένο νερό. Στο διάλυμα διοχετεύεται αέριο άζωτο, πωματίζεται κατάλληλα και αποστειρώνεται. Μπορεί να φυλαχθεί στους 4° C για αρκετές εβδομάδες. Η απαιτούμενη ποσότητα από το διάλυμα ιχνοστοιχείων SL-10, προστίθεται στο βασικό διάλυμα αλάτων μετά την αποστείρωσή του.

Διάλυμα selenite-tungstate (σεληνιώδους νατρίου-βολφραμικού νατρίου)

NaOH	0,5	g
$Na_2SeO_3 \ge 5 H_2O$	3	mg
$Na_2WO_4 \ge H_2O$	4	mg
Απιονισμένο νερό	1000	ml

Το διάλυμα παρασκευάζεται, διοχετεύεται σε αυτό αέριο άζωτο, πωματίζεται κατάλληλα, αποστειρώνεται και φυλάσσεται στους 4° για αρκετές εβδομάδες. Κατάλληλη ποσότητα προστίθεται στο θρεπτικό μέσο μετά την αποστείρωσή του.

<u>Διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου 10% (NaHCO3)</u>

Παρασκευάζεται αυθημερόν διάλυμα NaHCO₃ 10% και μεταφέρεται σε θάλαμο αναερόβιων συνθηκών. Στο διάλυμα διοχετεύεται μίγμα N₂:CO₂ σε αναλογία 80:20 αρκετή ώρα και στη συνέχεια το φιαλίδιο σφραγίζεται με πώμα από τεφλόν και βιδωτό καπάκι. Το υπερκείμενο του διαλύματος αντικαθίσταται με το μίγμα N₂:CO₂ με τη βοήθεια δύο βελονών, όπου η μια χρησιμεύει για τη διοχέτευση του αερίου και η δεύτερη για την απομάκρυνσή του. Το διάλυμα στη συνέχεια αποστειρώνεται. Κατάλληλη ποσότητα προστίθεται στο βασικό διάλυμα αλάτων μετά την αποστείρωσή του, κάτω από αναερόβιες συνθήκες.

<u>Διάλυμα βιταμινών</u>

Οι βιταμίνες και οι συγκεντρώσεις τους στο διάλυμα βιταμινών περιγράφονται παρακάτω:

Βιοτίνη	2	mg
Φολικό οξύ	2	mg
Υδροχλωρική πυριδοξίνη (Pyrodoxine-HCl)	10	mg
Ένυδρη υδροχλωρική θειαμίνη (Thiamine- HCl x 2 H ₂ O)	5	mg
Ριβοφλαβίνη	5	mg
Νικοτινικό οξύ	5	mg
D-παντοθενικό ασβέστιο (D-Ca-pantothenate)	5	mg
Βιταμίνη B ₁₂	0,1	mg
p-αμινοβενζοϊκό οξύ	5	mg
Λιποϊκό οξύ (Lipoic acid)	5	mg
Απιονισμένο νερό	1000	ml

Για κάθε βιταμίνη παρασκευάζεται πυκνό στοκ διάλυμα μικρού όγκου, το οποίο φιλτράρεται με φίλτρο σύριγγας με 0,2μm, σε φιαλίδιο αποστειρωμένο και αποθηκεύεται στους 4°C. Για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου, παρασκευάζεται η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος βιταμινών από τα στοκ διαλύματα, το οποίο αποστειρώνεται με τη βοήθεια φίλτρου (0,2μm) και προστίθεται στο θρεπτικό μέσο μετά την αποστείρωσή του και αφού έχει έρθει σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να μην καταστραφούν οι βιταμίνες λόγω υψηλής θερμοκρασίας.

<u>Διαλύματα υποστρωμάτων</u>

Παρασκευάζονται διαλύματα για το κάθε ένα υπόστρωμα με τις παρακάτω συγκεντρώσεις:

Οξικό νάτριο (Na –acetate) 15% w/v

Γαλακτικό νάτριο (Na-lactate) 25% w/v

Αιθανόλη 6% v/v

Ηλεκτρικό οξύ (succinic acid) 11% w/v

Τα διαλύματα των υποστρωμάτων παρασκευάζονται αυθημερόν σε υάλινα φιαλίδια, διοχετεύεται σε αυτά αέριο άζωτο, πωματίζονται κατάλληλα και αποστειρώνονται. Μετά την αποστείρωση μεταφέρονται στο θάλαμο αναερόβιων συνθηκών όπου προστίθενται το καθένα στο αντίστοιχο θρεπτικό μέσο σε ατμόσφαιρα 80N₂:20CO₂.

Διάλυμα ένυδρου θειούχου νατρίου 3% (Na₂S x 9 H₂O)

Οι κρύσταλλοι του θειούχου νατρίου εκφυλίζονται στον αέρα και γι' αυτό το λόγω θα πρέπει να επιλέγονται οι καθαροί κρύσταλλοι. Ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα θειούχου νατρίου, μεταφέρεται σε φιαλίδιο με πώμα από τεφλόν και μεταφέρεται στο θάλαμο αναερόβιων συνθηκών. Προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα απιονισμένου νερού ενώ παράλληλα στο διάλυμα διοχετεύεται αέριο N₂ και οι κρύσταλλοι διαλύονται. Στη συνέχεια πωματίζεται το φιαλίδιο και διοχετεύεται αέριο N₂ στο υπερκείμενο αέριο χώρο. Το διάλυμα αποστειρώνεται και μπορεί να φυλαχθεί στους 4°C για μερικές εβδομάδες.

Το διάλυμα του θειούχου νατρίου, ως αναγωγικός παράγοντας, προστίθεται στο θρεπτικό μέσο αφού έχει ολοκληρωθεί η προσθήκη των υπόλοιπων διαλυμάτων.

Na-dithionite

Το διθειονώδες νάτριο προστίθεται στο διάλυμα τελευταίο, μετά την αναγωγή του διαλύματος από το θειούχο νάτριο και έχει σκοπό να ανάγει περισσότερο το θρεπτικό μέσο κάτι που θεωρείται απαραίτητο για την ανάπτυξη συγκεκριμένων ειδών θειικοοαναγωγικών Bacteria (Hines *et al.*, 1997). Αντιδρά άμεσα με το οξυγόνο και έτσι, υδατικό διάλυμα διθειονώδους νατρίου μπορεί να παρασκευαστεί με νερό απαλλαγμένο από οξυγόνο σε ατμόσφαιρα αερίου αζώτου. Σαν διάλυμα διατηρείται μικρό διάστημα σε θερμοκρασία δωματίου.

Επειδή όμως το διθειονώδες νάτριο λόγω της τοξικότητάς του είναι στείρο, μπορεί εναλλακτικά να προστεθεί μια ελάχιστη κατ'εκτίμηση ποσότητα απευθείας στο θρεπτικό μέσο με τη βοήθεια μιας αποστειρωμένης σπάτουλας.

4.2.2 Θρεπτικό διάλυμα για είδη του γένους Methanosarcina

Χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο που προτείνει η Συλλογή Καλλιεργειών DSMZ (Θρεπτικό μέσο 120 για καλλιέργεια ειδών που ανήκουν στο γένος *Methanosarcina*), με μερικές τροποποιήσεις. Για τα αλάτια που βρίσκονται στο διάλυμα σε χαμηλή συγκέντρωση παρασκευάστηκαν πυκνά στοκ διαλύματα ενώ τα υπόλοιπα αλάτια ζυγίζονται στις απαιτούμενες ποσότητες.

Διαδικασία παρασκευής:

Για ένα λίτρο διαλύματος, αρχικά παρασκευάζεται το βασικό διάλυμα αλάτων, και μετά την αποστείρωση προσθέτονται τα υπόλοιπα συμπληρωματικά συστατικά. Το βασικό διάλυμα παρασκευάζεται με προσθήκη κατά σειρά των συστατικών στις ποσότητες που περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

<u>Α. Βασικό διάλυμα</u>

NaCl	2,25	gr
Yeast Extract	2	gr
Casitone ή Peptone from casein	2	gr
K ₂ HPO ₄ 3,48% w/v	10	ml
KH_2PO_4 2% w/v	11,35	ml
NH ₄ Cl 2,5% w/v	20	ml
$MgSO_4x7H_2O~5\%~w/v$	10	ml
CaCl ₂ x2H ₂ O 1,5% w/v	16,7	ml
FeSO ₄ 0,01%	200	ml
Resazurin 1mg/ml	1	ml
Απιονισμένο νερό		ml

Το διάλυμα συμπληρώνεται με νερό μέχρι το σωστό όγκο και μεταφέρεται στο θάλαμο αναερόβιων συνθηκών, όπου διοχετεύεται σε αυτό μίγμα αερίου 80N₂:20CO₂ προκειμένου να απομακρυνθεί το περιεχόμενο οξυγόνο. Η φιάλη με το θρεπτικό σφραγίζεται κατάλληλα και το θρεπτικό αποστειρώνεται. Μετά την αποστείρωση μεταφέρεται για λίγα λεπτά σε λεκάνη με πάγο για να πέσει η θερμοκρασία και στη συνέχεια στο θάλαμο αναερόβιων συνθηκών όπου αφήνεται μέχρι να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου σε ατμόσφαιρα μίγματος αερίου 80%N₂ και 20%CO₂. Τότε προστίθενται κατά σειρά τα υπόλοιπα διαλύματα όπως περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Διάλυμα ιχνοστοιχείων SL-10	1	ml
Διάλυμα βιταμινών	10	ml
NaHCO ₃ 10%	8,5	ml
Διάλυμα μεθανόλης 50% v/v	10	ml
Cystein-HCl xH ₂ O 5% w/v	6	ml
Na ₂ Sx9H ₂ O 3%	10	ml

Το διάλυμα ιχνοστοιχείων SL-10, μπορεί εναλλακτικά να προστεθεί στο βασικό διάλυμα πριν την αποστείρωσή του. Η παρασκευή του διαλύματος ιχνοστοιχείων SL-10, του διαλύματος βιταμινών, του διαλύματος του όξινου ανθρακικού νατρίου καθώς και του αναγωγικού παράγοντα ένυδρου θειούχου νατρίου 3% περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.1. Οι αναγωγικοί παράγοντες ένυδρη υδροχλωρική κυστεΐνη και ένυδρο θειούχο νάτριο προστίθενται τελευταίοι στο διάλυμα.

Το τελικό pH μέσου θα πρέπει να είναι μεταξύ 6,5 και 6,8.

Μετά την προσθήκη και των αναγωγικών παραγόντων το διάλυμα έχει γίνει διάφανο και είναι έτοιμο να μεταφερθεί στα σωληνάκια τύπου Hungate ειδικά για αναερόβιες καλλιέργειες.

Β. Συμπληρωματικά συστατικά

Διάλυμα μεθανόλης 50%

Παρασκευάζεται διάλυμα μεθανόλης 50% v/v το οποίο αποστειρώνεται σε ατμόσφαιρα αζώτου και κατάλληλη ποσότητα προστίθεται στο θρεπτικό μέσο μετά την αποστείρωσή του.

<u>Ένυδρη υδροχλωρική κυστεΐνη (Cystein-HClx H₂O) 5% w/v</u>

Παρασκευάζεται πυκνό διάλυμα κυστεΐνης 5% w/v, το οποίο αποστειρώνεται σε ατμόσφαιρα αζώτου και προστίθεται στο θρεπτικό μέσο μετά την αποστείρωσή του. Αφήνεται να αντιδράσει με το θρεπτικό μέσο και στη συνέχεια προστίθεται ο επόμενος αναγωγικός παράγοντας, το ένυδρο θειούχο νάτριο.

4.3 Καλλιέργεια αναερόβιων μικροοργανισμών

Η καλλιέργεια αναερόβιων μικροοργανισμών παρουσιάζει κάποιες ιδιαιτερότητες σε σχέση με εκείνη των αερόβιων. Αρχικά, το θρεπτικό μέσο θα πρέπει να γίνει αναερόβιο, το οποίο επιτυγχάνεται με τη χρήση των αναγωγικών παραγόντων. Όλοι οι χειρισμοί που ακολουθούν γίνονται σε ατμόσφαιρα αερίων απαλλαγμένων από οξυγόνο. Επιπλέον, θα πρέπει να υπάρχει η δυνατότητα να παρακολουθείται η αναερόβια κατάσταση του θρεπτικού μέσου σε όλη τη διάρκεια ανάπτυξης των καλλιεργειών, κάτι που επιτυγχάνεται με τη βοήθεια του δείκτη της ρεσαζουρίνης. Τέλος θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλα δοχεία και πώματα ώστε να είναι δυνατή η διατήρηση των αναερόβιων συνθηκών, ενώ όλοι οι χειρισμοί κατά τη διάρκεια των καλλιεργειών θα πρέπει γίνονται σε κατάλληλο περιβάλλον ώστε να αποτραπεί η εισροή οξυγόνου.

Συνήθως τα θρεπτικά μέσα για αυστηρά αναερόβιους μικροοργανισμούς υποβάλλονται σε βρασμό προκειμένου να απομακρυνθεί το περιεχόμενο οξυγόνο, που είναι μια αρκετά χρονοβόρα διαδικασία. Στην παρούσα μελέτη, αντί του βρασμού, και στα δύο θρεπτικά η διοχέτευση αερίου απαλλαγμένου από οξυγόνο (μίγμα 80N₂:20CO₂) είχε τα ίδια αποτελέσματα. Αυτή η διαδικασία έχει βρεθεί ότι είναι περισσότερο αποτελεσματική από ότι ο βρασμός για την απομάκρυνση του οξυγόνου από το διάλυμα στην περίπτωση των αυστηρά αναερόβιων μεθανιογόνων Archaea (Kendall and Boone, 2006).

Οι αναγωγικοί παράγοντες προστίθενται σε όλα τα αναερόβια θρεπτικά μέσα για να μειώσουν και να αντισταθμίσουν το δυναμικό οξειδοαναγωγής σε ιδανικά επίπεδα. Οι πιο κοινοί αναγωγικοί παράγοντες είναι το θειογλυκολικό νάτριο (sodium thioglycolate), η υδροχλωρική κυστεΐνη (cysteine x HCl), το ένυδρο θειούχο νάτριο (Na₂S x 9H₂O), ο θειούχος σίδηρος, η διθειοθρεϊτόλη (dithiothreitol) και το διθειονώδες νάτριο (Na₂S₂O₄) (DSMZ). Οι αναγωγικοί παράγοντες προστίθενται στο θρεπτικό μέσο τελευταίοι, αφού έχουν προστεθεί όλα τα υπόλοιπα συστατικά και λίγο πριν τη χρήση του θρεπτικού μέσου. Το διθειονώδες ή υδροθειώδες νάτριο (sodium dithionite) προστίθεται αφού έχει πρώτα γίνει η αναγωγή από το θειούχο νάτριο για να μειώσει το δυναμικό οξειδοαναγωγής κάτω από τα -300 mV.

Έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι η χρήση του θειώδους νατρίου ως αναγωγικού παράγοντα σε αντικατάσταση του θειούχου νατρίου, επιτρέπει την προετοιμασία αναερόβιων θρεπτικών μέσων ακόμα κι εκτός θαλάμου αναερόβιων συνθηκών και αρκετά στελέχη αναερόβιων Archaea καλλιεργήθηκαν με επιτυχία με αυτόν τον

Υλικά & Μέθοδοι

τρόπο (Rothe and M. Thomm). Η προσθήκη του διθειονώδους νατρίου στα θρεπτικά μέσα για θειικοαναγωγικά Bacteria, έχει βρεθεί ότι ευνοεί την ανάπτυξη κάποιων ειδών, όπως τα είδη του γένους *Desulfosarcina* (Brenner *et al.*, 2005)

Η (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one-10-oxide ρεσαζουρίνη sodium salt) χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης, προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχής μετατροπή του θρεπτικού μέσου σε αναερόβιο. Η ρεσαζουρίνη είναι μια χρωστική ευαίσθητη στην αλλαγή του δυναμικού οξειδοαναγωγής και χρησιμοποιείται στις αναερόβιες καλλιέργειες ώστε να παρακολουθούνται τυχόν μεταβολές στο δυναμικό οξειδοαναγωγής. Γενικά είναι χρωστική μη τοξική για τα Bacteria ενώ είναι αποτελεσματική σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση (0,5 με 1 mg/l). Στην ανενεργή της μορφή έχει χρώμα σκούρο μπλε. Το πρώτο στάδιο αναγωγής συμβαίνει όταν η ρεσαζουρίνη βρίσκεται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει περίσσεια οργανικών συστατικών, μετά από βρασμό για λίγα λεπτά ή όταν θρεπτικό μέσο από ανόργανα άλατα θερμαίνεται απουσία οξυγόνου. Σε αυτό το μη αναστρέψιμο στάδιο ενεργοποίησής της, μετατρέπεται σε ρεσορουφίνη (resorufin), που έχει ροζ χρώμα σε τιμές pH κοντά στο ουδέτερο. Σε ένα επόμενο αναστρέψιμο στάδιο αναγωγής σχηματίζεται η υδρορεσορουφίνη (hydroresorufin), η οποία είναι άχρωμη. Το ζεύγος οξειδοαναγωγής resorufin/hydroresorufin γίνεται τελείως άχρωμο κάτω από ένα δυναμικό περίπου -110 mV και ανακτά το ροζ χρώμα σε ένα δυναμικό μεγαλύτερο του -51 mV. Ροζ χρώμα στο θρεπτικό μέσο δεν σημαίνει απαραίτητα ότι το μέσο έχει οξειδωθεί από το οξυγόνο (πχ εξαιτίας ενός περατού στο οξυγόνο πώματος). Για παράδειγμα, ορισμένα Bacteria που προκαλούν αναγωγή των νιτρικών, κατά τη της ανάπτυξής τους παράγουν νιτρώδη τα οποία δρουν ως πιθανό διάρκεια οξειδωτικό και έτσι μπορεί να ανεβάσει το δυναμικό πάνω από -51mV (DSMZ).

Καλλιέργεια σε σωληνάκια τύπου Hungate: Τα σωληνάκια τύπου Hungate, χρησιμοποιήθηκαν στην καλλιέργεια αναερόβιων μικροοργανισμών καθώς έδιναν τη δυνατότητα διατήρησης αναερόβιων συνθηκών ενώ διευκόλυναν και τους χειρισμούς κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας (Attebery and Finegold, 1969) Τα σωληνάκια καλλιέργειας (16x125mm), φέρουν ένα πώμα από λάστιχο βουτυλίου το οποίο ασφαλίζει με ένα δεύτερο πλαστικό πώμα με οπή που βιδώνει με σπείρωμα στο άνοιγμα του σωλήνα. Με αυτό το σύστημα αποφεύγεται η περίπτωση να εκτοπιστεί το πώμα στην περίπτωση που αυξηθεί η πίεση στο σωληνάκι λόγω παραγωγής αερίων από την καλλιέργεια, ενώ προσφέρει τη δυνατότητα αφαίρεσης δείγματος ή

88

Υλικά & Μέθοδοι

αέρα με τη βοήθεια βελόνας που μπορεί να τρυπήσει το λαστιχένιο πώμα από βουτύλιο χωρίς να αφήσει το οξυγόνο να περάσει μέσα από αυτό.

Το θρεπτικό υλικό μεταφέρεται στο σωληνάκι καλλιέργειας αμέσως μετά την προσθήκη των αναγωγικών παραγόντων και αφού έχει εξισορροπηθεί (διάφανο χρώμα) σε ατμόσφαιρα 80%N₂ και 20% CO₂ και πωματίζεται. Στη συνέχεια διοχετεύεται με τη βοήθεια βελόνας αέριο μίγμα 80%N₂ και 20% CO₂ ενώ μια δεύτερη βελόνα εισάγεται στο πώμα ώστε να αντικατασταθεί όλο το υπερκείμενο αέριο με το αέριο μίγμα που είναι απαραίτητο για την καλλιέργεια των μικροοργανισμών που έχουν επιλεγεί.

Για την αφαίρεση ποσότητας δείγματος καλλιέργειας, το σωληνάκι καλλιέργειας πρέπει να κρατηθεί με το άνοιγμα προς τα κάτω και με τη βοήθεια βελόνας απομακρύνεται από το λαστιχένιο πώμα η απαραίτητη ποσότητα. Χρησιμοποιείται αποστειρωμένη σύριγγα μιας χρήσης στην οποία έχει προηγηθεί γέμισμα και άδειασμα με αέριο μίγμα αρκετές φορές ώστε να εξαλειφθεί η πιθανότητα εισόδου οξυγόνου στην καλλιέργειας. Λόγω της εσωτερικής αυξημένης πίεσης το έμβολο της σύριγγας ανοίγει και η σύριγγα γεμίζει εύκολα. Για την αφαίρεση αέριου από την καλλιέργεια, το σωληνάκι κρατείται σε όρθια θέση, με το πώμα προς τα πάνω και αφαιρείται η απαραίτητη ποσότητα.

Στο τέλος κάθε χειρισμού, το υπερκείμενο αέριο στο σωλήνα καλλιέργειας αντικαθίσταται με το επιθυμητό μίγμα αερίων. Για τα θειικοαναγωγικά Bacteria και τους αντιπροσώπους του γένους *Methanosarcina* χρησιμοποιήθηκε το μίγμα 80N₂:20CO₂ που είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη του. Η διαδικασία αντικατάστασης του υπερκείμενου αερίου επαναλαμβάνεται κάθε φορά που λαμβάνεται δείγμα από την καλλιέργεια, ενώ μπορεί να γίνει και ενδιάμεσα, ώστε να απομακρυνθεί αέριο που τυχόν έχει παραχθεί από την καλλιέργεια. Στο τέλος απομακρύνεται πρώτα η βελόνα εκροής αερίου και έπειτα η βελόνα με την οποία εισάγεται το αέριο μίγμα. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται εσωτερικά του σωλήνα μικρή πίεση ώστε να είναι δυνατή αργότερα η αφαίρεση δείγματος χωρίς να χρειαστεί να ανοίξει το σωληνάκι.

Καλλιέργειες σε δοχεία πίεσης: Κατασκευάστηκαν ανοξείδωτα μεταλλικά δοχεία πίεσης προκειμένου να προσομοιωθούν οι *in situ* συνθήκες (πίεση ~200bar). Τα δοχεία αυτά είναι κυλινδρικά και στο πάνω μέρος τους κλείνουν με σπειρωτό πώμα από το ίδιο υλικό στο οποίο υπάρχει προσαρμοσμένο μανόμετρο (Εικόνα 2.4.1). Στο

89

κάτω μέρος τους, μέσω βαλβίδας, μπορούν να συνδεθούν με αντλία HPLC η οποία χρησιμοποιείται για την αύξηση της πίεσης στο εσωτερικό του δοχείου.





Εικόνα 2.4.1 Επώαση σε δοχεία πίεσης. α. Δοχείο πίεσης μαζί με σύριγγα-suba-seal, β. σύριγγες με κομμένο το άκρο luer και το έμβολο, πωματισμένες με suba-seal.

Σαν σωληνάκι καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένη πλαστική σύριγγα των 5 ml, από την οποία έχει αφαιρεθεί το άκρο luer, στο οποίο προσαρμόζεται ειδικό πώμα Suba-Seal (Sigma Aldrich) που κλείνει αεροστεγώς τη σύριγγα. εμποδίζει τη διαρροή θρεπτικού, κι επιπλέον δίνει τη δυνατότητα λήψης δείγματος με βελόνα χωρίς να χρειαστεί να απομακρυνθεί το πώμα (Εικόνα 2.4.2). Μετά τον εμβολιασμό που πραγματοποιείται εντός του θαλάμου αναερόβιων συνθηκών, οι σύριγγες μεταφέρονται έξω από το θάλαμο και μέσα στο δοχεία πίεσης τα οποία πληρώνονται με νερό και κλείνονται καλά. Με τη βοήθεια τις αντλίας η οποία συνδέεται στο κάτω μέρος του δοχείου, αυξάνεται η πίεση μέχρι ~ 200 bar.

Το πιο σημαντικό στάδιο για τη δημιουργία των αρχικών καλλιεργειών εμπλουτισμού είναι η ανάκτηση του δείγματος. Η ανάκτηση δειγμάτων από περιβάλλον με ακραίες συνθήκες (υψηλή πίεση) ενέχει αρκετούς κινδύνους για τη βιωσιμότητά τους και θεωρείται ότι ένα ιδανικό μικροβιολογικό δείγμα θα πρέπει να παραμένει στο σκοτάδι, σε *in situ* πίεση και θερμοκρασία και να μην διαταραχθεί μηχανικά ή χημικά. Η επίδραση που μπορεί να έχει η απόκλιση από αυτές τις συνθήκες εξαρτώνται από την έκταση και τη διάρκεια απόκλισης από τις *in situ* συνθήκες, από το βάθος του δείγματος, από το επίπεδο δραστηριότητας του δείγματος και από τους μικροοργανισμούς που έχουν ανακτηθεί. Στις πιθανές διαταράξεις που μπορεί να υποστεί το δείγμα, περιλαμβάνεται η απώλεια των ζωντανών μικροοργανισμών, η

Υλικά & Μέθοδοι

απώλεια των ειδικών σχέσεων που μπορεί να έχουν με τα συστατικά του ιζήματος, η μη επιθυμητή ανάπτυξη άλλων αυτόχθονων ή αλλόχθονων μικροοργανισμών (Yayanos 1995).

Για τις αρχικές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλια, δείγματα ιζήματος τα οποία συλλέχθηκαν αμέσως μετά την ανάκτηση και το άνοιγμα των πυρήνων στο κατάστρωμα και μεταφέρθηκαν στον θάλαμο αναερόβιων συνθηκών, όπου όλοι οι χειρισμοί που ακολούθησαν, έγιναν σε ατμόσφαιρα 80%N₂ και 20%CO₂. Τα σωληνάκια τύπου Hungate που περιείχαν τα απαραίτητα θρεπτικά μέσα, είχαν προετοιμαστεί στο χώρο του εργαστηρίου στο Πολυτεχνείο Κρήτης, λίγες μόνο ημέρες πριν την μεταφορά τους στο Ερευνητικό Σκάφος ΑΙΓΑΙΟ την παραμονή του απόπλου και διατηρούταν στους 4°C. Δύο ειδών καλλιέργειες δημιουργήθηκαν, τυπικές αναερόβιες καλλιέργειες σε ατμοσφαιρική πίεση, και καλλιέργειες σε δοχεία πίεσης που προσομοίαζαν τις in situ συνθήκες. Τα δείγματα ιζήματος ανακτήθηκαν από βάθος ~2000m όπου η in situ πίεση ήταν ~200bar και η θερμοκρασία που μετρήθηκε στους πυρήνες που ανακτήθηκαν κυμαίνονταν μεταξύ 4 και 14,5°C. Επομένως, τα κύτταρα κατά την ανάκτηση του πυρήνα υποβλήθηκαν σε αποσυμπίεση και ακολούθως, στην πρώτη περίπτωση καλλιέργειας εμπλουτισμού καλλιεργήθηκαν σε ατμοσφαιρική πίεση, ενώ στη δεύτερη περίπτωση υποβλήθηκαν ξανά σε συμπίεση μέχρι ~200 bar.

Για τη δημιουργία των αρχικών καλλιεργειών στα δοχεία πίεσης χρησιμοποιήθηκαν αναερόβια θρεπτικά διαλύματα σε τα οποία είχαν παρασκευαστεί σε φιάλες στο Πολυτεχνείο Κρήτης, λίγες μόλις μέρες πριν τη μεταφορά τους στον Ωκεανογραφικό Σκάφος ΑΙΓΑΙΟ, που έγινε την παραμονή του απόπλου και φυλάχτηκαν στους 4°C.

Ο εμβολιασμός έγινε στο θάλαμο αναερόβιων συνθηκών σε ατμόσφαιρα 80N₂:20CO₂. Κάθε δείγμα ιζήματος εμβολιάστηκε εις τριπλούν για της καλλιέργειες σε σωληνάκια hungate, ενώ έγινε μόνο ένας εμβολιασμός για κάθε δείγμα στις καλλιέργειες στα δοχεία πίεσης, λόγω περιορισμένου χώρου εντός του δοχείου και περιορισμένου αριθμού δοχείων. Στα δοχεία πίεσης ο εμβολιασμός έγινε σε 2ml θρεπτικού μέσου μέσα σε σύριγγες οι οποίες πωματίστηκαν στη συνέχεια με subaseal ειδικό για αναερόβιες καλλιέργειες. Για να υποβοηθηθεί ο εμβολιασμός στις περιπτώσεις που το ίζημα ήταν αρκετά πυκνό προηγήθηκε αραίωση του ιζήματος με ίσο όγκο θαλασσινού νερού περασμένου από φίλτρο 0,2μm (particle free sea waterpfsw). Η διαδικασία αυτή έγινε κάτω από ρεύμα αερίου μίγματος 80%N₂ και 20%CO₂. Στα σωληνάκια καλλιέργειας μετά το κλείσιμό τους διοχετεύτηκε το ίδιο

91

Υλικά & Μέθοδοι

μίγμα αερίου με τη βοήθεια βελόνας ώστε να αντικατασταθεί όλος ο υπερκείμενος αέριος χώρος με το μίγμα αερίου. Το ίδιο έγινε και στα δοχεία-σύριγγες μέσω του ειδικού πώματος suba-seal, που μεταφέρθηκαν στη συνέχεια στα δοχεία πίεσης.

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλια καθώς και τα θρεπτικά μέσα που επιλέχθηκαν για κάθε δείγμα περιγράφονται αναλυτικά στους πίνακες που ακολουθούν. Τα θρεπτικά μέσα για θειικοαναγωγικά Bacteria ονομάζονται με τις συντομογραφίες La, Ac, Eth και Suc, και αφορούν τα υποστρώματα γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, αιθανόλη και ηλεκτρικό οξύ, αντίστοιχα. Το θρεπτικό μέσο για *Methanosarcina* σημειώνεται ως Meth. Οι καλλιέργειες στα σωληνάκια hungate ονομάστηκαν αριθμητικά κατά σειρά που εμβολιάστηκαν. Στους πίνακες που ακολουθούν αναφέρεται ο αριθμός των καλλιεργειών που εμβολιάστηκαν από κάθε υπόστρωμα.

Α. Ηφαίστειο ιλύος Amsterdam

Από το ηφαίστειο ιλύος Amsterdam συλλέχθηκαν δείγματα από τρεις πυρήνες βαρύτητας και δύο πυρήνες τύπου και εμβολιάσθηκαν σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα (Πίνακας 2.4.1).

Ποράνας	Ráan	Καλλιέργειες									
πυρηνας/ Βάθος υδάτινης	Βαθη δειγμάτων	Σωληνάκια hungate					Δοχεία πίεσης				
στήλης	(cm)	Θει	οαναγα	ογικά Bac	teria		Θειοαναγωγικά Bacteria				
		Ac	La	Suc	Eth	Meth	Ac	La	Suc	Eth	Meth
AX02GC2 2030m	35	3	3	3	3	3	3	3	-	-	3
AX02AP2 2030m	Άγνωστο (~20??)	3	3	-	-	3	-	1	-	-	1
AX02AP4 2024m	Άγνωστο	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
AX06GC1 2236m	148	3	3	3	-	3					
AX11GC1	76	3	3	3	3	3					
2025m	114	3	3	3	3	3					

Πίνακας 2.4.1 Αρχικές καλλιέργειες από το ηφαίστειο ιλύος Amsterdam

Συνολικά, από το Amsterdam, δημιουργήθηκαν 81 αρχικές καλλιέργειες σε σωληνάκια hungate, από τις οποίες 63 ήταν σε θρεπτικό μέσο για θειοαναγωγικά Bacteria και 18 σε θρεπτικό μέσο για *Methanosarcina sp.* Επίσης 16 σύριγγες χρησιμοποιήθηκαν συνολικά για την δημιουργία καλλιεργειών σε δοχεία πίεσης από την περιοχή AX02, από τις οποίες οι 5 στόχευαν είδη του γένους *Methanosarcina sp.*

B. Ηφαίστειο ιλύος Kazan

Από το ηφαίστειο ιλύος Kazan συλλέχθηκαν δείγματα για καλλιέργειες από τον πυρήνα βαρύτητας AX19GC1. Για τις καλλιέργειες σε σωληνάκια hungate χρησιμοποιήθηκε ίζημα και από τέσσερα βάθη δειγματοληψίας, και έγινε «εμβολιασμός» σε όλα τα θρεπτικά μέσα. Για τα δοχεία πίεσης χρησιμοποιήθηκε ίζημα μόνο από το βαθύτερο δείγμα (110cm) (Πίνακας 2.4.2).

Πίνακας 2.4.2	Αρχικές καλλ	ιέργειες από τ	το ηφαίστειο	ιλύος Kazan
---------------	--------------	----------------	--------------	-------------

Πυράνας		Καλλιέργειες								
Πορηνας/ Βάθος δεινμάτων		Σωληνάκια hungate					Δοχεία πίεσης			
υδάτινης στήλης	(cm)	Θειοαναγωγικά Bacteria				Θειοαναγωγιι Bacteria			ά	
		Ac	La	Suc	Eth	Meth	Ac	La	Suc	Eth
	2	3	3	3	3	3				
AX19GC1	37	3	3	2	3	3				
1693m	73	3	3	3	3	3				
	110	3	3	2	3	3	1	1	1	1

Συνολικά, από το Kazan, δημιουργήθηκαν 58 αρχικές καλλιέργειες από τις οποίες οι 46 στόχευαν θειοαναγωγικά Bacteria και οι 12 αντιπροσώπους του γένους *Methanosarcina*. Στα δοχεία πίεσης, χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα τέσσερα θρεπτικά μέσα για τα θειοαναγωγικά Bacteria.

Γ. Ηφαίστειο ιλύος Thessaloniki

Από το ηφαίστειο ιλύος Thessaloniki ανακτήθηκαν δείγματα από δύο πυρήνες βαρύτητας για καλλιέργειες σε ατμοσφαιρική πίεση (Πίνακας 2.4.3).

Πυρήνας/	Βάθ η		k	Καλλιέργει	ιες		
Βάθος υδάτινης	ο ο ο ο ο ο ο ο ο ο ο ο ο ο ο ο ο ο ο		Σωλ	ηνάκια hu	ingate		
στήλης	(cm)	Θειοαναγωγικά Bacteria					
0111215		Ac	La	Suc	Eth	Meth	
AX47GC1	60	3	3		3	3	
1265m	100	3	3				
AVAQCCI	30	3	3			3	
1264m	80	2	3			3	
	125	3	3			3	

Πίνακας 2.4.3 Αρχικές καλλιέργειες από το ηφαίστειο ιλύος Thessaloniki

Συνολικά από το Thessaloniki δημιουργήθηκαν 44 καλλιέργειες, από τις οποίες οι 32 στόχευαν θειοαναγωγικά Bacteria και οι 12 αντιπροσώπους του είδους *Methanosarcina* sp.

Δ. Σαπροπηλός

Πέρα από τις καλλιέργειες που δημιουργήθηκαν από ιζήματα που ανακτήθηκαν από την περιοχή των ηφαιστείων ιλύος, συλλέχθηκαν δείγματα και από έναν πυρήνα βαρύτητας σαπροπηλικό, που ανακτήθηκε από την ευρύτερη περιοχή του ηφαιστείου Amsterdam από βάθος 2120m. Ο πυρήνας είχε μήκος 263cm και ανακτήθηκε δείγμα από βάθος ~186cm από μια ζώνη πάχους 60cm γκρί χρώματος. Δύο καλλιέργειες συνολικά δημιουργήθηκαν σε ατμοσφαιρική πίεση από το δείγμα του πυρήνα αυτού η 82, σε θρεπτικό μέσο για θειοαναγωγικά Bacteria με πηγή άνθρακα το γαλακτικό οξύ και η 83 που στόχευε αντιπροσώπους του γένους *Methanosarcina* sp.

Μετά τον εμβολιασμό τα σωληνάκια και τα δοχεία πίεσης μεταφέρθηκαν σε θάλαμο στους 11°C. Οι αρχικές καλλιέργειες κατά τη διάρκεια της αποστολής επωάστηκαν σε θάλαμο στους 11°C. Ανακαλλιέργειες σε φρέσκο θρεπτικό μέσο γίνονταν ανά χρονικά διαστήματα για να διατηρηθούν ζωντανοί οι μικροοργανισμοί που είχαν αναπτυχθεί αλλά και ως προσπάθεια να δημιουργηθούν καθαρές καλλιέργειες, με τη σταδιακή μείωση του πληθυσμού των λιγότερο ανθεκτικών κυττάρων στο επιλεκτικό μέσο επώασης. Η ανακαλλιέργεια επιτυγχάνεται με τη μεταφορά 1ml από την καλλιέργεια σε 9ml φρέσκου θρεπτικού μέσου. Οι αρχικές καλλιέργειες παρέμειναν για μεγάλο χρονικό διάστημα στο αρχικό σωληνάκι καλλιέργειας. Για τα δοχεία πίεσης, ανακαλλιέργειες έγιναν κάθε φορά που ανοίγονταν, τόσο σε σύριγγες προκειμένου να επωαστούν ξανά στα δοχεία πίεσης, όσο και σε σωληνάκια hungate, για επώαση σε ατμοσφαιρική πίεση.

Καλλιέργειες στοκ δημιουργήθηκαν με μεταφορά σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Όπως έχει αναφερθεί για τα θειικοαναγωγικά Bacteria, του γένους Desulfosarcina, Desulfovibrio, Desulfobacter κ.α., η δημιουργία καλλιεργειών στοκ, γίνεται όταν η καλλιέργεια φτάσει στη αρχή της φάσης στασιμότητας, οπότε και μεταφέρεται στους 2-5°C στο σκοτάδι, και μπορεί να μεταφέρεται σε φρέσκο μέσο ανά τακτά διαστήματα (~6 εβδομάδες) για να διατηρηθεί η βιωσιμότητα (Brenner *et al.*, 2005). Από τις καλλιέργειες στοκ σε χαμηλές θερμοκρασίες, ήταν δυνατή η δημιουργία ανακαλλιεργειών, με εμβολιασμό φρέσκου θρεπτικού μέσου και επώαση στους 11°C. Επίσης καλλιέργειες στοκ δημιουργήθηκαν και με μεταφορά καλλιέργειας σε γλυκερόλη, και ακολούθως αποθήκευση στους -20°C

4.4 Δημιουργία καθαρών καλλιεργειών

Η επιλογή των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται στην καλλιέργεια, οφείλεται αρχικά στο επιλεκτικό θρεπτικό μέσο, στο οποίο οι δότες ηλεκτρονίων (υπόστρωμα) ευνοεί την ανάπτυξη συγκεκριμένων μόνο ειδών. Από τις αρχικές καλλιέργειες εμπλουτισμού θα πρέπει να έχουν γίνει διαδοχικά τουλάχιστον δύο με πέντε ανακαλλιέργειες πριν γίνει η προσπάθεια για απομόνωση σε καθαρές καλλιέργειες (Widdel and Bak, 1992). Με τον τρόπο αυτό απομακρύνονται σταδιακά οι κόκκοι του ιζήματος και αραιώνεται η παρουσία ενδογενών μικροοργανισμών που δεν ανήκουν στους μικροοργανισμούς που στοχεύουν οι καλλιέργειες.

Μετά από διαδοχικές ανακαλλιέργειες είναι δυνατό να προκύψουν καθαρές καλλιέργειες, αφού είναι δυνατό στο επιλεκτικό θρεπτικό μέσο να αναπτυχθούν σταδιακά οι περισσότερο ανθεκτικοί μικροοργανισμοί, ενώ εκείνοι που ευνοούνται λιγότερο από τις συνθήκες καλλιέργειας (θρεπτικό, θερμοκρασία), σταδιακά να εξαλειφθούν, ενώ στις πιο εύρωστες μικτές καλλιέργειες εάν μεταφερθούν σε διαφορετική από τη συνήθη θερμοκρασία επώασης, είναι δυνατό να επικρατήσουν σταδιακά διαφορετικοί μικροοργανισμοί, που ευνοούνται από τις νέες συνθήκες.

Τεχνική ενσωμάτωσης της καλλιέργειας σε άγαρ (Deep-Agar)

Η τεχνική αυτή προτείνεται ιδανική για τη δημιουργία καθαρών καλλιεργειών θειικοαναγωγικών Bacteria (Brenner *et al.*, 2005). Στην τεχνική αυτή στερεής καλλιέργειας, η καλλιέργεια ενσωματώνεται μέσα στο άγαρ, σε σωληνάκι τύπου hungate, και ενώ το άγαρ παραμένει ακόμα σε ρευστή μορφή, δημιουργούνται σειριακές αραιώσεις (F. Widdel and F. Bak, 1992). Όλοι οι χειρισμοί γίνονται σε θάλαμο αναερόβιων συνθηκών σε ατμόσφαιρα 20N₂:80CO₂ και κατά τη διάρκεια των αραιώσεων τα σωληνάκια βρίσκονται κάτω από ρεύμα αερίου ίδιας σύστασης, ώστε να αποφευχθεί παρουσία οξυγόνου.

Αρχικά, παρασκευάζεται διάλυμα άγαρ 3,3% w/v, σε απιονισμένο νερό. Το άγαρ προηγουμένως έχει ξεπλυθεί αρκετές φορές με απιονισμένο νερό, ώστε να απομακρυνθούν συστατικά τα οποία μπορεί να είναι παρεμποδιστικά για την ανάπτυξη. Ποσότητα 3 ml από το διαλυμένο άγαρ, μεταφέρεται σε 6-8 σωληνάκια καλλιέργειας και αποστειρώνεται. Ενώ το άγαρ στα σωληνάκια καλλιέργειας

Υλικά & Μέθοδοι

διατηρείται ζεστό (~55°C), προσθέτονται σε αυτό 6ml από το θρεπτικό μέσο που έχει ήδη προετοιμαστεί και διατηρείται επίσης ζεστό. Από την καλλιέργεια εμπλουτισμού, μεταφέρεται στη συνέχεια 0,5-1ml, και δημιουργούνται διαδοχικές αραιώσεις 1:10 στα υπόλοιπα σωληνάκια καλλιέργειας. Στη συνέχεια τα σωληνάκια μεταφέρονται για να σταθεροποιηθούν σε παγωμένο νερό, πωματίζονται και ο υπερκείμενος αέριος χώρος αντικαθίσταται με το μίγμα αερίου (80% N_2 και 20%CO₂).

Οι χειρισμοί πρέπει να είναι ταχύτατοι και όσο το άγαρ παραμένει ρευστό στα σωληνάκια (θερμοκρασία >40°C). Όταν σταθεροποιηθεί το άγαρ, τα σωληνάκια μεταφέρονται στην κατάλληλη θερμοκρασία επώασης τοποθετημένα κάθετα με το πώμα προς τα κάτω, ώστε τυχόν υγρασία που συγκεντρώνεται κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας να μην περάσει από τα τοιχώματα της στερεής καλλιέργειας. Η υγρασία αυτή αφαιρείται όταν ανοιχθούν τα σωληνάκια καλλιέργειας για να ανακτηθούν οι αποικίες που αναπτύχθηκαν. Με διαδοχικές ανακαλλιέργειες ενσωμάτωσης σε στερεό άγαρ προκύπτουν καθαρές καλλιέργειες (Widdel and Bac, 1992, Brenner *et al.*, 2005).

Κεφάλαιο 3 - Αποτελέσματα

1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΦΘΟΝΙΑ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑΣ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΘΑΝΙΟΥ

Α. Ηφαίστειο Ιλύος Amsterdam

Σε όλους τους πυρήνες που ανακτήθηκαν από το ηφαίστειο ιλύος Amsterdam εντοπίστηκαν υδρίτες ή υπήρχαν ενδείξεις παρουσίας υδριτών οι οποίοι είχαν διαλυθεί κατά τη διάρκεια ανάκτησης των πυρήνων (βρασμός ιζήματος, διάκενα με νερό εντός του ιζήματος). Στο Amsterdam οι σχηματισμοί υδριτών ήταν εντοπισμένοι σε βάθος κάτω από τα 30cm του ιζήματος. Υψηλές συγκεντρώσεις μεθανίου μέσα στο ίζημα ανιχνεύθηκαν στα βάθη που εντοπίστηκαν υδρίτες.

Α.1 Πεδίο ΑΧ02 – Σύντομη γεωχημική περιγραφή

Το πεδίο ΑΧ02 είναι μια περιοχή με χαμηλή ροή εκλυόμενης ιλύος όπως προέκυψε από τα γεωχημικά δεδομένα, ενώ εντοπίστηκαν υδρίτες σε όλους τους πυρήνες ιζήματος. Στον πυρήνα AX02BC1 τα γεωχημικά προφίλ βάθους έδειξαν πολύ χαμηλή συγκέντρωση μεθανίου (<0.1mmol L^{-1}) σε όλο το μήκος του, ενώ τα στοιχεία που μεταφέρονται από το θαλασσινό νερό (θειικά ιόντα, χλώριο, μαγνήσιο) παρέμειναν στα επίπεδα του θαλασσινού νερού σε όλο το βάθος του πυρήνα, υποδηλώνοντας ότι υπάργει εισροή θαλασσινού νερού σε όλο το βάθος του ιζήματος που μελετήθηκε. Η μέγιστη τιμή στη συγκέντρωση του μεθανίου παρατηρήθηκε στο βαθύτερο επίπεδο (31cm) και ήταν ίση με 0.101 mmol L^{-1} και βρέθηκε να μειώνεται προς την επιφάνεια του ιζήματος. Η συγκέντρωση των θειικών στα 3.5cm ήταν κοντά στα επίπεδα του θαλασσινού νερού (29,6 mmol kg⁻¹ ιζήματος) και παρέμεινε περίπου σταθερή σε όλο το μήκος του πυρήνα με εξαίρεση το βαθύτερο δείγμα, όπου εμφάνισε μια μικρή μείωση (23,5 mmol kg⁻¹ ιζήματος) που θα μπορούσε να αποτελεί ένδειξη ότι πραγματοποιείται ΑΟΜ. Τα προφίλ βάθους του χλωρίου, του μαγνησίου και των θειικών ιόντων έδειξαν ότι η επίδραση της ροής από τα βαθύτερα επίπεδα του ιζήματος ήταν ελάχιστη, καθώς οι τιμές τους μέχρι και τα 25 cm βάθος είναι κοντά στα επίπεδα του θαλασσινού νερού. Επιπλέον, τα προφίλ βάθους για το πυρίτιο και το βάριο, στοιχεία που προέρχονται από τα βαθύτερα επίπεδα του ιζήματος μέσω της ανοδικής ροής, εμφάνισαν μια απότομη αύξηση στην συγκέντρωσή τους μόνο στα κατώτερα επίπεδα του ιζήματος (κάτω από τα 23, 5 cm).

