

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



Πτυχιακή εργασία

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ
ΘΑΛΑΣΣΙΟΥ ΦΥΤΟΥ *POSIDONIAS OCEANICA* ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ
ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΛΑΚΚΑΣΩΝ ΜΑΓΓΑΝΑΣΩΝ ΚΑΙ
ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

ΜΑΡΙΟΣ ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ

ΛΕΜΕΣΟΣ 2016

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Πτυχιακή εργασία

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ
ΘΑΛΑΣΣΙΟΥ ΦΥΤΟΥ *POSIDONIAS OCEANICA* ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ
ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΛΑΚΚΑΣΩΝ ΜΑΓΓΑΝΑΣΩΝ ΚΑΙ
ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

ΜΑΡΙΟΣ ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ

Σύμβουλος καθηγήτρια
Δρ. κα Μάρλεν. Ι. Βάσκες

Λεμεσός 2016

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Μάριος Παπαγεωργίου, [2016]

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της πτυχιακής εργασίας από το Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω πρώτα την καθηγήτρια μου Δρ. Μάρλεν Βάσκες που μου έδωσε την ευκαιρία να επιλέξω το συγκεκριμένο θέμα πτυχιακής διατριβής και για την εμπιστοσύνη που μου έδειχνε όλο αυτό το διάστημα. Τον καθηγητή μου Δρ. Κώστα Ανδρέου για την βοήθεια, τον χρόνο που μου αφιέρωσε και τον εξοπλισμό που μου έδωσε για να στήσω το σύστημα χωνεύσεων που χρειαζόμουν. Επίσης το τμήμα ΓΕΒΕΤ που μου παρείχε μέρος από τον εξοπλισμό του για διεκπεραίωση των πειραμάτων μου. Τον καθηγητή Δρ. Ιάκωβο Παντελίδη και την Δρ. Μαρία Τσολακίδου του τμήματος ΓΕΒΕΤ για τις χρήσιμες συμβουλές και την όμορφη συνεργασία που είχαμε. Ακόμη δεν θα μπορούσα να παραλείψω τον Δρ. Παντελή Χαριασίδα για την τεράστια βοήθεια που μου παρείχε κατά την διάρκεια των πειραμάτων μου στο όργανο ICP/MS. Σημαντική βοήθεια είχα και από τις συμφοιτήτριες μου Βαλάντω Κάιζερ και Ελένη Αριστοδήμου στις δειγματοληψίες και για την προετοιμασία των δειγμάτων μου και έκαναν τις ώρες του εργαστηρίου πιο ευχάριστες. Τέλος δεν θα μπορούσα να παραλείψω την Χριστίνα Μοδέστου και την Ιωάννα Σταυρινίδου οι οποίες μέσω των συμβουλών που μου έδιναν κατάφερα να φέρω εις πέρας μια πτυχιακή εργασία με επίπεδο. Χωρίς τα πιο πάνω άτομα δεν θα ήταν δυνατόν να αποκτήσω γνώσεις, κριτική σκέψη και τεχνικές τις οποίες δεν κατείχα και το κυριότερο να γεννηθούν συνεργασίες και φιλίες με αναμνήσεις και διάφορα συναισθήματα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το θαλάσσιο οικοσύστημα και ως εκ τούτου τα θαλάσσια λιβάδια *Posidonia oceanica* χαρακτηρίζονται από υψηλό δείκτη βιοποικιλότητας και αποτελούν ενδιαίτημα για πολλούς οργανισμούς, μεταξύ αυτών και τα ψάρια. Συνεπώς, απαιτείται διερεύνηση και παρακολούθηση των οικοσυστημάτων αυτών για κατανόηση του τρόπου λειτουργίας τους. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης χαρακτηρίστηκε η μικροβιακή κοινότητα του θαλάσσιου φυτού *Posidonia oceanica* από δύο διαφορετικές περιοχές της Κύπρου: 1) Κάβο Γκρέκο και 2) περιοχή Λεμεσού. Χρησιμοποιήθηκαν μοριακές τεχνικές για την απομόνωση και ταυτοποίηση των μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένου της αντίδρασης πολυμεράσης, εξαγωγή γενετικού υλικού και καθαρισμό παραγόμενων προϊόντων. Επίσης, έγινε ανάλυση βαρέων μετάλλων με την μέθοδο επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος φασματοφωτόμετρο μάζας στα φύλλα του θαλάσσιου φυτού *Posidonia oceanica*, στο θαλασσινό νερό κοντά στο φυτό και σε δύο είδη ψαριών που ζουν κοντά σε αυτό το *Boops boops* και το *Diplodus sargus sargus*.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης φανερώνουν τα ακόλουθα: το μεγαλύτερο μικροβιακό φορτίο εντοπίστηκε στην περιοχή Λεμεσού ($0,4 \times 10^8$). Ο συνολικός αριθμός μυκήτων που απομονώθηκαν είναι 43. Απομονώθηκαν συνολικά 134 βακτήρια, 78 από την περιοχή Κάβο Γκρέκο και 56 από την περιοχή Λεμεσού. Το κυρίαρχο γένος βακτηρίου είναι το *Vibrio*. Απομονώθηκαν επίσης τα γένη *Bacillus*, *Ustilago* και *Achromobacter*. Το κυρίαρχο γένος μυκήτων είναι το *Cladosporium* και ακολουθεί το *Penicillium*, το *Engyodontium* και τέλος το *Aspergillus*.

Η ενζυματική διερεύνηση ενεργότητας λακκασών και μαγγανασών μέσω του αποχρωματισμού επιλεγμένων βαφών έδειξε ότι οι μύκητες *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium uredinicola*, *Engyodontium album*, *Cladosporium sphaerospermum* και *Aspergillus sydowii* παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ποσοστό αποχρωματισμού (>80%). Σημείο αναφοράς ήταν ο μύκητας *P. chrysosporium* το οποίο παράγει τις λακκάσες και μαγγανάσες. Οι πιο πάνω μύκητες παρουσίασαν ποσοστό βιοαποικοδόμησης στις 7 ημέρες 80-89,9% και θεωρείται ότι παράγουν τα συγκεκριμένα ένζυμα.

Η ανάλυση των βαρέων μετάλλων έδειξε ότι οι μέγιστες συγκεντρώσεις στα φύλλα του φυτού στην περιοχή Κάβο Γκρέκο παρουσιάστηκαν για το ασβέστιο με ποσότητα 9408 μg/g.

Για την περιοχή της Λεμεσού η μέγιστη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων ήταν για το ασβέστιο ίση με 11318 µg/g. Για το θαλασσινό νερό κοντά στο φυτό *Posidonia oceanica* στην περιοχή Κάβο Γκρέκο την μέγιστη συγκέντρωση παρουσίασε το ασβέστιο 10431 µg/mL. Για την περιοχή Λεμεσού η μέγιστη συγκέντρωση παρουσιάστηκε από το ασβέστιο 10768 µg/mL. Τα ψάρια που εξετάστηκαν ήταν τα είδη *Boops boops* και *Diplodus sargus sargus*. Από το κάθε ψάρι εξετάστηκε το συκώτι, τα βράγχια και μέρος από τους μύες με το δέρμα. Για το ψάρι *Boops boops* στο συκώτι η μέγιστη συγκέντρωση ήταν του μαγνησίου με 53253,3 µg/g υγρού βάρους. Για τα βράγχια η μέγιστη συγκέντρωση ήταν του μαγνησίου 78320 µg/g υγρού βάρους. Για τους μύες με το δέρμα η μέγιστη ποσότητα ήταν του μαγνησίου 91066,67 µg/g υγρού βάρους. Για το ψάρι *Diplodus sargus sargus* στο συκώτι η μέγιστη συγκέντρωση ήταν του μαγνησίου 23617,3 µg/g υγρού βάρους. Για τα βράγχια η μέγιστη συγκέντρωση ήταν για το μαγνήσιο 91356,6 µg/g υγρού βάρους. Τέλος για τους μύες η μέγιστη συγκέντρωση ήταν για το μαγνήσιο 127106,7 µg/g υγρού βάρους.

Ολοκληρώνοντας τα πιο πάνω αποτελέσματα αποτελούν μια πρώτη ένδειξη της ποικιλότητας της μικροβιακής κοινότητας του φυτού *Posidonia oceanica* στην Κύπρο με πιθανές υποσχόμενες εφαρμογές στην βιομηχανία. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση της ενδοφυτικής κοινότητας καθώς και άλλων ενζύμων. Επιπρόσθετα, η ανάλυση των βαρέων μετάλλων κατέδειξε ότι το θαλάσσιο φυτό, τα ψάρια που ζουν κοντά στο φυτό και το νερό κοντά στην *Posidonia oceanica* δεν είναι επιβαρημένα από ρυπογόνους παράγοντες κάτι που αποδεικνύει την καλή ποιότητα των θαλασσών της περιοχής του Κάβο Γκρέκο και Λεμεσού.

Λέξεις κλειδιά: αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα φασματοφωτόμετρο μάζας, έλεγχος αποχρωματισμού, χαρακτηρισμός μικροβιακής κοινότητας, βαρέα μέταλλα.

ABSTRACT

The marine ecosystem and particularly *Posidonia oceanica* meadows coastal waters are characterized by a high biodiversity index and were identified as a priority habitat for many organisms, among them fish. Investigation and monitoring of these ecosystems are required to understand their function. In the present study, the microbial community of the marine plant *Posidonia oceanica* was isolated from two different regions of Cyprus: 1) Cape Greco and 2) area of Limassol was characterized. Molecular techniques were used for the isolation and identification of microorganisms including the following: polymerase chain reaction (PCR), extraction of genetic material, gel electrophoresis and cleaning of PCR products. Furthermore, an analysis of heavy metals by the method of inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP/MS) was conducted in order to examine the presence of heavy metals in the leaves of the marine plant *P. oceanica*, in seawater near the plant and in two species of fish that live near the plant: *Boops boops* and *Diplodus sargus sargus*.

The findings of this study revealed the following: the highest microbial load was detected in Limassol ($0,4 \times 10^8$). The total number of fungi that were isolated was 43. The total bacterial isolates were 134, 78 bacteria from Cavo Greco and 56 from Limassol. The dominant bacterial genus was *Vibrio*. The following genera were also isolated: *Bacillus*, *Ustilago* and *Achromobacter*. The predominant fungal genus was *Cladosporium*, followed by *Penicillium*, *Engyodontium* and *Aspergillus*.

The enzymatic screening of fungi for laccases and mangannases showed that the fungi with the greatest decolorizing rate $>80\%$ were: *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium uredinicola*, *Engyodontium album*, *Cladosporium sphaerospermum* and *Aspergillus sydowii*. The above fungi showed biodegradation rate from 80 to 89.9%, 7 days after incubation, considering as producers of these enzymes.

Analysis of heavy metals showed that the highest concentrations in the leaves of the plant in Cape Greco area was 9408 $\mu\text{g/g}$ for calcium. In Limassol area, the maximum concentration of heavy metals was 11318 $\mu\text{g/g}$ for calcium. For seawater near *P. oceanica* in Cape Greco area maximum concentration was showed 10431 $\mu\text{g/mL}$ for calcium. For Limassol, the calcium element was estimated to have the maximum concentration of 10768 $\mu\text{g/mL}$. Liver, gills and part of the muscle with skin were examined and isolated from each fish. For the liver of

Boops boops, the maximum concentration was 53253,3 µg/g wet weight for magnesium. For gills the maximum concentration was 78320 µg/g wet weight for magnesium. For the muscle the greatest amount of magnesium was 91066,67 µg/g wet weight. For liver of *Diplodus sargus sargus*, the maximum concentration was observed 23617,33 µg/g wet weight for magnesium. For gills the greatest concentration was 91386,67 µg/g wet weight for magnesium. Finally, for the muscle, the maximum concentration was detected 127106,7 µg/g wet for magnesium.

Concluding, the above results represent a first indication of the diversity of the microbial community of the plant *P. oceanica* in Cyprus with promising potential applications in industry. However, further investigation of endophytic community and other enzymes is required. Additionally, the analysis of heavy metals showed that the marine plant, the investigated fish living near the plant and the water near the *P. oceanica* are not burdened by pollutants proving the good quality of the coastal waters of Cape Greco and Limassol area.

Keywords: polymerase chain reaction, inductively coupled plasma mass spectrometer, discoloration control, microbial community characterization, heavy metals.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iv
ABSTRACT	vi
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	viii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	xiii
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	xvi
ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ.....	xvii
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	xviii
1 Εισαγωγή.....	1
1.1 Θαλάσσια λιβάδια.....	1
1.2 Θαλάσσια λιβάδια που βρίσκονται στην Ευρώπη.....	1
1.3 Σημαντικότητα θαλάσσιων λιβαδιών	3
1.4 Θαλάσσιοι μικροοργανισμοί	4
1.5 Ρύπανση θαλασσών με έμφαση στα βαρέα μέταλλα	6
1.5.1 Συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων σε διάφορα είδη ψαριών.....	11
1.5.2 Συγκέντρωση βαρέων μετάλλων στο θαλάσσιο φυτό <i>Posidonia oceanica</i>	12
1.5.3 Τρόπος ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης βαρέων μετάλλων	13
1.6 Στόχος της εργασίας	16
2 Υλικά και μεθοδολογία	18
2.1 Περιοχή μελέτης και συλλογή δειγμάτων	18
2.2 Προετοιμασία δείγματος	18
2.3 Αντιδραστήρια.....	19
2.4 Ανάλυση δειγμάτων	19
2.5 Περιοχή μελέτης.....	20
2.6 Απομόνωση μικροοργανισμών από την <i>P. oceanica</i>	20

2.6.1	Προετοιμασία θρεπτικών υποστρωμάτων.....	20
2.6.2	Διαδικασία απομόνωσης	23
2.6.3	Προετοιμασία δειγμάτων για ICP/MS.....	24
2.7	Εξαγωγή Γενετικού υλικού	24
2.7.1	Εξαγωγή Γενετικού υλικού από βακτήρια	24
2.7.2	Διαδικασία CTAB	25
2.7.3	Εξαγωγή Γενετικού υλικού από μύκητες	26
2.8	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR)	26
2.8.1	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για βακτήρια	26
2.8.2	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για μύκητες	28
2.9	Ηλεκτροφόρηση	30
2.10	Καθαρισμός προϊόντων PCR.....	31
2.11	Ενζυμική δραστηριότητα μυκήτων	31
3	Αποτελέσματα.....	34
3.1	Απομόνωση μικροοργανισμών.....	34
3.2	Απομόνωση DNA.....	35
3.2.1	Απομόνωση βακτηριακού DNA.....	35
3.2.2	Απομόνωση μυκητιακού DNA.....	36
3.2.3	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	37
3.2.4	Καθαρισμός προϊόντος PCR.....	40
3.2.5	Αλληλούχιση	42
3.2.6	Ενζυματική αποικόνιση μυκήτων.....	46
3.3	Ανάλυση βαρέων μετάλλων	55
3.3.1	Ανάλυση βαρέων μετάλλων πρότυπες καμπύλες.....	55
3.3.2	Ανάλυση βαρέων μετάλλων στα ψάρια	66
3.3.3	Ανάλυση βαρέων μετάλλων στο φυτό <i>Posidonia oceanica</i>	70

3.3.4	Ανάλυση βαρέων μετάλλων στο θαλασσινό νερό από την περιοχή των φυτών <i>Posidonia oceanica</i>	72
4	Συζήτηση.....	74
5	Συμπεράσματα-Μελλοντικοί στόχοι.....	97
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	100

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων στο θαλάσσιο φυτό <i>Posidonia oceanica</i> στην περιοχή της Σικελίας	13
Πίνακας 2: Παράμετροι λειτουργίας ICP-MS (Maciel et al., 2014)	19
Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά δειγματοληπτικών περιοχών	20
Πίνακας 4: Χημικά για την παρασκευή του GPYc	21
Πίνακας 5: Χημικά για την παρασκευή του GPYr.....	21
Πίνακας 6: Χημικά για την παρασκευή του ONR7a.....	22
Πίνακας 7: Χημικά για την παρασκευή του θαλασσινό άγαρ.....	23
Πίνακας 8: Χημικά αντιδραστήρια για PCR βακτηρίων.....	27
Πίνακας 9: Συνθήκες PCR για βακτήρια.....	28
Πίνακας 10: Χημικά αντιδραστήρια για PCR μυκήτων.....	29
Πίνακας 11: Συνθήκες PCR για μύκητες	30
Πίνακας 12: Χημικά για την παρασκευή του Methyl-red0.....	32
Πίνακας 13: Χημικά για την παρασκευή του Methyl-red30	32
Πίνακας 14: Χημικά για την παρασκευή του RBBR0	32
Πίνακας 15: Χημικά για την παρασκευή του RBBR30	33
Πίνακας 16: Βακτηριακό φορτίο και αριθμός απομονώσεων από ρίζα, ρίζωμα, μάτε και φύλλα το φυτό <i>Posidonia oceanica</i> από τις περιοχές Λεμεσού και Κάβο Γκρέκο σε διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα.....	34
Πίνακας 17: Μυκητιακό φορτίο και αριθμός απομονώσεων από ρίζα, ρίζωμα, μάτε και φύλλα από το φυτό <i>Posidonia oceanica</i> από την περιοχή Κάβο Γκρέκο σε διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα	35
Πίνακας 18: Συγκέντρωση γενετικού υλικού ng/ul από την εξαγωγή DNA βακτηρίων	36
Πίνακας 19: Συγκέντρωση γενετικού υλικού ng/ul από την εξαγωγή DNA μυκήτων	37
Πίνακας 20: Μετρήσεις καθαρισμένων προϊόντων βακτηρίων στο φασματοφωτόμετρο.	40

Πίνακας 21: Μετρήσεις καθαρισμένων προϊόντων μυκήτων στο φασματοφωτόμετρο	41
Πίνακας 22: Αποτελέσματα αλληλούχισης βακτηρίων	42
Πίνακας 23: Αποτελέσματα αλληλούχισης βακτηρίων από Κάβο Γκρέκο και Λεμεσό.....	44
Πίνακας 24: Αποτελέσματα αλληλούχισης μυκήτων.....	45
Πίνακας 25: Αποτελέσματα αλληλούχισης μυκήτων από Κάβο Γκρέκο	46
Πίνακας 26: LOD και LOQ για κάθε μέταλλο.....	66
Πίνακας 27: Συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων στο ψάρι <i>Boops boops</i> μg/g υγρού βάρους.	67
Πίνακας 28: Συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων στο ψάρι <i>Diplodus sargus sargus</i> μg/g υγρού βάρους.....	69
Πίνακας 29: Συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων για τις περιοχές Κάβο Γκρέκο και Λεμεσό στο θαλάσσιο φυτό <i>Posidonia oceanica</i> μg/g.....	71
Πίνακας 30: Συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων για τις περιοχές Κάβο Γκρέκο και Λεμεσό στο θαλάσσιο νερό κοντά στο φυτό <i>Posidonia oceanica</i> μg/mL.....	72
Πίνακας 31: άρθρα με τεχνικές ανάλυσης βαρέων μετάλλων ICP/MS σε διάφορες τοποθεσίες και τα αποτελέσματά τους	79

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής RBBR 0,2g για το θρεπτικό υπόστρωμα GPY.....	47
Γράφημα 2: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής RBBR 0,1g για το θρεπτικό υπόστρωμα GPY.....	47
Γράφημα 3: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής RBBR 0,05 g για το θρεπτικό υπόστρωμα GPY.....	48
Γράφημα 4: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής RBBR 0,2 g + 3 g NaCl για το θρεπτικό υπόστρωμα GPY.....	48
Γράφημα 5: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής Methyl-red 0,2 g για το θρεπτικό υπόστρωμα GPY.....	49
Γράφημα 6: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής Methyl-red 0,1 g για το θρεπτικό υπόστρωμα GPY.....	49
Γράφημα 7: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής Methyl-red 0,05 g για το θρεπτικό υπόστρωμα GPY.....	50
Γράφημα 8: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής Methyl-red 0,2 g + 3g NaCl για το θρεπτικό υπόστρωμα GPY.....	50
Γράφημα 9: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής RBBR 0,2 g για το θρεπτικό υπόστρωμα ONR7a.	51
Γράφημα 10: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής RBBR 0,1 g για το θρεπτικό υπόστρωμα ONR7a.....	51
Γράφημα 11: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής RBBR 0,05 g για το θρεπτικό υπόστρωμα ONR7a.....	52
Γράφημα 12: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής RBBR 0,2 g + 3g NaCl για το θρεπτικό υπόστρωμα ONR7a.	52
Γράφημα 13: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής Methyl-red 0,2 g για το θρεπτικό υπόστρωμα ONR7a.	53