Α.1.1 Πυρήνας ΑΧ02ΒC1

Α.1.1.1 Αφθονία κυττάρων, μέγεθος και αφθονία συσσωματωμάτων

Η συγκέντρωση των μεμονωμένων κυττάρων στο πιο ρηχό επίπεδο του ιζήματος που μελετήθηκε (2 cm), ήταν 4.67x10⁸ κύτταρα cm⁻³ νωπού ιζήματος ενώ κυμάνθηκε μεταξύ 1,01x10⁸-5,67x10⁸ κύτταρα cm⁻³ ν.ιζ. σε όλο το μήκος του πυρήνα με εξαίρεση τα 26cm που ήταν μια τάξη μεγέθους χαμηλότερη (3,31x 10⁷ κύτταρα cm⁻³ ν.ιζ.). Σε όλο το βάθος του πυρήνα, με εξαίρεση τα 32 cm, η συγκέντρωση των μεμονωμένων κυττάρων βρέθηκε να υπερτερεί εκείνης των κυττάρων σε συσσωματώματα (Εικόνα 3.1.1).



Εικόνα 3.1.1 Προφίλ βάθους της κατανομής της αφθονίας (x10⁶ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ.) των μεμονωμένων κυττάρων (λευκή στήλη) και των κυττάρων σε συσσωματώματα (διάστικτη στήλη).

Σε βάθος μέχρι 14 cm τα μεμονωμένα κύτταρα συμμετείχαν σε ποσοστό 81,5-98,3% στην ολική κυτταρική αφθονία. Στα βαθύτερα επίπεδα, το ποσοστό των μεμονωμένων κυττάρων ήταν μικρότερο του 60% της ολικής κυτταρικής ενώ στα 38cm κυριάρχησαν πάλι τα μεμονωμένα κύτταρα (93,6% της ολικής αφθονίας), όπου τα κύτταρα σε συσσωματώματα είχαν τη μέγιστη συγκέντρωση (5,67x10⁸ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ.).
Συσσωματώματα κυττάρων παρατηρήθηκαν σε όλα τα βάθη του πυρήνα. Τα συσσωματώματα ήταν σφαιρικά ή είχαν περισσότερο ακανόνιστα σχήματα, ενώ συχνά παρατηρήθηκαν συσσωματώσεις κυττάρων να σχηματίζουν ένα μεγαλύτερο συσσωμάτωμα (Εικόνα 3.1.2). Η συγκέντρωσή των συσσωματωμάτων σε όλο το μήκος του πυρήνα ήταν της τάξης του 10^6 συσσωματώματα cm⁻³ ν.ιζ. (Εικόνα 3.1.1). Μέχρι τα 26cm βάθος, το μέγεθος των συσσωματωμάτων είχε διάμετρο συνήθως μεταξύ 1-2m και σπάνια ανιχνεύθηκαν μεγαλύτερα συσσωματώματα. Τα μικρότερα συσσωματώματα αποτελούνταν μόλις από λίγα κύτταρα που μπορεί να εκφράζουν ένα αρχικό ή ενδεχομένως ένα τελικό στάδιο σχηματισμού συσσωματώματος. Στα 32 και 44cm όμως, τα συσσωματώματα ήταν πολύ μεγαλύτερα φτάνοντας συχνά τα 12 με 15μm, αποτελούμενα από μερικές χιλιάδες κύτταρα, ενώ στα 44cm, τα συσσωματώματα έφταναν τα 5μm αποτελούμενα από μερικές εκατοντάδες κύτταρα (Εικόνα 3.1.2). Έτσι, ενώ η συγκέντρωση των συσσωματωμάτων ήταν περίπου σταθερή κατά μήκος του πυρήνα, η συγκέντρωση τελικά των κυττάρων που συμμετείχαν σε συσσωματώματα ήταν μεγαλύτερη στα βαθύτερα επίπεδα, όπου τα συσσωματώματα είγαν μεγαλύτερο μέγεθος.



Εικόνα 3.1.2 Συσσωματώματα που ανιχνεύθηκαν με χρώση DAPI. Διακρίνονται συσσωματώματα τύπου σφαίρας, αλλά και συσσωματώματα κυττάρων που συνενώνονται σε μεγαλύτερα συσσωματώματα (Μεγέθυνση x 1000). Μέγεθος μπάρας 5μm.

Στα 2 cm βάθος όπου τα συσσωματώματα ήταν πολύ μικρά, η συγκέντρωση των κυττάρων στα συσσωματώματα ήταν χαμηλή (8,13x10⁶ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ.). Στα υπόλοιπα βάθη, η τιμή της κυμάνθηκε μεταξύ 2,71x10⁷ με 7,24x10⁷ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ., με εξαίρεση τα 32 και 44 cm που η συγκέντρωση των κυττάρων στα συσσωματώματα ήταν κατά δύο και μια τάξη μεγέθους υψηλότερη (5,00 x 10⁹ και

2,45 x 10⁸ κύτταρα cm⁻³ ν.ιζ. αντίστοιχα), εξαιτίας του μεγαλύτερου μεγέθους των συσσωματωμάτων (Εικόνα 3.1.2).

Η ολική κυτταρική αφθονία στα 2 cm βάθος ήταν 4,75 x 10^8 κύτταρα cm⁻³ v.ιζ και από το επίπεδο αυτό του ιζήματος και κάτω, παρέμεινε στην ίδια τάξη μεγέθους μέχρι τα 20cm. Στα 32 cm, παρατηρήθηκε η μέγιστη τιμή στην ολική κυτταρική αφθονία (5,19x10⁹ κύτταρα cm⁻³), πού οφείλεται στη μεγάλη συγκέντρωση των κυττάρων σε συσσωματώματα, τα οποία συμμετείχαν στην ολική αφθονία σε ποσοστό 96,4% (Εικόνα 3.1.1, Εικόνα 3.1.8). Στα 38 cm βάθος όπου παρατηρήθηκε το χαμηλότερο ποσοστό των κυττάρων σε συσσωματώματα η ολική αφθονία ήταν ίση με 6,06x10⁸ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ. και βρέθηκε ότι οφείλεται κατά 93,6 % στα μεμονωμένα κύτταρα. Τδια περίπου τιμή είχε η ολική αφθονία στο βαθύτερο επίπεδο του πυρήνα στα 44 cm (5,98 x 10^8 κύτταρα cm⁻³ v.ιζ.), όμως σε αυτό το βάθος οφειλόταν στην υψηλή συγκέντρωση των κυττάρων σε συσσωματώματα (2,45x10⁸ κύτταρα. cm⁻³ v.ιζ.) που συνεισέφερε κατά 41% στην ολική αφθονία (Εικόνα 3.1.1, Εικόνα 3.1.8). Στον πυρήνα ΑΧ02BC1, που ανακτήθηκε από περιοχή χαμηλής ροής έκλυσης ιλύος, σε όλα τα βάθη που μελετήθηκαν η κυτταρική αφθονία ήταν υψηλή, και ιδιαίτερα στα βαθύτερα επίπεδα, που υποδηλώνει πολύ έντονη μικροβιακή δραστηριότητα.

Α.1.1.2 Μορφολογία και δομή των συσσωματωμάτων

Ο ταυτόχρονος υβριδισμός με τους ανιχνευτές EUB338I-III και ARC915 αποκάλυψε δύο διαφορετικές δομές συσσωματωμάτων. Στην πρώτη δομή, τα συσσωματώματα ήταν περίπου σφαιρικά σε σχήμα με έναν εσωτερικό πυρήνα από Archaea ο οποίος φάνηκε να περιβάλλεται εξωτερικά μερικώς ή ολικώς από Bacteria (Εικόνα 3.1.3i, ii, iv, v). Στη δεύτερη δομή, συσσωματώματα από Archaea και συσσωματώματα από Bacteria βρέθηκαν να συμμετέχουν σε τυχαίες διατάξεις στο σχηματισμό ενός μεγαλύτερου συσσωματώματος με σχήμα το οποίο δεν ήταν πάντα σφαιρικό, ενώ κάποιες φορές οι δύο αυτές ομάδες παρατηρήθηκαν σε πιο χαλαρή σύνδεση μεταξύ τους (Εικόνα 3.1.3.iii, iv).



Εικόνα 3.1.3 Τεχνική FISH με ταυτόχρονο υβριδισμό με τους ανιχνευτές ARC915 για τα Archaea (πράσινο) και DSS658 για τα θειικοαναγωγικά Bacteria της ομάδας Desulfosarcina/Desulfococcus (κόκκινο). Σφαιρικά συσσωματώματα με κεντρικό πυρήνα από Archaea να περιβάλλεται από θειικοαναγωγικά Bacteria (i, ii, v, vi,). Συσσωματώματα από Archaea και θειικοαναγωγικά Bacteria που συμμετέχουν στο σχηματισμό ενός μεγαλύτερου συσσωματώματος σε πιο χαλαρή σύνδεση μεταξύ τους (iii, iv). Μικρά συσσωματώματα αποτελούμενα και από τις δύο ομάδες κυττάρων (v, vi, vii, viii). Συσσωμάτωμα από Archaea χωρίς την εμφανή παρουσία Bacteria (ix). Στις φωτογραφίες, από αριστερά προς τα δεξιά χρήση φίλτρου για ολικά κύτταρα (χρώση DAPI), θειικοαναγωγικά Bacteria (κόκκινο), Archaea (πράσινο) και φίλτρο για ταυτόχρονη ανίχνευση και των δύο ομάδων.

Όλα τα Bacteria βρέθηκε ότι άνηκαν στα θειικοαναγωγικά Bacteria της ομάδας Desulfosarcina/Desulfococcus. Ακόμα και στα πιο μικρά συσσωματώματα, αποτελούμενα μόλις από λίγα κύτταρα βρέθηκαν να συνυπάρχουν και οι δύο ομάδες μικροοργανισμών (Εικόνα 3.1.3.v, vi, vii, viii), ενώ υπήρξαν και περιπτώσεις που μικρά συσσωματώματα αποτελούνταν αποκλειστικά μόνο από Archaea ή θειικοαναγωγικά Bacteria (Εικόνα 3.1.3. ix).

A.1.1.3 Ανίχνευση των αναερόβιων μεθανιότροφων ANME-2

Με τη βοήθεια της τεχνικής FISH και τον ανιχνευτή ANME-2, που στοχεύει αναερόβιους μεθανιότροφους οξειδωτές της ομάδας ΑΝΜΕ-2, διαπιστώθηκε ότι τα Archaea που συμμετείχαν στα συσσωματώματα της περιοχής AX02 ανήκαν στα ANME-2. Επιπλέον, προκειμένου να μελετηθεί αν στα συσσωματώματα υπήρχαν αναερόβια μεθανιότροφα Archaea της ομάδας ANME-3, που λόγω μη επιλεκτικού υβριδισμού θεωρήθηκαν ότι ανήκουν στα ΑΝΜΕ-2 που ανιχνεύθηκαν, εφαρμόστηκε η τεχνική FISH με ταυτόχρονο υβριδισμό με τον ανιχνευτή ANME-3 και τον ανιχνευτή DBB305, όπου δεν εντοπίστηκαν ANME-3/DBB συσσωματώματα σε κανένα από τα βάθη του πυρήνα AX02BC1 και σε κανέναν άλλο πυρήνα από την περιοχή ΑΧ02. Διαπιστώθηκε επομένως, ότι όλα τα συσσωματώματα που ανιχνεύθηκαν αποτελούνταν από ANME-2 Archaea μαζί με θειικοαναγωγικά ομάδας Desulfosarcina/Desulfococcus Bacteria (Εικόνα 3.1.4). Τα της συσσωματώματα που σπάνια βρέθηκαν να αποτελούνται αποκλειστικά από ANME-2 ή μόνο από θειικοαναγωγικά Bacteria, στην καταμέτρηση θεωρήθηκαν σαν μικτά συσσωματώματα με μέση διάμετρο κυττάρων 0,45μm (βλ. Κεφάλαιο 2). Επομένως όλα τα συσσωματώματα που ανιχνεύθηκαν με την χρώση DAPI ήταν συσσωματώματα τύπου ANME-2/DSS και άρα η αφθονία των συσσωματωμάτων καθώς και η συγκέντρωση των κυττάρων που συμμετείχαν σε συσσωματώματα, θεωρήθηκε ότι αντιπροσωπεύει τα συσσωματώματα αυτού του τύπου.



Εικόνα 3.1.4 Τεχνική FISH με ταυτόχρονο υβριδισμό με τον ανιχνευτή ANME-2 με CY3 (κόκκινο) και DSS658 με fluorescein (πράσινο). Στις εικόνες αριστερά η παρατήρηση με τη χρώση DAPI και δεξιά η παρατήρηση με το διπλό φίλτρο.

Κεφάλαιο 3

Αποτελέσματα

Η παρουσία των ANME-2/DSS συσσωματωμάτων, όπως παρατηρήθηκε και με τη χρώση DAPI, σε όλο το μήκος του πυρήνα, είναι μια ισχυρή ένδειξη ότι η αναερόβια οξείδωση του μεθανίου είναι δυνατό να συμβαίνει σε όλα τα βάθη του ιζήματος που εξετάστηκαν, καθώς αυτά τα συσσωματώματα έχουν βρεθεί σε ιζήματα όπου συμβαίνει AOM κι έχουν θεωρηθεί ότι μεσολαβούν για την πραγματοποίησή της (Boetius *et al*, 2000). Στα 32cm βάθος, μπορεί να θεωρηθεί ότι υπάρχει μεγαλύτερη δραστηριότητα AOM, καθώς παρατηρήθηκε η μέγιστη συγκέντρωση κυττάρων σε συσσωματώματα, κατά δύο τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη σε σχέση με τα υπόλοιπα βάθη και τα συσσωματώματα ήταν μεγαλύτερα σε μέγεθος σε σχέση με εκείνα στα υπόλοιπα βάθη του ιζήματος. Το επίπεδο αυτό του ιζήματος μπορεί να θεωρηθεί ως «ζώνη αυξημένης AOM» με τη μεσολάβηση ANME-2/DSS συσσωματωμάτων (Εικόνα 3.1.6, Εικόνα 3.1.8). Ομοίως, 44 cm βάθος, όπου η αφθονία των κυττάρων σε συσσωματώματα ήταν κατά μια τάξη μεγέθους μεγαλύτερη, μπορεί να θεωρηθεί επίσης περιοχή με αυξημένη δραστηριότητα AOM.

A.1.1.4 Ανίχνευση των αναερόβιων μεθανιότροφων ANME-1

Μεθανιότροφα ANME-1 Archaea, ανιχνεύθηκαν με τη βοήθεια της τεχνικής FISH. Τα κύτταρά αυτά ήταν κυλινδρικά, ραβδόμορφα, με μήκος 2-4 μm. Στο ίζημα βρίσκονταν μεμονωμένα, είτε σχημάτιζαν μικρές αλυσίδες των 2-3 κυττάρων ενώ σπάνια σχημάτιζαν μεγαλύτερες αλυσίδες. Σπάνια βρέθηκαν να συνυπάρχουν μαζί με άλλα κύτταρα, κάποια από τα οποία προσδιορίστηκαν ως θειοαναγωγικά Bacteria της ομάδας *Desulfosarcina/Desulfococcus* (Εικόνα 3.1.5). Τα ANME-1 κύτταρα καταμετρήθηκαν σαν κύτταρα που ανήκαν στα μεμονωμένα κύτταρα. Τα ANME-1 ήταν ανύπαρκτα στα πρώτα δύο ανώτερα βάθη που εξετάστηκαν (2 και 6 cm). Σε όλα τα βάθη τα ANME-1 ανιχνεύθηκαν κυρίως ως μεμονωμένα κύτταρα, εκτός από το επίπεδο των 32cm, όπου το 78,7% των ANME-1 κυττάρων βρέθηκε να σχηματίζει αλυσίδες. Στα 26cm τα μεμονωμένα ANME-1 αποτελούσαν το 86,7% των ANME-1. Στα υπόλοιπα βάθη τα ANME-1 ως μεμονωμένα κύτταρα αποτελούσαν το 45-60% των ANME-1 κυττάρων.



Εικόνα 3.1.5 Ανίχνευση ANME-1 κυττάρων με την τεχνική FISH. Εικόνες i-iv, αριστερά χρώση DAPI (μπλε), δεξιά FISH με τον ανιχνευτή ANME-1 σημασμένο με CY3 (κόκκινο). (i) Διακρίνονται κύτταρα να σχηματίζουν ζεύγη ή μικρές αλυσίδες.(ii-iii) Τα ANME-1 κύτταρα βρέθηκαν να συνυπάρχουν μαζί με άλλα κύτταρα. (ii) Διακρίνεται μια ομάδα από κύτταρα κόκκους πάνω δεξιά που συνυπάρχει με τα ANME-1 κύτταρα. (iii) Διακρίνεται μια ομάδα από κύτταρα κόκκους πάνω δεξιά που συνυπάρχει με τα ANME-1 κύτταρα. (iv) Τα ANME-1 κύτταρα παρατηρήθηκαν σπάνια να σχηματίζουν συσσωματώσεις κυττάρων μαζί με άλλα κύτταρα. Διακρίνεται ένα μεγάλο συσσωμάτωμα αποτελούμενο από μικρότερες συσσωματώσεις κυττάρων. Διακρίνεται ένα σφαιρικό συσσωμάτωμα στο κέντρο, τύπου ANME-2/DSS, δύο ακόμα συσσωματώσεις κυττάρων πάνω δεξιά και στο κάτω μέρος συσσωματώσεις από ANME-1 κύτταρα. (v και vi) Ταυτόχρονος υβριδισμός με τους ανιχνευτές ANME-1 και ANME-2 με CY3 (κόκκινο) και DSS658 με fluorescein (πράσινο). Τυπικά ραβδοειδή κύτταρα των ANME-1 βρέθηκαν να συνυπάρχουν μαζί με θειικοαναγωγικά Bacteria της ομάδας *Desulfosaricina/Desulfococcus* αλλά και μαζί με σφαιρικά συσσωματώματα από ANME-2 κύτταρα (vi).

Η συγκέντρωση των ANME-1 κυττάρων παρουσίασε αύξηση με το βάθος (Εικόνα 3.1.6). Στα 14cm η αφθονία των ANME-1 ήταν 9,46x10⁶ κύτταρα cm⁻³ ν.ιζ. που αντιστοιχεί στο 3,24% της ολικής κυτταρικής αφθονίας (Εικόνα 3.1.8). Στα επόμενα επίπεδα του ιζήματος η συγκέντρωση των ANME-1 μειώθηκε ελαφρά μέχρι τα 26cm βάθος (5,05x10⁶ κύτταρα cm⁻³ ν.ιζ.). Το επίπεδο των 26 cm είναι το βάθος όπου καταμετρήθηκε η χαμηλότερη κυτταρική αφθονία (Εικόνα 3.1.6) στην οποία τα ANME-1 κύτταρα συμμετείχαν σε ποσοστό 8,1% (Εικόνα 3.1.8).



Εικόνα 3.1.6 Πυρήνας AX02BC1. Προφίλ βάθους της κατανομής των ANME-1 κυττάρων και των ANME-2/DSS συσσωματωμάτων. Η μαύρη στήλη αντιπροσωπεύει τα ANME-1 κύτταρα, η διάστικτη στήλη αντιπροσωπεύει τα ANME-2/DSS συσσωματώματα, ενώ η άσπρη στήλη αντιπροσωπεύει τα υπόλοιπα κύτταρα που δεν ανήκουν στα ANME-1, ANME-2/DSS συσσωματώματα. Η ολική κυτταρική αφθονία σημειώνεται με τη γραμμή (-•-). Στο διάγραμμα πάνω δεξιά μεγεθύνεται η σκιασμένη περιοχή του κάτω διαγράμματος. Οι κυτταρικές αφθονίες δίνονται σε 10⁶ κύτταρα cm⁻³ ν.ιζ.

Η συγκέντρωση των ANME-1 κυττάρων παρουσίασε μεγάλη αύξηση στο επίπεδο των 32 cm και βαθύτερα. Στα 32 cm, όπου παρατηρήθηκε η μέγιστη συγκέντρωση των ANME-2/DSS συσσωματωμάτων, η αφθονία των ANME-1 ήταν αυξημένη περίπου κατά μια τάξη μεγέθους (5,36x10⁷ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ.) σε σχέση με το αμέσως προηγούμενο επίπεδο. Στο παρακείμενο βαθύτερο επίπεδο (38cm) η αφθονία των ANME-1 αυξήθηκε ξανά κατά μια τάξη μεγέθους και είναι το βάθος όπου παρατηρήθηκε η μέγιστη αφθονία των ANME-1 (1,17x10⁸ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ.) που αποτελούσαν το 19,3% της ολικής αφθονίας στο βάθος αυτό (Εικόνα 3.1.6). Στα 44cm, η συγκέντρωση των ANME-1 ήταν $3,13 \times 10^7$ κύτταρα cm⁻³ ν.ιζ., ποσοστό 5,25% της ολικής κυτταρικής αφθονίας (Εικόνα 3.1.8).



□ μεμονωμένα κύτταρα πλην των ANME-1 🛛 μεμονωμένα ANME-1 🔳 ANME-1 αλυσίδες

Εικόνα 3.1.7 Πυρήνας AX02BC1. Κατανομή % των ANME-1 κυττάρων στα μεμονωμένα κύτταρα. Η διάστικτη στήλη αντιπροσωπεύει τα μεμονωμένα ANME-1 κύτταρα, η μαύρη στήλη τα κύτταρα ANME-1 σε αλυσίδες ενώ με λευκό χρώμα απεικονίζονται τα μεμονωμένα κύτταρα που δεν ανήκουν στα ANME-1. Στη στήλη δεξιά παρατίθεται το ποσοστό των ANME-1 κυττάρων (μεμονωμένων και σε αλυσίδες) στα μεμονωμένα κύτταρα.

Τα ANME-1 κύτταρα είχαν μεγαλύτερη συμμετοχή τόσο στην αφθονία των μεμονωμένων κυττάρων, όσο και στην ολική αφθονία, κυρίως στα βαθύτερα επίπεδα του ιζήματος (Εικόνα 3.1.7, Εικόνα 3.1.8). Στα πρώτα δύο επίπεδα που ανιχνεύθηκαν τα ANME-1 (14 και 20cm), βρέθηκε ότι η συμμετοχή τους στην αφθονία των μεμονωμένων κυττάρων ήταν χαμηλή (1,8-3,6%). Στα βάθη μεταξύ 26 και 38cm τα ANME-1 συμμετείχαν στην αφθονία των μεμονωμένων κυττάρων σε ποσοστό μεγαλύτερο του 15%. Στα 32cm, το ποσοστό αυτό έφτασε το 28,3%, όπου τα ANME-1 κύτταρα σε αλυσίδες βρέθηκε να αποτελούν το 22,3% της αφθονίας των μεμονωμένων κυττάρων (Εικόνα 3.1.7).

Στα 38cm βάθος, όπου ανιχνεύθηκε η μεγαλύτερη αφθονία τους, τα ΑΝΜΕ-1 συμμετείχαν σε ποσοστό 20,6% στην αφθονία των μεμονωμένων κυττάρων. Στο βάθος αυτό 19,3% των ολικών κυττάρων που καταμετρήθηκαν ανήκαν στα ΑΝΜΕ-1. Στα υπόλοιπα επίπεδα του ιζήματος που μελετήθηκαν, τα ΑΝΜΕ-1 κύτταρα συνεισέφεραν στην ολική αφθονία σε ποσοστό που κυμάνθηκε από 1 μέχρι 8,1% (Εικόνα 3.1.8). Το επίπεδο των 38cm, είναι το βάθος που παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη κυτταρική αφθονία των μεμονωμένων κυττάρων (5,67x10⁸ κύτταρα cm⁻³ ν.ιζ.) και ο αυτό οφείλεται στη αφθονία των ΑΝΜΕ-1 κυττάρων.



🗆 κύτταρα που δεν ανήκουν στα ANME-1 και ANME-2/DSS 🛛 🖬 ANME-1 🛛 ANME-2/DSS

Εικόνα 3.1.8 Πυρήνας AX02BC1. Σύγκριση της συγκέντρωσης των ANME-1 (τμήμα στήλης με μαύρο χρώμα) και ANME-2/DSS (διάστικτο τμήμα στήλης) κατά βάθος ιζήματος. Τα ANME-2/DSS συσσωματώματα ανιχνεύθηκαν σε όλα τα βάθη με μέγιστη αφθονία στα 32cm. Τα ANME-1 ανιχνεύθηκαν στα 14cm και η αφθονία τους βρέθηκε να αυξάνεται με το βάθος με μέγιστη τιμή στα 38 cm.

Παρά το γεγονός ότι η ολική κυτταρική αφθονία ήταν περίπου σταθερή στα βάθη 38 και 44 cm η κατανομή των διαφορετικών μεθανιότροφων μικροοργανισμών ήταν διαφορετική (Εικόνα 3.1.6, Εικόνα 3.1.8). Έτσι, ενώ στα 38cm κυριάρχησαν τα

ANME-1 κύτταρα, στα 44cm τα ANME-2/DSS συσσωματώματα κάλυψαν το 41% της ολικής αφθονίας.

Η ανίχνευση των ANME-1, είναι μια ένδειξη ότι μπορεί να συμβαίνει AOM σε βάθος από 14 cm μέχρι τον πυθμένα του πυρήνα και θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι η δραστηριότητα της AOM είναι πιο έντονη μεταξύ των 32 και 44 cm όπου η συγκέντρωσή των ANME-1 ήταν υψηλή (10⁷-10⁸ κύτταρα cm⁻³ ν.ιζ.). Στα 38 cm βάθος, όπου η συγκέντρωση των ANME-1 παρουσίασε μέγιστη τιμή, κατά μια τάξη μεγέθους μεγαλύτερη από την συγκέντρωση των ANME-1 στα υπόλοιπα βάθη, μπορεί να θεωρηθεί ως «ζώνη αυξημένης AOM» με τη μεσολάβηση ANME-1.

Α.1.2. Σύγκριση μεταξύ ιζημάτων που αποσυμπιέστηκαν σταδιακά και ακαριαία

Οι πυρήνες που μελετήθηκαν από το ηφαίστειο ιλύος Amsterdam, ανακτήθηκαν από βάθος ~2000 m κι επομένως η *in situ* πίεση ήταν ~200 bar. Στους πυρήνες που ανακτήθηκαν με διαφορετικές τεχνικές πυρηνοληψίας από την ίδια περιοχή, μελετήθηκε η επίδραση της αποσυμπίεσης (απότομη ή σταδιακή αποσυμπίεση) στην κυτταρική αφθονία αλλά και στις ιδιαίτερες δομές που σχημάτιζαν τα κύτταρα (συσσωματώματα, αλυσίδες κυττάρων).

Πίνακας 3.1.1 Ολική κυτταρική αφθονία (κύτταρα cm⁻³ νωπού ιζήματος), στο κιβώτιο - πυρήνα AX02BC1, στον πυρήνα βαρύτητας AX02GC2, στους πυρήνες APCA AX02AP1 και AX02AP4 και στον πυρήνα MAC AX02MA2.

Βάθος (cm)	AX02BC1	AX02GC2	AX02AP1	AX02MA2	AX02AP4
2	4.75×10^8			6.76 x 10 ⁸	
8	3.02×10^8				
14	2.92 x 10 ⁸				
20	$1.74 \ge 10^8$			1.94 x 10 ⁸	Άγνωστο
26	6.24×10^7				βάθος
30			$2.41 \ge 10^8$		
32	5.19 x 10 ⁹				1.13 x 10 ⁹
35		4.25×10^8			
38	$6.06 \ge 10^8$				
44	5.98 x 10 ⁸				

Στον AX02GC2, που ανακτήθηκε με τη βοήθεια πυρηνολήπτη βαρύτητας, η ολική αφθονία των κυττάρων σε βάθος ιζήματος 35cm ήταν 4,25 x 10^8 κύτταρα cm⁻³ v.ιζ. Η συγκέντρωση των συσσωματωμάτων ήταν 5,99 x 10^6 συσσωματώματα cm⁻³ v.ιζ (2,20 x 10^8 κύτταρα cm⁻³ v.ιζ), που αντιστοιχεί σε ποσοστό 52% της ολικής αφθονίας. Οι τιμές αυτές είναι αναμενόμενες εάν συγκριθούν με τις συγκεντρώσεις που

110

βρέθηκαν στα βαθύτερα επίπεδα του πυρήνα AX02BC1 (Πίνακας 3.1.1), καθώς και οι δύο πυρήνες υπέστησαν σταδιακή αποσυμπίεση κατά τη διάρκεια ανέλκυσής τους από το βυθό. Η ολική αφθονία στους πυρήνες APCA και MAC ήταν της ίδιας τάξης μεγέθους με εκείνη στον πυρήνα AX02BC1 και AX02GC2 (Πίνακας 3.1.1). Οι πυρήνες αυτοί αν και ανακτήθηκαν από την ίδια περιοχή είχαν διαφορετικές πιέσεις, λόγω πιθανής δυσλειτουργίας του μηχανισμού APCA και MAC.

Σε όλους τους πυρήνες τύπου APCA και MAC εντοπίστηκαν αδιατάρακτα συσσωματώματα, σε διαστάσεις που δε διέφεραν από εκείνες που βρέθηκαν στους AX02BC1 και AX02GC2 (Εικόνα 3.1.9.i-iii). Η συγκέντρωση των κυττάρων σε συσσωματώματα ήταν μεταξύ 2,32 x 10⁷ και 7,91 x 10⁷ κύτταρα cm⁻³ ν.ιζ. συμμετέχοντας σε ποσοστό μεταξύ 12 και 60% στην ολική κυτταρική αφθονία. Αλυσίδες κυττάρων τύπου ANME-1 ανιχνεύθηκαν και στους πυρήνες APCA και MAC (Εικόνα 3.9.iv).



Εικόνα 3.1.9 Τα συσσωματώματα που ανιχνεύθηκαν σε δείγματα από τους πυρήνες που ανακτήθηκαν υπό πίεση και υποβλήθηκαν σε διαφορετική μεταχείριση αποσυμπίεσης, παρέμειναν ανεπηρέαστα. i) Πυρήνας ΑΧ02ΑΡ1 τύπου ΑΡCA (~12bar πίεση, άμεση αποσυμπίεση), ii) Πυρήνας ΑΧ02ΑΡ4 τύπου ΑΡCA (135bar πίεση, άμεση αποσυμπίεση), iii) Πυρήνας ΑΧ02ΑΡ4 τύπου ΑΡCA (135bar πίεση, άμεση αποσυμπίεση), iii) Πυρήνας ΑΧ02ΑΡ4 τύπου ΑΡCA (135bar πίεση, άμεση αποσυμπίεση), iii) Πυρήνας ΑΧ02ΑΡ4 τύπου ΑΡCA (135bar πίεση, άμεση αποσυμπίεση), iii) με ανιχνευτή για ΑΝΜΕ-1 Archaea με CY3 (κόκκινο χρώμα).

Κεφάλαιο 3

Αποτελέσματα

Επομένως, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ενώ τα κύτταρα είναι ευαίσθητα σε αλλαγές πίεσης, οι διαφορετικές τεχνικές δειγματοληψίας που εφαρμόστηκαν και στις οποίες διέφερε η διάρκεια αποσυμπίεσης ανάλογα με την εσωτερική πίεση που είχαν, δεν φάνηκε να επηρέασαν τελικά την ολική κυτταρική αφθονία, ούτε τις δομές στις οποίες αυτά συμμετέχουν (συσσωματώματα ή αλυσίδες). Είτε η αποσυμπίεση έγινε απότομα (AX02AP4), είτε σε δύο στάδια (AX02AP1), ή έγιναν διαδοχικά αποσυμπίεση, συμπίεση και δεύτερη αποσυμπίεση (AX02MA2), δεν προκλήθηκαν βλάβες τα συσσωματώματα. Κατεστραμμένα κύτταρα από την απότομη αλλαγή πίεσης δεν θα ήταν δυνατό να ανιχνευθούν με τη χρώση DAPI και αυτό θα επηρέαζε την ολική αφθονία. Αφού οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί ενδημούν σε βάθος 2030m, $\delta\eta\lambda\alpha\delta\eta$ σε in situ πίεση ~ 200 atm, έχουν αναπτύξει μηγανισμούς αντοχής στις υψηλές πιέσεις και πιθανότατα αντοχής και σε μεταβολές πίεσης όπως έχει διαπιστωθεί και από προηγούμενες μελέτες. Μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν από ψυχρό περιβάλλον βαθιάς θάλασσας βρέθηκε ότι έχουν τη δυνατότητα να αλλάζουν τη σύσταση των λιπιδίων των μεμβρανών τους όταν υπόκεινται σε αλλαγές πίεσης κατά την καλλιέργειά τους, το ίδιο και όταν υπόκεινται σε αλλαγές θερμοκρασίας (Yayanos 1995) και ότι η μικροβιακή αύξηση επηρεάζεται από τη σχέση μεταξύ της θερμοκρασίας και της πίεσης σε περιβάλλον βαθιάς θάλασσας (Horikoshi, 1998, Kato and Qureshi 1999).

Α.2 Πεδίο ΑΧ09 - Σύντομη γεωχημική περιγραφή

Ο πυρήνας AX09GC1 ανακτήθηκε από περιοχή του ηφαιστείου με μεγάλη ροή εκλυόμενης ιλύος όπως προέκυψε από τα γεωχημικά δεδομένα. Η συγκέντρωση του μεθανίου σε όλα τα βάθη που εξετάστηκαν ήταν μεγάλη και παρατηρήθηκε μια κορυφή στα 55 cm βάθος (6,2 mmol L⁻¹ v.ιζ.) που εξηγείται με την ύπαρξη υδρίτη σε αυτό το βάθος ή σε κάποιο από τα γειτονικά βάθη. Η επίδραση της εκλυόμενης ιλύος από τα βαθύτερα επίπεδα ήταν προφανής και από τις συγκεντρώσεις του βαρίου και του πυριτίου, που μεταφέρονται με την ανοδική ροή από τα βαθύτερα επίπεδα του ιζήματος, και είχαν αρκετά υψηλή τιμή στο ρηχότερο επίπεδο ιζήματος που μελετήθηκε (1μmol kg⁻¹ ιζήματος και 110μmol kg⁻¹ ιζήματος αντίστοιχα, στα 16cm βάθος).

Οι συγκεντρώσεις των ιόντων από το θαλασσινό νερό (χλώριο, μαγνήσιο και θειικά ιόντα) υποδηλώνουν ότι υπήρχε εισροή θαλασσινού νερού μέσα στο ίζημα αλλά και

σημαντική αναγωγή των θειικών ιόντων στα ανώτερα επίπεδα του ιζήματος όπως προέκυψε και από τις τιμές του υδρόθειου που ήταν υψηλές (3,3-7,9mmol L⁻¹ v.ιζ.) στα τρία πρώτα επίπεδα του ιζήματος (16, 31,5 και 52,5cm). Επομένως από τα γεωχημικά δεδομένα υπήρξε ένδειξη ΑΟΜ τουλάχιστον στα ανώτερα επίπεδα του ιζήματος. Η συγκέντρωση των θειικών ιόντων βρέθηκε ότι μειώνονταν με το βάθος, αλλά στο βαθύτερο επίπεδο που μελετήθηκε (91 cm) ήταν ακόμα αρκετά υψηλή (5,78mmol kg⁻¹ v.ιζ.).

Α.2.1 Αφθονία κυττάρων, μέγεθος και αφθονία συσσωματωμάτων

Υψηλή κυτταρική αφθονία (αφθονία των μεμονωμένων κυττάρων και ολική αφθονία), παρατηρήθηκε στο ρηχότερο (2cm) και στο βαθύτερο (96cm) επίπεδο του ιζήματος που μελετήθηκε (Πίνακας 3.1.2). Χαμηλότερες τιμές στην κυτταρική αφθονία παρατηρήθηκαν στα ενδιάμεσα βάθη που μελετήθηκαν, στα 32 και 64cm, δηλαδή στα βάθη παρακείμενα στη ζώνη όπου παρατηρήθηκε η υψηλότερη συγκέντρωση μεθανίου, που εξηγήθηκε με την παρουσία μεγάλου σχηματισμού υδρίτη.

Βάθος (cmbsf)	Μεμονωμένα κύτταρα (κύτταρα cm ⁻³ ν.ιζ.)	Κύτταρα σε συσσωματώματα (κύτταρα cm ⁻³ ν.ιζ.)	Ολική κυτταρική αφθονία (κύτταρα cm ⁻³ ν.ιζ.)
2	$2,71 \times 10^8$	$1,00 \ge 10^8$	$3,71 \times 10^8$
32	$7,85 \ge 10^7$	Δ.Α.	$7,85 \times 10^7$
63	$8,65 \ge 10^7$	$3,27 \ge 10^6$	$8,97 \ge 10^7$
95	$2,80 \ge 10^8$	$1,28 \ge 10^7$	$2,93 \times 10^8$

Πίνακας 3.1.2 Προφίλ βάθους για τα μεμονωμένα κύτταρα, τα κύτταρα που συμμετέχουν σε συσσωματώματα και την ολική κυτταρική αφθονία στον AX09GC1.

Δ.Α.: Δεν ανιχνεύθηκαν

Η μέγιστη κυτταρική αφθονία παρατηρήθηκε στο πιο ρηχό επίπεδο του ιζήματος στα 2 cm βάθος $(3,71 \times 10^8 \text{ κύτταρα cm}^{-3} \text{ v.ιζ.})$. Στο βάθος αυτό παρατηρήθηκε και η μέγιστη συγκέντρωση συσσωματωμάτων ίση με 2.32×10^6 συσσωματώματα cm $^{-3}$ v.ιζ. $(1 \times 10^8 \text{ κύτταρα cm}^{-3} \text{ v.ιζ.})$, που αντιπροσωπεύει το 27% της ολικής κυτταρικής αφθονίας (Εικόνα 3.1.10).



Εικόνα 3.1.10 Πυρήνας AX09GC1. Ποσοστό συμμετοχής στην ολική αφθονία των μεμονωμένων κυττάρων (λευκό τμήμα στήλης) και των κυττάρων σε συσσωματώματα (διάστικτο τμήμα στήλης).

Σε όλα τα βάθη κυριάρχησαν τα μεμονωμένα κύτταρα, ενώ στα 32 cm, δεν ανιχνεύθηκαν συσσωματώματα. Στα ενδιάμεσα βάθη, στα 32 και 63 cm, η ολική κυτταρική αφθονία ήταν περίπου κατά μια τάξη μεγέθους χαμηλότερη (7.85x10⁷ και 8.97x10⁷ κύτταρα cm⁻³ ν.ιζ., αντίστοιχα). Στα δύο βαθύτερα επίπεδα τα συσσωματώματα ήταν λίγα και κάλυπταν μόνο ένα μικρό ποσοστό της ολικής κυτταρικής αφθονίας (~ 4%) (Εικόνα 3.1.10). Στα 95 cm, η ολική κυτταρική αφθονία ήταν υψηλή (2,93 x 10⁸ κύτταρα cm⁻³ ν.ιζ.). Σε αυτό το βάθος παρατηρήθηκε χαμηλή συγκέντρωση συσσωματωμάτων (9,14x10⁵ συσσωματώματα cm⁻³ ν.ιζ.).

Τα συσσωματώματα που παρατηρήθηκαν στα 95 και 63cm ήταν συνήθως μικρά σε μέγεθος (1-3μm) αποτελούμενα από λίγα κύτταρα, ενώ λίγο μεγαλύτερα συσσωματώματα παρατηρήθηκαν σε βάθος 2cm (1-2μm). Στο βάθος αυτό, πολύ σπάνια παρατηρήθηκαν πολύ μεγάλα συσσωματώματα μεγάλης διαμέτρου (Εικόνα 3.1.11.iv).

Α.2.2 Μορφολογία και δομή των συσσωματωμάτων

Ομοίως με τον πυρήνα AX02BC1, τα συσσωματώματα είχαν δύο δομές, μια σφαιρική με έναν πυρήνα από Archaea να περιβάλλεται από κύτταρα Bacteria και μια δεύτερη δομή όπου ομάδες Archaea και Bacteria σχημάτιζαν συσσωματώματα σε τυχαίες διατάξεις (Εικόνα 3.1.11).



Εικόνα 3.1.11 Συσσωματώματα και κύτταρα ANME-1 από τα βάθη 2 και 95cm. i) Συσσωματώματα με χρώση DAPI από τα 95cm, ii) Αλυσίδες από κύτταρα τύπου ANME-1 (χρώση DAPI). iii) Ταυτόχρονος υβριδισμός με τους ανιχνευτές ARC915 με fluorescein (πράσινο) και EUB338I-III με CY3 (κόκκινο). Από αριστερά προς τα δεξιά παρατήρηση με φίλτρο για DAPI, fluorescein, CY3 και διπλό φίλτρο για fluorecein και CY3, 95cm βάθος. iv) Συσσωματώματα μεγάλης διαμέτρου, χρώση DAPI, 2cm βάθος, v) Ταυτόχρονος υβριδισμός με τους ανιχνευτές DSS658 με fluorescein (πράσινο) και ANME-2 με CY3 (κόκκινο). Από αριστερά προς τα δεξιά παρατήρηση με φίλτρο για DAPI, fluorescein, CY3 και διπλό φίλτρο για fluorecein και CY3, 2cm βάθος, vi) Αλυσίδες ANME-1 κυττάρων, DAPI αριστερά (μπλε), FISH δεξιά (κόκκινο).

A.2.3. Ανίχνευση αναερόβιων μεθανιότροφων ANME-2

Στον πυρήνα AX09GC1 η τεχνική FISH αποκάλυψε ότι τα συσσωματώματα των κυττάρων αποτελούνταν από θειικοαναγωγικά Bacteria της ομάδας Desulfosarcina/Desulfococcus και από τα μεθανιότροφα Archaea ANME-2 που θεωρούνται ότι μεσολαβούν στην ΑΟΜ. Δεν ανιχνεύθηκαν συσσωματώματα αποτελούμενα από ANME-3 και θειικοαναγωγικά Bacteria του γένους Desulfobulbus., που θεωρούνται επίσης ότι μεσολαβούν στην AOM (Niemann et al., 2006, Lösekann et al., 2007). Επομένως, όλα τα συσσωματώματα που ανιχνεύθηκαν με τη χρώση DAPI ανήκουν στα ANME-2/DSS και η αφθονία των κυττάρων σε συσσωματώματα, είναι η αφθονία των ANME-2/DSS συσσωματωμάτων. Σπάνια βρέθηκαν μικρά συσσωματώματα να αποτελούνται αποκλειστικά μόνο από τη μια ή την άλλη ομάδα αλλά στην καταμέτρηση θεωρήθηκαν ως μικτά συσσωματώματα.

Στον πυρήνα AX09GC1, τα ANME-2/DSS συσσωματώματα ανιχνεύθηκαν στο επιφανειακό (2 cm) και στα δύο βαθύτερα (63 και 95 cm) επίπεδα του ιζήματος (Εικόνα 3.1.12). Στο επιφανειακό επίπεδο η συγκέντρωση των κυττάρων σε ANME-2/DSS συσσωματώματα κάλυψε περίπου το 27% της ολικής αφθονίας, ενώ στα 63 και 95 cm περίπου το 4% (Εικόνα 3.1.13). Η ύπαρξη ANME-2/DSS συσσωματωμάτων αποτελεί ένδειξη ότι μπορεί να συμβαίνει AOM συνδεδεμένη με αναγωγή των θειικών, με τη μεσολάβηση ANME-2/DSS συσσωματωμάτων στα βάθη αυτά, κυρίως όμως στο ανώτερο επίπεδο, όπου η συγκέντρωση των κυττάρων σε ANME-2/DSS συσσωματώματα ήταν μέγιστη (1,00 x 10⁸ κύτταρα cm⁻³ ν.ιζ.) και λιγότερο στο βαθύτερο επίπεδο, όπου η συγκέντρωση των κυττάρων σε συσσωματώματα ήταν μια τάξη μεγέθους χαμηλότερη (1,28 x 10⁷ κύτταρα cm⁻³ ν.ιζ.) (Εικόνα 3.1.12).

A.2.4 Ανίχνευση των αναερόβιων μεθανιότροφων ANME-1

Μεθανιότροφα Archaea της ομάδας ANME-1, ανιχνεύθηκαν με την εφαρμογή της τεχνικής FISH, κυρίως στο επιφανειακό (2 cm) και στο βαθύτερο (95 cm) επίπεδο του ιζήματος (Εικόνα 3.1.12) ενώ στα 63cm ήταν σπάνια (<1% της ολικής αφθονίας). Τα ANME-1 παρατηρήθηκαν ως μεμονωμένα κύτταρα ή σχημάτιζαν μικρές αλυσίδες των δύο-τριών κυττάρων. Σπάνια, βρέθηκαν σε μεγαλύτερες συσσωματώσεις (Εικόνα 3.1.11.i,ii&vi).