Γράφημα 14: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής Methyl-red 0,1 g για το θρεπτικό υπόστρωμα ONR7a.	53
Γράφημα 15: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής Methyl-red 0,05 g για το θρεπτικό υπόστρωμα ONR7a.	54
Γράφημα 16: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής Methyl-red 0,2 g + 3g NaCl για το θρεπτικό υπόστρωμα ONR7a.....	54
Γραφική Παράσταση 1: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Li	55
Γραφική Παράσταση 2: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Be.....	56
Γραφική Παράσταση 3: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Mn.	56
Γραφική Παράσταση 4: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Ca.....	57
Γραφική Παράσταση 5: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Ti.	57
Γραφική Παράσταση 6: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου V.	58
Γραφική Παράσταση 7: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Cr.....	58
Γραφική Παράσταση 8: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Mn.	59
Γραφική Παράσταση 9: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Fe.....	59
Γραφική Παράσταση 10: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Co.	60
Γραφική Παράσταση 11: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Ni.....	60
Γραφική Παράσταση 12: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Cu.	61
Γραφική Παράσταση 13: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Zn.....	61
Γραφική Παράσταση 14: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου As.....	62
Γραφική Παράσταση 15: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Se.....	62
Γραφική Παράσταση 16: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Sr.	63
Γραφική Παράσταση 17: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Mo.	63
Γραφική Παράσταση 18: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Cd.	64
Γραφική Παράσταση 19: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Sb.....	64

Γραφική Παράσταση 20: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Tl.	65
Γραφική Παράσταση 21: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Pb.....	65

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

PCR: Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

ICP/MS Επαγωγικά Συζευγμένο Πλάσμα Φασματοφωτόμετρο Μάζας

ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ

PCR:	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
ICP/MS	Επαγωγικά Συζευγμένο Πλάσμα Φασματοφωτόμετρο Μάζας
RBBR	Βαφή χρώματος μπλε ανοικτού
Methyl- red	Βαφή κόκκινη

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία θα εξεταστεί το θαλάσσιο φυτό *Posidonia oceanica* σε δύο περιοχές της Κύπρου, Κάβο Γκρέκο και Λεμεσό, για χαρακτηρισμό της μικροβιακής του κοινότητας, βακτηριών και μυκήτων. Θα γίνει έλεγχος των μυκήτων για παραγωγή ενζύμων λακκάσων και μαγγανάσων μέσω αποχρωματισμού συγκεκριμένων βαφών. Τέλος θα μετρηθεί η συγκέντρωση βαρέων μετάλλων του θαλάσσιου φυτού και από τις δύο περιοχές, θα μετρηθεί η συγκέντρωση βαρέων μετάλλων στο θαλασσινό νερό κοντά στο φυτό και στις δύο περιοχές και θα εξεταστούν οι συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων δύο ειδών ψαριών το *Boops boops* και *Diplodus sargus sargus* από την περιοχή της Λεμεσού. Μέρος των αποτελεσμάτων θα παρουσιαστούν στο 10^ο συνέδριο του International Society for Environmental Biotechnology στην Βαρκελώνη στις 1-3 Ιουνίου 2016 σε ομιλία με τίτλο Unravelling the biodegradation potential of PAHs of a marine microbial consortium isolated from *Posidonia oceanica* of Cyprus.

1 Εισαγωγή

1.1 Θαλάσσια λιβάδια

Τα θαλάσσια λιβάδια είναι φυτά τα οποία μεγαλώνουν σε αμμώδεις βυθούς διαμορφώνοντας πυκνά παρατεταμένα φυτά (Salwmidi, 2012). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το ποσοστό των θαλάσσιων λιβαδιών είναι πάρα πολύ μικρό σε σχέση με τη θαλάσσια πανίδα. Το ποσοστό των θαλάσσιων λιβαδιών αντιστοιχεί στο 0,02% της πανίδας (Hemminga, M.A., 2002). Τα θαλάσσια λιβάδια είναι αποτέλεσμα εξέλιξης 100 εκατομμυρίων χρόνων περίπου που με τον καιρό ανέπτυξαν ανθεκτικότητα σε περιβάλλοντα με μεγάλη θερμοκρασία. Ανέπτυξαν σύστημα μεταφοράς οξυγόνου για την αντιμετώπιση διάφορων τοξικών ιζημάτων (Hemminga, M.A., 2002). Τα θαλάσσια λιβάδια καλύπτουν μέχρι και 600 000 km² των θαλασσών και σε σημεία που ενώνονται οι ποταμοί με τις θάλασσες σε όλη την Γη (Short, Carruthers, Dennison, & Waycott, 2007). Αξίζει να σημειωθεί στις περιοχές τις Ανταρκτικής δεν υπάρχουν θαλάσσια λιβάδια (Short et al., 2007). Τα θαλάσσια λιβάδια παίζουν καθοριστικό ρόλο στα διάφορα παράκτια οικοσυστήματα λόγω της μεγάλης πρωτογενούς παραγωγής. Ακόμη προμηθεύουν με τροφή διάφορα τροφικά πλέγματα, οξυγόνο σε ιζήματα, προσφέρουν ενδιαίτημα για μικροβιακή ανάπτυξη και ανακυκλώνουν διάφορα θρεπτικά συστατικά (Duarte & Regaudie-de-gioux, 2009). Τα θαλάσσια λιβάδια αναπτύσσονται κάτω από την επιφάνεια της θάλασσας χωρίς να χρειάζεται να έρθουν σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα. Τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία που χρειάζονται τα θαλάσσια λιβάδια λαμβάνονται από τα ιζήματα μέσω των ριζών ή από το νερό μέσω των φύλλων. Το οξυγόνο λαμβάνεται από το σύστημα καναλιών του ιστού και γεμίζει με αέρα. Η γύρη των θαλάσσιων λιβαδιών διαχέεται μέσω της ροής του νερού (Al Borum, 2009).

1.2 Θαλάσσια λιβάδια που βρίσκονται στην Ευρώπη

Υπάρχουν μόνο 4 είδη θαλάσσιων λιβαδιών στην Ευρώπη είναι: *Zostera marina*, *Zostera noltii*, *Cymodocea nodosa*, *Posidonia oceanica* και *Z. Marina*. Ξεκινούν από τα αρκτικά ύδατα κατά μήκος των ακτών της Νορβηγίας μέχρι την Μεσόγειο (Al Borum, 2009). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε όλο τον κόσμο υπάρχουν συνολικά 60 είδη θαλάσσιων λιβαδιών (Al Borum, 2009).

Το θαλάσσιο φυτό *Zostera marina* έχει μήκος 30 έως 60 cm με πλάτος 2 έως 10 mm και μέγιστο αριθμό φύλλων 7. Οι ρίζες του είναι λεπτές και το ρίζωμα έχει πάχος 2-6 mm. Το χρώμα των ριζωμάτων φανερώνει και την ηλικία του φυτού αφού το σκούρο καφέ χρώμα αντιστοιχεί στα παλαιά τμήματα και το λευκό-πράσινο σε νέα τμήματα που αναπτύχθηκαν πρόσφατα (Al Borum, 2009). Το φυτό παρουσιάζει και άνθη σε περιοχές που υπάρχουν αρσενικά και θηλυκά φυτά στο ίδιο άτομο. Η ανθοφορία εμφανίζεται κατά την περίοδο της άνοιξης για να μπορεί να γίνει η αναπαραγωγή μεταγενέστερα (Al Borum, 2009).

Το θαλάσσιο φυτό αυτό εμφανίζεται από τις νότιες ακτές της Νορβηγίας προς την Μεσόγειο Θάλασσα, τη Μαύρη Θάλασσα, των Καναρίων Νήσων μέχρι και την Mauretanean ακτή. Εμφανίζεται σε λασπώδη άμμο με πυκνή βλάστηση και στενά φύλλα. Το είδος αυτό εκτιθεί τα φύλλα του συνήθως έξω από το νερό. Έχει μικρά φύλλα με αριθμό από 2 έως 5 που ενώνονται στενά σε ένα οριζόντιο ρίζωμα. Κάθε ρίζωμα έχει πολλούς βλαστούς σε μικρά διαστήματα. Το μήκος των φύλλων είναι από 5 έως 25 cm και πλάτος από 0,5 έως 2 mm. Το ρίζωμα έχει πάχος 0,5 έως 2 mm και μήκος 5 έως 35 mm. Άνθη παρουσιάζονται όταν υπάρχουν αρσενικά και θηλυκά φυτά στο ίδιο άτομο. Οι σπόροι του φυτού μπορούν να διαχυθούν μέσω των πάπιων (Al Borum, 2009).

Το θαλάσσιο φυτό *Cymodocea nodosa* εμφανίζεται σε ζεστά νερά και είναι διαδεδομένο στην περιοχή της Μεσογείου θάλασσας, γύρο από τις Κανάριους Νήσους και κάτω από την ακτή της Βόρειας Αφρικής. Εμφανίζεται σε αβαθείς περιοχές. Το μήκος των φύλλων είναι από 10 έως 45 cm και το πλάτος τους 2 έως 4 mm. Οι ρίζες είναι λεπτές και το ρίζωμα έχει πάχος 2 έως 6 mm. Οι βλαστοί ενώνονται σε κάθετα ριζώματα. Το χρώμα του ριζώματος μπορεί να είναι λευκό ή ρόζ. Τα άτομα του φυτού μπορεί να είναι είτε αρσενικά είτε θηλυκά, η ανθοφορία είναι σπάνια και εμφανίζεται τους μήνες Μάιο μέχρι και τον Αύγουστο (Al Borum, 2009).

Το φυτό *Posidonia oceanica* θεωρείται το κυρίαρχο ενδημικό είδος θαλάσσιας βλάστησης στην περιοχή της Μεσογείου και καλύπτει τεράστιες εκτάσεις μέχρι 60 m βάθος (Mats Bjork, Fred Short, 2008). Είναι μακρόβιο είδος που ζει 4 έως 30 χρόνια (Hovey, Cambridge, & Kendrick, 2011). Το είδος αυτό ευημερεί σε θερμοκρασίες 13-26 °C. Το φυτό θεωρείται από τα πιο αναπαραγωγίσιμα στην Μεσόγειο θάλασσα. Το μήκος του ριζώματος του μπορεί να φτάσει τα 156 cm και έχει ρίζες που αναπτύσσονται κάτω από την επιφάνεια του ιζήματος. Τα φύλλα ζουν 5 έως 8 μήνες και έχουν πλάτος μικρότερο των 5 cm. Η άνθιση γίνεται όταν υπάρχει ζεστή και διαφέρει ανάλογα με το βάθος του νερού (Al Borum, 2009). Η ανάπτυξη

του *Posidonia oceanica* επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως το φως, η αλμυρότητα και η θερμοκρασία. Το φως μειώνεται με το βάθος έτσι μειώνεται και η φωτοσύνθεση από το φυτό. Το ποσοστό της αλμυρότητας, δηλαδή πόσα άλατα είναι διαλυμένα στη θάλασσα, επιδρά στην αλατότητα των θαλασσών και κατά συνέπεια αλλάζει η οσμωτική πίεση στα κύτταρα του φυτού. Τέλος τα λιβάδια αναπτύσσονται σε θερμά περιβάλλοντα με ακραίες θερμοκρασίες.

1.3 Σημαντικότητα θαλάσσιων λιβαδιών

Τα θαλάσσια λιβάδια λαμβάνουν μέρος σε πολλές οικολογικές διεργασίες και παίζουν καθοριστικό ρόλο σε αυτές. Τα θαλάσσια λιβάδια έχουν τη δυνατότητα να καθαρίζουν το νερό και να βελτιώνουν την ποιότητά του. Τα φύλλα των λιβαδιών μπορούν να μειώνουν την κίνηση των νερών με αποτέλεσμα τα αιωρούμενα σωματίδια να καθιζάνουν και λειτουργούν ως ένα φίλτρο για τα παράκτια ύδατα. Στην κατακράτηση των αιωρούμενων σωματιδίων συμβάλουν και οι οργανισμοί που ζουν πάνω στο φυτό μέσω της σύλληψής τους ή μέσω της βλέννας που δημιουργούν πάνω στα λιβάδια οι διάφοροι οργανισμοί (Al Borum, 2009). Τα θαλάσσια λιβάδια, διατηρούν και σταθεροποιούν τα ιζήματα. Αυτό είναι ευεργετικό γιατί αναπτύσσονται διάφορα είδη θαλάσσιων λιβαδιών και αναπτύσσεται ένα μεγάλο σύστημα φύλλων, ριζωμάτων και ριζών, τα οποία μειώνουν την επαναιώρηση του ιζήματος. Ακόμη η νεκρή ύλη από τα λιβάδια συσσωρεύεται στις ακτογραμμές και διαχέει την ενέργεια των κυμάτων προστατεύοντας τα ιζήματα (Al Borum, 2009). Επίσης υπάρχει και ένας μεγάλος αριθμός οργανισμών που χρησιμοποιεί τα λιβάδια ως βιότοπο. Δημιουργούν κρυψώνες για προστασία από την θήρευση και έτσι έχουμε την ποικιλία και στην πανίδα. Τα θαλάσσια λιβάδια παράγουν μεγάλα ποσοστά πρωτογενούς παραγωγής και είναι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί που διατηρούν τα ποσοστά διοξειδίου του άνθρακα σε αποδεκτά όρια. Τα νεκρά φυτά από τα λιβάδια αποσυντίθενται με αργό ρυθμό έτσι το ποσοστό διοξειδίου του άνθρακα που απελευθερώνεται αποθηκεύεται στο ίζημα και δεν επηρεάζεται η ποιότητα των θαλασσών (Hemminga, M.A., 2002; Orth et al., 2006). Τα θαλάσσια λιβάδια διαδραματίζουν σημαντικότατο ρόλο στα θαλάσσια οικοσυστήματα και τη διατήρησή τους (Hovey et al., 2011).

1.4 Θαλάσσιοι μικροοργανισμοί

Το 70% της επιφάνειας της Γης καλύπτεται από ωκεανούς, θάλασσες και άλλα υδατικά συστήματα. Μέσα στα θαλάσσια οικοσυστήματα συμπεριλαμβάνονται και τα οικοσυστήματα των μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί είναι βακτήρια, ιοί (αρχαία), μύκητες και πρωτίστα. Υπάρχουν πολλά είδη μικροοργανισμών που με την πάροδο των χρόνων εξελίχθηκαν και ανέπτυξαν διάφορα συστήματα για να ευδοκιμούν σε θαλάσσια περιβάλλοντα. Λόγο αυτών των διάφορων συστημάτων υπάρχει μια μεγάλη ποικιλομορφία (Munn, 2011).

Τα βακτήρια είναι μονοκύτταροι οργανισμοί και έχουν απλή δομή κυττάρων και ευρεία ποικιλία. Ομαδοποιούνται σύμφωνα με το 16s rRNA σε 80 φύλα και μόνο τα 20 είναι καλλιεργήσιμα (Munn, 2011). Από μελέτες το κυρίαρχο θαλάσσιο βακτήριο είναι πρωτεοβακτήριο το marine group. Η ομάδα αυτή έχει 5 είδη *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* και *Epsilonproteobacteria*. Το είδος *Gammaproteobacteria* έχει μέλη την οικογένεια *Vibrionaceae facultatively* και είναι αναερόβια βακτήρια. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει τα γένη: *Vibrio*, *Aliivibrio*, *Enterovibrio*, *Grimontia*, *Photobacterium*, και *Salinivibrio*. Τα διάφορα γένη δημιουργούν βιοφίλμ κατά τον αποικισμό τους στις επιφάνειες των θαλάσσιων λιβαδιών και μερικά από αυτά είναι παθογόνα για τον άνθρωπο. Τα βακτήρια που έχουν παθογόνα δράση στον άνθρωπο είναι: *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. shiloi*, *V. harbeyi* και *V. splendidus*. Κάποια μέλη από την οικογένεια *Vibrionaceae* είναι βιοφωταυγείς και τα συναντούμε εκτός από τα θαλάσσια λιβάδια και σε διάφορα όργανα θαλάσσιων ζώων. Στα βακτήρια αυτά παρουσιάζεται το ένζυμο λουσιφεράση το οποίο οξειδώνει το μονονουκλεοτίδιο φλαβίνης και παράγει γαλαζοπράσινο φως στα 490 nm (Munn, 2011).

Το γένος *Oceanospirillum* τα μέλη του έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν οργανικές ενώσεις. Η κατηγορία *Deltaproteobacteria* έχει το γένος *Bdellovibrio* που είναι ένα γένους gram αρνητικών βακτηρίων. Το βακτήριο αυτό όταν έρθει σε επαφή με την λεία του εκκρίνει ένα μίγμα ενζύμων και λιπιδίων για να διασπάσει το κυτταρικό τοίχωμα και να καταναλώσει το κυτταρόπλασμα του θηράματος. Το συγκεκριμένο βακτήριο είναι άγνωστη η οικολογική του σημασία και χρειάζεται περισσότερη μελέτη (Munn, 2011). Ένα άλλο σημαντικό είδος είναι τα κυανοβακτήρια τα οποία είναι συναρμολογητές αζώτου. Περιλαμβάνουν τα γένη *Prochlorococcus* και *Synechococcus*. Μεγάλης σημασίας βακτήρια είναι και τα μυκοβακτηρίδια. Είναι σαπρόφυτα σε ιζήματα, κοράλλια, ψάρια και φύκια. Τα βακτήρια

Actinomycetes αποικοδομούν πολυσακχαρίτες, λιπίδια και πρωτεΐνες. Πολλά αντιβιοτικά προέρχονται από αυτό το γένος.

Οι μικροβιακές κοινότητες των θαλάσσιων λιβαδιών δεν μελετήθηκαν σε βάθος παρά μόνο τα ιζήματα θαλάσσιων λιβαδιών (Benlloch et al., 2000). Τα διάφορα βακτήρια που βρέθηκαν σε διάφορα είδη λιβαδιών είναι *Vibrio*, *Alteromonas*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Marinobacter* και *Brochothrix* (Michel, Dauby, Dupont, Gobert, & Lepoint, 2015). Από το φυτό *Posidonia oceanica* συγκεκριμένα απομόνωσαν βακτήρια του γένους *Marinomonas*. Ακόμη βρέθηκε ότι η μεγαλύτερη ποσότητα βακτηρίων βρέθηκε στο ρίζωμα, ρίζες και φύλλα (Espinosa et al., 2010). Με βάση την αλληλουχία 16 s rRNA τα βακτήρια που βρέθηκαν ήταν *Vibrio spp.*, *Marinomonas spp.*, και *Desulfonivibrio zosterae* από τις ρίζες (Ivanova, 2004).

Οι μικροβιακές κοινότητες των θαλάσσιων λιβαδιών πρέπει να μελετηθούν σε μεγαλύτερο βάθος αφού υπάρχουν πολλά και διαφορετικά είδη μικροοργανισμών που δεν ανακαλύφθηκαν (Munn, 2011).

Τα αρχαία αναπτύσσονται σε θερμόφιλες και αλόφιλες συνθήκες με διάφορες ποικιλίες στα διάφορα θαλάσσια περιβάλλοντα. Υπάρχουν δύο μεγάλα φύλα αρχαίων το *Euryarchaeota* και *Crenarchaeota*. Πολλά μέλη από το φύλο *Euryarchaeota* παράγουν μεθάνιο. Τα μέλη του φύλου *Crenarchaeota* είναι λειτουργικά και παραγωγικά στα βαθύτερα στρώματα της θάλασσας και παίζουν σημαντικό ρόλο στην νιτροποίηση και σταθεροποίηση του διοξειδίου του άνθρακα. Τα αρχαία αναπτύσσονται σε ακραίες συνθήκες και για αυτό παρουσιάζουν μεγάλα ποσοστά στην Ανταρκτική (Munn, 2011).

Οι ιοί είναι μη κυτταρικά συστήματα. Το χαρακτηριστικό των περισσότερων ιών στο θαλάσσιο οικοσύστημα είναι το καψίδιο και αποτελείται από νουκλεϊκά οξέα και περιβάλλεται από πρωτεΐνες. Οι ιοί κυριαρχούν στη θάλασσα σε σχέση με τα προκαρυωτικά. Μπορούν να μολύνουν ακραία θερμόφιλα ή αλόφιλα βακτήρια. Κατά συνέπεια μολύνεται το νερό και τα θαλάσσια φύκια. Επίσης προκαλούν προβλήματα στους θαλάσσιους οργανισμούς (Nagasaki et al., 2004; Shirai et al., 2008).

Οι μύκητες είναι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που αποικούν σε χερσαία, υδάτινα και θαλάσσια οικοσυστήματα και διαδραματίζουν σημαντικό οικολογικό ρόλο. Οι μύκητες χωρίζονται σε 3 κατηγορίες *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* και *Zygomycetes*. Οι θαλάσσιοι μύκητες αναπτύσσονται σε ιζήματα, ξύλα, σάπια φύλλα, χόρτα και σε θαλάσσια ζώα. Οι μύκητες έχουν ως κύρια λειτουργία την αποσύνθεση ποωδών στοιχείων. Δηλαδή

υποβαθμίζουν την λιγνοκυτταρίνη. Ακόμη μια λειτουργία των μυκήτων είναι η αποικοδόμηση νεκρών ζώων και γιαυτό το λόγο μερικοί μύκητες καθιστούνται παθογόνοι σε θαλάσσια φυτά και ζώα. Σε διάφορες μελέτες θαλάσσιοι μύκητες χρησιμοποιήθηκαν για παραγωγή αιθανόλης (Munn, 2011). Οι μύκητες εμφανίζονται πιο συχνά σε ρηχά νερά και πιο σπάνια σε βαθιά νερά (Geir H. Mathiassen, Inger G. Alsos, Håvard Kausrud, Lennart Nilsen, Jenni Nordén, 2014).