Εικόνα 3.1.12 Πυρήνας AX09GC1. Προφίλ βάθους της κατανομής της αφθονίας των ANME-1 (μαύρη στήλη) και των ANME-2/DSS συσσωματωμάτων (διάστικτη στήλη). Το λευκό τμήμα της στήλης αντιπροσωπεύει τα κύτταρα που δεν ανήκουν ούτε στα ANME-1, ούτε στα ANME-2/DSS συσσωματώματα. Η αφθονία δίνεται σε 10⁶ κύτταρα cm⁻³ v. ιζ.

Η συγκέντρωση των ANME-1 στο πιο ρηχό επίπεδο ήταν χαμηλή (6,01 x10⁶ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ.) συμμετέχοντας σε ποσοστό μόλις 1,62% στην ολική κυτταρική αφθονία και σε ποσοστό 2,22% στα μεμονωμένα κύτταρα. Στα 95 cm βάθος, η συγκέντρωση των ANME-1 κυττάρων ήταν ίση με 2,8 x 10⁷ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ., συμμετέχοντας σε ποσοστό 10% στην αφθονία των μεμονωμένων κυττάρων. Στο βάθος αυτό παρατηρήθηκε η μέγιστη συγκέντρωση των ANME-1, που αποτελούσαν το 9,57% της ολικής αφθονίας (Εικόνα 3.1.13).



Εικόνα 3.1.13 Πυρήνας AX09GC1. Σύγκριση της συγκέντρωσης των ANME-1 (τμήμα στήλης με μαύρο χρώμα) και ANME-2/DSS (διάστικτο τμήμα στήλης) κατά βάθος ιζήματος. Τα ANME-2/DSS συσσωματώματα απουσίαζαν σε βάθος ιζήματος 32 cm. Τα ANME-1 ανιχνεύθηκαν μόνο στο επιφανειακό και στο βαθύτερο επίπεδο.

Τα ANME-1 στα 2 και 95cm όπου ανιχνεύθηκαν, βρέθηκαν κυρίως ως μεμονωμένα κύτταρα. Έτσι, στα 2 cm βάθος, τα ANME-1 βρέθηκαν να σχηματίζουν αλυσίδες σε ποσοστό 41% ενώ στα 95cm σε ποσοστό 39% των ολικών ANME-1.

Η ανίχνευση των ANME-1 Archaea στα βάθη 2 και 95cm του πυρήνα AX09GC1, αποτελεί μια επιπλέον ένδειξη ότι συμβαίνει AOM σε αυτά τα δύο επίπεδα του ιζήματος όπως προέκυψε και από την ανίχνευση των ANME-2/DSS συσσωματωμάτων. Από τις δύο ομάδες ANME, παρατηρήθηκε ότι τα ANME-1 επικράτησαν στο βαθύτερο επίπεδο ενώ τα ANME-2/DSS στο ανώτερο επίπεδο (Εικόνα 3.1.13).

Α.3 Πεδία ΑΧ06, ΑΧ08 και ΑΧ11

Οι πυρήνες βαρύτητας AX06GC1, AX08GC1 και AX11GC1 ανακτήθηκαν από περιοχή του ηφαιστείου Amsterdam με μεγάλη ροή εκλυόμενης ιλύος, όπως αποδείχθηκε από τα γεωχημικά δεδομένα. Υδρίτες εντοπίστηκαν στον πυρήνα AX11GC1, ενώ κατά το άνοιγμα του πυρήνα A06GC1 παρατηρήθηκε έντονος 'βρασμός' στα βαθύτερα στρώματα του ιζήματος, ένδειξη εγκλωβισμένου αερίου ή/και διάλυσης υδριτών. Στους πυρήνες αυτούς τα υποδείγματα ιζήματος συλλέχθηκαν σε μεγάλες αποστάσεις μεταξύ τους, προκειμένου να κατασκευαστεί προφίλ βάθους της κυτταρικής αφθονίας.

Α.3.1 Αφθονία κυττάρων, μέγεθος και αφθονία συσσωματωμάτων

Στον πυρήνα AX06GC1, η ολική αφθονία είχε μια μέγιστη τιμή στο ρηχότερο επίπεδο, στα 2 cm (1,59 x 10⁸ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ.), ενώ ήταν κατά μια τάξη μεγέθους χαμηλότερη στα υπόλοιπα βάθη του ιζήματος που εξετάστηκαν (49, 99 και 148cm) και κυμάνθηκε μεταξύ 3,51x10⁸ και 4,07x10⁸ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ. (Εικόνα 3.1.14). Δεν ανιχνεύθηκαν συσσωματώματα σε κανένα από τα βάθη του ιζήματος. Από τα γεωχημικά δεδομένα προέκυψε ότι ο πυρήνας ανακτήθηκε από περιοχή με μεγάλη ροή μεθανίου από τα βαθύτερα επίπεδα και παρατηρήθηκε απότομη κλίση στα θειικά ιόντα, στα πρώτα επίπεδα του ιζήματος, υποδηλώνοντας την ύπαρξη ΑΟΜ περίπου στα 40 cm βάθος. Από το προφίλ βάθους της αφθονίας των κυττάρων στον πυρήνα αυτό, δεν προέκυψε κάποια ένδειξη για αυξημένη μικροβιακή δραστηριότητα και δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι συμβαίνει ΑΟΜ, τουλάχιστον στα τέσσερα επίπεδα ιζήματος που μελετήθηκαν.

Παρόμοιο προφίλ βάθους της ολικής αφθονίας είχε και ο πυρήνας AX08GC1, με μια μέγιστη συγκέντρωση στα 2 cm βάθος (2,91 x 10⁸ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ.) (Εικόνα 3.1.14). Στα 50 και 100cm βάθος, η κυτταρική αφθονία ήταν μια τάξη μεγέθους χαμηλότερη. Ούτε και σε αυτόν τον πυρήνα ανιχνεύθηκαν συσσωματώματα υπεύθυνα για AOM. Τα γεωχημικά δεδομένα έδειξαν ότι ανακτήθηκε από περιοχή υψηλής ροής εκλυόμενης ιλύος, όπου παρατηρήθηκε εισροή θαλασσινού νερού στα πρώτα 50 cm, ενώ κάτω από αυτό το βάθος υπήρξε έντονη επίδραση των ρευστών από τα βαθύτερα στρώματα, όπου η αλατότητα ήταν χαμηλή καθώς και τα θειικά ιόντα, ενώ το μεθάνιο ήταν αυξημένο.



Εικόνα 3.1.14 Προφίλ βάθους της ολικής αφθονίας των κυττάρων (10⁶ κύτταρα cm⁻³ ν.ιζ.) για τους πυρήνες AX06GC1, AX08GC1 και AX11GC1.

Στον πυρήνα AX11GC1, η συγκέντρωση των κυττάρων στα 2 και 38 cm ήταν υψηλή, της τάξης των 10^8 κύτταρα cm⁻³ ν.ιζ., και κατά μια τάξη μεγέθους γαμηλότερη στα 76 και 114 cm βάθος. Η υψηλότερη τιμή στην ολική κυτταρική αφθονία βρέθηκε στα 38 cm (2,32 x 10^8 κύτταρα cm⁻³ v.ιζ.) (Εικόνα 3.1.14). Σε όλα τα βάθη κυριάρχησαν τα μεμονωμένα κύτταρα (91-97% της κυτταρικής αφθονίας) ενώ παρατηρήθηκαν συσσωματώματα σε χαμηλή συγκέντρωση που κυμάνθηκε μεταξύ $1,48 \times 10^5$ -5.67 $\times 10^5$ συσσωματώματα cm⁻³ v.ιζ. Τα συσσωματώματα αυτά ήταν μικρά σε μέγεθος, συνήθως αποτελούνταν από μόλις λίγα κύτταρα μέχρι λίγες δεκάδες κύτταρα (~30 κύτταρα) και σε όλα τα βάθη η συγκέντρωση των κυττάρων σε συσσωματώματα ήταν χαμηλή (1,04 x 10^6 -8,13 x 10^6 κύτταρα cm⁻³ v.ιζ) (Εικόνα 3.1.15A). Η μεγαλύτερη (5.67×10^5) cm⁻³ συσσωματωμάτων συσσωματώματα ν.ιζ.) συγκέντρωση παρατηρήθηκε σε βάθος 38 cm, όπου παρατηρήθηκε και η μεγαλύτερη συγκέντρωση κυττάρων σε συσσωματώματα ($8,13 \times 10^6$ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ.) που αντιστοιχεί στο 3,51% της ολικής κυτταρικής αφθονίας. Στα 76 cm όμως, όπου η ολική κυτταρική αφθονία ήταν χαμηλή $(6,06x10^7 \text{ κύτταρα cm}^{-3} \text{ v.i}\zeta.)$ τα κύτταρα σε συσσωματώματα αντιστοιχούσαν στο 9% της ολικής αφθονίας (Εικόνα 3.1.15B).





Α. Προφίλ βάθους της κατανομής των μεμονωμένων κυττάρων (λευκό τμήμα στήλης) και των κυττάρων σε συσσωματώματα (διάστικτο τμήμα στήλης). (10⁶ κύτταρα cm⁻³ ν.ιζ)
Β. Ποσοστό συμμετοχής στην ολική αφθονία των μεμονωμένων κυττάρων (λευκό τμήμα στήλης) και των συσσωματωμάτων (διάστικτο τμήμα στήλης).

Ο πυρήνας AX11GC1, από γεωχημικής πλευράς προσομοίαζε με τον πυρήνα AX08GC1, όπου στα ανώτερα ~50cm του ιζήματος υπήρχε εισροή ιόντων από το θαλασσινό νερό που μειώνονταν με το βάθος, ενώ κάτω από τα 50cm η συγκέντρωση του μεθανίου ήταν υψηλή. Η ανίχνευση μικρού μεγέθους συσσωματωμάτων δεν αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι μπορεί να συνέβαινε AOM στα βάθη που μελετήθηκαν. Ισως όμως τα συσσωματώματα αυτά αποτελούσαν ένα αρχικό στάδιο σχηματισμού των υπεύθυνων για την AOM συσσωματωμάτων.

Β. Ηφαίστειο ιλύος Kazan

Σε όλους τους πυρήνες που ανακτήθηκαν από το ηφαίστειο ιλύος Kazan παρατηρήθηκε υψηλή συγκέντρωση μεθανίου σε όλο το μήκος τους και εντοπίστηκαν μικροί σχηματισμοί υδριτών, σε μέγεθος ρυζιού διάσπαρτοι μέσα στο ίζημα σε βάθος κάτω από τα 30 cm.

Β.1 Πυρήνας ΑΧ19GC1

Η ολική κυτταρική αφθονία είχε τη χαμηλότερη τιμή στο βαθύτερο στρώμα (110cm) $5,98 \times 10^7$ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ., στα βάθη 73 και 37 cm ήταν περίπου $1,1 \times 10^8$ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ ενώ είχε λίγο χαμηλότερη τιμή στο επιφανειακό στρώμα ($8,02 \times 10^7$ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ.) (Εικόνα 3.1.16). Η σχετικά υψηλή κυτταρική αφθονία στα 37 και 73 cm συγκριτικά με το ρηχότερο και το βαθύτερο επίπεδο θα μπορούσε να είναι ένδειξη AOM, όμως δεν ανιχνεύθηκαν συσσωματώματα, με εξαίρεση τα 37 cm βάθος που ήταν σπάνια ($3,66 \times 10^6$ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ.), και αποτελούσαν μόλις στο 3% της ολικής κυτταρικής αφθονίας. Στον πυρήνα αυτό η μέγιστη συγκέντρωση μεθανίου παρατηρήθηκε σε βάθος 81 cm ($4,23 \text{ mmol L}^{-1}$ v.ιζ.) ενώ ήταν περίπου σταθερή στα δύο ρηχότερα στρώματα που εξετάστηκαν, στα 54 και 26 cm ($1,9 \text{ mmol L}^{-1}$ v.ιζ.) (Anaximander EU Project, Final Report). Η υψηλή συγκέντρωση μεθανίου σε όλο το μήκος του πυρήνα καθώς και οι διάσπαρτοι υδρίτες που εντοπίστηκαν υποδηλώνει έντονη ροή εκλυόμενης ιλύος.

Β.2 Πυρήνας ΑΧ21ΑΡ1

Η ολική κυτταρική αφθονία ήταν μικρότερη από 10⁶ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ. σε όλα τα βάθη και ενώ δεν ανιχνεύθηκαν συσσωματώματα. Η χαμηλή κυτταρική αφθονία πρέπει να οφείλεται στους χειρισμούς που μεσολάβησαν μέχρι τη δειγματοληψία και όχι στην απουσία κυττάρων στα δείγματα που εξετάστηκαν. Ο πυρήνας υποβλήθηκε σε αργή αποσυμπίεση διάρκειας πέντε ωρών, προκειμένου να εκτιμηθούν τα περιεχόμενα αέρια συστατικά του ενώ μεσολάβησε μεγάλο χρονικό διάστημα από τη στιγμή που τελείωσε η αποσυμπίεση μέχρι το άνοιγμά του και τη λήψη των δειγμάτων (12 ώρες). Η απουσία κυττάρων από όλα τα βάθη μάλλον σημαίνει ότι τα κύτταρα είχαν καταστραφεί πριν γίνει η δειγματοληψία λόγω της διαδικασίας απαέρωσης που προηγήθηκε κι έτσι δεν ήταν δυνατόν να εντοπιστούν με τη χρώση DAPI, ενώ η μονιμοποίηση με φορμαλδεΰδη έγινε 12 ώρες αργότερα.

Β.3 Πυρήνας ΑΧ23GC1

Με την τεχνική χρώσης DAPI, διαπιστώθηκε χαμηλή κυτταρική αφθονία στα τρία βαθύτερα στρώματα του πυρήνα που εξετάστηκαν (76, 113 και 150cm), πολύ μικρότερη του 10^6 κύτταρα cm⁻³ ν.ιζ. Αντίθετα, στα δύο ανώτερα στρώματα που εξετάστηκαν (39 και 2 cm) η ολική αφθονία ήταν δύο τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη, δηλαδή 3,66x10⁸ και 4,15x10⁸ κύτταρα cm⁻³ ν.ιζ, αντίστοιχα (Εικόνα 3.1.16).



Εικόνα 3.1.16 Προφίλ βάθους της ολικής κυτταρικής αφθονίας στον πυρήνα AX19GC1(--) και στον AX23GC1(--). Αφθονία σε 10^6 κύτταρα cm⁻³ ν.ιζ.

Στα δύο ανώτερα στρώματα του πυρήνα AX23GC1 ανιχνεύθηκαν συσσωματώματα κυττάρων. Στα 39cm βάθος τα συσσωματώματα ήταν μικρά σε μέγεθος (1-1,5μm) αποτελούμενα από μόλις λίγα κύτταρα, συνεισφέροντας περίπου κατά 78% στην ολική κυτταρική αφθονία. Η παρουσία συσσωματωμάτων σε αυτό το βάθος αποτελεί ένδειξη AOM. Στο ανώτερο στρώμα, στα 2cm, το ποσοστό των κυττάρων που συμμετέχουν σε συσσωματώματα έφτασε περίπου το 18% της ολικής κυτταρικής αφθονίας. Στο στρώμα αυτό με την τεχνική χρώσης DAPI, ανιχνεύθηκαν κύτταρα τύπου ANME-1 σε μορφή αλυσίδας σε ποσοστό περίπου 10% των μεμονωμένων κυττάρων.

Στον AX23GC1, κατά το άνοιγμά του στο κατάστρωμα εντοπίστηκαν πολλοί υδρίτες μεγέθους ρυζιού στο κάτω μισό τμήμα του πυρήνα, στα βάθη δηλαδή όπου η κυτταρική αφθονία ήταν χαμηλότερη από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (<<10⁶ κύτταρα cm⁻¹ v.ιζ.) Τα μικρό μέγεθος συσσωματωμάτων στα δύο ανώτερα επίπεδα θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως αρχικό στάδιο δημιουργίας συσσωματωμάτων που πιθανότατα μεσολαβούν στην AOM, δεν υπάρχει όμως ισχυρή ένδειξη ότι συμβαίνει AOM στα βάθη που μελετήθηκαν.

Γ. Ηφαίστειο ιλύος Kula

Στους πυρήνες που ανακτήθηκαν από την περιοχή του ηφαιστείου Kula δεν ανιχνεύθηκαν υδρίτες αλλά αρκετοί από τους πυρήνες που ανακτήθηκαν από την κορυφή του ηφαιστείου παρουσίασαν την τυπική μορφή ιλύος.

Γ.1 Πυρήνας AX28GC1

Από τον πυρήνα AX28GC1, ανακτήθηκαν δείγματα από πέντε βάθη (2, 32, 64, 96, 128 cm), για δημιουργία προφίλ βάθους χαμηλής ανάλυσης, της ολικής κυτταρικής αφθονίας. Τα ανώτερα χιλιοστά του πυρήνα είχαν κιτρινωπό χρώμα, και υπήρχε έντονη η μυρωδιά υδρόθειου κατά το άνοιγμά του. Επομένως ο πυρήνας αυτός, ανακτήθηκε από περιοχή του ηφαιστείου με παλαιότερη έκλυση ιλύος.

Η κυτταρική αφθονία στον πυρήνα AX28GC1, βρέθηκε ότι μειώνονταν με το βάθος, ενώ εμφάνισε ένα μέγιστο στα 64 cm (1,95x10⁸ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ.) (Εικόνα 3.1.17). Στο ανώτερο επίπεδο (2cm), η ολική αφθονία ήταν υψηλή (4,82x 10⁸ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ.), ενώ με εξαίρεση τα 64cm, η κυτταρική αφθονία στα υπόλοιπα βάθη ήταν της τάξης του 10⁷ κύτταρα cm⁻³ νωπού ιζήματος. Η μέγιστη τιμή στα 64cm είναι δυνατό να υποδηλώνει έντονη μικροβιακή δραστηριότητα στο βάθος αυτό, σε σχέση με τα δύο παρακείμενα στρώματα που μελετήθηκαν (32 και 96cm). Στο βάθος αυτό, δεν ανιχνεύθηκαν συσσωματώματα κυττάρων ώστε να υπάρχει ένδειξη AOM. Λίγα συσσωματώματα ανιχνεύθηκαν στα 2cm βάθος, τα οποία ήταν μικρά σε μέγεθος, συνεισφέροντας μόλις κατά 2% στην ολική κυτταρική αφθονία (7,86 x10⁶ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ.).



Εικόνα 3.1.17 Προφίλ βάθους ολικής κυτταρικής αφθονίας (10⁶ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ) για τον πυρήνα AX28GC1.

Η έντονη οσμή υδρόθειου που παρατηρήθηκε κατά το άνοιγμα του πυρήνα, υποδηλώνει τη δράση θειικοαναγωγικών Bacteria, όμως σε κανένα από τα βάθη που μελετήθηκαν δεν ανιχνεύθηκαν υπεύθυνοι για την ΑΟΜ μικροοργανισμοί.

Οι πυρήνες που ανακτήθηκαν από το ηφαίστειο ιλύος Kula είχαν υψηλές τιμές μεθανίου (Anaximander EU Project, Final Report) και η υφή του ιζήματος υποδήλωνε εγκλωβισμένο αέριο. Επομένως, αν και ο πυρήνας αυτός ανακτήθηκε από παλαιότερη έκλυση ιλύος, υπήρχε ροή μεθανίου από τα βαθύτερα επίπεδα του ιζήματος. Όπως και στους πυρήνες που ανακτήθηκαν από περιοχές με υψηλή εκλυόμενη ροή μεθανίου από το Amsterdam και το Kazan, έτσι και στον πυρήνα αυτό, παρατηρήθηκε χαμηλή κυτταρική αφθονία, στα βαθύτερα επίπεδα του πυρήνα.

2 ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟΝ ΚΥΚΛΟ ΤΟΥ ΜΕΘΑΝΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΝ ΚΥΚΛΟ ΤΟΥ ΘΕΙΟΥ

2.1 Εμπλουτισμός καλλιεργειών

Amsterdam - Από το ηφαίστειο ιλύος Amsterdam δημιουργήθηκαν 81 αρχικές καλλιέργειες σε σωληνάκια hungate (1 atm), από τις οποίες οι 63 στόχευαν τον εμπλουτισμό θειικοαναγωγικών Bacteria. Επίσης δημιουργήθηκαν 16 καλλιέργειες σε δοχεία πίεσης από τις οποίες 11 στόχευαν τα θειικοαναγωγικά Bacteria. Από τις καλλιέργειες σε 1 atm τελικά παρατηρήθηκε αύξηση σε 9 για τα θειικοαναγωγικά Bacteria Kai σε 2 στο θρεπτικό μέσο για Methanosarcina (Πίνακας 3.2.1).

Για τα θειικοαναγωγικά Bacteria, παρατηρήθηκε αύξηση κυρίως στο θρεπτικό μέσο με υπόστρωμα το γαλακτικό οξύ, όπου αναπτύχθηκαν επτά καλλιέργειες. Από τους συνολικά 18 εμβολιασμούς σε θρεπτικό μέσο με υπόστρωμα οξικό οξύ, παρατηρήθηκε αύξηση σε δύο μόνο καλλιέργειες (68Ac και 69Ac). Δεν υπήρξε κάποια ένδειξη αύξησης σε θρεπτικό μέσο με υπόστρωμα ηλεκτρικό οξύ και αιθανόλη. Στο θρεπτικό μέσο για *Methanosarcina* παρατηρήθηκε αύξηση σε δύο από τις 18 καλλιέργειες. Κυτταρική αύξηση παρατηρήθηκε τόσο σε καλλιέργειες με εμβόλια από πυρήνες που ανακτήθηκαν με κλασσικές τεχνικές λήψης πυρήνα (AX02GC1 και AX11GC1) που αποσυμπιέστηκαν αργά κατά την ανάκτησή τους από πίσση και είτε αποσυμπιέστηκαν ταχύτατα στο κατάστρωμα (AX02AP4) είτε υποβλήθηκαν σε αργή αποσυμπίεση κατά τη διάρκεια της οποίας μετρήθηκαν τα περιεχόμενα αέρια, και τα δείγματα ελήφθησαν πολλές ώρες αργότερα (AX02AP2). Δεν εμφανίστηκε όμως αύξηση στα δείγματα που ανακτήθηκαν από τον πυρήνα ΑΧ06GC1 (Πίνακας 3.2.1).

Kazan - Από το ηφαίστειο ιλύος Kazan δημιουργήθηκαν συνολικά 58 καλλιέργειες σε latm και 4 σε δοχεία πίεσης. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από όλα τα βάθη του πυρήνα βαρύτητας AX19GC1, και αύξηση παρατηρήθηκε κυρίως από τα δείγματα από τα 37cm και βαθύτερα, ενώ μόνο μια καλλιέργεια που προέρχονταν από τα 2cm βάθος εμφάνισε αύξηση (134suc). Από τις 46 καλλιέργειες εμπλουτισμού για θειικοαναγωγικά Bacteria εμφάνισαν αύξηση οι εφτά (Πίνακας 3.2.1), ενώ παρατηρήθηκε αύξηση σε μια μόνο καλλιέργεια σε θρεπτικό μέσο για

Methanosarcina (125). Για τα θειικοαναγωγικά Bacteria, παρατηρήθηκε κυρίως αύξηση σε θρεπτικό μέσο με υπόστρωμα γαλακτικό οξύ, ενώ παρατηρήθηκε αύξηση και σε μια καλλιέργεια σε κάθε ένα από τα υπόλοιπα υποστρώματα. Είναι ο μόνος πυρήνας από τον οποίο αναγεννήθηκαν κύτταρα σε υπόστρωμα ηλεκτρικό οξύ (134suc) και αιθανόλη (109eth).

Thessaloniki - Από το ηφαίστειο ιλύος Thessaloniki, εμφάνισαν αύξηση τρεις από τις συνολικά 44 καλλιέργειες από τον πυρήνα AX48GC1, μια σε θρεπτικό μέσο με υπόστρωμα οξικό οξύ, μια σε θρεπτικό μέσο με υπόστρωμα γαλακτικό οξύ και μια σε θρεπτικό για *Methanosarcina*. Σε εμβόλια από τον πυρήνα AX47GC1, παρατηρήθηκε αύξηση μόνο σε μια καλλιέργεια σε θρεπτικό για *Methanosarcina* (Πίνακας 3.2.1).

Πίνακας 3.2.1 Αναγέννηση καλλιεργειών (1 atm) από δείγματα ιζήματος. Θρεπτικό μέσο για θειικοαναγωγικά Bacteria με υπόστρωμα οξικό οξύ (Ac), γαλακτικό οξύ (La), ηλεκτρικό οξύ (Suc) και αιθανόλη (Eth). Θρεπτικό μέσο για *Methanosarcina* (Meth). Οι καλλιέργειες που εμφάνισαν αύξηση σημειώνονται με τον αύξοντα αριθμό με τον οποίο έχουν ονομαστεί στους Πίνακες 2.2.1-2.2.5. Με – σημειώνονται οι καλλιέργειες στις οποίες δεν παρατηρήθηκε αύξηση.

	Πυρήνας/ Βάθος υδάτινης	Βάθη δειγμάτων (cm)	Καλλιέργειες				
			Σωληνάκια hungate				
	στήλης		Θειοαναγωγικά Bacteria				
	Stilvild		Ac	La	Suc	Eth	Meth
	AX02GC2 2030m	35					
Amsterdam	AX02AP2 2030m	Άγνωστο (~20??)		16 17 -			22 - 24
	AX02AP4 2024m	Άγνωστο	- 68 69	70 71 -			
	AX06GC1 2236m	148				-	
	AX11GC1	76		55			
	2025m	114		40 41 -			
Kazan	AX19GC1 1693m	2 37 73 110	 86	- 118 119 102 - 88 -	134	- 109 -	125
Thessaloniki	AX47GC1 1265m	60 100					154
	AX48GC1 1264m	30		- 186 -			196
		80					
		125	166				
	Σαπροπηλός ΑΧ12GC2 2120m	186		-			-

Καλλιέργειες σε δοχεία πίεσης

Τα δοχεία πίεσης ανοίχθηκαν αφού πρώτα διαπιστώθηκε κυτταρική αύξηση στις καλλιέργειες σε σωληνάκια, περίπου 3 μήνες μετά τον αρχικό εμβολιασμό τους, οπότε κι έγιναν αμέσως ανακαλλιέργειες σε νέες σύριγγες και τα δοχεία σφραγίστηκαν ξανά. Σε δείγματα που συλλέχθηκαν από τις σύριγγες, δεν διαπιστώθηκε κυτταρική αύξηση με τη χρώση DAPI. Είναι πολύ πιθανόν τα κύτταρα που είχαν υποστεί ήδη αποσυμπίεση κατά την ανάκτηση των πυρήνων, από τα 200bar σε ατμοσφαιρική πίεση, να μην άντεξαν μια δεύτερη επανασυμπίεση στα 200bar, μετά από περίπου πέντε ώρες που μεσολάβησαν από τη λήψη των δειγμάτων.

Όταν εμβόλιο από τις καλλιέργειες στα δοχεία πίεσης μεταφέρθηκε σε φρέσκο θρεπτικό μέσο σε σωληνάκια καλλιέργειας (1atm), δεν διαπιστώθηκε αύξηση για πολλούς μήνες, γεγονός που ενισχύει το αρχικό συμπέρασμα ότι δεν υπήρξε κυτταρική αύξηση στα δοχεία πίεσης.

2.2 Κυτταρική αύξηση

Ένδειξη για κυτταρική αύξηση αποτέλεσε αρχικά η μακροσκοπική παρατήρηση, όπου παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή στο θρεπτικό μέσο (θολότητα, συσσωματώματα). Στις αρχικές καλλιέργειες ήταν δύσκολο να παρατηρηθεί κάποια αλλαγή καθώς υπήρχε ποσότητα ιζήματος που προκαλούσε θολότητα κατά την ανάδευση, αλλά μετά από διαδογικούς εμβολιασμούς όπου προέκυψαν καλλιέργειες με υψηλή αύξηση, η κυτταρική αύξηση ήταν δυνατό να παρατηρηθεί και μακροσκοπικά. Σε κάποιες από τις καλλιέργειες σε θρεπτικό μέσο για θειικοαναγωγικά Bacteria, παρατηρήθηκε θολότητα (88La) ενώ σε άλλες (41La, 102La), το θρεπτικό μέσο κατά την ανάδευση φάνηκε να περιέχει ένα παχύρρευστο μαύρο νέφος κυττάρων, πιθανότατα λόγω της παραγωγής κάποιου κολλώδους εξωκυτταρικού συστατικού. Η μάζα αυτή των κυττάρων, κατά την ανάδευση, παρέμενε κολλημένη στον πυθμένα του σωλήνα καλλιέργειας και δύσκολα διαλυόταν κατά τους μετέπειτα χειρισμούς της διαδικασίας χρώσης DAPI. Σε δύο καλλιέργειες (16La και 17La) σε θρεπτικό με υπόστρωμα γαλακτικό οξύ, παρατηρήθηκαν λευκά αιωρούμενα συσσωματώματα. Σε αρκετές καλλιέργειες, δεν υπήρξε μακροσκοπικά κάποια ένδειξη αύξησης (55La, 68Ac, 70La) ακόμα και μετά από πολλούς μήνες επώασης. Στις καλλιέργειες σε θρεπτικό μέσο για Methanosarcina το ίδιο το θρεπτικό μέσο σχημάτιζε συσσωματώματα τα οποία διαλύονταν με την ανάδευση, πιθανόν εξαιτίας του εκχυλίσματος ζύμης που περιείχε.

Ο πιο ασφαλής τρόπος να διαπιστωθεί η κυτταρική αύξηση όμως, ήταν με τη λήψη δείγματος και τη μικροσκοπική παρατήρηση μετά από εφαρμογή χρώσης DAPI (Εικόνα 3.2.1, Εικόνα 3.2.2).

2.2.1 Θρεπτικό μέσο για θευκοαναγωγικά Bacteria

Στο θρεπτικό μέσο για θειικοαναγωγικά Bacteria με υπόστρωμα γαλακτικό οξύ, η αύξηση αρχικά ήταν αργή αλλά μετά από διαδοχικούς εμβολιασμούς σε φρέσκο θρεπτικό μέσο, κάποιες καλλιέργειες εμφάνισαν υψηλούς ρυθμούς αύξησης (41La, 71La, 88La, 102La). Αντίθετα όμως, ενώ κάποιες καλλιέργειες αρχικά εμφάνισαν τελικά δεν αναγεννήθηκαν μετά τον ταγύτατη αύξηση, δεύτερο-τρίτο επανεμβολιασμό που ακολούθησε (16, 17). Στην καλλιέργεια 17c μετά από τρεις μήνες επώασης, η κυτταρική αφθονία ήταν $1,29 \times 10^7$ κύτταρα/ml, ενώ αντίθετα στην 88b η κυτταρική αφθονία έφτασε αυτό το επίπεδο $(3.69 \times 10^7 \text{ κύτταρa/ml})$ μετά από πέντε μήνες επώασης. Παρόλα αυτά, η 17c δεν εμφάνισε αύξηση μετά από δύο ανακαλλιέργειες, ενώ αντίθετα η 88La εμφάνισε ταχύτατη αύξηση η οποία διατηρήθηκε σε όλες τις ανακαλλιέργειες που ακολούθησαν και μάλιστα η κυτταρική αφθονία έφτανε σε επίπεδα της τάξης 10⁷ κύτταρα/ml μετά από μόλις ένα μήνα επώασης στις τελευταίες ανακαλλιέργειες. Η ίδια ζωηρή αύξηση παρατηρήθηκε και στην 41La επίσης σε θρεπτικό μέσο γαλακτικό οξύ.

Στις καλλιέργειες με υπόστρωμα οξικό οξύ η αύξηση ήταν εξαιρετικά αργή, δεν διαπιστώθηκε μακροσκοπικά αλλά μόνο μετά από χρώση DAPI. Έτσι, στις περισσότερες καλλιέργειες (68Ac, 69Ac, 86Ac) μετά από επώαση τριών μηνών η κυτταρική αύξηση ήταν της τάξης του 10⁵ κύτταρα/ml, ενώ μετά από έξι με οχτώ μήνες ήταν της τάξης του 10⁶ κύτταρα/ml. Μεγαλύτερος ρυθμός αύξησης παρατηρήθηκε στην 166c, στην οποία μετά από τρεις μήνες επώαση παρατηρήθηκε κυτταρική αφθονία της τάξης του 10⁶ κύτταρα/ml, ενώ μετά από έξι μήνες ήταν μια τάξη μεγέθους υψηλότερη (Εικόνα 3.2.1.vi).

Σε καλλιέργειες με υπόστρωμα ηλεκτρικό οξύ και αιθανόλη, παρατηρήθηκε αύξηση μόνο σε μια καλλιέργεια από το κάθε ένα υπόστρωμα, στην 109eth σε υπόστρωμα αιθανόλης και στην 134suc σε υπόστρωμα ηλεκτρικό οξύ. Η αύξηση των καλλιεργειών αυτών ήταν εξαιρετικά αργή. Όταν όμως εμβόλιο από τις δύο αυτές καλλιέργειες μεταφέρθηκε σε θρεπτικό μέσο με υπόστρωμα γαλακτικό οξύ, πολύ σύντομα προέκυψαν καλλιέργειες με μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης.

Συνολικά υψηλή αύξηση εμφάνισαν πέντε καλλιέργειες (41, 70, 71, 88 και 102) σε θρεπτικό μέσο με υπόστρωμα γαλακτικό οξύ καθώς και οι δύο καλλιέργειες που μεταφέρθηκαν από υπόστρωμα αιθανόλης και ηλεκτρικού οξέος σε υπόστρωμα με γαλακτικό οξύ (109ethLa, 134sucLa).

Στις αρχικές καλλιέργειες που παρατηρήθηκε αύξηση, αλλά και στις πρώτες ανακαλλιέργειες, παρατηρήθηκαν τουλάχιστον δύο τύποι κυττάρων (Εικόνα 3.2.1). Στην πορεία των επανεμβολιασμών, οι περισσότερες καλλιέργειες παρέμειναν μικτές. Συχνά παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα είχαν την τάση να σχηματίζουν συσσωματώματα μεταξύ τους αλλά και πάνω σε κόκκους του ιζήματος.



Εικόνα 3.2.1 Παρακολούθηση της κυτταρικής αύξησης με χρώση DAPI σε θρεπτικό μέσο για θειικοαναγωγικά Bacteria.

i-v) καλλιέργειες σε υπόστρωμα γαλακτικό οξύ, vi) καλλιέργεια σε υπόστρωμα οξικό οξύ.

2.2.2 Θρεπτικό μέσο για Methanosarcina

Στο θρεπτικό μέσο για εμπλουτισμό Archaea του γένους Methanosarcina, η κυτταρική αύξηση ήταν εξαιρετικά αργή. Συνολικά παρατηρήθηκε κυτταρική αύξηση σε πέντε από τις 43 αρχικές καλλιέργειες που εμβολιάστηκαν με ίζημα. Σε δύο καλλιέργειες (125 και 196), η αύξηση ανιχνεύθηκε μετά την πρώτη ανακαλλιέργεια, με εμβόλιο από της αρχικές καλλιέργειες που είχαν επωαστεί για δύο μήνες (125b, 196b). Στην 125b, μετά από πέντε μήνες επώασης η κυτταρική αφθονία ήταν της τάξης του 10⁷ κύτταρα/ml, ενώ στην 196b η κυτταρική αφθονία στο ίδιο χρονικό

διάστημα ήταν μια τάξη μεγέθους χαμηλότερη. Σε αυτές τις καλλιέργειες από την αρχή παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα είχαν μορφή ραβδοειδή και δεν παρατηρήθηκε κάποια άλλη μορφολογία, που σημαίνει ενδεχομένως ότι αναπτύχθηκε μόνο ένα είδος μικροοργανισμού.

Στις υπόλοιπες τρεις καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν (22, 24 και 154), παρατηρήθηκε υψηλή αύξηση όταν χρησιμοποιήθηκε εμβόλιο από καλλιέργειες που είχαν επωαστεί για αρκετά μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (22-30 μήνες) και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε φρέσκο θρεπτικό μέσο (22e, 24e, 22be, 24be, 24ce, 154ce) (Εικόνα 3.2.2). Σε κάποιες καλλιέργειες παρατηρήθηκαν συσσωματώματα που θύμιζαν συσσωματώματα τύπου sarcina, δηλαδή πολύ πυκνές συσσωματώσεις κυττάρων ανά τετράδες (22be, 22e), τα οποία δεν είχαν δυνατό σήμα με τη χρώση DAPI αλλά πολύ έντονο σήμα με την τεχνική FISH. Στην καλλιέργεια 24e παρατηρήθηκαν μεγάλοι στρογγυλοί σχηματισμοί που έμοιαζαν με κύστες, μετά από επώαση για 16 μήνες (Εικόνα 3.2.2, Εικόνα 3.2.3). Τέτοιες κύστες έχει διαπιστωθεί ότι σχηματίζουν μερικά είδη των αναερόβιων Archaea του γένους *Methanosarcina*, αλλά και αερόβιων Bacteria του γένους *Methylosarcina* (Η. Summer, 2009, Wise *et al*, 2001). Στην καλλιέργεια (22be), τα κύτταρα σχημάτιζαν πυκνά συσσωματώματα, που φαίνονταν να καλύπτονται από κάποια εξωκυτταρική ουσία, με χαμηλό σήμα με τη χρώση DAPI. (Εικόνα 3.2.3).



Εικόνα 3.2.2 Χρώση DAPI σε καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο για Methanosarcina

i) 125be, δεύτερη ανακαλλιέργεια με εμβόλιο από καλλιέργεια 28 μηνών, ενάμιση μήνας επώαση, διακρίνονται μεγάλα ραβδοειδή κύτταρα ii) 196b, πρώτη ανακαλλιέργεια, πέντε μήνες επώαση, μεγάλα ραβδοειδή κύτταρα iii) 154c, πρώτη ανακαλλιέργεια, διάρκεια επώασης ενάμιση μήνας, διακρίνονται μικρά κύτταρα κόκκοι iv) 24e, διάρκεια επώασης 16 μήνες, διακρίνονται μεγάλες κύστες v) 22be, διάρκεια επώασης 16 μήνες, πολύ μικρά κύτταρα κόκκοι που σχηματίζουν πυκνά συσσωματώματα τύπου sarcina, τα οποία είχαν αδύναμο σήμα με χρώση DAPI.

2.3 Τεχνική FISH

Στις καλλιέργειες με την πιο ζωηρή εμφάνιση, διερευνήθηκε ποιοι μικροοργανισμοί είχαν αναπτυχθεί, με την εφαρμογή της τεχνικής FISH.

2.3.1 Θευκοαναγωγικά Bacteria

Στις καλλιέργειες σε θρεπτικό μέσο για θειικοαναγωγικά Bacteria διερευνήθηκε αρχικά εάν είχαν αναπτυχθεί και κάποια Archaea μαζί με τα Bacteria. Διερευνήθηκαν οι πιο ζωηρές καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα γαλακτικό οξύ, καθώς και η 109 και 134 που μεταφέρθηκαν σε γαλακτικό οξύ, από υπόστρωμα αιθανόλης και ηλεκτρικού οξέος αντίστοιχα (Πίνακας 3.2.2).

Πίνακας 3.2.2 Διερεύνηση των μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν στις καλλιέργειες με ταχεία αύξηση σε υπόστρωμα γαλακτικό οξύ

καλλιέργεια	ARC915 Archaea	EUB338I-III Bacteria	DSS658 Desulfosarcina/ Desulfococcus	DSV698 Desulfovibrio	DBB305 Desulfobulbus
41i	Δ.Α.	+	+	+	Δ.Α.
70e	Δ.Α.	+	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
71d	Δ.Α.	+	Δ.Α.	Δ.Α.	
88i	Δ.Α.	+	+	Δ.Α.	Δ.Α.
102i	Δ.Α.	+	+	Δ.Α.	Δ.Α.
109gci	Δ.Α.	+	+	Δ.Α.	Δ.Α.
134bgi	Δ.Α.	+	+	Δ.Α.	Δ.Α.

^{*} Δ .Α. Δ εν ανιχνεύθηκε η ομάδα αυτή.

Όλες οι καλλιέργειες βρέθηκαν θετικές για τον ανιχνευτή για Bacteria, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν Archaea (Εικόνα 3.2.3). Με εξαίρεση την 70 και την 71, στις υπόλοιπες βρέθηκε ότι τα κύτταρα άνηκαν στην ομάδα *Desulfosarcina/Desulfococcus*. Τα κύτταρα της ομάδας αυτής έχουν βρεθεί σε αφθονία σε θαλάσσια ιζήματα που περιέχουν μεθάνιο τόσο ως μεμονωμένα κύτταρα, όσο και σε συσσωματώματα μαζί με τα ANME-2 Archaea και κάποιες φορές μαζί με τα ANME-1 Archaea που μεσολαβούν στην AOM. Η ομάδα *Desulfovibrio* ανιχνεύθηκε σποραδικά στην 41, ενώ σε καμία καλλιέργεια δεν ανιχνεύθηκαν κύτταρα του γένους *Desulfovibrio* και *Desulfobulbus* έχουν επίσης ανιχνευθεί ως μεμονωμένα κύτταρα σε ιζήματα πλούσια σε μεθάνιο, ενώ τα *Desulfobulbus* συμμετέχουν και σε συσσωματώματα μαζί με τα ANME-3 Archaea.



Εικόνα 3.2.3 Α. FISH και με τον ανιχνευτή DSS658 για θειικοαναγωγικά Bacteria της ομάδας *Desulfosarcina/Desulfococcus*, Αριστερά χρώση DAPI (μπλε), δεξιά FISH (κόκκινο). B. CARD-FISH με τους ανιχνευτές DSS658 και DSV698 για θειικοαναγωγικά Bacteria της ομάδας *Desulfosarcina/Desulfococcus* και του γένους *Desulfovibrio*.

Α. i) καλλιέργεια 41, διακρίνονται μικρά κύτταρα κόκκοι, και μεγαλύτερα τύπου vibrio, ii) καλλιέργεια 88, διακρίνονται μικρά κύτταρα κόκκοι, και κύτταρα τύπου vibrio, iii) καλλιέργεια 102, διακρίνονται κύτταρα κόκκοι, με τάση για συσσωματώματα iv) 134, μόνο κάποια από τα κύτταρα αριστερά έδωσαν θετικό σήμα με την τεχνική FISH και v) καλλιέργεια 109 1) μετά από ένα μήνα επώασης, όπου κυριαρχούν κύτταρα τύπου vibrio και 2), μετά από εννέα μήνες επώασης, όπου κυριαρχούν κύτταρα κόκκοειδή.

B. vi) καλλιέργεια 41, CARD-FISH 1) με DSV698 για τα θειικοαναγωγικά Bacteria του γένους *Desulfovibrio*. Ο ανιχνευτής έδωσε θετικό σήμα και για τα κύτταρα τύπου sarcina, 2) με DSS658 για τα θειικοαναγωγικά Bacteria της ομάδας *Desulfosarcina/Desulfococcus*, δεν ανιχνεύθηκαν τα κύτταρα τύπου vibrio.

Στην καλλιέργεια 41, πέρα από τα είδη *Desulfosarcina* που έχουν την τυπική τύπου sarcina μορφολογία, και τα συγγενικά τους είδη με τις διαφορετικές μορφολογίες που μπορεί να ανιχνεύθηκαν με τον DSS658, αναπτύχθηκαν σποραδικά και κύτταρα τύπου vibrio που ανήκουν στο γένος *Desulfovibrio*.

Όταν εφαρμόστηκε η τεχνική CARD-FISH, η οποία ενισχύει περισσότερο το σήμα σε σχέση με την FISH, στην καλλιέργεια 41, παρατηρήθηκε ότι ο ανιχνευτής DSV698, δεν μπόρεσε να διακρίνει μεταξύ των κυττάρων *Desulfovibrio* και των κυττάρων

Desulfosarcina/Desulfococcus, καθώς και οι δύο ομάδες έδωσαν δυνατό σήμα με τον DSV (Εικόνα 3.2.3.vi). Αντίθετα, όταν η τεχνική εφαρμόστηκε για τον ανιχνευτή DSS658, υπήρξε επιλεκτικός υβριδισμός τότε μόνο για τα κύτταρα Desulfosarcina/Desulfococcus, ενώ τα κύτταρα Desulfovibrio δεν ανιχνεύθηκαν (Εικόνα 3.2.3.vii). Εφόσον και στις δύο περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες προτεινόμενες συνθήκες υβριδισμού για τους ανιγνευτές, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι τα κύτταρα με θετικό σήμα για Desulfosarcina/ Desulfococcus της καλλιέργειας 41, μπορεί να ανήκουν σε ένα νέο είδος που συνδέεται και με το γένος Desulfovibrio, αν και στη βιβλιογραφία οι δύο αυτοί ανιχνευτές αναφέρονται ότι διακρίνουν τις δύο αυτές ομάδες κυττάρων (Manz et al, 1998). Η ίδια μορφολογία πυκνών συσσωματωμάτων τύπου sarcina παρατηρήθηκε και στα κύτταρα της καλλιέργειας 109 (σε γαλακτικό οξύ), όταν χρησιμοποιήθηκε ή τεχνική CARD-FISH.

2.3.2 Θρεπτικό μέσο για Methanosarcina

Το θρεπτικό μέσο για Methanosarcina στόχευε την αύξηση κυττάρων Archaea του γένους Methanosarcina τα οποία χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα τη μεθανόλη. Σε καμία από τις καλλιέργειες δεν ανιχνεύθηκαν Archaea, ενώ με εξαίρεση τις καλλιέργειες 125 και 196 στις οποίες αναγνωρίστηκε μια μόνο μορφή κυττάρων, οι υπόλοιπες καλλιέργειες ήταν μικτές (Πίνακας 3.2.3).