Οι μύκητες ως συνήθως χρησιμοποιούν τα σφουγγάρια της θάλασσας ως βιότοπο. Έχουν ισχυρή συσχέτιση τα σφουγγάρια της θάλασσας με τους μύκητες αλλά παραμένει ασαφής (Gnavi, Ercole, Panno, Vizzini, & Varese, 2014).

Υπάρχουν οι ενδοφυτικοί μύκητες που ζουν στα διάφορα όργανα του φυτού και σε κάποια στιγμή αποικούν χωρίς να βλάπτουν το ξενιστή. Για τους μύκητες στα θαλάσσια λιβάδια υπάρχουν λίγες πληροφορίες και ακόμη πιο λίγες είναι διαθέσιμες. Διάφορα είδη που απομονώθηκαν από θαλάσσια λιβάδια είναι *Penicillium sclerotiorum*, *Aspergillus granulatus*, *Candida utilis*, *Penicillium* spp., *Hypocreales* sp., *Cladosporium* sp., *Phialophora* sp., *Talaromyces* sp., *Sporobolomyces holsaticus*, *Gamsia* sp., *Fusarium* sp., *Acremonium* sp., *Alternaria* sp., *Paecilomyces* sp., και *Arthriniium arundinis*. Συγκεκριμένα τα είδη που απομονώθηκαν από το φυτό *Posidonia oceanica* είναι: *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Stachylidium*, *Phaeocryptopus*, *Pyrenochaete* και *Phialophora* (Benlloch et al., 2000).

Τέλος σε διάφορα άρθρα θαλάσσιοι μύκητες παράγουν ποικιλίες ενζύμων όπως: πηκτινάση, ξυλάση, φαινολάση, λακκάσες και μαγγάνιο υπεροξειδάσης (E. B. G. Jones et al., 2015).

1.5 Ρύπανση θαλασσών με έμφαση στα βαρέα μέταλλα

Τα προγράμματα περιβαλλοντικής παρακολούθησης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πληροφόρηση γύρω από σημαντικά ζητήματα που αφορούν την υγεία του ανθρώπου αλλά και τις επιπτώσεις στο οικοσύστημα. Πρόσφατες μελέτες επικεντρώνονται στους κινδύνους που ενέχει στην ανθρώπινη υγεία η κατανάλωση θαλάσσιων ειδών τα οποία εκτίθενται σε ενώσεις που βρίσκονται στο θαλάσσιο περιβάλλον. Μεταξύ αυτών βαρέα μέταλλα από ανθρωπογενή ή φυσική προέλευση, έχουν αναγνωριστεί ως οι πιο συχνοί και επαναλαμβανόμενης έκθεσης ρύποι στο θαλάσσιο περιβάλλον. Η ραγδαία βιομηχανική ανάπτυξη με συνέπεια την παραγωγή μεγάλων όγκων αποβλήτων οδηγεί στην εναπόθεση αυτών σε ποταμούς, λίμνες ή και θάλασσες. Στη Μεσόγειο θάλασσα την τελευταία δεκαετία

υπολογίζεται η εναπόθεση 650.000.000 τόνων λυμάτων, 129.000 τόνων ορυκτέλαιου, 60.000 τόνων υδραργύρου και 36.000 τόνων φωσφορικών αλάτων (Βαλαβανίδης, 2014).

Μεγάλο μέρος αποβλήτων, λόγω της μη ή δύσκολης βιοαποικοδόμησης τους και της επιμονής τους μπορούν να συσσωρεύονται σε περιβαλλοντικά μέσα και στην τροφική αλυσίδα επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο την ανθρώπινη υγεία.

Τα ψάρια με τη διήθηση νερού ή τη κατανάλωση μικρότερων ψαριών, ιζημάτων ή άλλων υδρόβιων οργανισμών εισάγουν και πολλά βαρέα μέταλλα με μη αντιστρεπτό τρόπο (Jayarabha, 2014). Δηλαδή, δεν υπάρχει κάποιος τρόπος αποβολής των βαρέων μετάλλων από τον οργανισμό των ψαριών γιατί τα βαρέα μέταλλα δημιουργούν ισχυρούς δεσμούς με διάφορα όργανα και ιστούς στον οργανισμό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, μέσω της τροφικής αλυσίδας και της κατανάλωσης ψαριών από τον άνθρωπο, σημαντικές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων όπως μόλυβδος, κάδμιο, σίδηρος, χαλκός να καταλήγουν στον άνθρωπο (Yang, Yao, Xu, Jiang, & Xin, 2007, Jayarabha et al., 2014). Επομένως, κρίνεται αναγκαία η διερεύνηση της βιοσυσώρευσης βαρέων μετάλλων στα ψάρια αφού αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής του ανθρώπου.

Τα βαρέα μέταλλα έχουν 5 φορές μεγαλύτερη πυκνότητα από αυτή του νερού. Η τοξικότητά τους εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως, η δόση, η οδός έκθεσης και η ηλικία. Μπορεί να προκαλέσουν καρκίνο, εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος, εγκεφαλικά προβλήματα, στειρότητα, προβλήματα σε έμβρυα. Τα βαρέα μέταλλα τα οποία χαρακτηρίζονται επικίνδυνα λόγω των μικρών ποσοτήτων που χρειάζεται για να δημιουργήσουν πρόβλημα είτε στον άνθρωπο είτε σε κάποιο ζώο ή φυτό είναι το αρσενικό, κάδμιο, χρώμιο, μόλυβδος και ο υδράργυρος. Βαρέα μέταλλα τα οποία βιοσυγκεντρώνονται ή βιοσυσσωρεύονται στους ιστούς των ψαριών μπορεί να προκαλέσουν ακόμη και θάνατο (Toxicity & Species, 2014, Tchounwou, Yedjou, Patlolla, & Sutton, 2012).

Τα βαρέα μέταλλα βρίσκονται γύρω από το φλοιό της γης και μέσω της διάβρωσης μπορεί να γίνει ρύπανση υπόγειων υδάτων. Επίσης έκθεση σε βαρέα μέταλλα μπορεί να συμβεί από εκρήξεις ηφαιστειών, αλλά η κυριότερη αιτία ρύπανσης είναι οι ανθρωπογενείς δραστηριότητες όπως οι μεταλλουργικές επιχειρήσεις, γεωργικές χρήσεις, βαριές βιομηχανικές παραγωγές, σταθμοί παραγωγής ηλεκτρικής ενέργειας, πυρηνικά εργοστάσια, εργοστάσια υφασμάτων και μονάδες επεξεργασίας χαρτιού (Tchounwou et al., 2012).

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα βαρέα μέταλλα όπως ο χαλκός, το ασβέστιο και το μαγνήσιο σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις μπορεί να είναι ευεργετικά για τα φυτά, τα ζώα και τον άνθρωπο. Για παράδειγμα ο χαλκός χρησιμεύει σε αρκετές οξειδώσεις ενζύμων. Ωστόσο μικρές διαφοροποιήσεις στις συγκεντρώσεις των μετάλλων οδηγούν σε διάφορες ανεπιθύμητες ασθένειες και παρενέργειες όχι μόνο στα φυτά και ζώα αλλά και στον άνθρωπο (Tchounwou et al., 2012).

Η εστίαση της βιβλιογραφικής ανασκόπησης έγινε στα βαρέα μέταλλα As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn, Mo, Ni, Se και Zn επειδή είναι τα βαρέα μέταλλα τα οποία μπορούν σε ελάχιστες συγκεντρώσεις να αλλοιώσουν το φυσικό περιβάλλον με προβλήματα στην βιοποικιλότητα και κατ'έκταση στον άνθρωπο. Το αρσενικό (As) είναι μέταλλο και μπορεί να απελευθερωθεί στην ατμόσφαιρα ως τριοξείδιο. Μπορεί εύκολα να προσροφηθεί στο έδαφος σε λίμνες και θάλασσες. Μπορεί να απελευθερωθεί με φυσικούς τρόπους όπως ηφαιστεια, από τη βλάστηση, φυτοφάρμακα, επεξεργασία ξύλου με συντηρητικά και από γεωλογικές εναποθέσεις. Ανάλογα με το επίπεδο και τη συχνότητα έκθεσης στον άνθρωπο μπορεί να προκαλέσει δερματικές βλάβες, περιφερική νευροπάθεια, γαστρεντερικά συμπτώματα, διαβήτη, νεφρικές επιδράσεις συστήματος, των καρδιαγγειακών παθήσεων και καρκίνο. Το αρσενικό μπορεί να προσληφθεί από θαλάσσιους οργανισμούς μέσω οργανικών ενώσεων χαμηλής τοξικότητας. Η πρόσληψη αρσενικού μέσω θαλασσινών δεν περιέχει μεγάλο κίνδυνο για την υγεία του ανθρώπου. Όταν προκληθεί οξεία δηλητηρίαση από το αρσενικό τα άμεσα συμπτώματα είναι εμετός, πόνος στην κοιλιά, μούδιασμα στα άκρα και σε ακραίες περιπτώσεις θάνατο (Disease & Healthy, 2001).

Το κάδμιο (Cd) είναι ένα στοιχείο το οποίο με διάφορες ενώσεις που δημιουργούνται μαζί του μπορεί να προκαλέσει καρκίνο. Χρησιμοποιείται στον καθαρισμό μετάλλων, περιέχεται στα καυσαέρια των αυτοκινήτων. Προσροφάται εύκολα στα φυτά και μέσω της τροφικής αλυσίδας μεταφέρεται στον άνθρωπο. Μπορεί να βιοσυσσωρεύεται σε μικροοργανισμούς, φυτά και ζώα. Στα υδρόβια μακρόφυτα και ψάρια παρουσιάζει 50 και 100 φορές βιοσυγκέντρωση σε σχέση με το νερό. Στα ψάρια συσσωρεύεται κυρίως στο ήπαρ, βράγχια και νεφρά. Στα υδρόβια φυτά βιοσυσσωρεύεται στις ρίζες και στον κορμό. Το κάδμιο μπορεί να προκαλέσει καρκίνο του προστάτη, παθήσεις στους πνεύμονες, στο συκώτι, στα νεφρά και στα οστά. Ακόμη η τοξικότητα του μετάλλου μπορεί να μεγιστοποιηθεί όταν αντιδράσει με το οξυγόνο. Λόγω της μεγάλης ρύπανσης που προκαλεί το κάδμιο σε πολλές χώρες όπως στην Δανία έχει απαγορευτεί η χρήση του από το 1980 (Χαλάρη, 2006).