			•	
καλλιέργεια	Επώαση	Μορφολογία κυττάρων	ARC915 Archaea	EUB338I-III Bacteria
22be	16 μήνες	Κόκκοι - συσσωματώματα, μικρά ραβδοειδή κύτταρα	Δ.Α.	+
22f	2 μήνες	Μικρά ραβδοειδή κύτταρα, αλυσίδες των 2 κυττάρων	Δ.Α.	+
24e(1)	16 μήνες	Μικρά ραβδοειδή κύτταρα	Δ.Α.	+
24e(2)	16 μήνες	Μικρά ραβδοειδή κύτταρα, κύστες	Δ.Α.	+
24f	2 μήνες	Κύτταρα ράβδοι, κύστες	Δ.Α.	+
125be	16 μήνες	Μεγάλα ραβδοειδή κύτταρα	Δ.Α.	+
125be(1)f	2 μήνες	Μεγάλα ραβδοειδή κύτταρα	Δ.Α.	+
154e		Μικρά ραβδοειδή κύτταρα και κόκκοι	Δ.Α.	+

Πίνακας 3.2.3 Διερεύνηση των μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν στις καλλιέργειες με ταχεία αύξηση σε θρεπτικό μέσο για *Methanosarcina*. Σε διαδοχικές καλλιέργειες που προήλθαν από την ίδια αρχική, παρατηρήθηκαν διαφορετικοί τύποι κυττάρων.

Δ.Α. Δεν ανιχνεύθηκε η ομάδα αυτή.

Στις καλλιέργειες που εμφάνισαν αύξηση, δημιουργήθηκαν επαναληπτικές επανακαλλιέργειες από το ίδιο εμβόλιο. Έτσι, στις καλλιέργειες 24e(1) και 24e(2) που προέκυψαν από το ίδιο εμβόλιο, μετά από επώαση 16 μηνών παρατηρήθηκαν και στις δύο ραβδοειδή κύτταρα με πολύ ασθενές σήμα στη χρώση DAPI, ενώ στην 24e(2) ανιχνεύθηκαν επιπλέον μεγάλοι σφαιρικοί σχηματισμοί που έμοιαζαν με κύστες. Τα ραβδοειδή κύτταρα είχαν πολύ έντονο σήμα με την εφαρμογή της τεχνικής FISH και ανιχνεύθηκαν και ανάμεσα στις κύστες. Κάποιες από τις κύστες είχαν έντονο σήμα με την τεχνική FISH ενώ άλλες δεν έδωσαν σήμα (Εικόνα 3.2.4i). Οι κύστες αυτές εμφανίστηκαν και στην ανακαλλιέργεια που ακολούθησε (24f) μετά από δύο μήνες επώαση.



Εικόνα 3.2.4 FISH με τον ανιχνευτή EUB338I-III για Bacteria σε καλλιέργειες σε θρεπτικό μέσο *Methanosarcina*. Αριστερά χρώση DAPI (μπλε), δεξιά (κόκκινο) FISH i) καλλιέργεια 24e(2), διακρίνονται κύστες και μικρά ραβδοειδή κύτταρα, ii) καλλιέργεια 22be(2), πυκνά συσσωματώματα από κύτταρα που δύσκολα διακρίνονται στη χρώση DAPI αλλά πολύ ευδιάκριτα με την τεχνική FISH. Διακρίνονται κυρίως κύτταρα κόκκοι, αλλά και μικρά ραβδοειδή κύτταρα. iii) καλλιέργεια 22f, μικρά ραβδοειδή κύτταρα, με ασθενές σήμα με τη χρώση DAPI, αλλά πολύ έντονο με την τεχνική FISH. iv) καλλιέργεια 125e, μεγάλα

Στην καλλιέργεια 22, ανιχνεύθηκαν κύτταρα κόκκοι, πολύ μικρά σε μέγεθος, που δεν ήταν εύκολα διακριτά με τη χρώση DAPI, καθώς σχημάτιζαν πυκνά συσσωματώματα κι έδιναν την εντύπωση ότι καλύπτονταν από κάποια εξωκυτταρική ουσία. Τα συσσωματώματα αυτά θύμιζαν συσσωματώματα τύπου sarcina. Με την εφαρμογή της τεχνικής FISH όμως, τα κύτταρα ήταν πολύ ευδιάκριτα με έντονο σήμα, και

κύτταρα ράβδοι v) καλλιέργεια 154e, μικρά κύτταρα τύπου vibrio

διαπιστώθηκε ότι άνηκαν στα Bacteria (Εικόνα 3.2.4ii). Στην καλλιέργεια αυτή, ως μεμονωμένα κύτταρα ή στα συσσωματώματα ανιχνεύθηκαν και λεπτά ραβδοειδή κύτταρα, τα οποία επίσης δεν είχαν δυνατό σήμα με τη χρώση DAPI, ακόμα και σε καλλιέργειες που είχαν πρόσφατα εμβολιασθεί αλλά είχαν έντονο σήμα με την τεχνική FISH και τον ανιχνευτή για Bacteria (Εικόνα 3.2.4iii). Στην καλλιέργεια 125, ανιχνεύθηκε μόνο μια μορφή κυττάρων, σε όλες τις διαδοχικές ανακαλλιέργειες, τα οποία βρέθηκε ότι ανήκαν επίσης στα Bacteria (Εικόνα 3.2.4iv). Στην καλλιέργεια 154, ανιχνεύθηκαν κυρίως μικρά κυρτά ραβδοειδή κύτταρα (vibrio) και σποραδικά κύτταρα κόκκοι και βρέθηκε ότι όλα άνηκαν στα Bacteria (Εικόνα 3.2.4v)

2.4 Καθαρές καλλιέργειες

Προκειμένου να δημιουργηθούν καθαρές καλλιέργειες δοκιμάστηκαν τρεις μέθοδοι: οι διαδοχικοί επανεμβολιασμοί, η δοκιμή της επιλογής με βάση τη θερμοκρασία αύξησης, και η ενσωμάτωση σε στερεό υπόστρωμα.

Στις περισσότερες καλλιέργειες και στα δύο θρεπτικά, παρατηρήθηκαν τουλάχιστον δύο τύποι κυττάρων και οι διαδοχικές ανακαλλιέργειες είχαν σαν στόχο την αύξηση των κυττάρων εκείνων που ευνοούσε το επιλεκτικό θρεπτικό μέσο.

Σε δύο καλλιέργειες (125 και 196) όμως, σε θρεπτικό μέσο για Methanosarcina, τόσο στις αρχικές καλλιέργειες όσο και μετά από επανεμβολιασμοί προέκυψαν καλλιέργειες στις οποίες με τη χρώση DAPI ανιχνεύθηκε μια μόνο μορφολογία κυττάρων, κι ενδεχομένως αποτελούνταν από ένα μόνο είδος μικροοργανισμού.

Σε κάποιες καλλιέργειες παρατηρήθηκε διαδοχική επικράτηση διαφορετικών τύπων κυττάρων στην πορεία των επανεμβολιασμών. Σε δύο καλλιέργειες σε γαλακτικό οξύ, την 88 και την 102, ενώ στην αρχική καλλιέργεια ανιχνεύθηκαν κύτταρα τύπου vibrio, ως κυρίαρχη μορφολογία κυττάρων, μετά την πρώτη ανακαλλιέργεια αλλά και στους επανεμβολιασμούς που ακολούθησαν, κυριάρχησαν κύτταρα με μορφή κόκκων και τα κύτταρα τύπου vibrio ανιχνεύονταν μονάχα σποραδικά, αλλά δεν εξαλείφθηκαν (Εικόνα 3.2.5). Οι αρχικές καλλιέργειες 88in και 102in, στις οποίες είχαν ανιχνευθεί κύτταρα τύπου vibrio, μετά τον πρώτο μήνα επώασης, τοποθετήθηκαν στο ψυγείο (6-8°C) προκειμένου να επιβραδυνθεί η κυτταρική αύξηση. Μετά από 9 μήνες επώασης στους 6°C, η κυτταρική αύξηση ελέγχθηκε ξανά και διαπιστώθηκε ότι δεν είχε αλλάξει κάτι στην αύξηση των κυττάρων, κυριαρχούσαν κύτταρα τύπου vibrio και είχαν δυνατό σήμα με την τεχνική FISH που σημαίνει ότι παρέμεναν μεταβολικά ενεργά. Εμβόλιο από την 88in, αλλά και την
Αποτελέσματα

102in, χρησιμοποιήθηκε μετά από 23 μήνες παραμονής στους 6-8°C, για ανακαλλιέργεια και προέκυψε η καλλιέργεια 88ing και η 102ing. Διαπιστώθηκε μετά από ένα μήνα επώασης, ότι και στις δύο αυτές καλλιέργειες που αναγεννήθηκαν, κυριαρχούσαν κύτταρα κόκκοι, ενώ σποραδικά παρατηρήθηκαν και κύτταρα τύπου vibrio. Σε διαδοχικές ανακαλλιέργειες που ακολούθησαν, παρατηρήθηκε ότι κυριάρχησαν κύτταρα κόκκοι και σταδιακά τα κύτταρα τύπου vibrio ελαττώνονταν. Επομένως, ενώ δεν επηρεάστηκε η αύξηση από επώαση σε χαμηλότερες των 11°C θερμοκρασίες, οι καλλιέργειες που αναγεννήθηκαν μετά από παραμονή για μεγάλο χρονικό διάστημα στους 6°C, είχαν την ίδια πορεία με εκείνες που είχαν διατηρηθεί στους 11°C.

Στην καλλιέργεια 109, στην οποία τα κύτταρα είχαν μορφή κόκκων όταν αναπτύσσονταν σε υπόστρωμα αιθανόλης, όταν μεταφέρθηκε σε υπόστρωμα γαλακτικού οξέος, στον πρώτο μήνα επώασης τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν ήταν μορφής vibrio. Μετά από 9 μήνες επώασης βρέθηκε ότι στην ίδια καλλιέργεια κυριαρχούσαν κύτταρα με μορφή κόκκων και σπάνια ανιχνεύθηκαν κύτταρα τύπου vibrio. Και σε αυτή την καλλιέργεια μετά από τις διαδοχικές καλλιέργειες που ακολούθησαν επικράτησε η δεύτερη μορφή κυττάρων, ενώ τα κύτταρα τύπου vibrio ανιχνεύονταν σπάνια αλλά δεν εξαλείφθηκαν. Και οι δύο τύποι κυττάρων βρέθηκε ότι άνηκαν στην ομάδα των θειικοαναγωγικών Bacteria *Desulfosarcina/Desulfococcus* (Εικόνα 3.2.3ν).

Αντίθετα με τις τρεις καλλιέργειες που εμφάνισαν διαδοχική επικράτηση διαφορετικών μικροοργανισμών, στην 41, επίσης σε υπόστρωμα γαλακτικού οξέος, σε όλες τις ανακαλλιέργειες παρατηρήθηκαν κοκκοειδή κύτταρα αλλά και τύπου vibrio σε όλες τις διαδοχικές ανακαλλιέργειες (Εικόνα 3.2.5).

Προκειμένου να διατηρηθεί μόνο η μία ομάδα κυττάρων στις παραπάνω μικτές καλλιέργειες, έγινε αραίωση του χρησιμοποιούμενου εμβολίου και ακόλουθη επώαση σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες. Έτσι, 800μl εμβολίου από κάθε καλλιέργεια μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό μέσο μεγαλύτερου όγκου (100ml), σε μια αραίωση δηλαδή λίγο μικρότερη του 1:100, και οι καλλιέργειες επωάστηκαν σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, στους 11°C και στους 25°C ώστε να ελεγχθεί εάν υπήρχε ευαισθησία κάποιας ομάδας μικροοργανισμών σε υψηλότερες θερμοκρασίες και να εξαλειφθεί σταδιακά. Την πρώτη εβδομάδα επώασης, λαμβάνονταν δείγμα καθημερινά και με τη χρώση DAPI διαπιστώθηκε ότι και οι τρεις καλλιέργειες παρουσίασαν ταχεία αύξηση και στις δύο θερμοκρασίες. Την ημέρα του

εμβολιασμού, η κυτταρική αφθονία στις καλλιέργειες 41_{110C} και 41_{250C} ήταν της τάξης του 10^6 κύτταρα/ml, ενώ σε όλες τις άλλες καλλιέργειες, μια τάξη μεγέθους χαμηλότερη. Στην πορεία της επώασης τις πρώτες επτά ημέρες, σε όλες τις καλλιέργειες παρατηρήθηκε ότι σταδιακά, άρχισαν να υπερισχύουν σε αφθονία τα κύτταρα τύπου vibrio. Στην καλλιέργεια 41_{250C} , αυτό παρατηρήθηκε από την τρίτη μέρα, όπου η κυτταρική αφθονία ήταν της τάξης του 10^7 κύτταρα/ml, και στην 41_{110C} την έβδομη μέρα επώασης. Την έβδομη ημέρα, η κυτταρική αφθονία της 41_{250C} (4,24x 10^8 κύτταρα/ml) ξεπερνούσε κατά δύο τάξεις μεγέθους εκείνη της 41_{110C} (5,73x 10^6 κύτταρα/ml).



Εικόνα 3.2.5 Στήλη αριστερά, από αριστερά προς τα δεξιά, διαδοχικές καλλιέργειες (d, h, i) που προέκυψαν από τις αρχικές 88in, 102in και 41in, μετά από ένα μήνα επώαση σε υπόστρωμα γαλακτικό οξύ. Στην 88 και 102, στις αρχικές καλλιέργειες επικράτησαν κύτταρα τύπου vibrio, τα οποία στην πορεία των ανακαλλιεργειών εξαλείφονταν και κυριάρχησαν τα κύτταρα κόκκοι, ενώ στην 41 συνυπήρχαν και οι δύο τύπο κυττάρων μέχρι την έβδομη ανακαλλιέργεια (i). Στήλη δεξιά: Επώαση στους 11 και στους 25°C. Μετά από επώαση εφτά ημερών, στους 11°C και στις τρεις καλλιέργειες επικράτησαν μεγάλα κύτταρα τύπου vibrio, ενώ στους 25° επικράτησαν κύτταρα τύπου vibrio στην 102 και την 41 αλλά υπήρχαν και οι δύο τύποι κυττάρων (κόκκοι, vibrio) στην 88.

Την έβδομη ημέρα επώασης, στην καλλιέργεια 88_{110C} κυριάρχησαν τα κύτταρα τύπου vibrio ενώ στην 88_{250C} υπήρχαν και οι δύο τύποι κυττάρων και η ολική αφθονία και

Αποτελέσματα

στις δύο θερμοκρασίες ήταν της τάξης του 10⁶ κύτταρα/ml. Στην 102, την τέταρτη μέρα επώασης κυριαρχούσαν τα κύτταρα κόκκοι, αλλά την έβδομη μέρα κυριαρχούσαν τα κύτταρα τύπου vibrio και στις δύο θερμοκρασίες και η κυτταρική αφθονία ήταν της τάξης του 10⁷ κύτταρα/ml (Εικόνα 3.2.5). Στην 109_{110C}, την έβδομη ημέρα επώασης η κυτταρική αφθονία είχε παραμείνει χαμηλή (4,24x10⁵ κύτταρα/ml) στα επίπεδα της ημέρας εμβολιασμού, όπου όμως παρατηρήθηκαν και οι δύο τύποι κυττάρων, ενώ στην 109_{250C} την ίδια ημέρα η κυτταρική αφθονία ήταν δύο τάξεις μεγέθους υψηλότερη, όπου ανιχνεύθηκαν μεγάλα κύτταρα τύπου vibrio, αλλά και αλυσίδες κυττάρων. Επομένως, η υψηλότερη θερμοκρασία φάνηκε να επηρέασε θετικά την κυτταρική αύξηση, και μάλιστα τα κύτταρα τύπου vibrio. Όμως και στις δύο θερμοκρασίες, ανιχνεύθηκαν τουλάχιστον δύο διαφορετικοί τύποι κυττάρων κι επομένως δεν μπορούμε να θεωρήσουμε ότι θα μπορούσε να γίνει επιλογή μικροοργανισμών με βάση τη θερμοκρασία.

Το ίδιο εμβόλιο που χρησιμοποιήθηκε για την αναγέννηση των καλλιεργειών που αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες, χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό των τυπικών σωλήνων τύπου hungate (10ml καλλιέργειας), δηλαδή αραίωση της καλλιέργειας 1:10 όπου μετά από εννέα μήνες επώασης βρέθηκε ότι στις καλλιέργειες που προέκυψαν (41i, 88i, 102i, 109i και 134i) επικράτησαν κύτταρα κόκκοι. Συμπεραίνουμε από τα παραπάνω, ότι πιθανόν η μεγάλη αραίωση του εμβολίου προκάλεσε την επικράτηση κυττάρων τύπου vibrio και στις δύο θερμοκρασίες. Πάντως, τα κύτταρα αυτά ανιγνεύθηκαν έστω και σποραδικά σε όλες τις επόμενες ανακαλλιέργειες όπου επικρατούσε και ο άλλος τύπος κυττάρων. Μπορούμε να θεωρήσουμε ότι κατά τη μεταφορά εμβολίου σε φρέσκο θρεπτικό μέσο αναπτύσσονται ταχύτατα τα κύτταρα τύπου vibrio, ενώ μετά από κάποιο σύντομο χρονικό διάστημα, οι συνθήκες είναι ευνοϊκότερες για την αύξηση των κυττάρων κόκκων, τα οποία και υπερισχύουν αριθμητικά. Κάτι αντίστοιχο μπορούμε να θεωρήσουμε ότι συνέβη και με τον αρχικό εμβολιασμό με ίζημα στις αρχικές καλλιέργειες 88in και 102in, όπου υπήρξε μεγάλη αραίωση του εμβολίου. Αν λάβουμε υπόψη ότι η κυτταρική αφθονία για τα δείγματα ιζήματος από τα οποία προέκυψαν οι δύο αυτές καλλιέργειες ήταν της τάξης του 10^7 κύτταρα cm⁻³ v.ιζ. και ότι μόνο ένα μικρό μέρος αυτών των κυττάρων αντιστοιχεί σε θειικοαναγωγικά Bacteria που επιλεκτικά μπορούν να αναπτυχθούν στο συγκεκριμένο θρεπτικό μέσο, τότε πρέπει να αναλογιστούμε ότι το αρχικό εμβόλιο αραιώθηκε αρκετά στην αρχική καλλιέργεια που δημιουργήθηκε. Στις ανακαλλιέργειες που προέκυψαν όμως από

Αποτελέσματα

αυτές τις δύο αρχικές καλλιέργειες επικράτησαν σταδιακά τα κύτταρα κόκκοι. Σε αυτές τις συνθήκες μεγάλης αραίωσης λοιπόν, φαίνεται να επικρατούν θειικοαναγωγικά Bacteria τύπου vibrio, τουλάχιστον στα αρχικά στάδια της καλλιέργειας, μέχρι ένα μήνα επώασης, ενώ στην πορεία, τα κύτταρα κόκκοι υπερτερούν. Η τεχνική χρώσης FISH, αποκάλυψε ότι τα κοκκοειδή κύτταρα των καλλιεργειών 41, 88, 102 και 109, ήταν θειοαναγωγικά Bacteria που ανήκουν στην ομάδα *Desulfosarcina/Desulfococcus* sp, αλλά το ίδιο αποκαλύφθηκε και για τα κύτταρα τύπου vibrio των καλλιεργειών, ενώ στην 134 διαπιστώθηκε ότι υπήρχαν και κύτταρα που δεν ανήκαν σε αυτή την ομάδα (Εικόνα 3.2.3). Πρόκειται δηλαδή για μικτές καλλιέργειες, που συμπεριφέρθηκαν με παρόμοιο τρόπο, όπου παρέμειναν μικτές μετά από διαδοχικές ανακαλλιέργειες, αλλά και επώαση σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Επίσης, από ότι προέκυψε, η επικράτηση των διαφορετικών κάθε φορά μικροοργανισμών δεν οφειλόταν στη θερμοκρασία.

Εφόσον μετά από διαδοχικές ανακαλλιέργειες αλλά και με επώαση σε διαφορετικές θερμοκρασίες δεν προέκυψε επιλογή κάποιων μικροοργανισμών και οι καλλιέργειες παρέμειναν μικτές, δοκιμάστηκε η καλλιέργεια σε στερεό υπόστρωμα με άγαρ, ώστε να απομονωθούν αποικίες που ενδεχομένως θα αναπτύσσονταν. Επιλέχθηκαν καλλιέργειες που είχαν εμφανίσει ζωηρή εμφάνιση, σε θρεπτικό μέσο για θειικοαναγωγικά Bacteria με υπόστρωμα γαλακτικό οξύ. Τελικά παρατηρήθηκε σχηματισμός αποικιών μετά από επώαση περίπου δύο μηνών, σε δύο μόνο στερεές καλλιέργειες, την 102, και την 109 που είχε προκύψει με μεταφορά εμβολίου από υπόστρωμα αιθανόλης σε γαλακτικό οξύ. Η διαδικασία ενσωμάτωσης της καλλιέργειας στο άγαρ, υποβάλλει τα κύτταρα σε θερμοκρασιακό σοκ, αφού το άγαρ πριν την ενσωμάτωση της καλλιέργειας θα πρέπει να έχει θερμοκρασία περίπου 40°C. Άμεσα μετά την προσθήκη της καλλιέργειας στο θερμό άγαρ, οι καλλιέργειες με το στερεό υπόστρωμα μεταφέρονταν για μερικά δευτερόλεπτα σε παγωμένο νερό, για να στερεοποιηθεί και να κρυώσει το άγαρ. Πολύ πιθανόν, το σοκ της υψηλής θερμοκρασίας να επηρέασε τη βιωσιμότητα των καλλιεργειών. Οι αποικίες ήταν μικρές και είχαν ανοικτό καφέ χρωματισμό. Στην αραίωση που παρατηρήθηκαν αποικίες, ήταν πολύ μικρές σε διάμετρο και πολύ κοντά η μια με την άλλη, κι έτσι δεν ήταν δυνατό να μεταφερθούν μεμονωμένα σε υγρό θρεπτικό μέσο.

Κεφάλαιο 4 - Συζήτηση

1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΦΘΟΝΙΑ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑΣ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΘΑΝΙΟΥ ΣΕ ΙΖΗΜΑΤΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΥΔΡΙΤΕΣ ΜΕΘΑΝΙΟΥ

Α. Ηφαίστειο ιλύος Amsterdam

Α.1 Ιζήματα από περιοχή χαμηλής ροής εκλυόμενης ιλύος

Α.1.1. Ένδειξη αναερόβιας οξείδωσης του μεθανίου (ΑΟΜ)

Η ΑΟΜ είναι μια διεργασία που συμβαίνει ευρέως σε θαλάσσια ιζήματα πάνω από συσσωρεύσεις/αναβλύσεις μεθανίου ή περιοχές όπου έχουν βρεθεί υδρίτες μεθανίου και η δραστηριότητά της σε βάθος μέσα στο ίζημα συνδέεται άμεσα με τις γεωχημικές συνθήκες που επικρατούν. Τα ηφαίστεια ιλύος μπορεί να βρίσκονται σε ενεργή κατάσταση ή σε κατάσταση λήθαργου στη διάρκεια του χρόνου, καταστάσεις που επηρεάζουν και το γεωχημικό χαρακτήρα του ιζήματος. Οι εκρήξεις τους μπορεί να είναι ήπιες ή βίαιες, απελευθερώνοντας σημαντικές ποσότητες μεθανίου στην ατμόσφαιρα σποραδικά ή συνεχώς (Dimitrov, 2003, Kvenvolden and Rogers, 2005). Η ποσότητα του μεθανίου που εκλύεται από ένα ηφαίστειο που εκρήγνυται υπολογίζεται ότι μπορεί να φτάσει τα 3,3x10⁶ m³ το χρόνο κατά τη διάρκεια περιόδων ύφεσης, μέχρι και περισσότερο από 350×10^6 m³ κατά τη διάρκεια μιας μόνο έκρηξης. Από παρατηρήσεις των εκρήξεων που έχουν καταγραφεί σε ηφαίστεια ιλύος παγκοσμίως, συμπεραίνεται ότι η συχνότητα με την οποία μπορεί να εκρήγνυται ένα ηφαίστειο μπορεί να κυμαίνεται από λιγότερο από ένα χρόνο μέχρι και περισσότερο από 65 χρόνια ενώ είναι δύσκολο να καταγραφούν οι εκρήξεις των υποθαλάσσιων ηφαίστείων (Dimitrov, 2003a). Επομένως, οι ξαφνικές/μη αναμενόμενες μεταβολές της δραστηριότητας των ηφαιστείων ιλύος και η επακόλουθη επίδραση στο γεωχημικό χαρακτήρα του ιζήματος, επηρεάζουν και την εγκατάσταση των μικροβιακών κοινοτήτων στα ιζήματα. Πληροφορίες για τη σύσταση των κοινοτήτων αυτών μπορούν να αντληθούν από τη μελέτη της δομής των κοινοτήτων και των συσσωματωμάτων με τη βοήθεια της τεχνικής FISH, με φυλογενετικές αναλύσεις και αναλύσεις λιπιδιακών βιοδεικτών, όπου μπορούν να προκύψουν ενδείξεις και για τη δραστηριότητα της ΑΟΜ.

Έχει βρεθεί ότι η AOM πραγματοποιείται με τη μεσολάβηση μεθανιογόνων Archaea, που είναι όμως ικανά να επιτελέσουν και αντίστροφη μεθανιογένεση, δηλαδή κατανάλωση μεθανίου σε συντροφική σχέση με θειικοαναγωγικά Bacteria. Τέτοιου

Συζήτηση

είδους συσσωματώματα έχουν ανιχνευθεί με την τεχνική FISH σε άλλα ηφαίστεια ιλύος και σε θαλάσσια ιζήματα όπου εκλύεται μεθάνιο. Τρεις ομάδες αναερόβιων μεθανιότροφων Archaea, θεωρούνται ότι μεσολαβούν στην AOM, τα ANME-1, τα ANME-2 και τα ANME-3 Archaea (Hoehler et al., 1994, Hinrichs et al., 1999, Pancost et al., 2000, Boetius et al., 2000, Niemann et al, 2006). Η ύπαρξη της AOM έχει μελετηθεί σε ηφαίστεια ιλύος στη Ανατολική Μεσόγειο με τη βοήθεια γεωχημικών δεδομένων, αναλύσεων βιοδεικτών και μοριακών αναλύσεων. Σε ιζήματα από ηφαίστεια ιλύος της Μεσογείου όπου εκλύεται μεθάνιο, η ΑΟΜ θεωρείται ότι είναι μια διαδεδομένη διεργασία, όπου οι μικροοργανισμοί καταναλώνουν την πλειοψηφία του εκλυόμενου μεθανίου (Pancost et al., 2000). Archaea της ομάδας των ANME-2 που θεωρείται ότι μεσολαβούν στην διεργασία της AOM, ανιχνεύθηκαν στο ηφαίστειο ιλύος Napoli και στο πεδίο ηφαιστείων ιλύος Olimpi (Heijs et al., 2005). Στα όρη Αναξίμανδρου, στο ηφαίστειο ιλύος Kazan, βρέθηκε ότι η ΑΟΜ συμβαίνει σε μια στενή ζώνη ιζήματος μεταξύ 14 και 18cm βάθους από τον πυθμένα (Haese et al., 2003). Στο ίδιο ηφαίστειο, αναλύσεις μοριακής ποικιλομορφίας φανέρωσαν ότι η AOM συμβαίνει σε 15 και 20 cm βάθος ιζήματος, όπου βρέθηκε ότι κυριαρχούσαν φυλότυποι των ANME-2 Archaea που έχουν παρατηρηθεί μονάχα σε ιζήματα όπου συμβαίνει ΑΟΜ και θειικοαναγωγικά Bacteria της ομάδας δ-Proteobacteria (Kormas *et al.*, 2008). Στο ηφαίστειο Amsterdam, φυλογενετικές αναλύσεις σε δείγματα που ελήφθησαν ανά 5 cm βάθος μέγρι τα 30 cm, βρέθηκαν τόσο ANME-1, όσο και ANME-2 Archaea, ενώ σε βάθος 30cm εντοπίστηκαν φυλότυποι των ANME-3 Archaea (Pachiadaki et al., 2011).

Τα αναερόβια μεθανιότροφα Archaea ANME-1, ANME-2 και ANME-3, αποτελούν τρεις διακριτά φυλογενετικές ομάδες στην επικράτεια των Archaea. Τα ANME-2 έχει βρεθεί ότι σχετίζονται στενά με καλλιεργούμενα είδη της τάξης Methanosarcinales, ενώ τα ANME-1 αποτελούν φυλογενετικά ξεχωριστή ομάδα, αλλά περιφερειακά σχετιζόμενη με τις τάξεις Methanosarcinales και Methanomicrobiales. Τα ANME-3 Archaea σχετίζονται περισσότερο με τα ANME-2 αλλά και με κάποια ακόμα καλλιεργούμενα μεθανιογόνα Archaea που ανήκουν στα γένη *Methanococcoides spp.* και *Methanolobus spp.*, τα οποία δεν σχετίζονται με τις άλλες δύο ομάδες των ANME (Hinrichs *et al.*, 1999, Niemann *et al.*, 2006, Lösekann *et al.*, 2007). Και οι τρεις αυτές ομάδες μεθανιότροφων Archaea, έχουν ανιχνευθεί σε ιζήματα από τα ηφαίστεια ιλύος Amsterdam και Kazan με φυλογενετικές αναλύσεις (Heijs *et al*, 2007, Kormas *et al*, 2008, Pachiadaki *et al.*, 2010, Pachiadaki *et al.*, 2011).

Συζήτηση

Στον πυρήνα AX02BC1 από το ηφαίστειο ιλύος Amsterdam, εντοπίστηκαν για πρώτη φορά με την τεχνική FISH συσσωματώματα ANME-2/DSS και ANME-1 Archaea, υποδηλώνοντας ότι συμβαίνει ΑΟΜ σε όλο το βάθος του πυρήνα. Ενδείξεις για την παρουσία αυτών των μικροοργανισμών στο ηφαίστειο ιλύος Amsterdam, είχαν προκύψει από προηγούμενες μελέτες με φυλογενετικές αναλύσεις (Pachiadaki et al., 2011) και αναλύσεις λιπιδίων βιοδεικτών (Pancost et al., 2000). Τα ANME-2/DSS συσσωματώματα ανιχνεύθηκαν σε όλα τα βάθη του πυρήνα. Ενώ η συγκέντρωση των συσσωματωμάτων παρέμεινε σταθερή σε όλο το βάθος του πυρήνα, το μέγεθος των συσσωματωμάτων βρέθηκε ότι αυξάνονταν με το βάθος κι επομένως και ο αριθμός των κυττάρων σε συσσωματώματα. Τα μικρά συσσωματώματα θεωρείται ότι μπορεί να αποτελούν ένα αρχικό στάδιο σχηματισμού (Boetius et al., 2000). Αντίστοιχα, μπορεί να θεωρηθεί ότι ένα μεγάλου μεγέθους συσσωμάτωμα είναι μεγαλύτερης ηλικίας. Στα 32 cm, όπου τα συσσωματώματα είχαν μέγεθος 12-15μm και στα 44cm βάθος όπου είχαν μέγεθος μέχρι 5μm, μπορεί να θεωρηθεί ότι ήταν εγκατεστημένα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στο ίζημα ή ότι οι συνθήκες στα βάθη αυτά ήταν ευνοϊκότερες για μεγαλύτερο γρονικό διάστημα ώστε να σχηματιστούν μεγαλύτερου μεγέθους συσσωματώματα. Στα ανώτερα επίπεδα του ιζήματος οι συνθήκες ενδεχομένως είναι περισσότερο μεταβλητές ή λιγότερο ευνοϊκές για το σχηματισμό μεγαλύτερου μεγέθους συσσωματωμάτων. Αυτό μπορεί να οφείλεται και σε μεταβολές στην εισροή του θαλασσινού νερού, με το οποίο μπορεί να μεταφέρεται και οξυγόνο επηρεάζοντας την εγκατάσταση των ΑΝΜΕ αφού έχει διαπιστωθεί ότι τα ΑΝΜΕ δεν ανέχονται το οξυγόνο, με τα ΑΝΜΕ-1 να είναι λιγότερο ανθεκτικά (Knittel et al., 2005). Τα ANME-1 κύτταρα ανιχνεύθηκαν στα 14cm και βαθύτερα, με ένα μέγιστο στα 38cm. Τόσο τα ANME-1, όσο και τα ANME-2/DSS συσσωματώματα, ευθύνονται για την μείωση στη συγκέντρωση του μεθανίου που μεταφέρεται με ανοδική ροή από βαθύτερα στρώματα και μπορεί να θεωρηθεί ότι αν και ανιχνεύθηκαν σε όλα τα βάθη του πυρήνα, υπήρξε μια «ζώνη αυξημένης AOM» στα βαθύτερα επίπεδα, μεταξύ 32 και 44cm (Εικόνα 4.1). Στον πυρήνα AX02BC1, το μεθάνιο είχε χαμηλές τιμές σε όλα τα βάθη του, χαμηλότερες από εκείνες που μετρήθηκαν σε άλλους πυρήνες από το Amsterdam. Η χαμηλή συγκέντρωση μεθανίου που καταμετρήθηκε θεωρήθηκε ότι συνδέεται με χαμηλή ροή έκλυσης. Η συγκέντρωση των θειικών ιόντων στο ίζημα παρέμεινε περίπου σταθερή, στα επίπεδα του θαλασσινού νερού κι εμφάνισε πτώση μόνο στο βαθύτερο επίπεδο που εξετάστηκε (29 cm), που μπορεί ίσως να θεωρηθεί ένδειξη AOM με βάση τις

γεωχημικές παραμέτρους (Εικόνα 4.1). Ο ρυθμός κατανάλωσης των θειικών ιόντων μέσα στο ίζημα, ελέγχεται από την ανοδική ροή του μεθανίου από βαθύτερα επίπεδα και απότομη κλίση στην κατανάλωση των θειικών λόγω AOM συμβαίνει σε ιζήματα όπου υπάρχει μεγάλη ροή μεθανίου (Borowski 1996). Εκτός από τις περιπτώσεις όπου υπάρχει ξεκάθαρη κατανάλωση θειικών ιόντων παρουσία μεθανίου, δηλαδή μεγάλη κλίση στο προφίλ βάθους των θειικών, τα γεωχημικά προφίλ από μόνα τους μπορεί να υποεκτιμήσουν την ύπαρξη AOM. Στον πυρήνα AX02BC1, η απουσία ενός τέτοιου προφίλ βάθους για τα θειικά, που η συγκέντρωσή τους παρέμεινε περίπου στις τιμές του θαλασσινού νερού μέχρι και τα 23,5 cm βάθος, υπονοεί μεν μια χαμηλή ροή μεθανίου που δικαιολογεί το προφίλ βάθους των θειικών, τα γεωχημικά που η συγκέντρωσή τους παρέμεινε περίπου στις τιμές του θαλασσινού νερού μέχρι και τα 23,5 cm βάθος, υπονοεί μεν μια χαμηλή ροή μεθανίου που δικαιολογεί το προφίλ βάθους των θειικών, συλάχιστον για τα ανώτερα 30 cm βάθος (Εικόνα 4.1).



Εικόνα 4.1 Προφίλ βάθους της αφθονίας των ANME-1 κυττάρων, των ANME-2/DSS συσσωματωμάτων, της ολικής αφθονίας και συσχέτισή τους με τα προφίλ βάθους του μεθανίου και των θειικών ιόντων. Κυτταρική αφθονία: x10⁶ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ. Με τον ανοικτό ρόμβο συμβολίζεται η συγκέντρωση του μεθανίου (μmol L⁻¹ v.ιζ), και με το ανοικτό τετράγωνο η συγκέντρωση των θειικών ιόντων (mmol kg⁻¹ v.ιζ.). Στα 32 cm βάθος ιζήματος, παρατηρείται μια μέγιστη συγκέντρωση κυττάρων σε ANME-2/DSS συσσωματώματα, ένδειξη έντονης AOM.

Συζήτηση

Η συνεχής εισροή θειικών ιόντων από το θαλασσινό νερό, μπορεί να ήταν όμως και αποτέλεσμα βιααναμόγλευσης του ιζήματος. Βιοαναμόγλευση έγει βρεθεί ότι προκαλούν διάφοροι οργανισμοί που αναπτύσσονται σε ιζήματα πάνω από πηγές διαφυγής αερίων, επωφελούμενοι από τα θρεπτικά συστατικά που εκλύονται. Οι οργανισμοί αυτοί μπορεί να είναι οστρακοειδή, δίθυρα, ή σκώληκες (πωγωνοφόρα), που με τις κινήσεις τους διαταράσσουν τα ανώτερα επίπεδα του ιζήματος, ενώ μαζί τους μπορεί να συμβιώνουν Bacteria που επίσης επωφελούνται από τα συστατικά που εκλύονται από το ίζημα. Τέτοιοι οργανισμοί έχουν εντοπιστεί στα ηφαίστεια ιλύος στην Ανατολική Μεσόγειο (Olu-Le Roy et al., 2004). Σε πυρήνα από το ηφαίστειο ιλύος Kazan, η βιοαναμόχλευση θεωρήθηκε ότι ήταν η αιτία που στα ανώτερα 10cm ιζήματος ανιγνεύθηκαν αερόβιοι μεθανιότροφοι μικροοργανισμοί (Heijs *et al.*, 2007). Σε περιοχή χαμηλής ροής έκλυσης σε ένα άλλο ηφαίστειο ιλύος (Haakon Mosby) στη θάλασσα Barents, όπου η συγκέντρωση του μεθανίου είχε τιμές χαμηλότερες από 0.05 mM μέχρι και τα 50 cm βάθος, διαπιστώθηκε η παρουσία σωληνοσκώληκων στην επιφάνεια του ιζήματος, οι οποίοι σχημάτιζαν στοές μέσα στο ίζημα μεταφέροντας με αυτόν τον τρόπο δέκτες ηλεκτρονίων σε βαθύτερα επίπεδα. Έτσι, ενώ το αναμενόμενο μέγιστο βάθος εισροής θειικών ιόντων θα έπρεπε να είναι τα 12 cm, υπολογίζοντας την καθοδική διάχυση των θειικών και την ανοδική ροή ρευστών, βρέθηκε ότι τα θειικά ιόντα μεταφέρονταν ακόμα βαθύτερα και μάλιστα η μέγιστη δραστηριότητα AOM ανιχνεύθηκε ανάμεσα στη βάση των σωληνοσκώληκων και πάνω από το επίπεδο όπου εντοπίστηκαν υδρίτες, δηλαδή σε μια ζώνη μεταξύ 60 και 90 cm βάθος, όπου τα ANME-2/ DSS συσσωματώματα εμφάνισαν μέγιστη αφθονία (Niemann et al., 2006, Lösekann et al., 2007, Lösekann et al., 2008).

Έντονη βιοαναμόχλευση θεωρήθηκε ότι συμβαίνει και στα ηφαίστεια ιλύος Amsterdam και Kazan, όταν σε πυρήνες ιζήματος που αναλύθηκαν, παρατηρήθηκε ότι τα ιόντα από το θαλασσινό νερό μειώνονταν με το βάθος, αλλά υπήρχε ένα επιφανειακό στρώμα περίπου 20cm όπου η σύσταση του ιζήματος ήταν σχετικά ομοιογενής (Haese *et al.*, 2006). Τα γεωχημικά προφίλ του πυρήνα AX02BC1, υποστηρίζουν μια τέτοια διεργασία. Σε συνδυασμό με τη χαμηλή εκλυόμενη ροή, η βιοαναμόχλευση θα μπορούσε να εξηγεί την εισροή σε βάθος του θαλασσινού νερού και τη συνεχόμενη αναπλήρωση των θειικών ιόντων, τα οποία καταναλώνονται μέσω της αναγωγής των θειικών ιόντων σε σύνδεση με την AOM. Στην περίπτωση του πυρήνα AX02BC1, δεν βρέθηκαν σωληνοσκώληκες ή δίθυρα που θα μπορούσαν να ευθύνονται για τη διευκόλυνση της μεταφοράς ιόντων από το θαλασσινό νερό προς τα βαθύτερα στρώματα του ιζήματος, αλλά έχουν βρεθεί σε αφθονία στην επιφάνειά του ηφαιστείου ιλύος Amsterdam από άλλες ερευνητικές ομάδες. Κατά τη διάρκεια προηγούμενων ερευνητικών αποστολών, υποβρύχιες έρευνες αποκάλυψαν πυκνές αποικίες χημειοσυνθετικών οργανισμών, όπως μεγάλα δίθυρα και πωγωνοφόρα (*Lamellibrachia* sp.), κυρίως στις περισσότερο ενεργές περιοχές του Amsterdam (Olu-Le Roy *et al.*, 2004). Και αυτοί οι οργανισμοί, φαίνεται ότι προτιμούν ένα περιβάλλον με χαμηλότερο ρυθμό AOM και περιοδική εισροή θαλασσινού νερού στο ίζημα (Valentine 2002).

Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι στον πυρήνα AX02BC1 που ανακτήθηκε από μια περιοχή χαμηλής εκλυόμενης ιλύος, οι μικροοργανισμοί έχουν προσαρμοστεί πολύ καλά στις υπάρχουσες σταθερές γεωχημικές συνθήκες, όπου η ροή ρευστών από τα βαθύτερα στρώματα ήταν ήπια. Αν και δεν υπήρξε ένδειξη ΑΟΜ μέσω των γεωχημικών προφίλ βάθους, υπήρξε ισχυρή ένδειξη ότι συμβαίνει ΑΟΜ από τα προφίλ βάθους της ολικής κυτταρικής αφθονίας. Η ανίχνευση των υπεύθυνων αναερόβιων μεθανιότροφων μικροοργανισμών, αποκάλυψε ότι η ΑΟΜ ήταν ενεργή σε όλα τα βάθη, κυρίως όμως στα 32cm και σε μια ζώνη μεταξύ 32 και 44cm βάθος, που μπορεί να θεωρηθεί ως «ζώνη αυξημένης AOM» (Εικόνα 4.1). Οι συνθήκες που ευνόησαν την εγκατάσταση των υπεύθυνων για την AOM αναερόβιων μεθανιότροφων ANME-1 και ANME-2, πιθανόν εκτείνονταν και σε μεγαλύτερα βάθη από 44 cm καθώς τα γεωχημικά προφίλ βάθους μοιάζουν αρκετά αναμενόμενα, χωρίς ανεξήγητες διακυμάνσεις μέχρι τα 31 cm βάθος, και υπεύθυνοι για την AOM μικροοργανισμοί ανιγνεύθηκαν σε μεγάλη συγκέντρωση στο βαθύτερο επίπεδο που μελετήθηκε (2,77 x 10^8 κύτταρα cm⁻³ v.ιζ.). Μπορεί να θεωρηθεί λοιπόν, ότι στο πεδίο ΑΧ02, υπήρχε ένα ισχυρό μικροβιακό φίλτρο, που συνέβαλε στον περιορισμό της έκλυσης μεθανίου από το ίζημα προς το θαλασσινό νερό.

Α.1.2 Συνύπαρξη των αναερόβιων μεθανιότροφων ΑΝΜΕ-1 και ΑΝΜΕ-2

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η διερεύνηση της αιτίας που προκαλεί την εγκατάσταση σε μια περιοχή των ANME-1 και των ANME-2 και την υπερίσχυση ανάλογα με τις συνθήκες της μιας ή της άλλης ομάδας. Σε κάποιες περιοχές με συσσώρευση υδριτών μεθανίου, βρέθηκε να επικρατούν αναερόβια μεθανιότροφα Archaea της ομάδας των ANME-1, όπως στην περιοχή του κόλπου του Μεξικού (Lloyd *et al.*, 2006, Orcutt *et al.*, 2004, Michaelis 2002) ή στα ανοξικά ιζήματα της Μαύρης Θάλασσας (Knittel *et al.*, 2004), ενώ σε άλλες βρέθηκε να επικρατούν

Συζήτηση

μεθανιότροφα Archaea της ομάδας των ANME-2, όπως στα επιφανειακά οξικά ιζήματα στο Hydrate Ridge (Knittel et al., 2004, Boetius et al., 2000) ή και σε άλλα ηφαίστεια ιλύος στην Ανατολική Μεσόγειο, όπως στο Kazan (Kormas et al., 2008, Heijs 2007). Ιδιαίτερα όμως για το ηφαίστειο ιλύος Amsterdam, η μελέτη της ποικιλομορφίας και της κατανομής των προκαρυωτικών κυττάρων σε βάθος ιζήματος 0-30cm, με δειγματοληψία ιζήματος υψηλής ανάλυσης, ανά 5cm βάθος, έδειξε την παρουσία των ANME-1, ANME-2 και ANME-3 μεθανιότροφων Archaea. Τα ANME-2 βρέθηκαν σε όλο τα βάθη που μελετήθηκαν, με κυριαρχία όμως στα επιφανειακά επίπεδα, ενώ τα ANME-1 βρέθηκαν να συνυπάρχουν με τα ANME-2 σε βάθος ιζήματος μέχρι και τα 20cm. Στα 30 cm βάθος η κυρίαρχη ομάδα Archaea ήταν τα ΑΝΜΕ-3, ενώ δεν βρέθηκαν φυλότυποι που να σχετίζονται με τα ΑΝΜΕ-1. Η συγκέντρωση του μεθανίου στον πυρήνα αυτό, ήταν μεγαλύτερη από ότι στον AX02BC1, σε όλα τα βάθη του ιζήματος και όπως ήταν αναμενόμενο, το προφίλ των θειικών ιόντων εμφάνισε μια σχετικά απότομη κλίση σε βάθος. (Pachiadaki et al., 2011). Από όλες τις παραπάνω περιπτώσεις, γίνεται φανερό ότι κάποιες ιδιαίτερες συνθήκες περιβαλλοντικές ή γεωγημικές, επηρεάζουν την κατά βάθος κατανομή των Archaea που εμπλέκονται με την AOM, αφού δημιουργούν ένα ιδιαίτερο μικροπεριβάλλον που ευνοεί την επικράτηση της μιας ή της άλλης ομάδας. Έτσι, ακόμα και πολύ μικρές γεωγημικές διαφορές, σε πολύ κοντινές περιοχές μέσα στο ίζημα, μπορεί να επηρεάσουν την αύξηση των αναερόβιων μεθανιότροφων μικροοργανισμών (Nauhaus et al., 2004, Knittel et al., 2005).

Στον πυρήνα AX02BC1, ενώ τα ANME-2/DSS συσσωματώματα ανιχνεύθηκαν σε όλο το μήκος του, τα ANME-1 ανιχνεύθηκαν σε βάθος 14cm και βαθύτερα. Ενώ σε όλα τα βάθη επικράτησαν τα ANME-2 πάνω στα ANME-1, στα 38cm παρατηρήθηκε μέγιστη κυτταρική αφθονία των ANME-1, μια τάξη μεγέθους υψηλότερη από την αφθονία των κυττάρων σε συσσωματώματα στο βάθος αυτό. Είναι αξιοσημείωτο, ότι ανάμεσα σε δύο στρώματα, όπου τα ANME-2/DSS κυριαρχούσαν, μεσολάβησε ένα επίπεδο ιζήματος με κυριαρχία των ANME-1. Δεν είναι εύκολο να δικαιολογηθεί η διαδοχική επικράτηση των ANME-2 και ANME-1 στα επίπεδα μεταξύ 32 και 44 cm βάθος και να εξηγηθεί ποιος περιβαλλοντικός ή βιολογικός παράγοντας ευνοεί την αύξηση των ANME-1 στο βάθος αυτό. Σε ιζήματα πλούσια σε μεθάνιο, τα ANME-1, ANME-2 και ANME-3 Archaea έχουν βρεθεί να συνυπάρχουν στα ίδια βάθη ιζήματος (Orphan *et al.*, 2004, Knittel *et al.*, 2005, Pachiadaki *et al.*, 2010, Pachiadaki *et al.*, 2011), όμως αρκετές φορές έχει παρατηρηθεί να επικρατεί ή να εμφανίζεται μια μόνο ομάδα κάθε φορά (Boetius et al. 2000, Michaelis et al., 2002, Niemann et al., 2006).

Τα ANME-1 έχουν παρατηρηθεί να κυριαρχούν σε περιοχές με μεγάλη ροή έκλυσης όπου η συγκέντρωσή τους αυξάνονταν με το βάθος. Σε ιζήματα από τη Μαύρη Θάλασσα τα ANME-1 κύτταρα βρέθηκε ότι αποτελούσαν το 20-50% των κυττάρων στα δείγματα που αναλύθηκαν (Knittel *et al.*, 2005). Σε πυρήνες από ιζήματα πλούσια σε μεθάνιο στο Hydrate Ridge και στο Eel River Basin, βρέθηκε να συνυπάρχουν τα ANME-1 και ANME-2 Archaea. Και στις δύο περιοχές μελετήθηκαν ιζήματα κάτω από αποικίες υδρόθειο-οξειδωτικών *Beggiatoa* sp. και αποικίες μυδιών του γένους *Calyptogena pacifica*, και παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωσή των ANME-1 αυξάνονταν προς τα βαθύτερα επίπεδα του ιζήματος (Orphan *et al.*, 2004, Knittel *et al.*, 2005). Τα ANME-1 επομένως και στις δύο περιοχές, επικράτησαν σε βάθη με μεγαλύτερη συγκέντρωση μεθανίου.

Σε πυρήνα ιζήματος από το ηφαίστειο Kazan, παρατηρήθηκε επίσης διαφορετική κατανομή των ANME Archaea σε βάθος ιζήματος. ANME-1 φυλότυποι ανακτήθηκαν από τα δύο βαθύτερα επίπεδα του ιζήματος 25 και 30cm, ενώ στα ενδιάμεσα επίπεδα φαίνεται ότι υπήρχε εναλλαγή των ANME-2 και ANME-3 φυλοτύπων με τα ANME-2 να επικρατούν στο επιφανειακό επίπεδο αλλά και στα βάθη 10, 15 και 20 cm. Στο βαθύτερο επίπεδο που μελετήθηκε (30cm), οι ANME-1, ANME-2 και ANME-3 φυλότυποι συνυπήρχαν, με τα ΑΝΜΕ-3 να κυριαρχούν ελαφρώς. Στον πυρήνα αυτό παρατηρήθηκε μείωση των θειικών ιόντων με το βάθος ενώ το μεθάνιο στα βαθύτερα επίπεδα είχε μεγάλη συγκέντρωση (~0,9-1,3mM) και παρατηρήθηκε μια διακριτή ζώνη μετάβασης αναγωγής θειικών/οξείδωσης μεθανίου στα ~13cm (Kormas et al., 2008, Pachiadaki et al., 2010). Αν και στον ΑΧ02BC1 τα γεωχημικά προφίλ υποδηλώνουν χαμηλότερη ροή έκλυσης σε σχέση με τον παραπάνω πυρήνα από το Kazan και αν και δεν παρατηρήθηκε ζώνη μετάβασης αναγωγής θειικών/ οξείδωσης μεθανίου, υπάρχει η κοινή παρατήρηση μεταξύ των δύο πυρήνων, ότι τα ΑΝΜΕ-1 κύτταρα επικράτησαν στα βαθύτερα στρώματα του ιζήματος, που δηλώνει ότι πιθανόν ανέχονται υψηλότερη συγκέντρωση μεθανίου και δεν επηρεάζονται από τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις θειικών ιόντων. Αντίθετα, τα ΑΝΜΕ-2 στον πυρήνα από το Kazan, κυριάρχησαν σε βάθη μεταξύ 10 και 25cm, όπου η συγκέντρωση του μεθανίου είχε μειωθεί. Αντίστοιχα, στον πυρήνα ΑΧ02BC1 που το μεθάνιο είχε χαμηλές τιμές σε όλα τα βάθη, επικράτησαν τα ANME-2 Archaea σε όλα τα βάθη. Επομένως τα ANME-2 φαίνεται να «προτιμούν» χαμηλότερη συγκέντρωση

μεθανίου. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται και από προηγούμενη πειραματική απόδειξη, όπου μετά από *in vitro* επώαση δειγμάτων ιζήματος από περιοχή πλούσια σε μεθάνιο, αποκαλύφθηκε ότι σε υψηλότερες ροές μεθανίου, τα ANME-1 επικράτησαν των ANME-2, με τα οποία ανταγωνίζονταν για τα θρεπτικά συστατικά (Girguis *et al.*, 2005).

Τα πιθανά σενάρια για την εξήγηση αυτής της διαφορετικής κατανομής κατά βάθος θα πρέπει να αναζητηθούν ανάμεσα στους κυριότερους παράγοντες που φαίνεται να επηρεάζουν την ίδια τη διεργασία της AOM, δηλαδή την επίδραση της θερμοκρασίας, την παρουσία υδριτών μεθανίου αλλά κυρίως τις ιδιαίτερες γεωχημικές συνθήκες, όπως η εκλυόμενη από τα βαθύτερα στρώματα ροή μεθανίου και η διαθεσιμότητα των θειικών ιόντων σε βάθος μέσα στο ίζημα.

Επίδραση της θερμοκρασίας

Η θερμοκρασία ως παράγοντας επίδρασης στην ΑΟΜ έχει διερευνηθεί σε προηγούμενες πειραματικές επωάσεις ιζημάτων, όπου παρατηρήθηκε ότι υπάρχει διαφοροποίηση στη δραστηριότητα της ΑΟΜ μεταξύ των ΑΝΜΕ-1 και ΑΝΜΕ-2 Archaea (Nauhaus *et al.*, 2004). Μετά από *in vitro* επώαση ιζημάτων παρατηρήθηκε ότι τα ΑΝΜΕ-1 εμφάνισαν μεγαλύτερη δραστηριότητα ΑΟΜ σε μέσες θερμοκρασίες (16-24°C) ενώ τα ΑΝΜΕ-2 σε χαμηλότερες. Με βάση το σενάριο της επίδρασης της θερμοκρασίας, θα πρέπει να θεωρηθεί ότι στον πυρήνα ΑΧ02BC1 η επικράτηση των ΑΝΜΕ-1 σε βάθος 38cm, οφείλεται σε αύξηση της θερμοκρασίας στο βάθος αυτό. Στον πυρήνα, η θερμοκρασία που μετρήθηκε στη βάση του κατά το άνοιγμα του ήταν ~14,5-15°C. Δεν φαίνεται όμως να υπάρχει κάποιος παράγοντας που να μετέβαλλε τοπικά τη θερμοκρασία στο βάθος 38cm, ευνοώντας την αύξηση των ΑΝΜΕ-1 ενώ στα παρακείμενα στρώματα υπερίσχυαν τα ΑΝΜΕ-2. Επομένως, μάλλον η διαφορετική κατανομή των ΑΝΜΕ-1, ΑΝΜΕ-2 κατά βάθος δεν πρέπει να οφείλεται σε αλλαγή θερμοκρασίας.

Σχηματισμοί υδριτών μεθανίου

Ο δεύτερος παράγοντας, που μπορεί να διερευνηθεί για την διαφορετική κατανομή των ANME-1, ANME-2 σε βάθος ιζήματος, είναι η παρουσία σχηματισμών υδριτών μεθανίου μέσα στο ίζημα. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ιζήματα όπου συσσωρεύονται υδρίτες στην περιοχή του Κόλπου του Μεξικού, παρατηρήθηκε υψηλή κυτταρική αφθονία στη ζώνη του ιζήματος όπου υπήρχαν υδρίτες και συγκεκριμένα, στο ίζημα που ήταν εξωτερικά των υδριτών ή σε άμεση επαφή με υδρίτες, ή σε ίζημα από στοές σκωληκίων, παρά στο εσωτερικό των υδριτών.

Συζήτηση

Μάλιστα, στα δείγματα κυριαρχούσαν κύτταρα τύπου ANME-1 σε δυάδες ή αλυσίδες, ενώ παρατηρήθηκαν κύτταρα τύπου ANME-1 και στο εσωτερικό κρυστάλλων υδρίτη όπου υπήρχαν ίχνη ιζήματος (Orcutt *et al.*, 2004). Με βάση το σενάριο του σχηματισμού υδριτών, στα 38cm, σχηματισμοί υδριτών ευνόησαν την επικράτηση των ANME-1 σε σχέση με τα ANME-2 Archaea. Και αυτό το σενάριο όμως θα πρέπει να απορριφθεί, καθώς στον πυρήνα AX02BC1 η συγκέντρωση του μεθανίου που μετρήθηκε στα 31 cm ήταν πολύ χαμηλή, μόλις 101 μmol L⁻¹ ν.ιζ, για να δικαιολογεί κορεσμό του ιζήματος σε μεθάνιο στο επίπεδο των 38 cm και άρα σχηματισμό υδριτών. Επίσης, αν πραγματικά υπήρχαν υδρίτες στη ζώνη, αυτή τότε η διάλυσή τους κατά την ανάκτηση του πυρήνα θα έπρεπε να συνοδεύεται και από μια μείωση στη συγκέντρωση των ιόντων χλωρίου, κάτι που δεν προέκυψε από τα γεωχημικά δεδομένα.

Γεωχημικές συνθήκες στο μικροπεριβάλλον του ιζήματος

Το επικρατέστερο σενάριο για την διαφοροποίηση στην κατανομή των ΑΝΜΕ-1 και ANME-2 με το βάθος θα πρέπει να αναζητηθεί στις ιδιαίτερες γεωχημικές συνθήκες της περιοχής αλλά και στο μικροπεριβάλλον που μπορεί να μεταβάλλεται μεταξύ των επιπέδων του ιζήματος. Τα ΑΝΜΕ-1 θεωρείται ότι προτιμούν ένα περιβάλλον περισσότερο αναγωγικό σε σχέση με τα ANME-2 (Knittel et al., 2005). Σε μια συγκριτική μελέτη που πραγματοποιήθηκε μεταξύ ιζημάτων της Μαύρης Θάλασσας και του Hydrate Ridge, παρατηρήθηκε ότι τα ANME-1 κύτταρα κυριαρχούσαν στα μονίμως ανοξικά ιζήματα της Μαύρης Θάλασσας, ενώ ανιχνεύθηκαν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στα επιφανειακά οξικά ιζήματα του Hydrate Ridge, όπου αντιθέτως ανιχνεύθηκαν ANME-2/DSS συσσωματώματα. Η περίπτωση του Hydrate Ridge μοιάζει με την περίπτωση του AX02. Μπορεί να υποτεθεί ότι στα ανώτερα επίπεδα του ιζήματος η εισροή οξυγονωμένου θαλασσινού νερού απέτρεψε την εγκατάσταση των ANME-1. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται και από το γεγονός ότι η ροή μεθανίου από το βάθος του ιζήματος ήταν χαμηλή, επιτρέποντας την εισροή θαλασσινού νερού σε μεγαλύτερο βάθος ιζήματος, ενώ το ίδιο θα μπορούσε να συμβεί με ενδεχόμενη βιοαναμόχλευση του ιζήματος, κάτι που έχει παρατηρηθεί ότι συμβαίνει στα ανώτερα ~20cm βάθος, σε δείγματα από ηφαίστεια ιλύος από το πεδίο Αναξίμανδρου (Haese et al., 2006). Για το λόγο αυτό τα ANME-1 απουσίαζαν στα βάθη μέχρι τα 8cm, και η αφθονία τους αυξάνονταν με το βάθος. Η εισροή θαλασσινού νερού όμως στα ανώτερα επίπεδα, φαίνεται ότι επηρέασε και την εγκατάσταση των ANME-2/DSS συσσωματωμάτων, σε λιγότερο βέβαια βαθμό, αφού

Συζήτηση

όσο αυξάνονταν το βάθος, αυξάνονταν και η συγκέντρωσή τους. Έτσι, ενώ στα ανώτερα επίπεδα τα συσσωματώματα ήταν μικρότερα σε μέγεθος, στα βαθύτερα στρώματα, ανιχνεύθηκαν συσσωματώματα μεγαλύτερα σε μέγεθος, και ενδεχομένως μεγαλύτερα και σε ηλικία.

Πέρα όμως από την παρουσία οξυγόνου, φαίνεται ότι στην κατανομή των δύο ομάδων Archaea επιδρά η ροή του μεθανίου από το βάθος του ιζήματος αλλά και η συγκέντρωση των θειικών ιόντων. Σε ιζήματα χαμηλής ροής μεθανίου υπάρχουν ενδείξεις επικράτησης των ANME-2 (Girguis et al., 2005, Niemann et al., 2006, Kormas et al., 2008). Ο πυρήνας AX02BC1, ανακτήθηκε από περιοχή πολύ χαμηλής ροής μεθανίου και αυτό δικαιολογεί την επικράτηση των ΑΝΜΕ-2 σε όλα τα βάθη, με εξαίρεση τα 38cm. Μπορεί να θεωρηθεί ότι η μη αναμενόμενη επικράτηση των ANME-1 στα 38cm, ήταν αποτέλεσμα μιας τοπικής γεωχημικής μεταβολής στο ίζημα που δημιούργησε ένα ιδιαίτερα ευνοϊκό μικροπεριβάλλον για τα ΑΝΜΕ-1. Τα προφίλ βάθους των γεωχημικών δεν εμφάνισαν μη κανονικές διακυμάνσεις μέχρι τα 31 cm βάθος που εξετάστηκαν. Στη ζώνη των 32 cm, τα ANME-2/DSS κυριάρχησαν. Είναι το βάθος όπου υπήρχε διαθέσιμο μεθάνιο αλλά και θειικά ιόντα. Λόγω της επίδρασης των ANME-2/DSS συσσωματωμάτων και της διεργασίας της AOM, θα ήταν αναμενόμενη και η απότομη κατανάλωση θειικών ιόντων και παραγωγή υδρόθειου. Μπορεί να υποτεθεί λοιπόν, ότι ενώ στα ανώτερα επίπεδα του ιζήματος, υπήρχε συνεχής αναπλήρωση των θειικών ιόντων από την εισροή θαλασσινού νερού, παρά την κατανάλωση από τα ANME-2/DSS συσσωματώματα, κάτω από τα 32 cm υπήρξε μια μη κανονική και απότομη μείωση στα θειικά ιόντα που εισχωρούσαν στα αμέσως βαθύτερα επίπεδα του ιζήματος. Επεκτείνοντας την υπόθεση, μπορεί να θεωρηθεί ότι η χαμηλή συγκέντρωση του μεθανίου που μετρήθηκε στα 31 cm βάθος, δεν ήταν αποτέλεσμα μόνο της χαμηλής ροής έκλυσης από τα βαθύτερα στρώματα, αλλά και της απότομης κατανάλωσης του στα βάθη κάτω από τα 32 cm, που ανιχνεύθηκαν οι υπεύθυνοι μεθανιότροφοι μικροοργανισμοί. Η απότομη μεταβολή στη διαθεσιμότητα των θειικών ιόντων, λόγω της έντονης AOM που παρατηρήθηκε στα 32 cm και η υψηλότερη συγκέντρωση του μεθανίου σε σχέση με τα ανώτερα στρώματα θα πρέπει να αποτέλεσαν ένα ιδιαίτερο μικροπεριβάλλον που ευνόησε την επικράτηση των ANME-1 σε σχέση με τα ANME-2. Ίσως όμως τα ANME-1, να έχουν τη δυνατότητα να καταναλώνουν μεθάνιο αυτά τα ίδια, χωρίς απαραίτητα τη μεσολάβηση κάποιου συντρόφου από τα θειικοαναγωγικά Bacteria. Αυτή η υπόθεση έχει διερευνηθεί για τα ιζήματα από την περιοχή Eel River Basin, όπου τα ANME-1 Archaea παρατηρήθηκαν

Συζήτηση

σαν μικροβιακά στρώματα χωρίς κάποιο άλλο μικροοργανισμό να παρεμβάλλεται (Orphan et al., 2002). Έχει όμως παρατηρηθεί ότι τα ANME-1 και ANME-2 ήταν ενεργά όταν υπήρχε παροχή θειικών ιόντων και μεθανίου και χωρίς θειικά ιόντα δεν παρατηρήθηκε AOM δραστηριότητα (Girguis et al., 2005, Nauhaus et al., 2005) Πιθανόν στα 38 cm, μια απότομη μείωση στην εισροή θειικών ιόντων από το ανώτερο επίπεδο, να έσπρωξε την ισορροπία προς όφελος των ANME-1, που πολύ πιθανόν δεν επηρεάζονται από χαμηλότερες συγκεντρώσεις θειικών. Αυτή η υπόθεση στηρίζεται και από την παρατήρηση ότι τα ANME-1 επικρατούν σε βαθύτερα επίπεδα του ιζήματος. Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη, στην Ιαπωνική θάλασσα, σε μια περιοχή με υδρίτες μεθανίου, τα ANME-1 Archaea εντοπίστηκαν σε θαλάσσια ιζήματα στη ζώνη του ιζήματος όπου τα θειικά ιόντα είχαν εξαντληθεί (Yanagawa et al, 2011). Πιθανόν τα ANME-1 έχουν τη δυνατότητα να προσαρμόζουν το μεταβολισμό τους ανάλογα με τις υπάρχουσες in situ κάθε φορά γεωχημικές συνθήκες, επιτελώντας AOM συνδεδεμένη ή ανεξάρτητη από την κατανάλωση θειικών ιόντων.

Κάτω από τα 38cm όπου τα ANME-1 εμφάνισαν μέγιστη τιμή, στο επίπεδο των 44 cm, επικράτησαν ξανά τα ANME-2/DSS συσσωματώματα. Αν υποτεθεί ότι η διεργασία της AOM μέσω των ANME-1 δεν απαιτεί κατανάλωση θειικών ιόντων σε τέτοιο βαθμό όπως η AOM με τη μεσολάβηση των ANME-2/DSS συσσωματωμάτων, τότε, στα αμέσως βαθύτερα επίπεδα, η συγκέντρωση των θειικών ιόντων ήταν πιθανόν υψηλότερη σε σχέση με εκείνη στα 38 cm, σαν αποτέλεσμα της συνεχούς καθοδικής εισροής θειικών στο ίζημα και της χαμηλής ανοδικής ροής του μεθανίου. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να εξηγηθεί επίσης γιατί στο βαθύτερο επίπεδο (44cm), βρέθηκε να συνυπάρχουν τα ANME-1 και τα ANME-2/DSS, τα οποία όμως υπερίσχυσαν ξανά των ANME-1.

Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι τα ANME-1 δεν εξαρτώνται τόσο από τη συγκέντρωση θειικών, όσο τα ANME-2 και πιθανότατα δεν απαιτούν για τη διατήρηση της ενέργειάς τους κατανάλωση θειικών ή τουλάχιστον όχι σε τόσο μεγάλο βαθμό. Ίσως και μια σχέση μεταξύ της ροής μεθανίου και της αντίστοιχης διαθεσιμότητας θειικών να σπρώχνει την ισορροπία υπέρ της υπερίσχυσης της μιας ή της άλλης ομάδας μεθανιότροφων. Τα ANME-1 ανιχνεύθηκαν σε μεγαλύτερα βάθη, αλλά φάνηκε ότι η εγκατάσταση των ANME-2/DSS συσσωματωμάτων επίσης ευνοείται σε μεγαλύτερα βάθη. Έτσι, σε περιοχές με χαμηλή ροή μεθανίου τα ANME-2, αναμένεται να ευδοκιμούν από τα πιο επιφανειακά επίπεδα ιζήματος, μέχρι και τα βάθη όπου

Συζήτηση

υπάρχει αφθονία θειικών ιόντων, ενώ τα ANME-1 σε πιο βαθιά επίπεδα, όπου η συγκέντρωση των θειικών είναι χαμηλότερη αλλά και η συγκέντρωση του μεθανίου υψηλότερη. Αντίστοιχα, σε περιοχές με υψηλότερη ροή έκλυσης, τέτοια που θα απέτρεπε πιθανή εισροή οξυγόνου στο ίζημα, τα ANME-1 θα αναμέναμε να υπάρχουν σε όλο το βάθος του ιζήματος, από τα βαθύτερα επίπεδα όπου η συγκέντρωση των θειικών ιόντων θα ήταν χαμηλή, μέχρι και τα ανώτερα επίπεδα.

Η διεργασία της ΑΟΜ στα ιζήματα που περιέχουν μεθάνιο, παραμένει ακόμα και σήμερα αινιγματική καθώς δεν έχουν απομονωθεί οι εμπλεκόμενοι μικροοργανισμοί και κάθε εξήγηση γύρω από τους παράγοντες που την επηρεάζουν στηρίζονται σε υποθέσεις γύρω από τον μεταβολισμό των κυττάρων αυτών. Μπορεί να υποτεθεί ότι υπάρχει μια ανταγωνιστική σχέση ως προς τα θρεπτικά στοιχεία (θειικά ιόντα, μεθάνιο), και η σχετική διαθεσιμότητά των στοιχείων αυτών να ευνοεί κάθε φορά την επικράτηση της μιας ή της άλλης ομάδας αναερόβιων μεθανιότροφων Archaea. Αυτό θα γίνει περισσότερο κατανοητό όταν μελετηθεί ο μεταβολισμός τους, γεγονός που προϋποθέτει την καλλιέργεια αυτών των μικροοργανισμών.

Α.2 Ιζήματα από περιοχή υψηλής ροής εκλυόμενης ιλύος

Α.2.1 Ένδειξη αναερόβιας οξείδωσης του μεθανίου (ΑΟΜ) – ζώνη υδριτών μεθανίου

Στον πυρήνα AX09GC1 προέκυψαν ενδείξεις ότι η AOM μπορεί να ήταν ενεργή σε δύο βάθη ιζήματος που μελετήθηκαν, στα 2 και στα 95cm, όπου ανιχνεύθηκαν ANME-1 και ANME-2/DSS συσσωματώματα. Τα ANME-1 Archaea και τα ANME-2/DSS συσσωματώματα όμως, βρέθηκε ότι αποτελούσαν μόνο ένα μικρό ποσοστό της ολικής αφθονίας σε αυτά τα βάθη (28,7% και 13,9% αντίστοιχα). Παρόλο που η συγκέντρωση του μεθανίου ήταν υψηλή και υπήρχε τροφοδότηση θειικών ιόντων σε όλο το βάθος του πυρήνα, φαίνεται ότι η AOM που συνδέεται με την κατανάλωση θειικών ιόντων ήταν μια μέτρια διεργασία στον πυρήνα αυτό και θα πρέπει να διερευνηθεί γιατί παρατηρήθηκε μονάχα στο ανώτερο και στο βαθύτερο στρώμα και όχι στα ενδιάμεσα βάθη. Οι *in situ* συνθήκες, (πίεση, θερμοκρασία, παροχή μεθανίου και εισροή θαλασσινού νερού), ήταν ιδανικές για το σχηματισμό υδριτών και μάλιστα υδρίτες σε μέγεθος ρυζιού, εντοπίστηκαν κατά το άνοιγμα του πυρήνα στο κατάστρωμα. Στο ηφαίστειο ιλύος Amsterdam, οι υδρίτες εντοπίστηκαν σε βάθος μεγαλύτερο των 30cm σε όλους τους πυρήνες. Ας σημειωθεί εδώ, ότι η συγκέντρωση του μεθανίου σε όλο το βάθος του πυρήνα ήταν μεγαλύτερη από το σημείο κορεσμού στο θαλασσινό νερό (~1mm L⁻¹) και η ζώνη κοντά στα 55 cm, όπου παρατηρήθηκε μια μέγιστη τιμή στη συγκέντρωση του μεθανίου (6,2mmol L⁻¹ ν.ιζ), συνδέθηκε με την παρουσία μεγάλου κρυστάλλου ή κρυστάλλων υδριτών, που είχαν ήδη διαλυθεί όταν ανοίχθηκε ο πυρήνας. Έτσι, αν το μεθάνιο στα 32 και στα 63cm, ήταν εγκλωβισμένο με τη μορφή κρυστάλλων υδριτών, τότε μπορεί να θεωρηθεί, ότι με αυτή τη μορφή δεν ήταν διαθέσιμο για κατανάλωση από τους μικροοργανισμούς, όπως είναι το ελεύθερο μεθάνιο που διαχέεται μέσα στο ίζημα και για το λόγο αυτό, η κυτταρική αφθονία στα ενδιάμεσα στρώματα του ιζήματος ήταν μια τάξη μεγέθους χαμηλότερη σε σχέση με τα 2 και τα 95cm (Εικόνα 4.2).



Еко́va 4.2 Профі́λ βάθους της ολικής αφθονίας (- \bullet -), των ANME-2/DSS συσσωματωμάτων (- \bullet -) και των ANME-1 κυττάρων (- \blacktriangle -) σε σύγκριση με τα προφίλ βάθους για τη συγκέντρωση του μεθανίου (mmol L⁻¹ v.ιζ.) (- \diamond -), υδρόθειου (mmol L⁻¹ v.ιζ.) (- \circ -) και των θειικών ιόντων (mmol kg⁻¹ v.ιζ.) (- \Box -). Στα επίπεδα του ιζήματος κοντά στην μέγιστη συγκέντρωση μεθανίου, παρατηρήθηκε μείωση στην αφθονία των κυττάρων (ολική αφθονία, αφθονία ANME-1 και αφθονία κυττάρων σε ANME-2/DSS). Η σκιασμένη περιοχή είναι η ζώνη σχηματισμού υδριτών.

Συζήτηση

Σε ιζήματα όπου εντοπίστηκαν σχηματισμοί υδριτών, κάποιες φορές βρέθηκε να υπερισχύουν τα ANME-1, ενώ άλλες τα ANME-2 Archaea. Σε δείγματα ιζήματος από επιφανειακούς σχηματισμούς υδριτών, από τον Κόλπο του Μεξικού, ανιχνεύθηκαν κύτταρα τύπου ΑΝΜΕ-1 στο εσωτερικό των υδριτών, όπου και μετρήθηκε ο χαμηλότερος ρυθμός ΑΟΜ και αναγωγής θειικών σε σχέση με τα δείγματα ιζήματος που περιέβαλαν τους υδρίτες. Στα ιζήματα αυτά διαπιστώθηκε, ότι η κυτταρική αφθονία στο εσωτερικό των υδριτών, ήταν της τάξης του 107 κύτταρα cm⁻³ v.ιζ. και ήταν περίπου δύο τάξεις μεγέθους χαμηλότερη σε σχέση με την αφθονία στα γειτονικά βάθη του ιζήματος. Τα κύτταρα τύπου ΑΝΜΕ-1 ήταν η κυρίαρχη μορφολογία κυττάρων που εντοπίστηκε στο ίζημα που βρίσκονταν κοντά ή σε επαφή με τους υδρίτες. Από τη μελέτη αυτή, προέκυψε μεν ότι οι μικροβιακοί πληθυσμοί ήταν ενεργοί τόσο εντός των υδριτών, όσο και στο ίζημα που τους περιέβαλλε, αλλά δεν προέκυψε εάν οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονταν εντός των σχηματισμών των υδριτών ή εντός θαλασσινού νερού ή ιζήματος που είχε εγκλωβιστεί μέσα στους υδρίτες (Orcutt et al., 2004). Έτσι, εάν στο εσωτερικό των υδριτών δεν υπάρχει εγκλωβισμένο θαλασσινό νερό ή ίζημα, πολύ πιθανόν δεν μπορούν να αναπτυχθούν οι μικροοργανισμοί και για το λόγο αυτό παρατηρήθηκε χαμηλή κυτταρική αφθονία. Σε ιζήματα όμως από το Hydrate Ridge, διαπιστώθηκε ότι στα επιφανειακά επίπεδα του ιζήματος όπου υπήρχαν σχηματισμοί υδριτών, τα συσσωματώματα ANME-2/DSS ήταν άφθονα στα ανώτερα 5cm που μελετήθηκαν με μια μέγιστη συγκέντρωση σε βάθος 1-2cm, ενώ τα ANME-1 κύτταρα, ανιγνεύθηκαν κυρίως στα κατώτερα επίπεδα του ιζήματος (Boetius et al., 2000, Boetius et al., 2004).

Η απουσία των μεθανιότροφων ANME-1 και ANME-2/DSS συσσωματωμάτων από τα δύο ενδιάμεσα βάθη του ιζήματος, μπορεί να οφείλεται, όχι μόνο στην ίδια την παρουσία υδριτών, που καταλαμβάνοντας χώρο εντός του ιζήματος, συντελούν στη μείωση της κυτταρικής αφθονίας, αλλά και στο γεγονός ότι ο σχηματισμός των υδριτών πιθανόν εκφράζει μια δυναμική κατάσταση όπου υπάρχει μια συνεχής σύνθεση/ διάλυσή τους, που δημιουργεί ασταθείς συνθήκες για την αύξηση των ANME. Στην περιοχή από την οποία ανακτήθηκε ο πυρήνας AX09GC1, είναι πιθανόν να υπήρχαν συνεχείς διακυμάνσεις στην εκλυόμενη ροή μεθανίου άρα και στην εισροή του θαλασσινού νερού μέσα στο ίζημα. Τέτοιες διακυμάνσεις δημιουργούν ασταθείς γεωχημικές συνθήκες (συγκέντρωση μεθανίου, εισροή θαλασσινού νερού), με άμεση επίδραση στο σχηματισμό και τη σταθερότητα των

υδριτών και κατά συνέπεια στη διαθεσιμότητα του μεθανίου και των θειικών ιόντων, για τους μεθανιότροφους μικροοργανισμούς. Αυτή η ασταθής κατάσταση είναι πιθανή, καθώς οι υδρίτες στο ηφαίστειο ιλύος Amsterdam βρέθηκαν να σχηματίζονται σε συνθήκες πολύ κοντά στα όρια σταθερότητάς τους, σε βάθος ~2030m και μόλις 30cm κάτω από την επιφάνεια του ιζήματος. Επομένως, μικρές μεταβολές στη θερμοκρασία ή στην εκλυόμενη ροή, επηρεάζουν τη σταθερότητα των υδριτών και πιθανόν δημιουργούν ένα μη ευνοϊκό περιβάλλον για την εγκατάσταση τόσο των ANME-1, όσο και των ANME-2/DSS συσσωματωμάτων. Έτσι αν θεωρηθεί ότι η ζώνη υδριτών είναι και η ζώνη στην οποία συμβαίνουν περισσότερο οι γεωχημικές μεταβολές, τότε αυτό θα εξηγούσε την παρατήρηση ότι στα παρακείμενα της ζώνης υδριτών στρώματα του ιζήματος, στα 32 και 63 cm βάθος, η ολική κυτταρική αφθονία ήταν χαμηλή, ενώ απουσίαζαν τα ANME-1 κύτταρα και ήταν πολύ χαμηλή ή μηδενική (32 cm βάθος) η συγκέντρωση των κυττάρων σε ANME-2/DSS συσσωματώματα (Εικόνα 4.2).

Η υψηλή συγκέντρωση του υδρόθειου που παρατηρήθηκε μεταξύ 16 και 52,5 cm βάθους, καθώς και η κατανάλωση των θειικών ιόντων (Εικόνα 4.2), υποδηλώνουν ότι υπήρχε αναγωγή των θειικών ιόντων, η οποία θα μπορούσε να συνδέεται ή να είναι ανεξάρτητη της AOM, και οφείλεται στην παρουσία διάφορων ομάδων θειικοαναγωγικών Bacteria. Αν υποτεθεί ότι η αναγωγή των θειικών ιόντων συνδέονταν με την AOM στα βάθη αυτά, τότε θα έπρεπε να εξεταστούν τρία σενάρια. Αρχικά μπορεί να θεωρηθεί ότι η ΑΟΜ, ήταν ενεργή, αλλά σε χαμηλότερη ένταση, αν ληφθεί υπόψη η χαμηλή ολική κυτταρική αφθονία, και ότι υπήρχαν ANME-2/DSS συσσωματώματα και ANME-1 κύτταρα σε πολύ μικρή αφθονία (<1% της κυτταρικής αφθονίας) και ότι η κατανάλωση των θειικών ιόντων στα βάθη αυτά οφειλόταν και σε αναγωγή θειικών ιόντων όπου τα θειικοαναγωγικά Bacteria χρησιμοποιούσαν ως πηγή άνθρακα και οργανικά συστατικά που δεν αποτελούσαν ενδιάμεσα προϊόντα της ΑΟΜ. Σε μια δεύτερη υπόθεση, μπορεί να θεωρηθεί ότι η ΑΟΜ ήταν ενεργή, με τη μεσολάβηση μικροοργανισμών που ανήκαν στα μεμονωμένα κύτταρα που ανιχνεύθηκαν, τα οποία αποτελούσαν και το μεγαλύτερο ποσοστό κυττάρων (71-100%) σε όλα τα βάθη που μελετήθηκαν και δεν ανήκαν στα ANME-1 Archaea ή στα ANME-2/DSS συσσωματώματα. Με την τεχνική FISH, δεν ήταν δυνατό να διακριθεί εάν στα μεμονωμένα κύτταρα περιλαμβάνονταν μεμονωμένα κύτταρα ANME-2 ή μεμονωμένα θειικοαναγωγικά Bacteria της ομάδας Desulfosarcina/Desulfococcus (DSS). Εάν συνέβαινε αυτό, τότε πιθανόν πρόκειται για μια μεταβατική κατάσταση,

Συζήτηση

όπου οι μεταβολές στην ανοδική ροή του μεθανίου και ο σχηματισμός/ αποδιοργάνωση των υδριτών απέτρεψε το σχηματισμό της συντροφικής σχέσης μεταξύ ANME-2 Archaea και των θειικοαναγωγικών Bacteria, που θα έπρεπε τότε να λειτουργούν αυτόνομα. Για να είναι όμως τότε δυνατή η ΑΟΜ σε σύνδεση με την αναγωγή των θειικών ιόντων, θα έπρεπε οι μικροοργανισμοί αυτοί να βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους μέσα στο ίζημα και άρα σε μεγάλη αφθονία, κάτι που δεν παρατηρήθηκε. Επιπλέον, αν στο μεγάλο ποσοστό των μεμονωμένων κυττάρων περιλαμβάνονταν ελεύθερα διαβιούντα ANME-2 και θειικοαναγωγικά Bacteria της ομάδας DSS, θα πρέπει αυτά να ήταν ικανά να διατηρήσουν την ενεργειακή τους κατάσταση ως μεμονωμένα κύτταρα και να μεσολαβούν στην πραγματοποίηση της ΑΟΜ, ακόμα και αν δεν βρίσκονταν σε φυσική επαφή μεταξύ τους. Κανένας μικροοργανισμός δεν έχει βρεθεί να αναπτύσσεται με μεθάνιο ως μοναδική πηγή άνθρακα και τόσο τα μεθανιογόνα Archaea όσο και τα θειικοαναγωγικά Bacteria έχει βρεθεί ότι επωφελούνται από τη συντροφική τους σχέση στη διεργασία της AOM, παρόλο που η διεργασία αυτή έχει χαμηλή θερμοδυναμικά απόδοση (Hoehler and Alperin, 1996, Knittel et al., 2009). Τα ANME-1 και τα ANME-2, θεωρείται ότι ευνοούνται από την συντροφική τους σχέση σχηματίζοντας συσσωματώματα και για το λόγω αυτό συνήθως απαντώνται σαν ANME-2/DSS συσσωματώματα, σε ιζήματα που περιέχουν μεθάνιο (πχ Boetius et al., 2000). Πιο σπάνια έχουν ανιχνευθεί σαν συσσωματώματα αποτελούμενα αποκλειστικά από ΑΝΜΕ-2 κύτταρα, τα οποία βρέθηκαν όμως στον ίδιο ορίζοντα ιζήματος μαζί με ANME-2/DSS συσσωματώματα και ANME-1 (Orphan et al., 2002). Επομένως η υπόθεση ότι η AOM στα βάθη αυτά ήταν αποτέλεσμα της μεσολάβησης των μεμονωμένων κυττάρων, θα πρέπει να απορριφθεί. Μια τελευταία εξήγηση για την απότομη κατανάλωση των θειικών ιόντων που παρατηρήθηκε σε βάθος μέχρι τα 52,5 cm, θα μπορούσε να είναι ότι όντως η διεργασία της AOM ήταν ενεργή σε κάποιο από τα γειτονικά επίπεδα του ιζήματος, από τα οποία όμως δεν είχαν ληφθεί δείγματα κι έτσι δεν ήταν δυνατό να ανιχνευθούν οι υπεύθυνοι μικροοργανισμοί. Σε γειτονικά επίπεδα μέσα στο ίζημα, είναι δυνατό μικρές μεταβολές στις γεωχημικές συνθήκες να δημιουργούν ένα ιδιαίτερο μικροπεριβάλλον επηρεάζοντας την εγκατάσταση ή όχι μικροοργανισμών που εμπλέκονται στην ΑΟΜ. Το ιδιαίτερο αυτό μικροπεριβάλλον για τους μεθανιότροφους μικροοργανισμούς μπορεί να εκτείνεται λίγα μόνο χιλιοστά ή εκατοστά, κάθετα μέσα στο ίζημα, όπου ελέγχεται από την κατανομή των δεκτών ηλεκτρονίων, όπως το οξυγόνο και τα θειικά ιόντα (Lösekann et al., 2007). Επομένως

Συζήτηση

μπορεί να θεωρηθεί ότι στα βάθη που παρατηρήθηκε κατανάλωση θειικών ιόντων, μπορεί να ήταν αποτέλεσμα της AOM σε σύνδεση με αναγωγή θειικών ιόντων, σε παρακείμενα βάθη ιζήματος, από τα οποία όμως δεν ανακτήθηκαν δείγματα για την παρούσα μελέτη.

Κάτω από τη ζώνη σχηματισμού υδριτών, στα 63 cm, ανιχνεύθηκαν ANME-2/DSS συσσωματώματα, αλλά σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν ANME-1 κύτταρα. Τα κύτταρα που δεν ανήκαν ούτε στα ANME-1 ούτε στα ANME-2/DSS συσσωματώματα αντιστοιχούσαν στο 96,4% της ολικής αφθονίας σε αυτό το βάθος. Η εισροή των θειικών ιόντων μέχρι και τα 91cm βάθος (5.78 mmol kg⁻¹ v.ιζ.) υποδηλώνει ότι ήταν διαθέσιμα για κατανάλωση από θειικοαναγωγικά Bacteria. Εξάλλου, έχει αναφερθεί ότι σε δείγματα ιζήματος από τη Μαύρη Θάλασσα, η ΑΟΜ ήταν ενεργή σε βάθος κάτω από τη ζώνη μετάβασης θειικών/μεθανίου, όπου η συγκέντρωση των θειικών ιόντων ήταν μικρότερη του 1mM (Knab et al., 2011). Στα 95cm ανιχνεύθηκαν ANME-1 και ANME-2/DSS αποτελούσαν μαζί μόλις το 14% της ολικής κυτταρικής αφθονίας, ενώ στο βάθος αυτό βρέθηκε ότι υπερίσχυαν τα ANME-1 κύτταρα έναντι των ANME-2/DSS συσσωματωμάτων (9,57% και 4,37% της ολικής κυτταρικής αφθονίας αντίστοιχα). Η παρουσία των μεθανιότροφων ANME-1 και ANME-2 Archaea σε βάθος κάτω από τη «ζώνη υδριτών», οφείλεται στην επικράτηση ευνοϊκών συνθηκών στα βάθη αυτά. Η επικράτηση των ΑΝΜΕ-1 έναντι των ΑΝΜΕ-2 στο βάθος αυτό, εξηγείται από την υψηλή συγκέντρωση μεθανίου σε συνδυασμό με χαμηλή συγκέντρωση θειικών ιόντων, όπως παρατηρήθηκε και στον πυρήνα AX02BC1. Εξάλλου, τα ANME-1 έχει βρεθεί ότι αναπτύσσονται περισσότερο σε συνθήκες αυξημένης ροής μεθανίου σε σχέση με τα ANME-2 (Girguis et al., 2005), και ο πυρήνας αυτός ανακτήθηκε από περιοχή με υψηλή ροή εκλυόμενης ιλύος.

Α.3 Σύγκριση πεδίων από το ηφαίστειο ιλύος Amsterdam

Κατακόρυφη κατανομή των ΑΝΜΕ σε πεδία με διαφορετική ροή έκλυσης ιλύος

Στο πεδίο AX02 οι συγκεντρώσεις μεθανίου που μετρήθηκαν ήταν κατά μια ή δύο τάξεις μεγέθους χαμηλότερες σε σχέση με τον πυρήνα AX09GC1 (Εικόνα 4.3). Στα 31 cm βάθος στον πυρήνα AX02BC1, η συγκέντρωση του μεθανίου ήταν μόλις 101.5 μmol L⁻¹ ν.ιζ., ενώ σε κοντινό βάθος, στα 34cm στον πυρήνα AX09GC1 ήταν ~ δεκαπέντε φορές υψηλότερη. Στα πρώτα 50cm στον πυρήνα AX09GC1, η μείωση της συγκέντρωσης των θειικών ιόντων ήταν απότομη, σε σχέση με τη συγκέντρωση των

θειικών στα πρώτα 23,5cm στον πυρήνα AX02BC1 που υποδηλώνει ότι στον AX09GC1 η ανοδική ροή μεθανίου ήταν υψηλότερη σε σχέση με τον AX02BC1 (Borowski *et al.*, 1996).





- i) AX02BC1: μ equation (mmol L⁻¹ v.iz.) (- \Diamond -) kai qeiika iónta (mmol kg⁻¹ v.iz.) (- Δ -).
- ii) AX09GC1: μεθάνιο (μmol L⁻¹ ν.ιζ.) (- \bullet -), θειικά ιόντα (mmol kg⁻¹ ν.ιζ.) (-▲-) και υδρόθειο (- \bullet -) (Gert de Lange)

Παρόλο που το πεδίο AX02 είναι λιγότερο ενεργό σε σχέση με το AX09 ως προς την έκλυση μεθανίου, φαίνεται ότι είναι περισσότερο ενεργό ως προς τη δραστηριότητα των μικροοργανισμών, δεδομένου ότι η ολική κυτταρική αφθονία, ήταν κατά κανόνα πολύ μεγαλύτερη από ότι στο AX09 (Πίνακας 4.1). Τα ANME-2/DSS συσσωματώματα που θεωρούνται υπεύθυνα για την AOM, ανιχνεύθηκαν σε όλα τα βάθη που εξετάστηκαν και σε όλους τους πυρήνες που ανακτήθηκαν από την περιοχή AX02. Στους πυρήνες AX02BC1 και AX09GC1 η κατακόρυφη κατανομή της αφθονίας των ANME-1 και των κυττάρων στα ANME-2/DSS συσσωματώματα διέφερε (Πίνακας 4.1). Ενώ στα 32 cm, στον πυρήνα AX02BC1 παρατηρήθηκε

μέγιστη συγκέντρωση κυττάρων σε συσσωματώματα, στον πυρήνα AX09GC1 αντίθετα, δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου συσσωματώματα. Μόνο στο επιφανειακό στρώμα του ιζήματος (2 cm), η ολική αφθονία ήταν στην ίδια τάξη μεγέθους και στους δύο πυρήνες. Από την άλλη, ενώ ANME-1 ανιχνεύθηκαν στον AX02BC1 στα 14 cm και βαθύτερα, στον πυρήνα AX09GC1 ανιχνεύθηκαν σε χαμηλή αφθονία και στα 2cm βάθος. Προέκυψε λοιπόν από τη σύγκριση μεταξύ των δύο πυρήνων ότι σε περιοχές με διαφορετικές ροές έκλυσης το προφίλ βάθους της κατανομής των μεθανιότροφων μικροοργανισμών διαφέρει, όπως έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενες μελέτες, (Knittel *et al.*, 2005, Niemann *et al.*, 2006, Lösekann *et al.*, 2007).