Το κοβάλτιο (Co) είναι μέταλλο με κυανό χρώμα. Δεν αντιδρά εύκολα με το οξυγόνο μόνο σε μεγάλες θερμοκρασίες. Το κοβάλτιο χρησιμοποιείται σε καταλύτες, ίνες χρωμάτων και στην επεξεργασία χαρτιού. Συμπλοκοποιείται εύκολα με άλλες ουσίες και μπορεί να διαλυτοποιηθεί σε διάφορα υγρά, λίμνες και θάλασσες (Λαδά, 2012). Επίσης μπορεί να προσροφηθεί σε διάφορα σωματίδια. Μπορεί να προκαλέσει γενετικές βλάβες με επακόλουθο την καρκινογένεση στον πνεύμονα. Ακόμη, μπορεί να προκαλέσει σε μεγάλες συγκεντρώσεις διάφορα είδη νόσων (Κουρουτού, Κάλης, Χατζησταύρου, & Λινού, 2012).

Το χρώμιο (Cr) είναι ένα μέταλλο, το οποίο συγκαταλέγεται μέσα στους σημαντικότερους ρύπους. Έχει μεγάλη βιομηχανική χρήση με αποτέλεσμα να διαφεύγουν μεγάλες ποσότητες χρωμίου στο περιβάλλον. Το χρώμιο μπορεί εύκολα να διαλυτοποιηθεί στο νερό, δεν διαβρώνεται και μπορεί να υπάρξει μόνο του στην ατμόσφαιρα. Μπορεί να βρεθεί σε εδάφη και σε θάλασσες μέσω φυσικών ή ανθρωπογενών δραστηριοτήτων. Το χρώμιο σε μικρές ποσότητες δρα ευεργετικά για τους ζωντανούς οργανισμούς όμως σε μορφή χρωμίου Cr (III). Σε αντίθετη περίπτωση όταν βρίσκεται σε μορφή Cr (VI) δημιουργεί διάφορα προβλήματα. Μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο γενετικό υλικό, εμβρυικές μεταλλάξεις, μεταλλάξεις στους ιστούς του σώματος και προβλήματα στην αναπαραγωγή. Η Ε.Ε έχει θεσπίσει ανώτατο όριο χρωμίου στο νερό 50 μg/L (Μιχαηλήδη, 2015).

Ο χαλκός (Cu) είναι ένα από τα σημαντικότερα μέταλλα για τον άνθρωπο τα ζώα και τα φυτά. Αποτελεί σημαντικό συστατικό για διάφορες διεργασίες ενζύμων τόσο στα φυτά όσο και στον άνθρωπο. Ο χαλκός σε διάφορες συγκεντρώσεις μπορεί να γίνει τοξικός και να επηρεάσει την ανθρώπινη υγεία. Η φυσιολογική συγκέντρωση στον άνθρωπο 70 kg σε όλο το σώμα είναι 100-150 mg. Η λιγότερο απαιτούμενη συγκέντρωση χαλκού στον άνθρωπο προκαλεί αναιμία και οι αυξημένες ποσότητες χαλκού την ασθένεια Wilson (Μετεντζόγλου, 2009).

Ο σίδηρος (Fe) είναι απαραίτητο μέταλλο το οποίο συμβάλει σε πολλές βιολογικές διαδικασίες όπως την σύνθεση πορφυρίνης και αιμογλοβίνης (Βασιλάκη, 2012). Έχει ευρεία εφαρμογή στο ναυτιλιακό τομέα αφού είναι το κύριο συστατικό κατασκευής πλοίων. Πολλές φορές ο σίδηρος είτε φυσικά ή λόγω ανθρώπινων παραγόντων καταλήγει στη θάλασσα. Συνήθως βρίσκεται στα θαλάσσια ιζήματα σε μορφή οξειδίου του σιδήρου και βοηθά στα χουμικά και άλλες οργανικές ενώσεις να οξειδωθούν. Είναι ενδιάμεσης τοξικότητας για τους θαλάσσιους οργανισμούς. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σιδήρου η τυχόν πρόσληψή του από θαλάσσιους οργανισμούς μπορεί να προκαλέσει αναστολή διάφορων ενζυμικών

δραστηριοτήτων, αντίδραση με νουκλεϊκά οξέα, καταστροφή λυσοσωμάτων και κυτταρικών μεμβρανών (Αρβανίτης, 2006).

Ο μόλυβδος (Pb) είναι από τα πιο τοξικά βαρέα μέταλλα με τεράστιες επιπτώσεις σε διάφορους οργανισμούς. Οι περισσότερες εκπομπές μολύβδου προέρχονται από ανθρωπογενείς δραστηριότητες. Οι θαλάσσιοι οργανισμοί προσλαμβάνουν το μόλυβδο από το δέρμα, τα βράγχια ή από τροφές που περιέχουν μόλυβδο. Βρέθηκε να συγκεντρώνεται κυρίως στα λιπίδια των μεμβρανών. Από το συνολικό μόλυβδο που προσλήφθηκε από τους θαλάσσιους οργανισμούς το 50 % παραμένει στους πνεύμονες ενώ το 8-18% απορροφάται από τον οργανισμό και το υπόλοιπο απομακρύνεται μέσω των κοπράνων. Ο μόλυβδος αναστέλλει διάφορα ένζυμα και επηρεάζει το αιματολογικό και νευρικό σύστημα. Επίσης σε μεγάλες συγκεντρώσεις επηρεάζονται οι μαθησιακές ικανότητες των παιδιών (Frumkin, Howard Louise, 2007).

Το μαγγάνιο (Mn) είναι ένα θρεπτικό μέταλλο για τον άνθρωπο το οποίο όμως σε μεγάλες συγκεντρώσεις μπορεί να γίνει τοξικό. Ρυθμίζει τις νευροψυχολογικές αλλαγές και προκαλεί την νόσο Πάρκινσον. Το μαγγάνιο αντικατέστησε το μόλυβδο μέσα στη βενζίνη με αποτέλεσμα πολλές ποσότητες αυτού του μετάλλου να βρεθούν στην ατμόσφαιρα. Αυτό είχε ως επακόλουθο να επηρεάσει αρνητικά σε νεαρά παιδιά την ικανότητα μάθησης και να αυξήσει την τάση βίας στους ενήλικες. Τα όρια για το μαγγάνιο για πρόσληψη μέσω αναπνοής είναι 10.000 g/ημέρα, στα τρόφιμα 2.000 g/ημέρα και στην ατμόσφαιρα 0,5 g/m³ (Finley, 2004).

Το μολυβδαίνιο (Mo) συνδέεται με γρανιτικά και όξινα πετρώματα επίσης βρίσκεται και στην επεξεργασία πετρελαίου (Papastergios, 2015). Το μολυβδαίνιο είναι ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο για όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς γιατί λειτουργά σαν συνένζυμο σε σημαντικές καταλυτικές αντιδράσεις όπως μετασχηματισμούς άνθρακα, αζώτου. Το μολυβδαίνιο έχει την τάση να συγκεντρώνεται στο συκώτι, νεφρά, κόκκαλα και δέρμα. Η ευρωπαϊκή ένωση δεν έχει θέση κάποιο όριο για το μολυβδαίνιο.

Το νικέλιο (Ni) είναι ένα από τα πέντε μέταλλα που φέρουν μαγνητικές ιδιότητες μπορεί να προκαλέσει καρκινογένεση όταν αντιδρά με το οξυγόνο. Η έκθεση νικελίου προκαλεί σχηματισμό ελευθέρων ριζών σε διάφορους ιστούς όχι μόνο στον άνθρωπο αλλά και στα ζώα με αποτέλεσμα να τροποποιούνται διάφορες βάσεις DNA και να υπεροξειδώνονται λιπίδια και πρωτεΐνες (Daw, K K, 2008). Η φυσιολογική συγκέντρωση νικελίου σε άνδρα 70 kg

είναι 0,2 µg/L. Η μεγαλύτερη έκθεση νικελίου στο ανθρώπινο σώμα παρατηρήθηκε να είναι μέσο του πόσιμου νερού (Daw, K K, 2008).

Το σελήνιο (Se) είναι μέταλλο απαραίτητο για τον ανθρώπινο οργανισμό σε ποσότητες ιχνοστοιχείων. Παρόλα αυτά σε μεγάλες ποσότητες μπορεί να προκαλέσει δηλητηριάσεις ακόμη και θάνατο. Συνήθως η έκθεση σε σελήνιο γίνεται μέσω βιομηχανικών ατυχημάτων (Gerberding Louise, 2003). Το σελήνιο μπορεί να πάρει διαφορετικές μορφές με διαφορετικό βαθμό τοξικότητας. Διάφορες εργαστηριακές μελέτες παρουσιάζουν διαφορετικό όριο τοξικότητας του σεληνίου λόγω των διαφορετικών μορφών που μπορεί να πάρει. Οι τιμές τοξικότητας στον άνθρωπο είναι 126-269 µg/L (Gerberding Louise, 2003).

Ο ψευδάργυρος (Zn) είναι ένα μέταλλο απαραίτητο για την σωστή λειτουργία του ανθρώπινου σώματος. Η δηλητηρίαση από ψευδάργυρο είναι πολύ σπάνια και απαιτεί μεγάλες ποσότητες ψευδαργύρου (Allowance, 1990). Το μεγαλύτερο πρόβλημα στον άνθρωπο παρουσιάζεται όταν υπάρχει έλλειψη ψευδραργύρου το οποίο προκαλείται από τον υποσιτισμό, γήρανση και από απορρύθμιση ομοιόστασης. Το LD₅₀ του ψευδάργυρου για τον άνθρωπο είναι γύρο στα 3 g/Kg σωματικού βάρους δηλαδή 10 φορές μεγαλύτερη από το κάδμιο και 50 από τον υδράργυρο (M. Jones, Schoenheit, & Weaver, 1979).

1.5.1 Συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων σε διάφορα είδη ψαριών

Οι αυξημένες βιομηχανικές δραστηριότητες οδηγούν σε αυξημένα βιομηχανικά απόβλητα από τα οποία κάποια καταλήγουν στις θάλασσες. Οι θάλασσες ρυπαίνονται από τα απόβλητα με διαφόρων τύπων απορριμμάτων. Μέσα στα απορρίμματα υπάρχουν και διάφορα βαρέα μέταλλα που επηρεάζουν αρνητικά την ποιότητα των θαλασσών και οδηγούν σε θανάτους διάφορων ψαριών (Zeitoun & Mehana, 2014). Τα μέταλλα βρίσκονται σε διάφορες φάσης στη θάλασσα όπως σωματίδια ή σε ιόντα. Τα μέταλλα που είναι σε μορφή ιόντων είναι και η μεγαλύτερη απειλή για τα ψάρια και γενικότερα για όλους τους θαλάσσιους οργανισμούς γιατί μπορεί να εισχωρήσουν στους ιστούς των ψαριών ή φυτών πιο εύκολα. Συνήθως οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων στα ψάρια είναι Fe>Zn>Pb>Cu>Cd>Hg (Zeitoun & Mehana, 2014). Διάφορες έρευνες έδειξαν ότι η μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων παρουσιάζονται στους μύες, το συκώτι, στα βράγχια και στους νεφρούς (Valon et al., 2013).