Πίνακας 4.1 Ανίχνευση	αναερόβιων	μεθανιότροφων	με την	τεχνική	FISH K	και σύγκριση	ι της
κυτταρικής αφθονίας (κι	ύτταρα cm ⁻³ v	ιζ.) μεταξύ των	πυρήνα	ov AX02	BC1 ко	a AX09GC1	

	Βάθος	Ολική αφθονία	ANME-1	ANME-2/DSS	ANME-3/DBB
Πυρήνας	υποδειγμάτων	κύτταρα/	κύτταρα/	κύτταρα/	κύτταρα/
	(cm)	cm ³ ν.ιζ	cm³ ν.ιζ	cm ³ ν.ιζ	cm ³ ν.ιζ
	2	$4,75 ext{ x10}^{8}$	Δ.Α.	8,13 x10 ⁶	
	8	$3,02 \times 10^8$	Δ.Α.	$5,58 \text{ x}10^7$	
AX02BC1	14	$2,92 \times 10^8$	$9,46 ext{ x10}^{6}$	$2,71 \text{ x}10^7$	
Μήκος	20	$1,74 ext{ x10}^{8}$	$1,88 ext{ x10}^{6}$	$7,24 \text{ x}10^7$	
48cm	26	$6,24 ext{ x10}^7$	$5,05 ext{ x10}^{6}$	$2,94 ext{ x10}^7$	Δ.Α.
	32	5,19 x10 ⁹	5,36 x10 ⁷	5,00 x10 ⁹	
	38	$6,06 ext{ x10}^{8}$	1,17 x10 ⁸	$3,86 \times 10^7$	
	44	$5,98 ext{ x10}^{8}$	$3,13 ext{ x10}^7$	$2,45 ext{ x10}^{8}$	
AVADOCI	2	3,71 x10 ⁸	$6,01 ext{ x10}^{6}$	1,00 x10 ⁸	
AX09GCI	32	$7,85 \text{ x}10^7$	Δ.Α.	Δ.Α.	
νιηκος	63	$8,97 ext{ x10}^7$	<1%	$3,27 ext{ x10}^{6}$	Δ.Α.
95cm	95	2,93 x10 ⁸	2,80 x10 ⁷	1,28 x10⁷	

ίζημα και για τον λόγο αυτό ANME-1 κύτταρα ανιχνεύθηκαν ακόμα και στο ανώτατο στρώμα ιζήματος (2 cm).

Συγκρίνοντας τους δύο πυρήνες, μπορεί να θεωρηθεί ότι η χαμηλή ροή μεθανίου, ευνόησε την εγκατάσταση ANME-2/DSS συσσωματωμάτων, αφού ανιχνεύθηκαν σε όλο το βάθος του πυρήνα AX02BC1 (Εικόνα 4.3). Πολύ πιθανόν, δεν είναι αυτή η ίδια η συγκέντρωση του μεθανίου που επηρεάζει την εγκατάσταση των ANME-2 και ANME-1 Archaea, αλλά μάλλον ένας συνδυασμός, εκλυόμενης ροής, συγκέντρωσης μεθανίου αλλά και λοιπών μεταβαλλόμενων γεωχημικών συνθηκών, όπως η διαθεσιμότητα των θειικών ιόντων, σε συνδυασμό βέβαια με παράγοντες όπως η πίεση και η θερμοκρασία. Έτσι, σε συνθήκες που ευνοείται ο σχηματισμός υδριτών, πιθανόν δυσχεραίνεται η εγκατάσταση των ANME-1 και των ANME-2/DSS συσσωματωμάτων, ακόμα και αν οι υδρίτες είναι διάσπαρτοι μέσα στο ίζημα. Δεν έχει αποδειχθεί εάν το δεσμευμένο στους υδρίτες μεθάνιο είναι διαθέσιμο στους μικροοργανισμούς (Orcutt *et al*, 2004). Επιπλέον, πιθανές μεταβολές στην ανοδική ροή του μεθανίου, δημιουργούν συνθήκες συνεχούς σχηματισμού/ διάλυσης των υδριτών και συνεπώς μη σταθερές γεωχημικές συνθήκες.

Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι σε περιοχές με χαμηλή ροή εκλυόμενης ιλύος, οι συνθήκες είναι ευνοϊκότερες και σταθερότερες για την αύξηση των μεθανιότροφων κοινοτήτων, ενώ, σε περιοχές με υψηλή ροή εκλυόμενης ιλύος, η εγκατάσταση των μεθανιότροφων κοινοτήτων μπορεί να περιορίζεται σε πολύ συγκεκριμένο ορίζοντα μέσα στο ίζημα, καθώς οι γεωγημικές συνθήκες μπορεί να μεταβάλλονται στο χώρο αλλά και κατά βάθος μέσα στο ίζημα. Τόσο η διεργασία της ΑΟΜ από τους υπεύθυνους μικροοργανισμούς, όσο και ο σχηματισμός υδρίτη μέσα στο ίζημα, αποτελούν καταστάσεις που αποτρέπουν την έκλυση μεθανίου προς τη στήλη του νερού στα θαλάσσια ιζήματα. Η διεργασία της ΑΟΜ, θεωρείται ένα σημαντικό φίλτρο που καταναλώνει περισσότερο από 80% του παραγόμενου μεθανίου στα θαλάσσια ιζήματα, που διαφορετικά θα κατέληγε στην ατμόσφαιρα (Hinrichs and Boetious, 2002). Στην πρώτη περίπτωση, στο πεδίο AX02, η παρουσία των ANME σε όλο το μήκος του πυρήνα και ιδιαίτερα στα βάθη μεταξύ 32 και 44 cm που μπορεί να θεωρηθεί ως ζώνη «αυξημένης AOM», μπορεί να θεωρηθεί ως σημαντικό μικροβιακό φίλτρο, καθώς στα βάθη αυτά τα ANME-1 κύτταρα και τα ANME-2/DSS συσσωματώματα, αποτελούσαν το 47 με 97% της ολικής κυτταρικής αφθονίας. Στη δεύτερη περίπτωση, στον πυρήνα AX09GC1, η ύπαρξη μιας ζώνης (στα ~ 55 cm) μέσα στο ίζημα με ευνοϊκές συνθήκες σχηματισμού υδριτών, αποτέλεσε ένα εμπόδιο

στην υψηλή ανοδική ροή του μεθανίου, ποσότητα του οποίου φαίνεται ότι εγκλωβίσθηκε στη ζώνη αυτή ως υδρίτης, αλλά λόγω της υψηλής ροής εκλυόμενης ιλύος υψηλές τιμές μεθανίου παρατηρήθηκαν πάνω από τη ζώνη αυτή. Πάνω από τη ζώνη των υδριτών, στο επιφανειακό στρώμα του ιζήματος, ανιχνεύθηκαν και οι δύο ομάδες μεθανιότροφων Archaea (ANME-1 και ANME-2), που μπορούν να θεωρηθούν ότι δρουν ως ένα φίλτρο πριν την απελευθέρωση του μεθανίου στο θαλασσινό νερό. Όμως οι δυο αυτές ομάδες μαζί, βρέθηκε ότι αποτελούσαν μόλις το 29% της ολικής κυτταρικής αφθονίας κι επομένως μπορεί να θεωρηθεί ότι η διεργασία της AOM ήταν μέτριας έντασης σε αυτό το βάθος. Εφόσον οι μεθανιότροφοι μικροοργανισμοί ανιχνεύθηκαν σε χαμηλή αφθονία, είναι πολύ πιθανόν μια ποσότητα μεθανίου που δεν συσσωρεύτηκε με τη μορφή υδριτών, και δεν καταναλώθηκε από τους μεθανιότροφους μικροοργανισμούς, να διέφυγε τελικά προς την υδάτινη στήλη.

Κυτταρική αφθονία και ένδειξη ΑΟΜ σε περιοχές με υψηλή ροή έκλυσης

Με εξαίρεση τους πυρήνες που ανακτήθηκαν από την περιοχή ΑΧΟ2, όλοι οι υπόλοιποι πυρήνες που μελετήθηκαν από το ηφαίστειο ιλύος Amsterdam, ανακτήθηκαν από περιοχές όπου η ροή της εκλυόμενης ιλύος ήταν υψηλή, όπως προέκυψε από τα γεωχημικά δεδομένα. Στους πυρήνες AX06GC1, AX08GC1 και AX11GC1 υπήρχε μια ομοιότητα στα γεωχημικά προφίλ. Στα ανώτερα 20-30cm βάθος, παρατηρήθηκε ότι το θαλασσινό νερό εισχωρούσε μέσα στο ίζημα και η συγκέντρωση των θειικών ιόντων ήταν στα επίπεδα εκείνης στο θαλασσινό νερό (~29mM). Πιθανόν η εισροή αυτή οφείλεται σε βιοαναμόχλευση από οργανισμούς που ευδοκιμούν σε περιοχές όπου εκλύεται μεθάνιο. Τέτοιοι οργανισμοί έχουν παρατηρηθεί στο ηφαίστειο ιλύος Amsterdam (Olu-Le Roy, et al, 2004), στο οποίο έχει παρατηρηθεί βιοαναμόχλευση στα ανώτερα 20cm του ιζήματος και σε προηγούμενες μελέτες (Haese et al., 2006). Από το βάθος αυτό και κάτω, η μείωση των θειικών ιόντων ήταν απότομη κι έφτασε περίπου σε μηδενικές τιμές σε βάθος κάτω από τα 60cm. Το μεθάνιο στα ανώτερα ~20cm ιζήματος είχε τιμές περίπου μηδενικές και αυξάνονταν με το βάθος. Υδρίτες εντοπίστηκαν στον πυρήνα AX11GC1, ενώ στον AX06GC1 παρατηρήθηκε έντονος «βρασμός» του ιζήματος στο κάτω μέρος του, ένδειξη συσσωρευμένου αερίου. Αντίθετα, στον πυρήνα AX09GC1, τα θειικά ιόντα σε βάθος 16 cm είχαν ήδη μειωθεί (11,2mM) αλλά δεν ήταν διαθέσιμα ακόμα και στα 91cm. Σε αντίθεση με τον AX09GC1, στους πυρήνες AX06GC1, AX08GC1 και AX11GC1, δεν παρατηρήθηκε κάποιο επίπεδο μέσα στο ίζημα που να υποδηλώνει την παρουσία μεγάλου υδρίτη, επομένως όπου υπήρχαν υδρίτες ήταν μικροί σε μέγεθος και γι αυτό σε όλα τα βάθη μετρήθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις μεθανίου.

Παρόλο που οι πυρήνες ανακτήθηκαν από περιοχές με υψηλή έκλυση μεθανίου, οι διαφορετικές γεωχημικές συνθήκες επηρέασαν τόσο την κυτταρική αφθονία όσο και την παρουσία των υπεύθυνων για την AOM μικροοργανισμών. Δύο βασικές διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ του AX09GC1 και των τριών άλλων πυρήνων. Η πρώτη αφορά την ένδειξη παρουσίας μεγάλου υδρίτη στο μέσο του πυρήνα και η δεύτερη τη διαθεσιμότητα θεικών ιόντων μέχρι στα βαθύτερα επίπεδα του πυρήνα. Στον AX11GC1 όπου υδρίτες εντοπίστηκαν στο κάτω μισό τμήμα του, η κυτταρική αφθονία ήταν υψηλή στα 2 και στα 38cm, ενώ κάτω από τα ~ 50cm όπου εντοπίστηκαν οι υδρίτες, η κυτταρική αφθονία ήταν χαμηλή, της τάξης του 10^7 κύτταρα cm⁻³ ν.ιζ. Ομοίως και στους πυρήνες AX06GC1, AX08GC1 η κυτταρική αφθονία ήταν της τάξης του 10^7 κύτταρα cm⁻³ ν.ιζ., σε βάθος κάτω από τα 60cm, όπου η συγκέντρωση του μεθανίου ήταν υψηλή (Εικόνα 4.4).



Εικόνα 4.4 Προφίλ βάθους της ολικής αφθονίας μεταξύ πυρήνων βαρύτητας που ανακτήθηκαν από πεδία με υψηλή ροή μεθανίου. AX06GC1 (-Φ-), AX08GC1 (-Φ-), AX09GC1 (-Φ-) και AX11GC1 (-Φ-).

Συζήτηση

Η δεύτερη διαφορά που παρατηρήθηκε μεταξύ των πυρήνων, ήταν η εισροή θειικών ιόντων σε βάθος, που παρατηρήθηκε μόνο στον πυρήνα AX09GC1. Στον πυρήνα αυτό, η κυτταρική αφθονία στα 95 cm βάθος ήταν μια τάξη μεγέθους μεγαλύτερη από την αφθονία σε αντίστοιχα βάθη στους υπόλοιπους πυρήνες (Εικόνα 4.4), ενώ εντοπίστηκαν και ANME-1 και ANME-2/DSS συσσωματώματα που αποτελούσαν το 14% της ολικής κυτταρικής αφθονίας. Πιθανόν στα μεμονωμένα κύτταρα ένα μεγάλο ποσοστό ανήκε σε θειικοαναγωγικά βακτήρια, δεδομένου ότι τα θεικά ιόντα ήταν διαθέσιμα μέχρι το βάθος αυτό.

Σε αντίθεση με τους υπόλοιπους πυρήνες στον πυρήνα AX11GC1, ανιχνεύθηκαν συσσωματώματα και στα τέσσερα βάθη που μελετήθηκαν, σε πολύ χαμηλή αφθονία όμως, που αποτελούσε μόλις το 2,5-9% της ολικής αφθονίας. Τα συσσωματώματα ανιχνεύθηκαν και κάτω από τα 60cm, όπου η συγκέντρωση των θειικών ιόντων ήταν περίπου μηδενική και ανιχνεύθηκαν και μικροί κρύσταλλοι υδριτών. Υπάρχουν αναφορές για ανίχνευση αναερόβιων μεθανιότροφων μικροοργανισμών σε βάθος όπου τα θειικά ιόντα είχαν χαμηλές τιμές (Heijs et al., 2007). Η ανίχνευση χαμηλής αφθονίας συσσωματωμάτων, θα μπορούσε να θεωρηθεί ένδειξη AOM, πολύ γαμηλής δραστηριότητας όμως, που πιθανόν εκφράζει μια ασταθή γεωχημικά κατάσταση για την εγκατάσταση των ΑΝΜΕ. Τα συσσωματώματα στον πυρήνα αυτό ήταν μικρά σε μέγεθος, αποτελούμενα από λίγα έως μερικές δεκάδες κύτταρα και μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελούν ένα αρχικό (Boetius et al., 2000), ή ενδεχομένως κι ένα τελικό στάδιο σχηματισμού συσσωματωμάτων εάν θεωρηθεί ότι οι γεωχημικές συνθήκες άλλαξαν εις βάρους της εγκατάστασης των μικροοργανισμών αυτών. Παρά τη διαθεσιμότητα σε θειικά ιόντα στους πυρήνες AX06GC1 και AX08GC1 μέχρι βάθος ~50cm, στα δείγματα που μελετήθηκαν στα 2 και 50cm βάθος δεν ανιχνεύθηκαν συσσωματώματα, τα οποία είναι πιθανόν να εντοπίζονταν σε κάποιο ενδιάμεσο βάθος από το οποίο δεν είγαν ληφθεί δείγματα. Μπορεί να θεωρηθεί ότι οι γεωγημικές συνθήκες στους πυρήνες AX09GC1 και AX11GC1 ήταν σταθερότερες, σε σχέση με τους άλλους δύο πυρήνες, τουλάχιστον σε συγκεκριμένους ορίζοντες, όπου και ευνοήθηκε ο σχηματισμός συσσωματωμάτων.

Συμπεραίνεται από τα παραπάνω, ότι σε περιοχές με υψηλή ροή έκλυσης ιλύος, πέρα από τη διαθεσιμότητα του μεθανίου και το ρυθμό διάχυσής του από τα βαθύτερα στρώματα, η εγκατάσταση των μεθανιότροφων μικροοργανισμών επηρεάζεται από ένα σύνολο ακόμα παραγόντων, στους οποίους συμπεριλαμβάνεται η διαθεσιμότητα των θειικών ιόντων, και η παρουσία υδριτών. Όπου τα θειικά ιόντα ήταν διαθέσιμα σε βάθος μέσα στο ίζημα, υπήρξαν ενδείξεις ΑΟΜ. Στα βάθη από τα οποία ανακτήθηκαν τα δείγματα, οι υδρίτες βρίσκονται στα όρια σταθερότητάς τους επηρεάζοντας το γεωχημικό χαρακτήρα του ιζήματος, και η επίδραση αυτή είναι εντονότερη όταν οι σχηματισμοί των υδριτών είναι μεγαλύτεροι σε μέγεθος. Με βάση τις παρατηρήσεις στους πυρήνες που μελετήθηκαν, από περιοχές με υψηλή εκλυόμενη ροή αναμένεται ότι εάν συμβαίνει ΑΟΜ, θα πρέπει οι μεθανιότροφοι μικροοργανισμοί να εντοπίζονται σε πολύ συγκεκριμένα βάθη εντός του ιζήματος, και αυτό είναι κάτι που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας. Μεθανιογόνα Archaea έχουν ανιχνευθεί στο ηφαίστειο αυτό τόσο με μελέτες βιοδεικτών λιπιδίων για μεθανιογόνα Archaea (Pancost et al., 2000) όσο και μετά από φυλογενετική ανάλυση (Pachiadaki et al., 2011) σε πυρήνες ιζήματος μήκους 30cm, από περιοχές υψηλής ροής εκλυόμενης ιλύος. Πιθανόν η AOM να ήταν ενεργή σε ρηχά επίπεδα του ιζήματος, πάνω από τα ~50cm όπου υπήρχαν διαθέσιμα θειικά ιόντα. Είναι πιθανό επίσης, η διεργασία της ΑΟΜ στα ιζήματα υψηλής ροής εκλυόμενης ιλύος, να είναι μια μέτρια διαδικασία, ή να μην συμβαίνει, όπως παρατηρήθηκε και σε άλλες περιοχές με έντονη ροή έκλυσης ιλύος. Πολύ υψηλές ροές αναβλύσεων, μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά τις μικροβιακές κοινότητες υπεύθυνες για την ΑΟΜ, καθώς είναι φτωχές σε δέκτες ηλεκτρονίων και δημιουργούν μια αρνητική σχέση μεταξύ της ροής έκλυσης και της αύξησης των μεθανιότροφων μικροοργανισμών όπως παρατηρήθηκε σε ιζήματα με ροή έκλυσης μεγαλύτερη του 0,4 m yr⁻¹, όπου διαπιστώθηκε μείωση της αποτελεσματικότητας των μεθανιότροφων μικροοργανισμών σαν μικροβιακό φίλτρο στο εκλυόμενο μεθάνιο. (Niemann et al., 2006). Στις περιπτώσεις αυτές το μεθάνιο εκλύεται στην υδάτινη στήλη. Έτσι και στην περίπτωση των πυρήνων από περιοχές υψηλής έκλυσης στο Amsterdam, μπορεί να θεωρηθεί ότι το μεθάνιο δεν καταναλώνεται πλήρως εντός του ιζήματος. Εξάλλου, μεθάνιο έχει ανιγνευθεί στην υδάτινη στήλη πάνω από το ηφαίστειο ιλύος Amsterdam, και σε ύψος περίπου 200m πάνω από τον πυθμένα (Charlou *et al.*, 2003).

Β. Ηφαίστειο ιλύος Kazan

Και οι δύο πυρήνες που μελετήθηκαν (AX19GC1 και AX23GC1) ανακτήθηκαν από μια ενεργή περιοχή καθώς η συγκέντρωση του μεθανίου βρέθηκε υψηλή σε όλο το μήκος τους. Οι υδρίτες που εντοπίστηκαν είχαν μέγεθος ρυζιού και δεν ήταν

εντοπισμένοι σε συγκεκριμένο βάθος αλλά βρίσκονταν διάσπαρτοι περίπου σε όλο το μήκος των πυρήνων, σε βάθος κάτω από τα 30cm.

Στον πυρήνα AX23GC1, στα 39cm, η κυτταρική αφθονία ήταν υψηλή και οφείλονταν κατά 78% σε συσσωματώματα, ένδειξη ότι πιθανόν συνέβαινε ΑΟΜ. Ενώ στο επιφανειακό βάθος, τα συσσωματώματα που ανιχνεύθηκαν αποτελούνταν από λίγα μόνο κύτταρα, στα 39cm είγαν διάμετρο έως 2μm, αποτελούμενα από μερικές δεκάδες κύτταρα. Στον πυρήνα AX19GC1 ελάχιστα συσσωματώματα ανιχνεύθηκαν στα 37cm, όπου αποτελούσαν μόλις το 3% της ολικής αφθονίας στο βάθος αυτό, που μπορεί να θεωρηθεί πιθανόν ως ένδειξη ΑΟΜ πολύ χαμηλής δραστηριότητας. Πιθανόν σε κάποιο γειτονικό επίπεδο να υπήρχε εντονότερη δραστηριότητα. Σε όλες τις προηγούμενες μελέτες όπου έγινε διερεύνηση της ΑΟΜ με φυλογενετικές αναλύσεις και λιπιδιακούς βιοδείκτες, έχουν αναλυθεί τα ανώτερα 35cm του ιζήματος. Η μόνη μελέτη στο ηφαίστειο Kazan που περιελάμβανε in situ παρατήρηση του ιζήματος με χρώση DAPI και Acridine Orange, καταδεικνύει την ύπαρξη συσσωματωμάτων σε βάθος μεγαλύτερο των 22cm (10⁶ συσσωματώματα cm⁻³ v.ιζ.), ενώ στα ανώτερα επίπεδα τα συσσωματώματα που ανιχνεύθηκαν ήταν ελάχιστα (Werne et al., 2004). Αυτό έρχεται σε συμφωνία με την παρατήρηση μεγαλύτερου αριθμού συσσωματωμάτων στα 39 cm σε σχέση με τα 2cm βάθος. Σε άλλους πυρήνες που έχουν ανακτηθεί από το Kazan, τα γεωχημικά προφίλ βάθους για το μεθάνιο, τα θειικά ιόντα, το υδρόθειο καθώς και το διαλυμένο ανόργανο άνθρακα αποκάλυψαν ότι η AOM συνέβαινε σε βάθη μεταξύ 6 και 20 cm στο ηφαίστειο Kazan (Haese et al., 2003, Heijs et al., 2007, Kormas et al., 2008). Με φυλογενετικές αναλύσεις και αναλύσεις λιπιδιακών βιοδεικτών, μικροοργανισμοί που σχετίζονται με Archaea που εμπλέκονται στην AOM, έχουν ανιχνευθεί σε διαφορετικά βάθη, που κυμαίνονται από το επιφανειακό στρώμα μέχρι και τα 34cm (Werne et al., 2004, Heijs et al., 2007, Kormas et al., 2008, Pachiadaki et al., 2010). Φαίνεται λοιπόν, ότι ενώ τα γεωχημικά δεδομένα τοποθετούν την ΑΟΜ σε πιο ρηχά επίπεδα του ιζήματος (6-20cm), μικροοργανισμοί υπεύθυνοι για την AOM έχουν βρεθεί και σε μεγαλύτερα βάθη. Η ανάλυση λιπιδίων εξάλλου, μπορεί να εκφράζει μια παλαιότερη κατάσταση, όπου στο ίζημα μπορεί να υπήρξε ΑΟΜ, αλλά να μην ήταν πια ενεργή όταν συλλέχθηκαν τα δείγματα (Werne et al., 2002).

Στα ανώτερα ~35cm από το ηφαίστειο ιλύος Kazan, σε διαφορετικές περιοχές του που έχουν μελετηθεί, παρατηρήθηκε διαφορετική κατανομή κατά βάθος των εμπλεκόμενων στην οξείδωση του μεθανίου μικροοργανισμών. Σε έναν πυρήνα από

Συζήτηση

ενεργή περιοχή του Kazan διαπιστώθηκε η ύπαρξη AOM στα 15 και 20 cm, όπου επικρατούσαν φυλότυποι που ανήκουν στην οικογένεια Methanosarcinales και πιο συγκεκριμένα στα ANME-2c, και φυλότυποι που ανήκουν σε θειικοαναγωγικά Bacteria ενώ δεν ανιχνεύθηκαν φυλότυποι των ANME-1. Τα γεωχημικά δεδομένα από τον ίδιο πυρήνα, υπέδειξαν την ύπαρξη μιας ζώνης διεργασίας AOM/ αναγωγής θειικών ιόντων σε βάθος ~13cm (Kormas et al., 2008). Σε μια πιο λεπτομερή δειγματοληψία του ίδιου πυρήνα ανά 5cm βάθος, ανακτήθηκαν φυλότυποι και των τριών ομάδων αναερόβιων μεθανιότροφων ANME-1, ANME-2 και ANME-3 με διαφορετική όμως σχετική παρουσία στα βάθη που εξετάστηκαν, ενώ εντοπίστηκαν και σε βαθύτερα των 13cm επίπεδα, όπου τα θειικά ιόντα είχαν εξαντληθεί (Pachiadaki et al., 2010). Έτσι, τα ΑΝΜΕ-2 βρέθηκαν να κυριαρχούν στα βάθη κοντά στην επιφάνεια του ιζήματος, ενώ τα ΑΝΜΕ-1 ανακτήθηκαν κυρίως από τα βαθύτερα στρώματα (25 και 30 cm) του ιζήματος. Στον πυρήνα αυτό ανακτήθηκαν και φυλότυποι που ανήκουν στα ANME-3 Archaea οι οποίοι βρέθηκαν να κυριαρχούν τόσο στα 5 cm όσο και στα 30cm βάθος. Σε έναν ακόμα πυρήνα από μια ενεργή περιοχή στο Kazan, η ανάλυση του 16SrRNA γονιδίου αλλά και η ανάλυση λιπιδιακών βιοδεικτών, αποκάλυψε ότι στα μεσαία επίπεδα (6-22cm) και κυρίως στα βαθύτερα επίπεδα (22-34cm) του ιζήματος, επικρατούσαν Archaea της ομάδας ANME-2 και θειικοαναγωγικά Bacteria, υποδηλώνοντας την ύπαρξη της διεργασίας της AOM, καθώς και της αναγωγής των θειικών ιόντων(Heijs et al., 2007). Στον πυρήνα αυτό όμως βρέθηκε, ότι προς την επιφάνεια του ιζήματος επικρατούσαν μικροοργανισμοί που σχετίζονταν με την αερόβια οξείδωση του μεθανίου, των οποίων η συγκέντρωση μειώνονταν με το βάθος ενώ αντίθετα αυξάνονταν η συγκέντρωση των μικροοργανισμών (ANME-2 και θειικοαναγωγικά Bacteria) που σχετίζονται με την αναερόβια οξείδωση του μεθανίου.

Φαίνεται λοιπόν από τα παραπάνω, ότι ενώ σε μια ενεργή περιοχή στο Kazan, στα ανώτερα στρώματα ιζήματος (<6 cm) βρέθηκε ότι υπήρχε εισροή οξυγόνου κι ανιχνεύθηκαν αερόβιοι μικροοργανισμοί ενώ δεν ανιχνεύθηκαν μεθανιότροφα Archaea υπεύθυνα για AOM (Werne *et al.*, 2002, Heijs *et al.*, 2007), σε κοντινή, επίσης ενεργή περιοχή, στα ίδια βάθη, ανιχνεύθηκαν μικροοργανισμοί που ανήκαν στα Archaea ANME-2 και ANME-3, που θεωρείται ότι οξειδώνουν αναερόβια το μεθάνιο (Pachiadaki *et al.*, 2010). Στην πρώτη περίπτωση η συγκέντρωση των θειικών ιόντων ήταν περίπου 3mM για το δείγμα βάθους 22-34cm (Heijs *et al.*, 2007) ενώ στη δεύτερη περίπτωση η εξάντληση των θειικών ιόντων παρατηρήθηκε σε πιο

ρηχό βάθος, περίπου στα 13cm (Kormas et al., 2008), που υποδηλώνει χαμηλότερη ροή έκλυσης ιλύος στον πρώτο πυρήνα. Στον πυρήνα που υπήρχε εισροή οξυγόνου στα ανώτερα επίπεδα, οι μικροοργανισμοί υπεύθυνοι για την ΑΟΜ, εντοπίζονταν σε μεγαλύτερα βάθη, ενώ στον πυρήνα που δεν παρατηρήθηκε εισροή οξυγόνου, ενδείξεις για την ΑΟΜ υπήρξαν σε όλα τα βάθη. Επομένως, πέρα από την κατά βάθος διαφοροποίηση των μικροβιακών κοινοτήτων τόσο για τα Bacteria όσο και για τα Archaea, φαίνεται ότι πρέπει να δεχθούμε ότι συμβαίνεί και μια διαφοροποίηση στο χώρο, αφού κοντινές περιοχές δειγματοληψίας, είναι πιθανό να εμφανίζουν διαφορετικά προφίλ μικροβιακών κοινοτήτων, λόγω επικράτησης διαφορετικών γεωχημικών συνθηκών. Η οριζόντια χωρική διαφοροποίηση των μικροβιακών κοινοτήτων, έχει αποδειχθεί και από προηγούμενες μελέτες στο ηφαίστειο Haakon Mosby, όπου οι διαφορετικές ομάδες των ΑΝΜΕ, παρατηρήθηκαν με την τεχνική FISH, σε πολύ συγκεκριμένα βάθη, σε διαφορετικές περιοχές του ίδιου ηφαιστείου. Η οριζόντια χωρική διαφοροποίηση των μικροβιακών κοινοτήτων, θεωρείται ότι μπορεί να εκτείνεται για εκατοντάδες μέτρα και να επηρεάζεται από την ροή μεθανίου από τα βαθύτερα στρώματα, ενώ φαίνεται να είναι σχετικά σταθερή για χρόνια (Niemann et al., 2006, Lösekann et al., 2007).

Έτσι, ενώ στον πυρήνα AX23GC1 υπήρξε ένδειξη ότι συμβαίνει AOM στα 39, σε κοντινή περιοχή, στον AX19GC1, σε βάθος 37cm, η ανίχνευση μικρού αριθμού συσσωματωμάτων (2,44x10⁵ συσσωματώματα cm⁻³ v.ιζ.), δεν μπορεί να θεωρηθεί ένδειξη AOM, αν και η κυτταρική αφθονία στο βάθος αυτό ήταν υψηλή (1,08x10⁸) κύτταρα cm⁻³ v.ιζ.). Επομένως, εάν θεωρηθεί ότι η ΑΟΜ συμβαίνει σε συγκεκριμένη ζώνη μέσα στο ίζημα, τότε το βάθος της ζώνης αυτής μπορεί να αλλάζει ανάλογα με την περιοχή δειγματοληψίας. Προηγούμενες μοριακές αναλύσεις, έχουν εντοπίσει ANME-1, ANME-2 και ANME-3 Archaea, σε όλα τα βάθη μέσα στο ίζημα και μέχρι τα 34cm που έχουν μελετηθεί (Heijs et al., 2007, Kormas et al., 2008, Pachiadaki et al., 2010), ενώ δεν υπάρχουν ενδείξεις για το τι συμβαίνει σε βαθύτερα στρώματα. Στους πυρήνες AX19GC1 και AX23GC1, δεν προέκυψε κάποια ένδειξη ότι συμβαίνει η AOM σε βάθη μεγαλύτερα των 39 cm, καθώς σε κανέναν πυρήνα δεν βρέθηκαν συσσωματώματα. Όπως προέκυψε από τον πυρήνα AX23GC1, οι συνθήκες για την αύξηση των μικροβιακών κοινοτήτων που σχετίζονται με την ΑΟΜ μάλλον φαίνεται να είναι περισσότερο ευνοϊκές στα δύο επίπεδα 2 και 39cm σε σχέση με τα βαθύτερα επίπεδα (76, 113 και 150cm), όπου η κυτταρική αφθονία ήταν πολύ γαμηλή $(<10^6$ κύτταρα cm⁻³ v.ιζ.). Η γαμηλή αυτή κυτταρική αφθονία μπορεί να εξηγηθεί από

Συζήτηση

την παρουσία διάσπαρτων υδριτών που εντοπίστηκαν κατά το άνοιγμα του πυρήνα, στα τρία βαθύτερα επίπεδα. Όπως έχει αναφερθεί ήδη, η συγκέντρωση των κυττάρων στα ιζήματα εντός των υδριτών είναι χαμηλότερη από ότι στο ίζημα που τους περιβάλλει (Orcutt *et al.*, 2004), κι επομένως η παρουσία υδριτών σε ένα ορίζοντα του ιζήματος, έχει σαν αποτέλεσμα χαμηλότερη κυτταρική αφθονία σε σχέση με παρακείμενους ορίζοντες. Επιπλέον, όπως συμπεράναμε και για τον πυρήνα AX09GC1, σε πυρήνες μεγάλης ροής εκλυόμενης ιλύος, οι συνθήκες στη ζώνη όπου βρίσκονται οι υδρίτες μπορεί να είναι ασταθείς γεωχημικά, επηρεάζοντας έτσι την εγκατάσταση των ANME μικροοργανισμών, σε σχέση με τα παρακείμενα στρώματα ιζήματος και αν ακόμα μεθανιότροφοι μικροοργανισμοί έχουν εγκατασταθεί στη ζώνη αυτή, βρίσκονται σε χαμηλή κυτταρική αφθονία.

Γ. Ηφαίστειο ιλύος Kula

Το ηφαίστειο ιλύος Kula ήταν το πρώτο ηφαίστειο της Ανατολικής Μεσογείου στο οποίο εντοπίστηκαν μεθανιοϋδρίτες (Woodside et al., 1997), αλλά στον πυρήνα που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία δεν εντοπίστηκαν υδρίτες. Θεωρείται όμως ενεργό ηφαίστειο, όπου οι συσσωρεύσεις αερίων είναι νεότερες σε σχέση με τα υπόλοιπα ηφαίστεια ιλύος στα όρη Αναξίμανδρου (Zitter et al., 2005b). Ο πυρήνας AX28GC1, ανακτήθηκε από περιοχή παλαιότερης έκλυσης ιλύος αφού παρατηρήθηκε στην επιφάνειά του ένα οξειδωμένο στρώμα ιζήματος. Επομένως, συμπεραίνεται ότι στα ανώτερα στρώματα του ιζήματος υπήρχε εισροή οξυγόνου. Σε βάθος 91cm η συγκέντρωση του μεθανίου εμφάνισε μέγιστη τιμή, ενώ στα 65 cm, το μεθάνιο είχε ήδη μειωθεί κατά 94%. Σε σχέση με τα προφίλ μεθανίου στα Amsterdam και Kazan, στο ηφαίστειο ιλύος Kula, το μεθάνιο είχε εξαντληθεί σε μεγαλύτερο βάθος (~60cm). Στα δείγματα που μελετήθηκαν από τα πέντε βάθη του πυρήνα AX28GC1 για τη δημιουργία χαμηλής ανάλυσης προφίλ βάθους της κυτταρικής αφθονίας, δεν ανιχνεύθηκαν συσσωματώματα χαρακτηριστικά για την διεργασία της AOM. Στα 2cm βάθος, ακριβώς κάτω από το οξειδωμένο ορίζοντα ιζήματος, ενδεχομένως υπήρχε επίσης εισροή οξυγονωμένου θαλασσινού νερού και για αυτό το λόγο ίσως δεν ανιχνεύθηκαν συσσωματώματα κύτταρών, αν και η κυτταρική αφθονία ήταν υψηλή $(4.28 \times 10^8 \text{ κύτταρα cm}^{-3} \text{ v.ιζ.})$. Παρατηρήθηκε όμως μια κορυφή στο προφίλ της κυτταρικής αφθονίας στα βάθος 64cm που μπορεί να θεωρηθεί ότι συνδέεται με αυξημένη μικροβιακή δραστηριότητα. Η δραστηριότητα αυτή, σε συνδυασμό με τη μείωση στη συγκέντρωση του μεθανίου που παρατηρήθηκε σε

βάθος ~ 60 cm, θα μπορούσε ενδεχομένως να σχετίζεται με την AOM, εφόσον όμως υπήργαν διαθέσιμα θειικά ιόντα μέχρι και αυτό το βάθος. Δεν υπήρξαν όμως επιπλέον στοιχεία που να υποστηρίζουν αυτή τη δραστηριότητα, καθώς δεν ανιχνεύθηκαν σε αυτό το βάθος τα τυπικά συσσωματώματα από μεθανιότροφα Archaea/ θειικοαναγωγικά Bacteria, ούτε και οι τυπικές αλυσίδες των ANME-1, μικροοργανισμοί που θεωρούνται ότι μεσολαβούν στην ΑΟΜ κι έχουν βρεθεί σε ιζήματα που περιέχουν μεθάνιο (Boetius et al., 2000, Valentine 2002 et al., Knittel et al., 2005). Εφόσον το μεθάνιο φάνηκε να εξαντλείται κοντά στα 60cm βάθος, ενδεχομένως υπήρχε ΑΟΜ δραστηριότητα σε κάποιο γειτονικό ορίζοντα. Είναι επίσης πιθανόν, η αύξηση της κυτταρικής αφθονίας στα 64cm, να σχετίζεται με κάποια άλλη μικροβιακή δραστηριότητα, που να μην σχετίζεται με την ΑΟΜ, ενδεχομένως με αναγωγή θειικών ιόντων εάν ήταν διαθέσιμα στο βάθος αυτό. Στην περίπτωση αυτή, τα θειικοαναγωγικά Bacteria θα εμπλέκονταν με την αναερόβια οξείδωση οργανικών συστατικών μικρότερου μοριακού βάρους (Morse, 2002). Εξάλλου, στις καλλιέργειες εμπλουτισμού ανακτήθηκαν θειικοαναγωγικά Bacteria ακόμα και από μεγάλα βάθη ιζήματος (125cm) όπου τα θειικά ιόντα θα έπρεπε να είχαν εξαντληθεί ή να βρίσκονταν σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση.

Δ. Σύγκριση των τριών ηφαιστείων ιλύος.

Οι πυρήνες που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ανακτήθηκαν από τρία διαφορετικά ηφαίστεια, από περιοχές με διαφορετικά χαρακτηριστικά. Μια διαφορά που παρατηρήθηκε στα ιζήματα μεταξύ των ηφαιστείων ιλύος Amsterdam, Kula και Kazan ήταν οι σχηματισμοί των υδριτών και ο εντοπισμός τους μέσα στο ίζημα. Στο Amsterdam, οι υδρίτες εντοπίζονταν σε συγκεκριμένα σημεία μέσα στον πυρήνα, ως μεγάλοι κρύσταλλοι, σε βάθος κάτω από τα 30cm. Αντίθετα στο Kazan παρατηρήθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις μεθανίου σε όλο το μήκος των πυρήνων, και οι υδρίτες που εντοπίστηκαν, ήταν διάσπαρτοι σε βάθος κάτω από τα 30cm, σαν νιφάδες ή σε μέγεθος ρυζιού, και όχι εντοπισμένοι. Αυτή η διασπορά των υδριτών σε όλο το βάθος, μπορεί να σημαίνει μεγαλύτερη ροή έκλυσης ιλύος σε σχέση με το ηφαίστειο ιλύος Amsterdam. Στο ηφαίστειο ιλύος Kula αντίθετα, δεν εντοπίστηκαν υδρίτες, αλλά οι υψηλές συγκεντρώσεις του μεθανίου και η αφρώδης μορφή του ιζήματος μπορεί να οφείλονται σε υδρίτες που είχαν διαλυθεί κατά την ανάκτηση του πυρήνα. Επιπλέον, ο πυρήνας από το Kula ανακτήθηκε από περιοχή παλαιότερης έκλυσης ιλύος.
Συζήτηση

Παρόλο που στα ιζήματα που ανακτήθηκαν από την περιοχή χαμηλής εκλυόμενης ροής από το Amsterdam, υπήρχαν ισχυρές ενδείξεις ότι η AOM ήταν εκτεταμένη σε όλο το βάθος του ιζήματος που μελετήθηκε (44cm) και υπήρχε μια ζώνη «αυξημένης AOM» μεταξύ 32 και 44cm, δεν υπήρξαν τόσο ισχυρές ενδείξεις για την AOM από τους πυρήνες που ανακτήθηκαν από περιοχές υψηλής εκλυόμενης ιλύος τόσο από το Amsterdam, όσο και από τα υπόλοιπα ηφαίστεια, με εξαίρεση ίσως τον πυρήνα AX09GC1, όπου ανιχνεύθηκαν μεθανιότροφα ANME-1 Archaea, αλλά και ANME-2/DSS συσσωματώματα, εντοπισμένα σε συγκεκριμένους ορίζοντες ιζήματος. Στον πυρήνα AX06GC1, στον οποίο το ίζημα «έβραζε» κατά το άνοιγμά του, υποδηλώνοντας συσσωρευμένο αέριο, η κυτταρική αφθονία ήταν χαμηλή σε βάθος κάτω των 49cm, της τάξης του 10^7 κύτταρα cm⁻³ v.ιζ. Ομοίως, και στους πυρήνες από το Kazan, όπου οι υδρίτες ήταν διάσπαρτοι αυτή τη φορά στα βαθύτερα επίπεδα, δεν ανιχνεύθηκαν μεθανιότροφοι μικροοργανισμοί και η κυτταρική αφθονία ήταν της ίδιας τάξης μεγέθους σε βάθος κάτω των 50cm, όπου η συγκέντρωση του μεθανίου ήταν υψηλή. Συμπεραίνεται επομένως, ότι η παρουσία μεγάλου σχηματισμού υδρίτη, ή υψηλής συγκέντρωσης μεθανίου όπως παρατηρήθηκε στο Amsterdam, δεν ευνόησε την εγκατάσταση μεθανιότροφων Archaea. Αλλά και η παρουσία πολλών διάσπαρτων υδριτών είχε το ίδιο αποτέλεσμα, όπως παρατηρήθηκε στα ιζήματα από το Kazan, αφού στα ιζήματα με υδρίτες η κυτταρική αφθονία είναι χαμηλότερη από ότι στα παρακείμενα ιζήματα (Orcutt et al., 2004).

Παρόλο που έχει παρατηρηθεί μια θετική συσχέτιση στην διαθεσιμότητα του μεθανίου και στην αφθονία των υπεύθυνων για την ΑΟΜ συσσωματωμάτων, όπως προέκυψε από τη μεγάλη κυτταρική αφθονία που παρατηρήθηκε σε περιοχές με μεγάλη ροή μεθανίου (Treude *et al*, 2005), έχει παρατηρηθεί επίσης ότι πολύ υψηλές ροές αναβλύσεων, μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά τις μικροβιακές κοινότητες υπεύθυνες για την ΑΟΜ καθώς είναι φτωχές σε δέκτες ηλεκτρονίων και δημιουργώντας μη ευνοϊκές συνθήκες για την εγκατάσταση των μεθανιότροφων μικροοργανισμών (Niemann *et al.*, 2006).

Φαίνεται από τα παραπάνω, ότι σε πυρήνες με υψηλή ροή εκλυόμενης ιλύος, είτε δεν συμβαίνει AOM λόγω της αδυναμίας των υπεύθυνων μεθανιότροφων μικροοργανισμών να εγκατασταθούν, ή εάν συμβαίνει AOM, εντοπίζεται σε πολύ συγκεκριμένα βάθη μέσα στο ίζημα. Δεν προέκυψαν ενδείξεις ότι η AOM πραγματοποιείται στα βάθη που υπάρχουν υδρίτες και αυτό μπορεί να οφείλεται σε μια κατάσταση μη-ισορροπίας, όπου συνεχείς σχηματισμός/διάλυση υδριτών,

173

δημιουργεί ασταθείς συνθήκες για την αύξηση των μεθανιότροφων μικροοργανισμών. Είναι εξίσου πιθανό όμως η AOM να συμβαίνει, σε κάποιο παρακείμενο επίπεδο του ιζήματος, από το οποίο δεν ανακτήθηκαν δείγματα. Επομένως το μεθάνιο που δεν έχει συσσωρευτεί σε υδρίτες και δεν έχει καταναλωθεί μέσο της AOM, τελικά καταλήγει στην υδάτινη στήλη.

2 ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟΝ ΚΥΚΛΟ ΤΟΥ ΜΕΘΑΝΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΝ ΚΥΚΛΟ ΤΟΥ ΘΕΙΟΥ

Τα δείγματα ιζήματος από τα οποία προέκυψαν τα εμβόλια για τις καλλιέργειες, ανακτήθηκαν από βάθος ~ 1260 - 2000m, από την επιφάνεια της θάλασσας. Οι μικροοργανισμοί επομένως αποσυμπιέστηκαν από τα ~ 200bar σε ατμοσφαιρική πίεση, όπου και επωάστηκαν στη συνέχεια, σε θερμοκρασία 11°C. Μελέτες στη φυσιολογία των πιεζόφιλων μικροοργανισμών, έχουν δείξει ότι η μικροβιακή αύξηση σε μεγάλα βάθη, επηρεάζεται από τη σχέση θερμοκρασίας και πίεσης (Horikoshi, 1998). Πιεζόφιλοι θεωρούνται οι μικροοργανισμοί εκείνοι που επιτυγχάνουν μέγιστη αύξηση σε πιέσεις μεταξύ 0,1MPa και 60 MPa και ανάλογα με το εύρος θερμοκρασίας που αναπτύσσονται μπορεί να είναι πιεζοψυχρόφιλοι, πιεζομεσόφιλοι και πιεζοθερμόφιλοι. Η Μεσόγειος Θάλασσα όμως, έχει μια μέση θερμοκρασία 13,5°C. Οι μικροοργανισμοί της Μεσογείου μπορεί να ενδημούν σε βάθος μέχρι 5000m και σε σταθερές θερμοκρασίες ~13,5°C. Μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασία δωματίου και για το λόγο αυτό κατατάσσονται στους πιεζομεσόφιλους μικροοργανισμούς και θεωρούνται ιδανικοί ως μικροοργανισμοί εργαστηρίου για τη μελέτη σχέσεων πίεσης και θερμοκρασίας με την αύξηση (Yayanos 1995).