Οι αυξομειώσεις των συγκεντρώσεων των μετάλλων στα ψάρια μπορεί να οδηγήσουν σε εγκεφαλικές ζημιές, παραμόρφωση γόνων, αναπηρία και δυσλειτουργίες στο ανοσοποιητικό σύστημα (Velcheva et al., 2010). Επίσης εκτός από βλάβη σε διάφορα όργανα όπως συκώτι, βράγχια και εγκέφαλο μπορεί να προκληθεί και θάνατος (Jarup, 2003; Valon et al., 2013; Velcheva et al., 2010; Zeitoun & Mehana, 2014).

1.5.2 Συγκέντρωση βαρέων μετάλλων στο θαλάσσιο φυτό *Posidonia oceanica*

Οι αυξημένες ποσότητες μετάλλων στις θάλασσες μπορούν να βιοσυσσωρευτούν όχι μόνο σε θαλάσσιους οργανισμούς αλλά και σε διάφορα θαλάσσια φυτά. Στην μεσόγειο θάλασσα το κυριότερο θαλάσσιο φυτό που παρουσιάζεται είναι η *Posidonia oceanica*. Σε αυτά τα θαλάσσια λιβάδια παρουσιάζεται μεγάλη σταθερότητα του ενδιαιτήματος αφού είναι περιοχή για αναπαραγωγή από ψάρια, κυνήγι και βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης. Σε περίπτωση καταστροφής των θαλάσσιων λιβαδιών αυτόματα χάνεται μεγάλο μέρος της θαλάσσιας βιοποικιλότητας. Για αυτό το λόγο χρειάζεται έρευνα και σύγκριση των βέλτιστων συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων του θαλάσσιου φυτού *Posidonia oceanica* στην Κύπρο με θαλάσσια φυτά *Posidonia oceanica* από άλλες χώρες.

Σε επιστημονική έρευνα βαρέων μετάλλων που έγινε στην Ιταλία στην περιοχή της Σικελίας το 2012 βρέθηκαν οι συγκεντρώσεις των ακόλουθων μετάλλων με την χρήση του οργάνου ανάλυσης φασματόμετρο μάζας με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα όπως φαίνονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1: Συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων στο θαλάσσιο φυτό *Posidonia oceanica* στην περιοχή της Σικελίας

Μέταλλα	Συγκέντρωση µg/g ξηρής βιοµάζας
As	1,9±0,07
Cd	0,065±0,001
Cr	2,66±0,32
Cu	1,66±0,05
Pb	1,90±0,06
Zn	23,05±2,05
Ni	2,63±0,39
Se	0,238±0,05
Hg	0,442±0,02

Παρατηρείται ότι τα μέταλλα Cd, Se και Hg έχουν την χαμηλότερη συγκέντρωση στο φυτό και το μέταλλο Zn την μεγαλύτερη συγκέντρωση. Τα μέταλλα As, Cr, Cu, Pb και Ni κυμαίνονται μεταξύ 1,5 έως 2,6 µg/g ξηρής βιομάζας.

1.5.3 Τρόπος ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης βαρέων μετάλλων

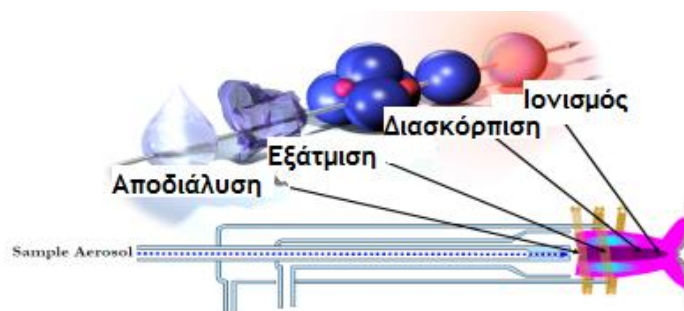
Ένας αξιόπιστος τρόπος μέτρησης των βαρέων μετάλλων είναι το φασματόμετρο μάζας με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP/MS). Το όργανο αυτό βασίζεται σε 4 ξεχωριστές λειτουργίες: (i) τη μεταφορά του δείγματος για παραγωγή ιόντων, (ii) μεταφορά των ιόντων σε σύστημα κενού με εστίαση των ιόντων σε ηλεκτροστατικούς φακούς, (iii) το διαχωρισμό ιόντων ανάλογα μάζα/φορτίο από τετράπολο φίλτρο και τέλος (iv) την ανίχνευση των ιόντων μάζας από τα ιόντα που διαχωρίστηκαν από το τετράπολο φίλτρο (Xseries, n.d.).

Συγκεκριμένα αντλία 3 καναλιών μεταφέρει το υγρό δείγμα στον εκνεφωτή. Ρεύμα αργού με υψηλή ταχύτητα χρησιμοποιείται για τη δημιουργία αεροζόλ δείγματος. Στο όργανο τοποθετούνται 0,8 mL/min αλλά ο αρχικός όγκος εξαρτάται και από το ιζώδες του δείγματος.

Το όργανο λειτουργά ιδανικά με σταγόνες δείγματος μικρότερες των 10 μm. Για την επίτευξη αυτού του μεγέθους γίνεται χρήση θαλάμου ψεκασμού. Στο θάλαμο γίνεται διαχωρισμός των σταγονιδίων και περνούν στο πλάσμα τα επιτρεπτά για το όργανο σταγονίδια. Ο νεφελοποιητής είναι το όργανο που δημιουργεί τις σταγόνες μόνο το 1% των αρχικών σταγονιδίων έχει το σωστό μέγεθος το υπόλοιπο απορρίπτεται. Το διάλυμα δεν πρέπει να περιέχει στερεά σωματίδια γιατί υπάρχει κίνδυνος φράξεις του οργάνου (Xseries).

Σημαντικό μέρος του οργάνου είναι το πώς δημιουργείται το πλάσμα. Υπάρχει μια σχέση μεταξύ ροής, συχνότητας RF και ενέργειας. Το αέριο αργό περνά από το χαλαζία στον άξονα του πηνίου. Το πηνίο παίρνει δύναμη από μια γεννήτρια ραδιοκυμάτων RF και δημιουργείται μαγνητικό πεδίο ραδιοσυχνότητας. Το υπάρχον πεδίο δεν μπορεί να αντιδράσει με το φέρον αέριο γιατί είναι αδρανές το αέριο. Έτσι το αέριο περνά από ένα πηνίο τέσλα και δημιουργούνται θετικά ιόντα αργού. Έτσι παύει να είναι αδρανές το αέριο και αντιδρά με το μαγνητικό πεδίο RF και σχηματίζεται πλάσμα δηλαδή ελεύθερα ηλεκτρικά φορτισμένα ατομικά σωματίδια και ηλεκτρόνια (8000-10000 K) στο εσωτερικό του φακού. Τέλος το δείγμα περνά από το πλάσμα και ιονίζεται (Xseries).

Συνοπτικά το δείγμα υπόκειται σε: αποδιάλυση, εξάτμιση, διασκόρπιση και ιονισμό όπως φαίνεται στην πιο κάτω εικόνα. Σε θερμοκρασία πλάσματος τα περισσότερα στοιχεία γίνονται θετικά ιόντα και δημιουργείται ένα απλό φάσμα μάζας που μπορεί να μετρηθεί.

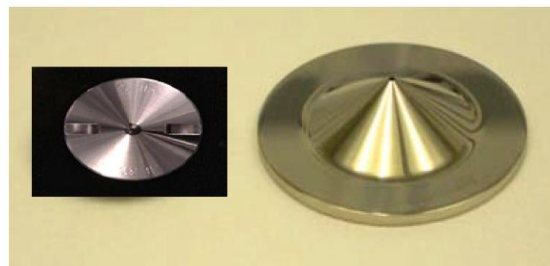


Εικόνα 1: Τα 4 στάδια που υπόκειται το δείγμα στο όργανο ICP/MS (Xseries).

Το αέριο για να ιονιστεί και να γίνει πλάσμα χρειάζεται δυναμικό 15,8 ev σε θερμοκρασία 75000 K. Αυτό συνεπάγει ότι το 80% των στοιχείων ιονίζονται και φτάνουν σε ποσοστό ιονισμού περισσότερο από 75%. Ακόμη κάποια στοιχεία χρειάζονται λιγότερο δυναμικό και μπορεί να παρατηρηθεί φάσμα μάζας στο μισό της αρχικής όπως για παράδειγμα το 138 Ba

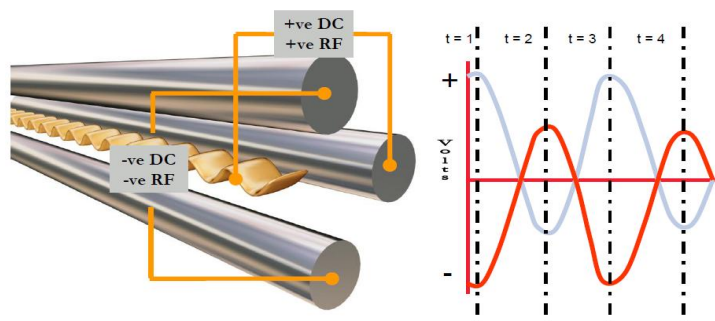
⁺⁺ σε 69 Βα. Έτσι το δυναμικό ιονισμού μπορεί να φανερώσει τι στοιχεία υπάρχουν στο δείγμα. Εκτός από το δυναμικό ιονισμού που είναι ξεχωριστό για κάθε στοιχείο άλλος παράγοντας για να φανερώσει τι στοιχεία υπάρχουν στο δείγμα είναι τα ισότοπα. Κάποια στοιχεία έχουν μόνο ένα ισότοπο και άλλα είναι πολύ ισοτοπικά (Xseries).

Το μέρος του οργάνου το οποίο δέχεται το δείγμα είναι φτιαγμένο από υλικά που έχουν θερμική και ηλεκτρική αγωγιμότητα όπως και χημική αντοχή και είναι από Ni/Cu. Πρέπει να αλλαχτεί το συγκεκριμένο μέρος του οργάνου (κώνος) όταν θα γίνει χρήση οξυγόνου από υλικό Pt το οποίο δεν προσβάλλεται από το οξυγόνο.