Από τους αρχικούς εμβολιασμούς, οι 142 στόχευαν σε είδη των θειικοαναγωγικών Bacteria και οι 43 σε είδη του γένους *Methanosarcina*. Από τις συνολικά 185 αρχικές καλλιέργειες που δημιουργήθηκαν αυξήθηκαν 18 σε θρεπτικό μέσο για θειικοαναγωγικα Bacteria και 5 σε θρεπτικό μέσο για *Methanosarcina*.

Δεν παρατηρήθηκε αύξηση σε καμία από τις καλλιέργειες που επωάστηκαν στα δοχεία πίεσης. Αν και έχει παρατηρηθεί ότι οι βαρόφιλοι μικροοργανισμοί αντέχουν την αποσυμπίεση σε ατμοσφαιρική πίεση για μικρό χρονικό διάστημα, αρκεί η θερμοκρασία να διατηρηθεί κοντά στην *in situ* θερμοκρασία (Yayanos, 1995), είναι πιθανό οι μικροοργανισμοί που επωάστηκαν στα δοχεία πίεσης να μην άντεξαν στα διαδοχικά στάδια αποσυμπίεσης κι επανασυμπίεσης στα οποία υποβλήθηκαν μέσα σε διάστημα λίγων ωρών από την ανάκτηση των δειγμάτων. Μπορεί ακόμα τα κύτταρα να καταστράφηκαν όταν τα δοχεία αποσυμπιέστηκαν στο εργαστήριο προκειμένου να ληφθούν δείγματα, μετά από την επώαση τριών μηνών. Η πίεση, θεωρείται μια σημαντική παράμετρος που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τον εμπλουτισμό

καλλιεργειών όπως και η θερμοκρασία, καθώς επιδρά τόσο στη φυσιολογία των μικροοργανισμών όσο και στις βιοχημικές αντιδράσεις. Μέχρι σήμερα, λίγοι πιεζόφιλοι μικροοργανισμοί έχει γίνει δυνατό να καλλιεργηθούν υπό πίεση (Alain and Querellou, 2009). Έχει διαπιστωθεί ότι οι μικροοργανισμοί βαθιάς θάλασσας διαθέτουν ειδικά προσαρμοσμένα γαρακτηριστικά, που τους δίνουν τη δυνατότητα να αναπτυχθούν σε ακραίες συνθήκες. Προκειμένου να αντέξουν τις αλλαγές πίεσης, οι μικροοργανισμοί από την βαθιά θάλασσα που έχουν καλλιεργηθεί, έχει βρεθεί ότι αλλάζουν τη σύσταση των φωσφολιπιδίων των μεμβρανών τους καθώς και τις πρωτεΐνες των μεμβρανών τους (Yayanos 1995). Όμως δεν είναι πάντα εφικτό να αναγεννηθούν καλλιέργειες από ιζήματα βαθιάς θάλασσας. Η φυλογενετική σχέση μεταξύ ειδών του γένους Desulfovibrio που απομονώθηκαν από βαθιά ιζήματα με επιφανειακά είδη, υποδηλώνει ότι μπορεί να υπάρχει ένας μηγανισμός προσαρμογής των μικροοργανισμών αυτών, που αναπτύσσεται κατά τη μεταφορά των μικροοργανισμών σε μεγαλύτερα βάθη και δημιουργεί νέα είδη πιεζόφιλα (Bale et al., 1997). Έχει διαπιστωθεί ότι υπάρχει φυλογενετικός διαγωρισμός, αλλά και προσαρμογή σε συνθήκες πίεσης στους πιεζόφιλους μικροοργανισμούς. Υπερπιεζόφιλα είδη Photobacterium, Colwellia και Shewanella, ανακτήθηκαν σε καλλιέργειες από βάθος υδάτινης στήλης 9.856m, όπου η in situ θερμοκρασία ήταν 1,8°C. Διαπιστώθηκε ότι τα είδη που απομονώθηκαν από τα βάθη αυτά, σχετίζονταν φυλογενετικά με μη πιεζόφιλα είδη από τα ίδια γένη, που είχαν απομονωθεί από αρκτικά ιζήματα. Επίσης διαπιστώθηκε ότι όλα τα πιεζόφιλα είδη, διέθεταν ένα διαφορετικού τύπου ριβόσωμα, το οποίο δεν διέθεταν τα συγγενικά είδη που άνηκαν στα ίδια γένη και δεν ήταν πιεζόφιλα (Lauro et al., 2007).

Τα ιζήματα από πυρήνες που ανακτήθηκαν με κλασσικές μεθόδους πυρηνοληψίας (πυρήνες βαρύτητας και κιβώτιο), αποσυμπιέστηκαν αργά για όση ώρα κράτησε η ανάκτηση του πυρήνα από τον πυθμένα. Από τους πυρήνες αυτούς προέκυψαν συνολικά 15 καλλιέργειες. Αντίθετα τα ιζήματα που χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλια από τους πυρήνες τύπου APCA είχαν υποβληθεί σε δύο διαφορετικές μεταχειρίσεις αποσυμπίεσης. Από τον πυρήνα τύπου APCA ΑΧ02ΑΡ02 που ανακτήθηκε με 160bar πίεση, προέκυψαν δύο καλλιέργειες σε γαλακτικό οξύ. Ο πυρήνας υποβλήθηκε σε διαδικασία αργής αποσυμπίεσης διάρκειας περίπου 13h. Αντίθετα ο πυρήνας τύπου APCA ΑΧ02ΑΡ4, ανακτήθηκε με πίεση 135bar και η αποσυμπίεσή του ήταν άμεση, διάρκειας 15min. Παρόλο που ο πυρήνας αυτός υποβλήθηκε σε ταχύτατη αποσυμπίεση, παρατηρήθηκε αύξηση σε δύο καλλιέργειες που εμβολιάσθηκαν με ίζημά του σε υπόστρωμα γαλακτικό οξύ και σε δύο σε υπόστρωμα οξικό οξύ Φαίνεται λοιπόν, ότι η διάρκεια αποσυμπίεσης των πυρήνων, είτε ήταν αργή (πυρήνας APCA AX02AP2, πυρήνες βαρύτητας), είτε ήταν απότομη (πυρήνας APCA AX02AP4), δεν απέτρεψε την αύξηση μικροοργανισμών. Οι βαρόφιλοι μικροοργανισμοί που μέχρι σήμερα έχουν ανακτηθεί σε 1 atm, έχει βρεθεί ότι αντέχουν την αποσυμπίεση στη 1 atm και μόνο εκείνοι που περιέχουν κενοτόπια με αέριο έχει παρατηρηθεί ότι καταστρέφονται κατά την αποσυμπίεση (Yayanos 1995).

2.1 Θρεπτικό μέσο για θειικοαναγωγικά Bacteria

Τα θειικοαναγωγικά Bacteria στη φύση, χρησιμοποιούν ποικιλία οργανικών υποστρωμάτων και απαντώνται σε ανοξικά ιζήματα ακόμα και σε εκείνα όπου δεν συμβαίνει AOM (Hansen, 1994). Στο θρεπτικό μέσο για θειικοαναγωγικά Bacteria, οι περισσότερες καλλιέργειες που εμφάνισαν αύξηση ήταν εκείνες που εμβολιάσθηκαν σε υπόστρωμα γαλακτικού οξέος, ενώ τέσσερις μόνο εμφάνισαν αύξηση σε υπόστρωμα οξικό οξύ, μια καλλιέργεια αναγεννήθηκε σε υπόστρωμα αιθανόλης, και μια σε υπόστρωμα ηλεκτρικό οξύ. Το ηλεκτρικό οξύ και η αιθανόλη, ήταν τα υποστρώματα με τη μικρότερη απόδοση στον εμπλουτισμό των καλλιεργειών. Όταν εμβόλιο από τις δύο καλλιέργειες που παρουσίασαν αύξηση σε υπόστρωμα αιθανόλης και ηλεκτρικού οξέος μεταφέρθηκε σε υπόστρωμα γαλακτικού οξέος, τότε οι δύο αυτές καλλιέργειες εμφάνισαν ταχύτερη αύξηση. Πρόκειται συνεπώς για καλλιέργειες που ευνοούνται περισσότερο σε υπόστρωμα γαλακτικού οξέος. Τα παραπάνω υποστρώματα επιλέχθηκαν ως οργανικά συστατικά μικρού μοριακού βάρους τα οποία εντοπίζονται στα θαλάσσια ιζήματα ως προϊόν διάσπασης μεγαλύτερου μοριακού βάρους οργανικών συστατικών αλλά και επειδή αποτελούν πηγές άνθρακα για την ομάδα τα θειικοαναγωγικά Bacteria του γένους Desulfosarcina και τον σγετιζόμενων με αυτά γενών. Το γαλακτικό οξύ και το οξικό οξύ αποτελούν συνήθη υπόστρωμα για εμπλουτισμό μεγάλου εύρους διαφορετικών γενών θειικοαναγωγικών Bacteria (Brenner et al., 2005).

Με εξαίρεση μια καλλιέργεια, σε όλες τις υπόλοιπες ανιχνεύθηκαν κύτταρα της ομάδας *Desulfosarcina/Desulfococcus*, τα οποία βρέθηκαν να συμμετέχουν στα ANME-2/DSS συσσωματώματα στα ιζήματα που μελετήθηκαν από το ηφαίστειο ιλύος Amsterdam. Στην ομάδα αυτή, περιλαμβάνονται είδη θειικοαναγωγικών Bacteria με ποικιλία διατροφικών απαιτήσεων, που οξειδώνουν οργανικά συστατικά πλήρως σε διοξείδιο του άνθρακα. Πολλά είδη από αυτά μπορούν να αναπτυχθούν

αυτότροφα με διοξείδιο του άνθρακα, υδρογόνο και θειικά ιόντα (Boetius *et al*, 2000). Τα θειικοαναγωγικών Bacteria της ομάδας αυτής, είναι εκείνα που συναντώνται περισσότερο σε ιζήματα πλούσια σε μεθάνιο. Στα ιζήματα αυτά, αποτελούν την πιο συχνά ανιχνεύσιμη ομάδα θειικοαναγωγικών Bacteria, κι έχουν βρεθεί να συμμετέχουν σε συσσωματώματα μαζί με μεθανιότροφα Archaea, της ομάδας ANME-2, σε συσσωματώσεις μαζί με ANME-1, αλλά και συχνά να σχηματίζουν τα ίδια συσσωματώματα ή να βρίσκονται ως μεμονωμένα κύτταρα (Boetius *et al.*, 2000, Orphan *et al.* 2001, Knittel *et al.* 2003, Knittel *et al.* 2005, Treude *et al.*, 2005, Niemann *et al.*, 2006). Η ομάδα αυτή κυττάρων έχει ανιχνευθεί και στη μεταβατική ζώνη θειικών ιόντων/μεθανίου σε ιζήματα από τα ηπειρωτικά περιθώρια (Harisson *et al.*, 2009).

Στις καλλιέργειες στις οποίες ανιχνεύθηκαν κύτταρα Desulfosarcina/Desulfococcus, παρατηρήθηκαν τουλάχιστον δύο διαφορετικοί τύποι κυττάρων. Πέρα από την κοκκοειδή μορφή που έχουν τα κύτταρα του γένους Desulfosarcina, ανιχνεύθηκαν και κύτταρα τύπου vibrio ή ραβδοειδή κύτταρα, τα οποία επίσης βρέθηκε ότι ανήκαν στην ομάδα Desulfosarcina/Desulfococcus. Το γένος Desulfosarcina σχετίζεται περισσότερο με τα γένη Desulfococcus, Desulfonema, Desulfobaba και Desulfofrigus. Τα είδη του γένους Desulfosarcina, χρησιμοποιούν ποικίλα υποστρώματα, αλλά για την απομόνωσή τους χρησιμοποιείται το βενζοϊκό οξύ, ως επιλεκτικό υπόστρωμα. Χαρακτηριστικό των κυττάρων αυτών είναι η τάση να σχηματίζουν συσσωματώματα τύπου sarcina. Τα είδη του γένους Desulfococcus έχουν μορφολογία οβάλ ή κόκκων, δεν σχηματίζουν όμως συσσωματώματα και αναπτύσσονται σε ποικιλία υποστρωμάτων. Τα είδη του γένους Desulfofaba, έχουν μορφολογία μεγάλων ράβδων και αναπτύσσονται καλά σε διάφορα υποστρώματα, μεταξύ των οποίων είναι το γαλακτικό οξύ και οι αλκοόλες τα οποία μετατρέπουν σε διοξείδιο του άνθρακα και οξικό οξύ. Τα κύτταρα του γένους Desulfofrigus είναι ραβδοειδή, ή καιπύλα ραβδοειδή κύτταρα (vibrio), χρησιμοποιούν οργανικά οξέα και αλκοόλες και μετατρέπουν το οργανικό υπόστρωμα πλήρως σε διοξείδιο του άνθρακα ή μερικώς σε οξικό οξύ. Τα είδη του γένους Desulfonema, σχηματίζουν χαρακτηριστικές μεγάλες αλυσίδες κυττάρων και αναπτύσσονται καλά διάφορα υποστρώματα, μεταξύ των οποίων το γαλακτικό οξύ (Brenner et al., 2005). Όλα τα παραπάνω είδη που συνδέονται στενά μεταξύ τους φυλογενετικά, είναι πιθανό να ανιχνεύονται με τον ίδιο ανιχνευτή που στοχεύει στην ομάδα Desulfosarcina/Desulfococcus των θειικοαναγωγικών Bacteria, κι επομένως, πέρα από την τυπική μορφή τύπου sarcina

του γένους *Desulfosarcina* που ανιχνεύθηκε, τα υπόλοιπα κύτταρα με διαφορετικές μορφολογίες που ανιχνεύθηκαν πιθανόν ανήκαν στα παραπάνω συγγενικά γένη.

Η αύξηση δυο ακόμα ειδών θειικοαναγωγικών Bacteria διερευνήθηκε στις καλλιέργειες που εμφάνισαν αύξηση, το γένος Desulfovibrio και το γένος Desulforhopalus. Τα δύο αυτά γένη, έχουν ανιχνευθεί επίσης σε μεγάλη αφθονία ως μεμονωμένα κύτταρα, σε ιζήματα πλούσια σε μεθάνιο, μετά την ομάδα Desulfosarcina/Desulfococcus (Ravenschlag et al., 2000, Knittel et al., 2003). Σημαντική είναι η παρουσία του γένους Desulforhopalus, αφού έχει βρεθεί να συμμετέχει σε συσσωματώματα μαζί με την τρίτη ομάδα των μεθανιότροφων Archaea, τα ANME-3 (Nieman et al., 2006). Τα είδη Desulfovibrio, έχουν χαρακτηριστική μορφολογία, με καμπύλη ραβδοειδή μορφή (vibrio), πολύ ζωηρή αύξηση και σχετικά λίγες απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά. Κατάλληλα υποστρώματα για την ανάπτυξή τους είναι το γαλακτικό οξύ ή ένα μίγμα υδρογόνου και διοξειδίου του άνθρακα, παρουσία οξικού οξέος (Brenner et al., 2005). Χαρακτηριστικά κύτταρα τύπου vibrio του γένους Desulfovibrio, ανιχνεύθηκαν με την τεχνική FISH σποραδικά σε μια καλλιέργεια σε γαλακτικό οξύ (καλλιέργεια 41), ενώ σε καμία από τις καλλιέργειες δεν ανιχνεύθηκαν κύτταρα του γένους Desulforhopalus.

Με την εφαρμογή της τεχνικής CARD-FISH στις καλλιέργειες 41 και 109, διαπιστώθηκε ότι τα συσσωματώματα των κοκκοειδών κυττάρων που αναπτύσσονταν ήταν της μορφής sarcina, όπως τα κύτταρα που βρέθηκε ότι περιέβαλλαν τα ANME-2 συσσωματώματα που εντοπίστηκαν στα ιζήματα. Αυτή η μορφή, όπου τα κύτταρα σχηματίζουν τετράδες και συνενώνονται σε μεγαλύτερα συσσωματώματα, δεν γινόταν πάντα αντιληπτή με την τεχνική FISH καθώς είχε λιγότερο ενισχυμένο σήμα. Στις καλλιέργειες εμπλουτισμού για θειικοαναγωγικά Bacteria παρατηρήθηκε αύξηση από διαφορετικά βάθη ιζήματος που χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλια, που κυμαίνονταν από 2cm μέχρι και 125cm. Στον πυρήνα AX19GC1 από το Kazan, που ανακτήθηκε από περιοχή με υψηλή ροή έκλυσης ιλύος, δύο καλλιέργειες που ανακτήθηκαν από τα 73 και 110cm (η 102 η 88 αντίστοιχα), εμφάνισαν ταχεία αύξηση σε υπόστρωμα γαλακτικό οξύ, ενώ παρατηρήθηκε χαμηλή αύξηση και σε μια ακόμα καλλιέργεια από τα 110cm (καλλιέργεια 86) σε υπόστρωμα οξικό οξύ. Χαμηλή αύξηση εμφάνισε και η καλλιέργεια 166, επίσης σε υπόστρωμα οξικού οξέος, που προέκυψε από ίζημα σε βάθος 125 cm από το ηφαίστειο ιλύος Thessaloniki. Φαίνεται λοιπόν, ότι τα θειικοαναγωγικά Bacteria είναι ενεργά ακόμα και σε βάθη όπου η συγκέντρωση των

Συζήτηση

θειικών ιόντων αναμένεται ότι ήταν πολύ χαμηλή. Σε αυτά τα βάθη όμως, θα πρέπει να δρουν ανταγωνιστικά για τα θειικά ιόντα με τα μεθανιογόνα Archaea, και όσο τα θειικά ιόντα είναι επαρκή, τα θειικοαναγωγικά Bacteria υπερισχύουν. Από τον πυρήνα AX19GC1, στα δύο ενδιάμεσα βάθη που μελετήθηκαν, στα 37 και 73cm, η κυτταρική αφθονία βρέθηκε ότι ήταν υψηλή $(10^8 \text{ κύτταρα cm}^3 \text{ v.ιζ.})$, και μπορούμε να θεωρηθεί, ότι εν μέρη οφείλεται σε θειικοαναγωγικά Bacteria, αφού από ιζήματα από αυτά τα βάθη, παρατηρήθηκε αύξηση συνολικά σε τρεις καλλιέργειες σε υπόστρωμα γαλακτικό οξύ και σε μια σε υπόστρωμα αιθανόλη. Επίσης, μια καλλιέργεια, η 134, αναγεννήθηκε σε υπόστρωμα ηλεκτρικού οξέος από τον πυρήνα αυτό, η οποία ήταν και η μοναδική καλλιέργεια θειικοαναγωγικών Bacteria που αναγεννήθηκε από τα 2cm βάθος. Στον ίδιο πυρήνα, είχαν παρατηρηθεί κατά το άνοιγμά του πολλοί μικροί υδρίτες διάσπαρτοι σε βάθος κάτω από τα 30cm. Επομένως, ο σχηματισμός υδριτών δεν φαίνεται να επηρεάζει την αύξηση των θειικοαναγωγικών Bacteria, όπως φάνηκε ότι επηρέασε την εγκατάσταση των αναερόβιων μεθανιότροφων μικροοργανισμών στο ίζημα. Εξάλλου ο ρυθμός αύξησης των θειικοαναγωγικών Bacteria της ομάδας Desulfosarcina/Desulfococcus έχει βρεθεί ότι δεν επηρεάζεται από διαφορετικές ροές μεθανίου (Girguis et al., 2005) και για το λόγο αύξηση κυττάρων της ομάδας αυτής παρατηρήθηκε σε καλλιέργειες που προέκυψαν από ποικίλα βάθη ιζήματος αλλά και από περιοχές με διαφορετικό ρυθμό ροής έκλυσης.

Από τις τέσσερις καλλιέργειες που αυξήθηκαν σε οξικό οξύ, οι δύο ανακτήθηκαν από ιζήματα σε μεγάλα βάθη (110 και 125cm). Το οξικό οξύ μπορεί να θεωρηθεί ως ευνοϊκό υπόστρωμα για τον εμπλουτισμό θειικοαναγωγικών Bacteria από μεγαλύτερα βάθη, ενώ αντίθετα το γαλακτικό οξύ φαίνεται ότι ήταν ευνοϊκο για την αύξηση θειικοαναγωγικών Bacteria από όλα τα βάθη του ιζήματος. Το οξικό οξύ είναι το πρόδρομο συστατικό στην ακετοκλαστική μεθανιογένεση, η οποία επιτελείται αποκλειστικά από μεθανιογόνα Archaea των ειδών Methanosarcina και Methanosaeta (Whitman et al., 2006). Επομένως στα βάθη αυτά, τα θειικοαναγωγικά Bacteria, ανταγωνίζονται για ίδιο υπόστρωμα, με τα μεθανιογόνα Archaea που επιτελούν το ακετοκλαστικό μονοπάτι της μεθανιογένεσης, ενώ ακόμα βαθύτερα όπου τα θειικά ιόντα θα έχουν εξαντληθεί, το οξικό οξύ θα είναι διαθέσιμο μόνο για τα μεθανιογόνα Archaea.

Η αύξηση θειικοαναγωγικών Bacteria, από βαθιά στρώματα του ιζήματος, όπου αναμένεται ότι η συγκέντρωση των θειικών ιόντων έχει εξαντληθεί, προκαλεί

Συζήτηση

ενδιαφέρον. Αν και δεν υπάρχουν διαθέσιμα γεωχημικά δεδομένα για τους πυρήνες από τα ηφαίστεια ιλύος Kazan και Thessaloniki, μπορεί να θεωρηθεί ότι αφού ανακτήθηκαν από περιοχές με υψηλή έκλυση ιλύος, η εισροή του θαλασσινού νερού δεν θα πρέπει να έφτανε μέχρι τα βαθύτερα στρώματα. Εισροή θαλασσινού νερού σε μεγάλο βάθος παρατηρήθηκε βέβαια στον πυρήνα AX09GC1, από τον οποίο δεν συλλέχθηκαν δείγματα για καλλιέργειες. Στον πυρήνα AX11GC1 από το Amsterdam, τα θειικά ιόντα είχαν καταναλωθεί σε βάθος ~ 60cm. Ανακτήθηκαν όμως καλλιέργειες, από μεγαλύτερα βάθη, τόσο από τα 76, όσο και από τα 114 cm βάθος ιζήματος, και μάλιστα η καλλιέργεια 41 που αναγεννήθηκε από τα 114cm βάθος, ήταν μια από τις καλλιέργειες με πολύ έντονη αύξηση. Στον πυρήνα αυτό εντοπίστηκαν λίγα συσσωματώματα σε όλα τα βάθη του. Στα 114cm από το οποίο αναγεννήθηκε η καλλιέργεια 41, τα συσσωματώματα αποτελούσαν μόλις το 2,5% της κυτταρικής αφθονίας, που θα μπορούσε να αποτελεί ένδειξη πολύ γαμηλής δραστηριότητας AOM. Η εμφάνιση αύξησης σε καλλιέργειες που προέκυψαν από βάθη ιζήματος όπου τα θειικά ιόντα θα έπρεπε να είχαν εξαντληθεί μπορεί να εξηγηθεί με δύο τρόπους. Είναι πιθανό, τα θειικοαναγωγικά Bacteria που αυξήθηκαν, να είχαν την ικανότητα επιβίωσης ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις θειικών ιόντων. Σε πλούσια σε μεθάνιο ιζήματα φυλότυποι θειικοαναγωγικών Bacteria έχουν ανακτηθεί από επίπεδα του ιζήματος όπου η συγκέντρωση των θειικών ιόντων ήταν χαμηλότερη του 1mM (Pachiadaki et al., 2010). Είναι επίσης πιθανό, οι μικροοργανισμοί αυτοί έγοντας μεταφερθεί από ανώτερα επίπεδα του ιζήματος, σε μη ευνοϊκές συνθήκες, σε βάθος όπου η συγκέντρωση των θειικών ιόντων ήταν χαμηλή, ή τα θειικά ιόντα είχαν εξαντληθεί, να είχαν μετατραπεί σε μια λήθαργου, που ενδεχομένως να τα έκανε ανθεκτικότερα και στη κατάσταση μεταβολή πίεσης στην οποία υποβλήθηκαν, και ακολούθως, όταν μεταφέρθηκαν σε ευνοϊκές συνθήκες, να παρουσίασαν αύξηση.

Θειικοαναγωγικά Bacteria ανακτήθηκαν από διάφορα βάθη ιζήματος, στα ηφαίστεια Amsterdam και Kazan, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αναγωγή των θειικών ιόντων ήταν εκτεταμένη διεργασία σε όλο το βάθος του ιζήματος που μελετήθηκε. Σε προηγούμενες μελέτες από το ηφαίστειο ιλύος Kazan, οι προσπάθειες να αναγεννηθούν θειικοαναγωγικά Bacteria από βάθη μέχρι 22cm, στα οποία όμως είχαν εντοπιστεί συσσωματώματα, απέβησαν άκαρπες (Werne *et al.*, 2004). Σε άλλη περίπτωση όμως, σε δείγματα που ανακτήθηκαν από τα πρώτα 30cm βάθος ιζήματος, από τα ηφαίστεια ιλύος Milano, Napoli και Amsterdam, αυξήθηκαν θειικοαναγωγικά

181

Συζήτηση

Bacteria (Pancost et al., 2000). Μικροοργανισμοί της ομάδας Desulfosarcina/ Desulfococcus ανακτήθηκαν σε καλλιέργεια ακόμα και από βάθη ιζήματός στα οποία δεν εντοπίστηκαν ANME-2/DSS συσσωματώματα. Στα βάθη αυτά επομένως, μπορεί να θεωρηθεί ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί ήταν άφθονοι και ενεργοί, και ότι η αύξησή τους στηρίζονταν σε πηγή άνθρακα που δεν αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν της AOM. Εξάλλου, σε in vitro επώαση ιζήματος από περιοχή πλούσια σε μεθάνιο όπου είχαν ανιχνευθεί τα μεθανιότροφα ANME-1 και ANME-2, παρατηρήθηκε ταχεία αύξηση των θειικοαναγωγικών Bacteria της ομάδας Desulfosarcina/Desulfococcus στα αρχικά στάδια της επώασης και μόνο όταν αυξήθηκε ο πληθυσμός των ANME, η αύξηση αυτών των θειικοαναγωγικών Bacteria βρέθηκε ότι ελέγχονταν από τη συντροφική τους σχέση με τα ANME (Girguis et al., 2005).

2.2 Θρεπτικό μέσο για Archaea του γένους Methanosarcina

Η τάξη Methanosarcinales είναι μια από τις πέντε τάξεις των μεθανιογόνων μικροοργανισμών. Αντιπρόσωποι της τάξης Methanosarcinales, είναι ευρέως διαδεδομένοι σε αναερόβια περιβάλλοντα και απαντώνται σε περιβάλλον γλυκού νερού και θαλάσσιο, σε εξαιρετικά αλόφιλα ιζήματα, σε λάσπη αναερόβιας χώνεψης, στο γαστρεντερικό σωλήνα των μηρυκαστικών, ακόμα και σε βαθιά χερσαία ιζήματα, όπως σε χρυσωρυχεία στην νότια Αφρική. Τα κύτταρα των Methanosarcinales μπορεί να έχουν μορφή κόκκων, ράβδων ή ψευδοσάρσινα (κύτταρα κόκκοι που ανά ομάδες σχηματίζουν μικρά συσσωματώματα). Είναι αυστηρά αναερόβιοι μικροοργανισμοί και εξασφαλίζουν την ενέργειά τους με την ταυτόχρονη παραγωγή μεθανίου. Από όλα τα μεθανιογόνα Archaea οι αντιπρόσωποι των Methanosarcinales έχουν το μεγαλύτερο εύρος στη χρήση υποστρωμάτων. Κάποια είδη ανάγουν το διοξείδιο του άνθρακα με υδρογόνο, άλλα αφομοιώνουν μεθύλια, άλλα διασπούν το οξικό οξύ, ενώ άλλα είδη χρησιμοποιούν και τα τρία παραπάνω καταβολικά μονοπάτια. Από όλα τα μεθανιογόνα, η ικανότητα της χρήσης του οξικού οξέος για αύξηση (ακετοκλαστικό μονοπάτι) περιορίζεται στα είδη Methanosarcina και Methanosaeta (Deppenmeier et al. 1996, Whitman et al., 2006, Kendall and Boone, 2006).

Σε θρεπτικό μέσο για τα μεθανιογόνα Methanosarcina, οι καλλιέργειες που εμφάνισαν αύξηση, προέρχονταν από ιζήματα από βάθη 30-60cm. Η μεθανιογένεση θεωρείται ότι συμβαίνει σε βάθος όπου τα θειικά ιόντα έχουν καταναλωθεί (< 1mM) (Hoehler *et al.*, 1996). Τα μεθανιογόνα επομένως αναμένεται να ήταν περισσότερο ενεργά στα βαθύτερα επίπεδα σε όλους τους πυρήνες, αφού με εξαίρεση την περιοχή

Συζήτηση

ΑΧ02, όλοι οι πυρήνες ανακτήθηκαν από περιοχές υψηλής έκλυση ιλύος και τα θειικά ιόντα δεν έφταναν σε μεγάλα βάθη. Οι μικροοργανισμοί που ανακτήθηκαν, σε αντίθεση με ότι συμβαίνει με τα μεθανιογόνα, φαίνεται ότι άντεχαν σε βάθη όπου υπήρχαν διαθέσιμα θειικά ιόντα. Τα μεθανιογόνα Archaea όμως, στα βάθη που τα θειικά ιόντα βρίσκονται σε αφθονία, ανταγωνίζονται για το υδρογόνο με τα θειικοαναγωγικά Bacteria, τα οποία υπερισχύουν (Hinrichs and Boetius, 2002). Αν και υπάρχει μια μεταβατική ζώνη, όπου συμβαίνουν παράλληλα η αναγωγή των θειικών ιόντων και η μεθανιογένεση (Whiticar, 1999), αναγεννήθηκαν καλλιέργειες και από την περιοχή ΑΧ02 στην οποία υπήρχε υψηλή συγκέντρωση θειικών ιόντων, στα επίπεδα του θαλασσινού νερού. Θειικοαναγωγικά Bacteria όμως, παρουσίασαν αύξηση σε καλλιέργειες τόσο από τα ίδια, όσο και από βαθύτερα στρώματα ιζήματος, κι επομένως από τα βάθη αυτά, εξαιτίας του ανταγωνισμού για το υδρογόνο, τα μεθανιογόνα Archaea θα πρέπει να βρίσκονταν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, γεγονός που σημαίνει ότι θα έπρεπε να ήταν μειωμένη η πιθανότητα να ανακτηθούν σε καλλιέργειες εμπλουτισμού.

Τα δείγματα από τον πυρήνα AX02AP2 προήλθαν από άγνωστο βάθος ιζήματος καθώς κατά το άνοιγμα του πυρήνα τύπου APCA, μετά τη μέτρηση αερίων, το ίζημα είχε διαταραχθεί, και εκτιμήσαμε ότι προέρχεται από βάθος μεταξύ 20-30cm. Από αυτό το βάθος όμως, αναγεννήθηκαν δύο καλλιέργειες, η 22 και η 24. Στον πυρήνα AX02BC1 που ανακτήθηκε από την ίδια περιοχή, τα προφίλ βάθους έδειξαν υψηλές συγκεντρώσεις θειικών ιόντων, στα επίπεδα του θαλασσινού νερού, μέχρι τα 29cm που ήταν το βαθύτερο επίπεδο ιζήματος που μελετήθηκε. Επομένως οι δύο αυτές καλλιέργειες που παρουσίασαν αύξηση, προέρχονται από επίπεδο του ιζήματος με πολύ υψηλή συγκέντρωση θειικών ιόντων και ήταν και οι μοναδικές καλλιέργειες σε θρεπτικό μέσο για *Methanosarcina*, που ανακτήθηκαν από το ηφαίστειο ιλύος Amsterdam. Αν και υπήρξαν εμβολιασμοί από βαθύτερα επίπεδα ιζήματος, δεν παρατηρήθηκε αύξηση στις καλλιέργειες αυτές.

Επιβεβαιώθηκε και με την τεχνική FISH, ότι στα βάθη ιζήματος όπου υπήρχαν διαθέσιμα θειικά ιόντα, στις καλλιέργειες που προέκυψαν δεν παρατηρήθηκε αύξηση μεθανιογόνων Archaea αλλά άγνωστων Bacteria. Το υπόστρωμα είχε ως πηγή άνθρακα τη μεθανόλη και οι καλλιέργειες εμπλουτισμού ήταν αυστηρά αναερόβιες. Τα μεθυλιότροφα Bacteria όμως, έχει βρεθεί ότι είναι υποχρεωτικά αερόβια, και αν και δεν αντέχουν υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, απαιτούν τουλάχιστον συνθήκες μικροαερόφιλες (Kotelnikova, 2002).

Συζήτηση

Στην καλλιέργεια 22f, τα κύτταρα ήταν πολύ μικρά σε μέγεθος και είχαν μορφή κοκκοειδη, ενώ σχημάτιζαν πολύ πυκνά συσσωματώματα που έμοιαζαν με συσσωματώματα τύπου sarcina. Τα κύτταρα αυτά είχαν πολύ αδύναμο σήμα με τη χρώση DAPI, ενώ αντίθετα, είχαν δυνατό σήμα με την τεχνική FISH. Κάτι αντίστοιχο είχε παρατηρηθεί και με τα ANME-2 συσσωματώματα από το Hydrate Ridge (Boetius *et al.*, 2000), όμως τα κύτταρα που αυξήθηκαν στην καλλιέργεια, δεν ανήκαν στα Archaea.

Σε καλλιέργειες που προέκυψαν από την 24 (24e(2), 24f), παρατηρήθηκαν σφαιρικοί σχηματισμοί, οι οποίοι έμοιαζαν με κύστες. Κύστες και εξωσπόρια, που αποτελούν ένα στάδιο λήθαργου, έχει βρεθεί ότι σχηματίζουν τα περισσότερα μεθανιότροφα Bacteria. Αυτές οι μορφές έχει βρεθεί ότι επιβιώνουν σε συνθήκες απουσίας οξυγόνου (Kotelnikova, 2002). Μεθανιότροφα Bacteria του γένους Methylocystis, βρέθηκαν να σχηματίζουν λιπιδιακές κύστες κατά τη φάση στασιμότητας, που τα έκαναν ανθεκτικά στην αφυδάτωση (Whittenbury et al., 1970). Σε δύο μεθυλιότροφα Bacteria του γένους Methylosarcina, το Methylosarcina fibrata και το Methylosarcina quisquiliarum, παρατηρήθηκε ότι κατά τη διάρκεια της φάσης στασιμότητας σχημάτιζαν κύστες. Και τα δύο είδη χρησιμοποιούσαν ως πηγή άνθρακα το μεθάνιο και τη μεθανόλη, ενώ το δεύτερο είδος βρέθηκε ότι ήταν πλειομορφικό, καθώς τα κύτταρά του άλλαζαν από ραβδοειδή σε κοκκοειδή μορφή (Wise *et al.*, 2001). Όμως και είδη του γένους Methanosarcina έχουν βρεθεί ότι σχηματίζουν κύστες. Το είδος Methanosarcina acetivorans, που απομονώθηκε από θαλάσσια ιζήματα, βρέθηκε ότι κατά την εκθετική φάση αύξησης σε υπόστρωμα οξικού οξέος, τα κύτταρά του είχαν σχήμα ακανόνιστων κόκκων, που σχημάτιζαν συσσωματώματα στα αρχικά στάδια της φάσης στασιμότητας, και τελικά μετατρέπονταν σε κύστες, οι οποίες απελευθέρωναν τους κόκκους όταν μεταφέρονταν σε φρέσκο θρεπτικό μέσο (Sowers et al., 1984).

Εφόσον τα είδη που αυξήθηκαν στις καλλιέργειες σε θρεπτικό μέσο για *Methanosarcina*, με υπόστρωμα μεθανόλη, βρέθηκε ότι άνηκαν όλα στα Bacteria, μπορεί να υποτεθεί ότι πρόκειται για νέα είδη μεθυλιότροφων Bacteria τα οποία χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα τη μεθανόλη, απουσία οξυγόνου, ίσως με τη χρήση κάποιου άλλου συστατικού που υπήρχε στο θρεπτικό μέσο, ως οξειδωτικό έναντι του οξυγόνου. Όμως οι αναερόβιοι μεθυλιότροφοι μικροοργανισμοί έχει βρεθεί ότι ανήκουν στα Archaea, ενώ δεν έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα Bacteria που να είναι μεθυλιότροφα απουσία οξυγόνου. Αν πρόκειται όμως για Bacteria τα οποία δεν

184

χρησιμοποιούν τη μεθανόλη, τότε ενδεχομένως η ανάπτυξή τους στηρίχθηκε σε άλλα πιθανά υποστρώματα που περιέχονταν στο θρεπτικό μέσο, όπως το εκχύλισμα ζύμης, η πεπτόνη και το διαλυμένο διοξείδιο του άνθρακα, αλλά πάντα κάτω από αναερόβιες συνθήκες.

Εφόσον δεν ανακτήθηκαν σε καλλιέργειες μικροοργανισμοί υπεύθυνοι για τη μεθανιογένεση, δεν προέκυψε κάποια ένδειξη ότι στα βάθη από τα οποία ανακτήθηκαν τα ιζήματα, η μεθανιογένεση ήταν ενεργή μέσω του μεθυλιοτροφικού μονοπατιού. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε στόχευε σε είδη του γένους *Methanosarcina* με ικανότητα να αφομοιώνουν τη μεθανόλη. Η μεθανόλη αποτελεί ένα μη ανταγωνιστικό υπόστρωμα. Είναι πιθανίογόνων Archaea και από άλλα γένη μεθανιογόνων. Ο εμπλουτισμός θειικοαναγωγικών Bacteria από όλα τα βάθη του ιζήματος μπορεί να θεωρηθεί ως μια ακόμα ένδειξη ότι χαμηλής δραστηριότητας μεθανιογένεσης αφού τα θειικοαναγωγικά Bacteria ανταγωνίζονται με τα μεθανιογόνα Archaea για υποστρώματα όπως το οξυγόνο και το οξικό οξύ (Whiticar, 1999).

Συμπεράσματα

Συμπεράσματα

Στα πλούσια σε μεθάνιο ιζήματα από τα ηφαίστεια ιλύος που μελετήθηκαν, οι υδρίτες βρέθηκε ότι σχηματίζονταν σε βάθος μόλις 30cm από τον πυθμένα. Από τα δεδομένα της παρούσας εργασίας συμπεραίνεται, ότι στους ορίζοντες του ιζήματος που υπάρχουν σχηματισμοί υδριτών, ιδιαίτερα όπου εντοπίζονται άφθονοι μικροί υδρίτες, ή μεγαλύτεροι σχηματισμοί, η κυτταρική αφθονία φαινομενικά είναι χαμηλότερη, αφού ένα μέρος του ιζήματος καταλαμβάνεται από τους κρυστάλλους, στο εσωτερικό των οποίων σύμφωνα και με προηγούμενες αναφορές η κυτταρική αφθονία είναι χαμηλότερη σε σχέση με το ίζημα που τους περιβάλει. Εφόσον δεν έχει διαπιστωθεί μέχρι σήμερα εάν οι μικροοργανισμοί έχουν την δυνατότητα να καταναλώσουν μεθάνιο άμεσα από τους σχηματισμούς υδριτών, συμπεραίνουμε ότι το μεθάνιο είναι διαθέσιμο μόνο όταν είναι διαλυμένο μέσα στο ίζημα και για το λόγο αυτό η κυτταρική αφθονία στους ορίζοντες που ανιχνεύθηκαν υδρίτες ήταν χαμηλή σε σχέση με παρακείμενους ορίζοντες ιζήματος.

Η διάρκεια της αποσυμπίεσης στην οποία υποβλήθηκαν τα ιζήματα (άμεση ή σταδιακή αποσυμπίεση), δεν επηρέασε την κυτταρική αφθονία, ούτε τις ιδιαίτερες δομές που σχηματίζουν τα κύτταρα (συσσωματώματα, αλυσίδες κυττάρων).

Στα ιζήματα από περιοχές υψηλής έκλυσης ιλύος, στα βάθη στα οποία ανιχνεύθηκαν υψηλές τιμές μεθανίου ή εντοπίστηκαν υδρίτες, δεν ανιχνεύθηκαν οι υπεύθυνοι για την AOM μικροοργανισμοί, τουλάχιστον όχι σε συγκεντρώσεις που να επιτρέπουν την ανίχνευσή τους από το πρωτόκολλο FISH που χρησιμοποιήθηκε. Η απουσία των ANME μικροοργανισμών από τα βάθη αυτά, μπορεί να μην οφείλεται στην καθαυτή ύπαρξη υδρίτη, αλλά μάλλον περισσότερο στη δημιουργία ασταθών γεωχημικών συνθηκών που δημιουργούν συνθήκες σταθεροποίησης/ διάλυσης των υδριτών, αποτρέποντας την εγκατάσταση των μεθανιότροφων κοινοτήτων. Στα ιζήματα από τα οποία ανακτήθηκαν οι πυρήνες, οι υδρίτες σχηματίζονται στα όρια σταθερότητάς τους. Τόσο ο σχηματισμός όσο και η διάλυση των υδριτών επηρεάζουν το γεωχημικό χαρακτήρα του ορίζοντα του ιζήματος στον οποίο συμβαίνουν, καθώς για το σχηματισμό των υδριτών χρησιμοποιείται το νερό, αλλά όχι και τα ιόντα που περιέχει, τα οποία εμπλουτίζουν τον ορίζοντα, ενώ αντίθετα κατά τη διάλυσή τους, εμπλουτίζεται το ίζημα σε νερό και μεθάνιο. Στα ιζήματα από υψηλή ροή έκλυσης λοιπόν, δεν υπήρξαν ισχυρές ενδείξεις ότι συμβαίνει ΑΟΜ. Εάν όμως συμβαίνει, τότε εντοπίζεται σε πολύ συγκεκριμένους ορίζοντες μέσα στο ίζημα, όπου οι γεωχημικές συνθήκες δημιουργούν ένα ιδιαίτερο μικροπεριβάλλον ιδανικό για την εγκατάστασή τους.

Σε ιζήματα από χαμηλή ροή έκλυσης ιλύος υπήρξε ισχυρότερη ένδειξη ότι συνέβαινε ΑΟΜ. Στα ιζήματα αυτά, ενδεχομένως λόγω σταθερότερων γεωχημικών συνθηκών, φαίνεται ότι ευνοείται η εγκατάσταση των μεθανιότροφων μικροοργανισμών και η ΑΟΜ μάλλον είναι ενεργή για αρκετό χρονικό διάστημα αφού εντοπίστηκαν μεγάλου μεγέθους συσσωματώματα. Η ΑΟΜ φαίνεται ότι είναι εκτεταμένη σε μεγάλο βάθος μέσα στο ίζημα, σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στις περιοχές με υψηλή ροή έκλυσης, και δρα ως ισχυρό μικροβιακό φίλτρο που καταναλώνει αποτελεσματικά το μεθάνιο το οποίο διαφορετικά θα διέφευγε στην υδάτινη στήλη.

Τα ANME-1 Archaea, φαίνεται ότι ευνοούνται από περισσότερο αναγωγικές συνθήκες σε σχέση με τα ANME-2, και από υψηλότερες ροές μεθανίου, αφού εντοπίστηκαν στα βαθύτερα επίπεδα του ιζήματος. Σε περιοχές με χαμηλή ροή έκλυσης μεθανίου, τα ANME-1 δεν ανιχνεύθηκαν στα ανώτερα στρώματα του ιζήματος όπου είναι πιθανό υπάρχει και εισροή οξυγονωμένου θαλασσινού νερού. Σε περιοχές με υψηλή ροή έκλυσης, η οποία παρεμποδίζει την εισροή οξυγονωμένου θαλασσινού νερού στα ανώτερα επίπεδα του ιζήματος, τα ANME-1 μπορεί να εντοπίζονται και στα ανώτερα στρώματα του ιζήματος.

Τα ANME-2/DSS συσσωματώματα αντίθετα, δεν φαίνεται να επηρεάζονται από λιγότερο αναγωγικές συνθήκες, αφού ανιχνεύθηκαν ακόμα και στα ανώτερα επίπεδα του ιζήματος σε περιοχές με χαμηλή ροή έκλυσης όπου ενδεχομένως υπήρχε εισροή οξυγόνου. Παρόλα αυτά και τα ANME-2/DSS συσσωματώματα φαίνεται ότι ευνοούνται από τις περισσότερο αναγωγικές συνθήκες αφού η αφθονία τους βρέθηκε να αυξάνεται στα βαθύτερα στρώματα.

Η ανάκτηση θειικοαναγωγικών Bacteria σε καλλιέργειες που προέκυψαν από τα ιζήματα, τόσο από βάθη που περιείχαν υδρίτες, όσο και από βάθη που δεν περιείχαν, υποδηλώνει ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί δεν επηρεάζονται από την παρουσία υδριτών. Ερωτηματικά δημιουργεί όμως η ανάκτηση θειικοαναγωγικών Bacteria από βάθη στα οποία αναμένεται να έχουν καταναλωθεί τα θειικά ιόντα. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι είτε τα θειικοαναγωγικά Bacteria εμφανίζουν αύξηση και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις θειικών ιόντων, είτε ότι στα βάθη αυτά βρίσκονταν σε μια κατάσταση λήθαργου, ή είχαν πολύ χαμηλούς ρυθμούς αύξησης και όταν μεταφέρθηκαν σε ευνοϊκές συνθήκες, παρουσίασαν ταχεία αύξηση.

Στις πέντε από τις επτά καλλιέργειες που εμφάνισαν ταχεία αύξηση, βρέθηκε ότι τα θειικοαναγωγικά Bacteria ανήκαν στην ομάδα *Desulfosarcina/Desulfococcus*, την ομάδα δηλαδή των κυττάρων που έχει βρεθεί ότι συμμετέχει στα ANME-2/DSS συσσωματώματα, ένδειξη ότι η ομάδα αυτή των θειικοαναγωγικών Bacteria ήταν ενεργή στο ίζημα. Η αδυναμία εμπλουτισμού μεθανιότροφων Archaea στο επιλεκτικό θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε, θα μπορούσε να υποδηλώνει ότι η μεθανιογένεση δεν είναι ενεργή στα βάθη αυτά, τουλάχιστον όχι μέσω του μεθυλιοτροφικού μονοπατιού. Ενδεχομένως η μεθανιογένεση συμβαίνει σε μεγαλύτερα βάθη μέσα στο ίζημα, κάτω από τα βάθη από όπου ανακτήθηκαν θειικοαναγωγικά Bacteria, τα οποία ανταγωνίζονται για τα ίδια υποστρώματα με τα μεθανιογόνα Archaea.

Είναι η πρώτη φορά που ανιχνεύθηκαν με την τεχνική FISH οι υπεύθυνοι για την AOM μικροοργανισμοί στο ηφαίστειο ιλύος Amsterdam, και βρέθηκε ότι ανήκαν στις ομάδες των ANME-1 και ANME-2. Η τεχνική FISH όμως, έχει ένα όριο ανίχνευσης της κυτταρικής αφθονίας των μικροοργανισμών, καθώς το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται, έχει προσαρμοστεί σε κατάλληλη αραίωση του δείγματος ώστε να μην υπάρχει παρεμβολή από το ίζημα στο μικροσκοπικό πεδίο. Αν και προηγούμενες φυλογενετικές αναλύσεις αποκάλυψαν την ύπαρξη και των ANME-3 Archaea σε ιζήματα από το Amsterdam, δεν διαπιστώθηκε κάτι τέτοιο με την εφαρμογή της τεχνικής FISH. Είναι πιθανόν οι μικροοργανισμοί αυτοί, να ήταν ενεργοί στην περιοχή, αλλά σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, ενδεχομένως συντελώντας σε χαμηλότερο βαθμό στην AOM στα ιζήματα αυτά.

Μελλοντικά

Η εφαρμογή της τεχνικής FISH μπορεί να δώσει πληροφορίες τόσο για την αφθονία των μικροοργανισμών όσο και για τη δομή και το μέγεθος των ιδιαίτερων δομών που μπορεί να σχηματίζουν (συσσωματώματα), αλλά έχει ένα όριο ανίχνευσης. Η φυλογενετική ανάλυση σε δείγματα ιζήματος μπορεί να δώσει πληροφορίες για τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν στο ίζημα, ακόμα και για εκείνους που βρίσκονται σε πολύ χαμηλή αφθονία, αλλά δεν δίνει πληροφορίες για τις ιδιαίτερες δομές (συσσωματώματα) που μπορεί να σχηματίζουν και τις ιδιαίτερες οικολογικές σχέσεις που μπορεί να έχουν με άλλους μικροοργανισμούς. Η ανάλυση λιπιδιακών βιοδεικτών δίνει πληροφορίες για την παρουσία ή όχι μικροοργανισμών υπεύθυνων για την AOM, αλλά είναι δυνατό να εκφράζει μια παλαιότερη κατάσταση, που είχε όμως αλλάξει τη στιγμή που ανακτήθηκαν τα ιζήματα, αφού τα λιπίδια παραμένουν για μεγαλύτερο διάστημα στο ίζημα σε σχέση με το DNA. Τα γεωχημικά προφίλ από μόνα τους, είναι δυνατό να υποεκτιμήσουν την παρουσία ΑΟΜ. Οι καλλιέργειες εμπλουτισμού, μπορεί να δώσουν πληροφορίες μονάγα για τους καλλιεργήσιμους μικροοργανισμούς που στοχεύει το επιλεκτικό μέσο. Κάθε μια από τις παραπάνω τεχνικές μεμονωμένα, μπορεί να δώσει συγκεκριμένες μόνο πληροφορίες για την AOM, αλλά έχει και μειονεκτήματα, ενώ δεν δίνει τη συνολική εικόνα για το τι συμβαίνει στο ίζημα. Θα ήταν επομένως σημαντικό σε μελλοντικές μελέτες, σε περιοχές όπου συσσωρεύεται/ εκλύεται μεθάνιο, ο σχεδιασμός της διερεύνησης της περιοχής να περιλαμβάνει ποικιλία μεθόδων. Η φυλογενετική ανάλυση για παράδειγμα, σε συνδυασμό με την τεχνική FISH και τα γεωχημικά δεδομένα, θα μπορούσε να δώσει πληροφορίες για τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν στο ίζημα, σε μικρή ή μεγαλύτερη αφθονία, τις πιθανές ιδιαίτερες δομές που μπορεί να σχηματίζουν μεταξύ τους, το ιδιαίτερο γεωχημικό μικροπεριβάλλον που ευνοεί την εγκατάσταση κάθε ομάδας, και την αποτελεσματικότητά των μικροοργανισμών αυτών ως μικροβιακό φίλτρο που παρεμποδίζει την έκλυση μεθανίου στην υδρόσφαιρα. Ο πιο σημαντικός όμως παράγοντας στο σχεδιασμό της μελέτης μιας περιοχής είναι η ίδια η δειγματοληψία. Όπως προέκυψε από την παρούσα εργασία, στον πυρήνα από χαμηλή ροή εκλυόμενης ιλύος, στον οποίο έγινε δειγματοληψία υψηλής ανάλυσης (ανά 6cm), προέκυψαν πολύ σημαντικές πληροφορίες για την κατά βάθος κατανομή των διαφορετικών μεθανιότροφων μικροοργανισμών, και το βάθος όπου η ΑΟΜ ήταν περισσότερο ενεργή. Μια αντίστοιχη λεπτομερής κατά βάθος δειγματοληψία σε πυρήνα από υψηλή ροή έκλυσης μεθανίου, μπορεί να αποκαλύψει τον ορίζοντα μέσα στο ίζημα στον οποίο η ΑΟΜ μπορεί να εντοπίζεται. Έτσι, μπορεί να αποκαλυφθεί εάν η ΑΟΜ εμποδίζει την έκλυση μεθανίου στην υδάτινη στήλη.

Η διεργασία της ΑΟΜ παραμένει μέχρι και σήμερα αινιγματική. Οι προσπάθειες αναγέννησης των υπεύθυνων μεθανιότροφων μικροοργανισμών σε καθαρή καλλιέργεια θα πρέπει να συνεχιστούν, αφού θα απαντήσουν πολλά ερωτήματα που έχουν προκύψει σχετικά με το μεταβολισμό των μικροοργανισμών αυτών, τα ενδιάμεσα προϊόντα που ενδεχομένως χρησιμοποιούν και τη σχέση τους με τα θειικοαναγωγικά Bacteria.

192

Βιβλιογραφία

- K. Allen and J. Querellou, Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges, Extremophiles 13 (4) (2009), 583-594
- G. Aloisi, C. Pierre, J.M. Rouchy, J.P. Foucher, J. Woodside and the MEDINAUT Scientific Party, Methane-related authigenic carbonates of eastern Mediterranean Sea mud volcanoes and their possible relation to gas hydrate destabilisation, Earth and Planetary Science Letters 184 (2000) 321-338.
- G. Aloisi, I. Bouloubassi, S.K. Heijs, R.D. Pancost, C. Pierre, J.S. Sinninghe Damsté, J. C. Gottschal, L.J. Forney and J.M Rouchy, CH₄-consuming microorganisms and the formation of carbonate crusts at cold seeps, Earth and Planetary Science Letters 203 (2002) 195-203
- R.I. Amann, W. Ludwig and K.H. Schleifer, Phylogenetic identification of in situ detection of individual microbial cells without cultivation, Microbiological Reviews 59 (1) (1995) 143-169
- R. Amann and W. Ludwig, Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology, FEMS Microbiology Reviews 24 (2000) 555-565
- H. R. Attebery and S.M Finegold, Combined screw-cap and rubber-stopper closure for hungate tubes (pre-reduced anaerobically sterilized roll tubes and liquid media). Appl. Microbiol. 18 (4), (1969), 558-561
- S.J. Bale, K Goodman, P.A.Rochelle, J.R. Marchesi, J.C.Fry, A.J. Weightman, R.J.Parkes, *Desulfovibrio profundus* sp. nov., a novel barophilic sulfate-reducing bacterium from deep-sediment layers in the Japan Sea, International Journal of Systematic Bacteriology, 47 (2), 1997, 515-521
- E.J. Beal, C.H. House, V.J. Orphan, Manganese- and Iron-dependent marine methane oxidation, Science 325 (2009), 184-187
- A. Boetius, K. Ravenschlag, C.J. Schubert, D. Rickert, F. Widdel, A. Gieseke, R. Amann,
 B.B. Jørgensen, U. Witte, O. Pfannkuche, A marine microbial consortium apparently
 mediating anaerobic oxidation of methane, Nature 405 (2000) 623-626
- A. Boetius and E. Suess, Hydrate Ridge: a natural laboratory for the study of microbial life fueled by methane from near-surface gas hydrates, Chemical Geology 205 (2004) 291-310
- W.S. Borowski, C.K. Paull, W. Ussler III, Marine pore-water sulfate profiles indicate in situ methane flux from underlying gas hydrate, Geology, 24 (7) (1996) 655-658
- W.S. Borowski, C.K. Paull, W. Ussler III, Global and local variations of interstitial sulfate gradients in deep-water, continental margin sediments: Sensitivity to underlying methane and gas hydrates, Marine Geology 159 (1999) 131-154

- W.S. Borowski, T.M. Hoehler, M.J. Alperin, N.M. Rodriguez, C.K. Paull, Significance of anaerobic methane oxidation in methane-rich sediments overlying the Blake Ridge gas hydrates, In *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results*, 164 (2000), Edited by C.K. Paull, R. Matsumoto, P.J. Wallace and W.P. Dillon, 87-99
- W.S. Borowski, A review of methane and gas hydrates in the dynamic, stratified system of the Blake Ridge region, offshore southeastern North America, Chemical Geology (2004) 311-346
- D.J. Brenner, N.R. Krieg, G.M. Garrity, J.T. Stalye, D.R. Boone, P. de Vos, M. Goodfellow,
 F.A. Rainey, K.H. Schleifer, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2,
 The Proteobacteria, Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria, 2nd
 Edition (2005), Springer-Verlag New York Inc.
- S.L. Caldwell, J.R. Laidler, E.A. Brewer, J.O. Eberly, S.C. Sandborgh and F.S. Colwell, Anaerobic Oxidation of Methane: Mechanisms, Bioenergetics, and the Ecology of Associated Microorganisms, Environmental Science and Technology, 42 (18) (2008) 6791-6799
- J.L. Charlou, J.P. Donval, T. Zitter, N. Roy, P. Jean-Baptiste, J.P. Foucher, J. Woodside and the MEDINAUT Scientific Party, Evidence of methane venting and geochemistry of brines on mud volcanoes of the eastern Mediterranean Sea, Deep-Sea Research I 50 (2003) 941-958.
- R.J. Cicerone and R.S. Ormland, Biochemical aspects of atmospheric methane. Global Biochemical Cycles 2 (4) (1988) 299-327
- H. Daims, , A. Brühl, R. Amann, K.H. Schleifer, and M. Wagner, The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. Systematic Applied Microbiology 22 (1999) 434–444.
- A.E. Dekas, R. S. Poretsky, V.J. Orphan, Deep-Sea Archaea Fix and Share Nitrogen in Methane-Consuming Microbial Consortia, Science 326 (2009) 422-426
- U. Deppenmeier, V. Müller, G. Gottschalk, Archives of Microbiology 165 (1999) 149-163
- L.I. Dimitrov, Mud volcanoes-the most important pathway for degassing deeply buried sediments, Earth-Science Reviews 59 (2002), 49-76.
- L.I. Dimitrov, Mud volcanoes-a significant source of atmospheric methane, Geo-Mar Letters 32 (2003)a 155-161
- L.I. Dimitrov and J. Woodside, Deep sea pockmark environments in the eastern Mediterranean Sea, Marine Geology 195 (2003)b 263-276
- E. J. Dlugokencky, S. Houweling, L. Bruhwiler, K. A. Masarie, P. M. Lang, J. B. Miller, 1 andP. P. Tans, Atmospheric methane levels off: Temporary pause or a new steadystate? Geophysical Research Letters 30 (19) (2003) 1992

- G. Etiope, R.W. Klusman, Geologic emissions of methane to the atmosphere, Chemosphere 49 (2002) 777–789
- G. Etiope, K.R. Lassey, R.W. Klusman, E. Boschi, Reappraisal of the fossil methane budget and related emission from geologic sources, Geophysical Research Letters 35 (2008) L09307, doi:10.1029/2008GL033623
- K.F. Ettwig, S. Shima, K.T. van de Pas-Schoonen, J. Kahnt, M.H. Medema, H.J.M. op den Camp, M.S. M. Jetten, M. Strous, Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of Archaea, Environmental Microbiology 10 (11), (2008) 3164–3173
- P. R. Girguis, A.E. Cozen, E. F. DeLong, Growth and population dynamics of Anaerobic Methane-Oxidizing Archaea and Sulfate-Reducing Bacteria in a Continuous-Flow Bioreactor, Applied and Environmental Microbiology, 71 (7) (2005) 3725-3733
- R.R. Haese, C. Meile, P. Van Cappellen, G. J. De Lange, Carbon geochemistry of cold seeps: Methane fluxes and transformation in sediments from Kazan mud volcano, eastern Mediterranean Sea, Earth and Planetary Science Letters 212 (2003) 361-375
- R.R Haese, C. Hensen, G.J. De Lange, Pore water geochemistry of eastern Mediterranean mud volcanoes: Implication for fluid transport and fluid origin, Marine Geology 225 (2006) 191-208
- T.A. Hansen, Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes, Antonie Van Leeuwnhoek 66 (1994)165-185
- R.S. Hanson and T.E. Hanson, Methanotrophic Bacteria, Microbiological Reviews 60 (2), (1996) 439-471
- B. K. Harrison, H. Zhang, W. Berelson and V.J. Orphan, Variations in Archaeal and Bacterial diversity associated with the Sulfate-Methane Transition Zone in Continental Margin sediments (Santa Barbara Basin, California), Applied and Environmental Microbiology 75(6) (2009) 1487-1499
- K. U. Heeschen, A. Dählmann, H.-J. Hohnberg, V. Lykousis, C. Perissoratis, G. de Lange, H. Amann, and G. Bohrmann Pressurized near-surface sediment cores of Anaximander mud volcanoes, Eastern Mediterranean, Geophysical Research Abstracts, Vol. 8, (2006)
- S.K. Heijs, R.R. Haese, P.W. J.J. van der Wielen, L.J. Forney, J.D. van Elsas, Use of 16SrRNA gene based clone libraries to assess microbial communities potentially involved in anaerobic methane oxidation in a Mediterranean Cold Seep, Microbial Ecology 53 (2007) 384-398
- SK. Heijs, J.S.S. Damste, L.J. Forney, Characterization of a deep-sea microbial mat from an active cold seep at the Milano mud volcano in the Eastern Mediterranean Sea, FEMS Microbiology Ecology 54 (1) (2005) 47-56

- M.A. Hines, P.T. Visscher, R. Devereux, (1997) Sulfur Cycling, In: Manual of Environmental Microbiology, Edited by C.J. Hurst, G.R. Knudsen, M.J. McInerney, L.D. Stetzenbach, M.V. Walter, ASM Press
- K.U. Hinrichs, J.M. Hayes, S.P. Sylva, P.G. Brewer, E.F. DeLong, Methane-conusming archaeobacteria in marine sediments, Nature, 398 (1999) 802-805
- K.U. Hinrichs and A. Boetius (2002), The anaerobic oxidation of methane: New insights in Microbial Ecology and Biochemistry, In: Ocean Margin Systems, Edited by G. Wefer, D. Billet, D. Hebbeln, B.B. Jørgensen, M. Schlüter, T. Van Weering, Springer-Verlang Berlin Heidelberg, 457-477
- T.M. Hoehler, M.J. Alperin, D.M. Albert, C.S. Martens, Filed and laboratory studies of methane oxidation in an anoxic marine sediment: Evidence for a methanogen-sulfate reducer consortium, Global Biochemical Cycles, 8 (4) (1994) 451-463
- T.M. Hoehler and M.J. Alperin, Anaerobic methane oxidation by a methanogen-sulfate reducer consortium: geochemical evidence and biochemical considerations, in Microbial growth on C1 compounds M. E. Lidstrom and F. R. Tabita Eds. Kluwer Academic Publishers, (1996) 326-333.
- M. Hovland, On the self-sealing nature of marine seeps, Continental Shelf Research 22 (2002) 2387-2394
- N. Iversen and B.B. Jørgensen, Anaerobic methane oxidation rates at the sulphate-methane transition in marine sediments from Kattegat and Skagerrak (Denmark), Limnol. Oceanography, 30 (5) (1985) 944-955
- IPCC, 2007: Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Edited by S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 996 pp.
- K. Ishii, M. Musmann, B.J. MacGregor and R. Amann, An improved fluorescence in situ hybridization protocol for the identification of bacteria and archaea in marine sediments, FEMS Microbiology Ecology 50 (2004) 203-212
- S. B. Joye, A. Boetius, B.N. Orcutt, J.P. Montoya, H.N. Schulz, M.J. Erickson, S. K. Lugo, The anaerobic oxidation of methane and sulfate reduction in sediments from Gulf of Mexico cold seeps, Chemical Geology 205 (2004) 219–238
- A.G. Judd, The geological methane budget at Continental Margins and its influence on climate change, Geofluids 2 (2002) 109-126
- J. Kallmeyer and A. Boetius, Effects of temperature and pressure on sulphate reduction and anaerobic oxidation of methane in hydrothermal sediments of Guyamas Basin, Applied and Environmental Microbiology, 70 (2) (2004) 1231-1233

- M.M. Kendall and D.R. Boone, The order Methanosarcinales, In the Prokaryotes 3rd Edition, Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer and E. Stackebrandt (2006) 244-256 Springer
- D.L. Kirchman, Elements, biochemicals and structures of microbes, In Processes in Microbial Ecology (2012) Oxford University Press
- K.Knittel, T. Lösekann, A. Boetius, E. Kort, R.Amann, Diversity and distribution of methanotrophic Archaea at cold seeps, Applied and Environmental Microbiology, 71 (1) 2005, 467-479
- K. Knittel and A. Boetius, Anaerobic Oxidation of Methane: Progress with an Unknown Process, Annual Review Microbiology 63 (2009) 311-314
- N.J. Knab, B.A. Cragg, E.R.C. Hornibrook, L. Holmkvist, R.D. Pancost, C. Borowski, R.J Parkes, B.B. Jørgensen, Regulation of anaerobic methane oxidation in sediments of the Black Sea, Biosciences 6 (2009) 1505-1518
- M. Krüger, T. Treude, h. Wolters, K. Nauhaus and A. Boetius, Microbial Methane turnover in different marine habitats, Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 227 (2005) 6-17
- A.J. Kopf, Significance of mud volcanism, Reviews of geophysics 40(2) (2002) 1005, doi:10.1029/2000RG000093
- S. Kotelnikova, Microbial production and oxidation of methane in deep subsurface, Earth-Science Reviews 58 (2002) 367-395
- K.A. Kvenvolden Methane Hydrate-A major reservoir of carbon in the shallow geosphere? Chemical Geology 71 (1988) 41-51
- K.A. Kvenvolden a, G.D. Ginsburg, V.A. Soloviev Worldwide distribution of subaquatic gas hydrates, Geo-Marine Letters 13 (1993) 32-40
- K.A. Kvenvolden b, Gas hydrates-Geological perspectives and global change, Reviews of Geophysics 32 (2) (1993) 173-187
- K.A. Kvenvolden, A Review of the geochemistry of methane in natural gas hydrate, Organic Geochemistry 23 (11/12) (1995) 997-1008
- K.A. Kvenvolden and B.W. Rogers, Gaia's breath-global methane exhalations, Marine and Petroleum Geology 22 (2005) 579-790
- F.M. Lauro, R.A. Chastain, L.E. Blankenship, A.A. Yayanos, D.H. Bartlett, The unique 16S rRNA genes of piezophiles reflect both phylogeny and adaptation, Applied and Environmental Microbiology, 73 (3), 2007
- E. Llobet-Brossa, E. Rosselló-Mora and R. Amann, Microbial Community Composition of Wadden Sea Sediments as Revealed by Fluorescence In Situ Hybridization, Applied and Environmental Microbiology, 64 (7) (1998) 2691-2696

- K. G. Lloyd, L. Lapham, A. Teske, An anaerobic methane-oxidizing community of ANME-1b Archaea in hypersaline Gulf of Mexico sediments, Applied and Environmental Microbiology, 72 (11) (2006) 7218–7230
- J. Lelieveld, P.J. Crutzen, F.J. Dentener, Changing concentration, lifetime and climate forcing of atmospheric methane, Tellus 50B (1998), 128–150
- L. Lonckea, J. Mascleb, Fanil Scientific Parties, Mud volcanoes, gas chimneys, pockmarks and mounds in the Nile deep-sea fan (Eastern Mediterranean): geophysical evidences, Marine and Petroleum Geology 21 (2004) 669–689
- T. Lösekann, K. Knittel, T. Nadalig, B. Fuchs, H. Niemann, A. Boetius, R. Amann, Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby mud volcano, Barents Sea, Applied and Environmental Microbiology, 74 (10) (2007), 3348-3362
- T. Lösekann, A. Robador, H. Niemann, K. Knitter, A. Boetius, N. Dubilier, Endosymbioses between bacteria and deep-sea siboglinid tubeworms from an Arctic Cold Seep (Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea), Environmental Microbiology 10 (12) (2008) 3237-3254
- V. Lykousis, S. Alexandri, J. Woodside, P. Nomikou, C. Perissoratis, D. Sakellariou, G. de Lange, A. Dählmann, D. Casas, G. Rousakis, D. Ballas, Chr. Ioakim, New evidence of extensive active mud volcanism in the Anaximander mountains (Eastern Mediterranean): The "ATHINA" mud volcano, Environmental Geology 46 (2004) 1030–1037
- V. Lykousis, S. Alexandri, J. Woodside, G. de Lange, A. Dählmann, C. Perissoratis, K. Heeschen, Chr. Ioakim, D. Sakellariou, P. Nomikou, G. Rousakis, D. Casas, D. Ballas, G. Ercilla, Mud volcanoes and gas hydrates in the Anaximander mountains (Eastern Mediterranean Sea), Marine and Petroleum Geology 26 (2009) 854–872
- R. MacDonald, I. Leifer, R. Sassen, P. Stine, R. Mitchell and N. Guinasso JR, Transfer of hydrocarbons from natural seeps to the water column and atmosphere, Geofluids 2 (2002) 95–107
- W. Manz, M. Eisenbrecher, T. R. Neu and Ulrich Szewzyk, Abundance and spatial organization of Gram-negative sulfate-reducing bacteria in activated sludge investigated by in situ probing with speci¢c 16S rRNA targeted oligonucleotides, FEMS Microbiology Ecology 25 (1998) 43-61
- A.M. Milkov, R. Sassen, T.V. Apanasovich, F.G. Dadashev, Global gas flux from mud volcanoes: A significant source of fossil methane in the atmosphere and the ocean, Geophysical Research Letters 30 (2) (2003) 1037
- W. Michaelis, R. Seifert, K. Nauhaus, T. Treude, V. Thiel, M. Blumenberg, K. Knittel, A. Gieseke, K. Peterknecht, T. Pape, A. Boetius, R. Amann, B.B. Jørgensen, F. Widdel, J.

Peckmann, N.V. Pimenov, M.B. Gulin, Microbial Reefs in the Black Sea Fueled by Anaerobic Oxidation of Methane, Science 297 (2002) 1013-1015

- J. J. Moran, E. J. Beal, J. M. Vrentas, V. J. Orphan, K.H. Freeman and C. H. House, Methyl sulfides as intermediates in the anaerobic oxidation of methane, Environmental Microbiology 10 (1) (2008) 162-173
- J.M. Morse, Sedimentary Geochemistry of the carbonate and sulphide Systems and their Potential Influence on Toxic Metal Bioavailability (2002) 165-187, In Chemistry of Marine Water and Sediments, Edited by A. Gianguzza, E. Pelizzetti and S. Sammartano, Springer
- K. Nauhaus, A. Boetius, M. Krüger, F. Widdel, *In vitro* demonstration of anaerobic oxidation of methane coupled to sulphate reduction in sediment from a marine gas hydrate area, Environmental Microbiology 4 (5) (2002) 296-305
- K. Nauhaus, T. Treude, A. Boetius, M. Krüger, Environmental regulation of the anaerobic oxidation of methane: a comparison of ANME-1 and ANME-II communities, Environmental Microbiology 7 (1) (2005) 98-106
- H.U. Neue and P.A Roger, Rice agriculture: factor controlling emissions. Chemosphere 26 (1993), 254-298
- H. Niemann, T. Lösekann, D. de Beer, M. Elvert, T. Nadalig, K. Knittel, R. Amann, E. J. Sauter, M. Schlüter, M. Klages, J.P. Foucher, A. Boetius, Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink, Nature 443 (2006) 854-858
- K. Olu-Le Roy, M. Sibuet, A. Fiala-Médioni, S. Gofas, C. Salas, A. Mariotti, J.P. Foucher and J. Woodside, Cold seep communities in the deep eastern Mediterranean Sea: composition, symbiosis and spatial distribution on mud volcanoes, Deep-Sea Research I 51 (2004) 1915-1936
- B.N. Orcutt, A. Boetius, S.K. Lugo, I.R. MacDonald, V. A. Samarkin, S.B. Joye, Life at the edge of methane ice: microbial cycling of carbon and sulphur in Gulf of Mexico gas hydrates, Chemical Geology 205 (2004) 239-251
- V.J. Orphan, K.U. Hinrichs, W.Ussler III, C.K. Paull, L.T. Taylor, S.P. Sylva, J.M. Hayes, E.F. DeLong, Comparative analysis of methane-oxidizing Archaea and sulphate – reducing Bacteria in anoxic marine sediments, Applied and Environmental Microbiology, 67 (4) (2001), 1922-1934
- V.J. Orphan, C.H. House, K.U. Hinrichs, K.D. McKeegan, E.F. DeLong, Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments, PNAS 99(11) 2002 7663-7668

- V.J. Orphan, W. Ussler III, T.H. Naehr, C.H. House, K.U. Hinrichs, C.K.Paul, Geological, geochemical and microbiological heterogeneity of the seafloor around methane vents in the Eel River Basin, offshore California, Chemical Geology 205 (2004) 265-289
- M.G. Pachiadaki, V. Lykousis, E.G. Stephanou, K.A. Kormas, Prokaryotic community structure and diversity in the sediments of an active submarine mud volcano (Kazan mud volcano, East Mediterranean Sea), FEMS Microbiology Ecology 72 (2010) 429–444
- M.G. Pachiadaki, A. Kallionaki, A. Dählmann, G.J. De Lange, K.A. Kormas, Diversity and spatial distribution of prokaryotic communities along a sediment vertical profile of a deep-sea mud volcano, Microbial Ecology 62 (2011) 655-668
- R.D. Pancost, J.D.S Damsté, S. de Lint, M.J.E.C Van der Maarel, J.C. Gottshal and The Medinaut shipboard scienticic party, Biomarker Evidence for widespread anaerobic methane oxidation in Mediterranean sediments, by a consortium of methanogenic archaea and bacteria, Applied and Environmental Microbiology, 66 (3) (2000) 1126-1132
- C. Perissoratis, C. Ioakim, S. Alexandri, J.Woodside, P. Nomikou, A. Dählmann, D. Casas, K. Heeschen, H. Amman, G. Rousakis, V. Lykousis, Thessaloniki mud volcano, the shallowest gas hydrate-bearing mud volcano in the Anaximander Mountains, Eastern Mediterranean, Journal of Geological Research (2011), Article ID 247983, doi:10.1155/2011/247983
- J. Pernthaler, F.O. Glöckner, W. Schönhuber and R. Amann. Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) with rRNA-targeted Oligonucleotide Probes, In: Methods in Microbiology, 30 (2001) 207-226
- A. Pernthaler, J. Pernthaler and R. Amann, Fluorescence *in situ* Hybridization and Catalysed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria, Applied and Environmental Microbiology, 68 (6) 2002 3094-3101
- K. Ravenschlag, K. Sahm, C. Knoblauch, B.B. Jørgensen, R. Amann, Community structure, cellular rRNA content, and activity of Sulfate-Reducing Bacteria in marine Arctic sediments, Applied and Environmental Microbiology 66 (8) (2000) 3592-3602
- W.S. Reeburgh, Methane consumption in Cariako Trench waters and sediments, Earth and Planetarly Science Letters 28 (1976) 337-344
- O. Rothe and M. Thomm, A simplified method for the cultivation of extreme anaerobic Archaea based on the use of sodium sulfite as reducing agent, Extremophiles 4 (2000) 247-252
- M. Schoell, Multiple origins of methane in the earth, Chemical Geology 71 (1988) 1-10.
- K.R. Sowers, S.F. Baron, J.G. Ferry, *Methanosarcina acetivorans* sp. nov., an acetotrophic methane-producing bacterium, isolated from marine sediments, Applied and Environmental Microbiology, 47 (5) (1984), 971-978

- D.A. Stahl, and R. I. Amann. Development and application of nucleic acid probes in bacterial systematics, In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England (1991) 205–248
- E. Suess, M.E. Torres, G. Bohrmann, R.W. Collier, J. Greinert, P. Linke, G. Rehder, A. Trehu, K. Wallmann, G. Winkler, E. Zuleger, Gas hydrate destabilization: enhanced dewatering, benthic material turnover and large methane plumes at the Cascadia convergent margin, Earth and Planetary Science Letters 170 (1999) 1-15
- R.K. Thauer, Anaerobic oxidation of methane with sulfate: on the reversibility of the reactions that are catalyzed by enzymes also involved in methanogenesis from CO₂. Current Opinion In Microbiology 14 (2011) 292-299
- J.H ten Veen, J.M. Woodside, T.A.C. Zitter, J.F. Dumont, J.M. Mascle and A. Volkonskaia, Neotectonic evolution of the Anaximander Mountains at the junction of the Hellenic and Cyprus Arcs, Techtonophysics 391 (2004) 35-65
- J.M. Tor, J.P.Amend and D.R.Loveley, Metabolism of organic compounds in anaerobic hydrothermal sulphate-reducing marine sediments, Environmental Microbiology 5 (7) 2003, 583-591
- T. Treude, M. Krüger, A. Boetius, B.B. Jørgensen, Environmental control on anaerobic oxidation of methane in the gassy sediments of the Eckernförde Bay (German Baltic), Limnol. Oceanography 50 (6) (2005), 1771-1786
- T. Treude, V. Orphan, K. Knitter, A. Gieseke, C.H. House, A. Boetius, Consumption of methane and CO₂ by methanotrophic microbial mats from gas seeps of the anoxic Black Sea, Applied and Environmental Microbiology, 73 (7) (2007), 2271-2283
- D.L. Valentine and W. S. Reeburgh, New perspectives on anaerobic methane oxidation, Environmental Microbiolog 477-484 (2000)
- D.L. Valentine, Biochemistry and microbial ecology of methane oxidation in anoxic environments: a review, Antoniew van Leeuwenhoek 81 (2002) 271-282
- G. Wallner, R. Amann, and W. Beisker, Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganism, Cytometry 14 (1993) 136–143.
- W.C. Wang, Y. L. Yung, A.A. Lacis, T. Mo, J.E. Hansen Greenhouse effects due to manmade perturbations of trace gases, Science 194 (4266), (1976) 685-690
- J. P. Werne, and J. S. Sinninghe Damsté, Molecular isotopic tracing of carbon flow and trophic relationships in a methane-supported benthic microbial community, Limnol. Oceanogr., 47(6), (2002) 1694–1701
- M.J. Whiticar, Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane, Chemical Geology 161 (1999), 291-314

- W.B. Whitman, T.L. Bowen, D.R. Boone, The Methanogenic Bacteria, In the Prokaryotes 3rd
 Edition, Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer and E.
 Stackebrandt (2006) 165-207 Springer
- F. Widdel and F. Bak, Gram-negative mesophilic sulphate reducing Bacteria, In: The Prokaryotes (1992) 3352-3378, Chapter 183, Volume IV, Springer and Verlag
- M.G. Wise, J.V. Mc Arthur, L.J. Shimkets, *Methylosarcina fibrata* gen. nov., sp. nov., and *Methylosarcina quisquiliarum* sp. nov., novel type I methanotrophs, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51 (2001), 611-621
- J.M. Woodside, M.K. Ivanov and A. F. Limonov, Neotectonics and fluid flow through seafloor sediments in the Eastern Mediterranean and Black Seas Parts I and II. IOC Technical Series No. 48. UNESCO 1997
- A.A. Yayanos, Microbiology to 10,500 meters in the deep sea, Annual Review Microbiology 49, (1995) 777-805 T.A.C. Zitter, C. Huguen, J. ten Veen and J. M. Woodside, Tectonic control on mud volcanoes and fluid seeps in the Anaximander Mountains, eastern Mediterranean Sea, Geological Society of America, Special Paper 409, (2006) 615-631
- T.A.C. Zitter, C. Huguen and J.M. Woodside, Geology of mud volcanoes in the eastern Mediterranean from combined sidescan sonar and submersible surveys, Deep-Sea Research I 52 (2005) 457–475
- T.A.C. Zitter, C. Huguen, J. ten Veen and J. M. Woodside, Tectonic control on mud volcanoes and fluid seeps in the Anaximander Mountains, eastern Mediterranean Sea, Geological Society of America, Special Paper 409, (2006) 615-631

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1.1 Σχηματική απεικόνιση όπου φαίνεται πώς η ανοδική ροή του μεθανίου ελέγχει
τα προφίλ βάθους των θειικών ιόντων και τη ζώνη εξάντλησης των θειικών ιόντων4
Εικόνα 2.1.1 Γεωτεκτονικός χάρτης της Ανατολικής Μεσογείου
Εικόνα 2.1.2 Βαθυμετρικός χάρτης της περιοχής των υποθαλάσσιων ορέων Αναξίμανδρου
Εικόνα 2.1.3 Λεπτομερής απεικόνιση της πολυδεσμικής σάρωσης στην περιοχή που
διερευνήθηκε για το πρόγραμμα ANAXIMANDER50
Εικόνα 2.1.4 Τρισδιάστατη απεικόνιση του ανάγλυφου των ηφαιστείων ιλύος Amsterdam,
Kazan, Kula και Thessaloniki
Εικόνα 2.2.1 Κλασσικοί πυρηνοσυλλέκτες α. Πυρήνας βαρύτητας και
β. Κιβώτιο πυρήνας
Εικόνα 2.2.2 Πυρηνοσυλλέκτες με δυνατότητα διατήρησης της in situ πίεσης.
α. Πυρηνοσυλλέκτης τύπου ΑΡCΑ και β. Πυρηνοσυλλέκτης τύπου ΜΑC59
Εικόνα 2.2.3 Σχηματική απεικόνιση του σωλήνα που χρησιμοποιήθηκε για τη δειγματοληψία
από τον πυρηνοσυλλέκτη τύπου κιβώτιο
Εικόνα 2.4.1 Επώαση σε δοχεία πίεσης90
Εικόνα 3.1.1 Προφίλ βάθους της κατανομής της αφθονίας των μεμονωμένων κυττάρων και
των κυττάρων σε συσσωματώματα
Εικόνα 3.1.2 Συσσωματώματα που ανιχνεύθηκαν με χρώση DAPI
Εικόνα 3.1.3 Τεχνική FISH με ταυτόχρονο υβριδισμό με τους ανιχνευτές ARC915 για τα
Archaea και DSS658 για τα θειικοαναγωγικά Bacteria της ομάδας Desulfosarcina/
Desulfococcus
Εικόνα 3.1.4 Τεχνική FISH με ταυτόχρονο υβριδισμό με τον ανιχνευτή ANME-2 με CY3 κα
DSS658 με fluorescein
Εικόνα 3.1.5 Ανίχνευση ΑΝΜΕ-1 κυττάρων με την τεχνική FISH
Εικόνα 3.1.6 Πυρήνας ΑΧ02BC1. Προφίλ βάθους της κατανομής των ΑΝΜΕ-1 κυττάρων
και των ANME-2/DSS συσσωματωμάτων
Εικόνα 3.1.7 Πυρήνας ΑΧ02BC1. Κατανομή % των ΑΝΜΕ-1 κυττάρων στα μεμονωμένα
κύτταρα
Εικόνα 3.1.8 Πυρήνας ΑΧ02BC1. Σύγκριση της συγκέντρωσης των ΑΝΜΕ-1 και ΑΝΜΕ-
2/DSS κατά βάθος ιζήματος
Εικόνα 3.1.9 Συσσωματώματα που ανιχνεύθηκαν σε δείγματα από τους πυρήνες που
ανακτήθηκαν υπό πίεση και υποβλήθηκαν σε διαφορετική μεταχείριση αποσυμπίεσης,
παρέμειναν ανεπηρέαστα
Εικόνα 3.1.10 Πυρήνας ΑΧ09GC1. Ποσοστό συμμετοχής στην ολική αφθονία των
μεμονωμένων κυττάρων και των κυττάρων σε συσσωματώματα

.*

Εικόνα 3.1.11 Συσσωματώματα και κύτταρα ΑΝΜΕ-1 από τα βάθη 2 και 95cm115
Εικόνα 3.1.12 Πυρήνας ΑΧ09GC1. Προφίλ βάθους της κατανομής της αφθονίας των
ANME-1 και των ANME-2/DSS συσσωματωμάτων117
Εικόνα 3.1.13 Πυρήνας ΑΧ09GC1. Σύγκριση της συγκέντρωσης των ΑΝΜΕ-1 και ΑΝΜΕ-
2/DSS κατά βάθος ιζήματος
Εικόνα 3.1.14 Προφίλ βάθους της ολικής αφθονίας των κυττάρων για τους πυρήνες
AX06GC1, AX08GC1 και AX11GC1
Εικόνα 3.1.15 Πυρήνας ΑΧ11GC1
Α. Προφίλ βάθους της κατανομής των μεμονωμένων κυττάρων και των κυττάρων σε
συσσωματώματα. Β. Ποσοστό συμμετοχής στην ολική αφθονία των μεμονωμένων κυττάρων
και των συσσωματωμάτων.
Εικόνα 3.1.16 Προφίλ βάθους της ολικής κυτταρικής αφθονίας στους πυρήνες ΑΧ19GC1
και AX23GC1
Εικόνα 3.1.17 Προφίλ βάθους ολικής κυτταρικής αφθονίας για τον πυρήνα AX28GC1 125
Εικόνα 3.2.1 Παρακολούθηση της κυτταρικής ανάπτυξης με χρώση DAPI σε θρεπτικό
μέσο για θειικοαναγωγικά Bacteria
Εικόνα 3.2.2 Χρώση DAPI σε καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο για Methanosarcina
Εικόνα 3.2.3 Α. FISH και με τον ανιχνευτή DSS658 για θειικοαναγωγικά Bacteria της
ομάδας Desulfosarcina/Desulfococcus
B. CARD-FISH με τους ανιχνευτές DSS658 και DSV698 για θειικοαναγωγικά Bacteria
της ομάδας Desulfosarcina/Desulfococcus και του γένους Desulfovibrio
Εικόνα 3.2.4 FISH με τον ανιχνευτή EUB338I-III για Bacteria σε καλλιέργειες σε θρεπτικό
μέσο Methanosarcina. Αριστερά χρώση DAPI, δεξιά FISH
Εικόνα 3.2.5 Στήλη αριστερά, από αριστερά προς τα δεξιά, διαδοχικές καλλιέργειες (d, h, i)
που προέκυψαν από τις αρχικές 88in, 102in και 41in, μετά από ένα μήνα επώαση σε
υπόστρωμα γαλακτικό οξύ. Στήλη δεξιά: Επώαση στους 11 και στους 25°C
Εικόνα 4.1 Προφίλ βάθους της συγκέντρωσης των ΑΝΜΕ-1 κυττάρων, των ΑΝΜΕ-2/DSS
συσσωματωμάτων, της ολικής αφθονίας και συσχέτισή τους με τα προφίλ βάθους του
μεθανίου και των θειικών ιόντων
Εικόνα 4.2 Προφίλ βάθους της ολικής αφθονίας, των ΑΝΜΕ-2/DSS συσσωματωμάτων και
των ΑΝΜΕ-1 κυττάρων σε σύγκριση με τα προφίλ βάθους για τη συγκέντρωση του
μεθανίου, υδρόθειου και των θειικών ιόντων156
Εικόνα 4.3 Σύγκριση των γεωχημικών προφίλ περιοχής χαμηλής ροής εκλυόμενης ιλύος
(AX02BC1) με μια περιοχή υψηλής ροής εκλυόμενης ιλύος (AX09GC1)
Εικόνα 4.4 Προφίλ βάθους της ολικής αφθονίας μεταξύ πυρήνων βαρύτητας που
ανακτήθηκαν από πεδία με υψηλή ροή μεθανίου

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 2.2.1 Δειγματοληψία από το ηφαίστειο ιλύος Amsterdam, για DAPI-FISH και
καλλιέργειες εμπλουτισμού, σε ατμοσφαιρική πίεση και σε δοχεία πίεσης63
Πίνακας 2.2.2 Δειγματοληψία από το ηφαίστειο ιλύος Kazan, για DAPI-FISH και
καλλιέργειες εμπλουτισμού, σε ατμοσφαιρική πίεση και σε δοχεία πίεσης
Πίνακας 2.2.3 Δειγματοληψία από το ηφαίστειο ιλύος Kula, για DAPI-FISH και
καλλιέργειες εμπλουτισμού, σε ατμοσφαιρική πίεση και σε δοχεία πίεσης
Πίνακας 2.2.4 Δειγματοληψία από το ηφαίστειο ιλύος Thessaloniki, για DAPI-FISH και
καλλιέργειες εμπλουτισμού, σε ατμοσφαιρική πίεση και σε δοχεία πίεσης
Πίνακας 2.2.5 Δειγματοληψία από σαπροπηλό, για DAPI-FISH και καλλιέργειες
εμπλουτισμού, σε ατμοσφαιρική πίεση και σε δοχεία πίεσης
Πίνακας 2.3.1 Ποσοστό % φορμαμιδίου που χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική FISH για κάθε
ανιχνευτή
Πίνακας 2.3.2 Συγκεντρώσεις NaCl στο διάλυμα ξεπλύματος (48°C) για διαφορετικές
συγκεντρώσεις φορμαμιδίου που χρησιμοποιήθηκαν στο διάλυμα υβριδισμού (46°C) 81
Πίνακας 2.3.3 Χαρακτηριστικά της χρωστικής DAPI και των φθοροχρωμάτων που
χρησιμοποιήθηκαν για σήμανση των ανιχνευτών
Πίνακας 2.4.1 Αρχικές καλλιέργειες από το ηφαίστειο ιλύος Amsterdam
Πίνακας 2.4.2 Αρχικές καλλιέργειες από το ηφαίστειο ιλύος Kazan
Πίνακας 2.4.3 Αρχικές καλλιέργειες από το ηφαίστειο ιλύος Thessaloniki
Πίνακας 3.1.1 Ολική κυτταρική αφθονία, στο κιβώτιο πυρήνα ΑΧ02BC1, στον πυρήνα
βαρύτητας ΑΧ02GC2, στους πυρήνες ΑΡCA ΑΧ02ΑΡ1 και ΑΧ02ΑΡ4 και στον πυρήνα
MAC AX02MA2
Πίνακας 3.1.2 Προφίλ βάθους για τα μεμονωμένα κύτταρα, τα κύτταρα που συμμετέχουν σε
συσσωματώματα και την ολική κυτταρική αφθονία στον AX09GC1
Πίνακας 3.2.1 Αναγέννηση καλλιεργειών (1 atm) από δείγματα ιζήματος. Θρεπτικό μέσο για
θειικοαναγωγικά Bacteria με υπόστρωμα οξικό οξύ (Ac), γαλακτικό οξύ (La), ηλεκτρικό οξύ
(Suc) και αιθανόλη (Eth). Θρεπτικό μέσο για Methanosarcina (Meth) 127
Πίνακας 3.2.2 Διερεύνηση των μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν στις πιο ζωηρές
καλλιέργειες σε υπόστρωμα γαλακτικό οξύ
Πίνακας 3.2.3 Διερεύνηση των μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν στις πιο ζωηρές
καλλιέργειες σε θρεπτικό μέσο για Methanosarcina
Πίνακας 4.1 Ανίχνευση αναερόβιων μεθανιότροφων με την τεχνική FISH και σύγκριση της
κυτταρικής αφθονίας μεταξύ των πυρήνων AX02BC1 και AX09GC1



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