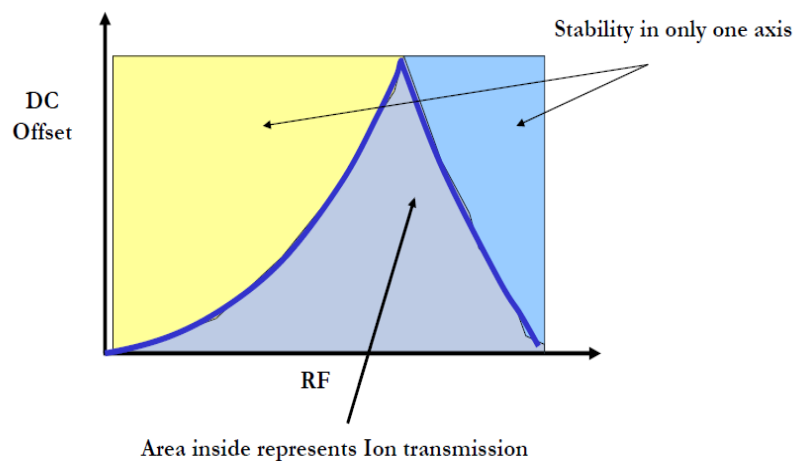
Εικόνα 2: Κώνος από Ni/Cu αριστερά και από Pt δεξιά (Xseries)

Αφού το δείγμα ιονιστεί πρέπει να γίνει ο διαχωρισμός των ιόντων από το τετράπολο φίλτρο. Στο τετράπολο φίλτρο υπάρχουν 2 ράβδοι οριζόντιοι και δύο κατακόρυφοι. Οι δύο οριζόντιοι τροφοδοτούνται με θετική τάση και οι δύο κάθετοι με αρνητική τάση. Έτσι τα ιόντα κινούνται ανάλογα με την τάση που εφαρμόζεται στο τετράπολο φίλτρο (Xseries).



Εικόνα 3: Τετράπολο φίλτρο (Xseries)

Τα ιόντα εκτελούν συγκεκριμένες πορείες με συγκεκριμένη συχνότητα και μόνο ένα ιόν μπορεί να περάσει από το φίλτρο κάθε φορά. Έτσι καταγράφεται μια γραφική παράσταση DC (εναλλασσόμενο ρεύμα) vs RF (συχνότητες) που εφαρμόζεται στις ράβδους και δημιουργείται η πορεία του ιόντος μέσα στο φίλτρο. Με συγκεκριμένα DC vs RF δημιουργούνται συγκεκριμένες γραφικές για κάθε στοιχείο επειδή μόνο ένα συγκεκριμένο ιόν έχει τη σωστή ταχύτητα και επιτάχυνση. Με αυτό τον τρόπο μπορούν να διαχωριστούν και τα διάφορα ισότοπα κάθε στοιχείου (Xseries).



Εικόνα 4: Γραφική παράσταση DC vs RF (Xseries)

Στην παρούσα μελέτη τα στοιχεία που θα αναλυθούν με το όργανο ICP/MS είναι As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn, Mo, Ni, Se και Zn. Θα γίνει δειγματοληψία από τη περιοχή Λεμεσού της Κύπρου. Τα είδη ψαριών που θα εξεταστούν είναι το *Boops Boops* και το *Diplodus sargus*. Από κάθε είδος θα ληφθούν 7 ψάρια, θα εξεταστούν από κάθε ψάρι τα βράγχια, το συκώτι και οι μύες με το δέρμα και το λιπαρό ιστό πάνω στο μυ και θα γίνουν τρεις επαναλήψεις για κάθε μέρος του ψαριού. Η επεξεργασία των δειγμάτων φαίνεται αναλυτικά στην πειραματική διαδικασία.

1.6 Στόχος της εργασίας

Οι κυριότεροι στόχοι της εργασίας είναι ο χαρακτηρισμός της μικροβιακής κοινότητας του θαλάσσιου φυτού *Posidonia oceanica* και η κατανόηση του τρόπου λειτουργίας του. Επίσης με τη συλλογή και καταγραφή των αποτελεσμάτων γίνεται με εμπλουτισμός της βιβλιογραφίας του φυτού για την Κύπρο που υπάρχουν ελλείψεις στοιχεία για ένα τόσο πλούσιο ενδιαίτημα.

Ακόμη κάποιοι από τους μικροοργανισμούς του φυτού μπορεί να αποτελέσουν σημαντικό εργαλείο για τις ανθρώπινες δραστηριότητες σε διάφορες εφαρμογές. Ο έλεγχος για παραγωγή λακκασών και μαγγανασών θα βοηθήσει για τυχόν χρήση των μικροοργανισμών σε διάφορες εφαρμογές απορρύπανσης.

Ο έλεγχος ρύπανσης από βαρέα μέταλλα σε ψάρια που ζουν κοντά στο θαλάσσιο φυτό θα φανερώσει εάν υπάρχει ρύπανση. Τα συγκεκριμένα ψάρια που θα εξεταστούν έχουν σαν καταφύγιο τα θαλάσσια λιβάδια *Posidonia oceanica*. Έτσι θα ήταν καλό να εξεταστούν και τα θαλάσσια λιβάδια με την ανάλυση βαρέων μετάλλων για τυχόν τοξικότητα στο φυτό ή στο θαλασσινό νερό κοντά στο φυτό.

Για τη συγκεκριμένη ανάλυση επιλέχθηκε το είδος *Diplodus sargus sargus* βρίσκεται στην μεσόγειο θάλασσα και παρουσιάζει οωτοκία από τον Μάρτιο μέχρι τον Μάιο. Το μέγεθός του φτάνει τα 21 cm. Ζει σε σχετικά ρηγά νερά μέχρι και 50 m σε αμμώδεις και βραχώδεις βυθούς. Προτιμούν να βρίσκονται σε λιβάδια *Posidonias oceanica* για εύρεση τροφής (Ιωάννου & Μιχαηλίδης).

Επίσης θα εξεταστεί και το είδος ψαριού *Boops boops* αλλιώς Γόππα. Το συγκεκριμένο είδος είναι ημιπελαγικό και συναντάται σε διάφορα υποστρώματα βυθού όπως λάσπη, βραχώδη, αμμώδη και με βλάστηση. Κυμαίνεται σε βάθος νερών από 1-350 m. Κινείται σε μεγάλα κοπάδια και έχει μήκος από 10-13 cm. Αναπαράγεται από τις αρχές του Φεβρουαρίου και τελειώνει η αναπαραγωγή τον Απρίλιο. Είναι ερμαφρόδιτο ψάρι και σε νεαρή ηλικία είναι θηλυκό και μετέπειτα γίνεται αρσενικό. Αλιεύεται πολύ εύκολα με δίχτυα (Ιωάννου & Μιχαηλίδης).



Εικόνα 5: Στα δεξιά *Boops boops* και αριστερά *Diplodus sargus sargus*

2 Υλικά και μεθοδολογία

2.1 Περιοχή μελέτης και συλλογή δειγμάτων

Λήφθηκαν θαλάσσια δείγματα άγριων ψαριών (*Boops boops* και *Diplodus sargus sargus*) 7 από κάθε είδος κατά τη διάρκεια του Απριλίου το 2016 στην Κύπρο. Οι συντεταγμένες που λήφθηκαν τα ψάρια είναι γεωγραφικό πλάτος 34°40'27.81"Β και γεωγραφικό μήκος 33°4'14.61"Α. Τα δείγματα αμέσως τοποθετήθηκαν σε ένα κουτί πάγου και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο και σφραγίστηκαν με σακούλα πολυαιθυλενίου. Τα δείγματα καθαρίστηκαν με μαχαίρι από ανοξείδωτο ατσάλι και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C μέχρι να γίνει η ανάλυση. Έγινε καταγραφή για τα χαρακτηριστικά του κάθε δείγματος όπως συνολικό βάρος και μήκος (Jayarabha et al., 2014).

2.2 Προετοιμασία δείγματος

Μετά από την απόψυξη των δειγμάτων, έγινε επιλογή τριών ιστών ψαριών χωρίς κόκκαλα για ανάλυση (ήπαρ, βράγχια, μύες με δέρμα). Επιλέχθηκαν περίπου 2 γραμμάρια συνολικά από κάθε είδος ψαριού από το ήπαρ, τα βράγχια και από τον ιστό των μυών 5 γραμμάρια περίπου. Ζυγίστηκαν με ηλεκτρονικό ζυγό ζύγισης (Kern abj) και αναλύθηκαν. Όλα τα δείγματα έγιναν ξήρανση σε κλίβανο θερμού αέρα στους 70 °C για 14 ώρες. Οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν με γουδί από πορσελάνη και γουδοχέρι. Έγιναν τρεις επαναλήψεις κάθε ιστού (Jayarabha et al., 2014). Για κάθε επανάληψη έγινε δύο φορές μέτρηση από το όργανο. Για κάθε επανάληψη έγινε αραιώση δείγματος 1:10, 1:100, 1:1000 και 1:10000. Σε κάθε δείγμα τοποθετήθηκε συγκεκριμένη ποσότητα τριών μετάλλων λιθίου, ίνδιου και λουτεσίου για να γίνεται αναγνώριση από το όργανο και να παρουσιάζει το ποσοστό επιτυχίας της ανάλυσης. Επιλέχθηκαν τα συγκεκριμένα στοιχεία γιατί το μοριακό βάρος τους είναι κοντά με το μοριακό βάρος των στοιχείων που μελετάται. Επίσης φτιάχτηκαν διαλύματα για δημιουργία πρότυπων καμπύλων για το κάθε στοιχείο με συγκεντρώσεις 0,5, 1, 5, 12,5, 25, 50, 75, και 100 ppb. Τα πρότυπα διαλύματα αποτελούνται από το διάλυμα με όλα τα στοιχεία βαρέων μετάλλων και το διάλυμα με τα τρία μέταλλα λιθίου, ίνδιου και λουτεσίου. Φτιάχτηκε το διάλυμα των 100ppb και ακολούθως έγιναν οι ανάλογες αραιώσεις.

2.3 Αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια ήταν αναλυτικής ποιότητας. Όλες οι αραιώσεις έγιναν με απιονισμένο νερό (18.2 MΩ cm) (Millipore *Direct-Q 3 ultra pure water*). νιτρικό οξύ, HNO₃ (65%) και υπεροξείδιο (Jayarabha et al., 2014).

2.4 Ανάλυση δειγμάτων

Τα αποξηραμένα δείγματα ζυγίζονται και χωνεύονται σε 100 mL για όλη την νύχτα με πυκνό νιτρικό οξύ (20 mL). Στη συνέχεια, προστίθενται διάλυμα πυκνού νιτρικού οξέος με υπεροξείδιο αναλογίας 4:1 σε κάθε ποτήρι ζέσεως. Τα δείγματα θερμαίνονται στους 120 °C μέχρι να ξηραθούν τελείως. Διάλυμα απιονισμένου νερού και πυκνού νιτρικού οξέος 4:1 χρησιμοποιείται για να διαλυθεί το υπόλειμμα του ποτηριού. Ακολούθως, το υγρό διηθείται σε διηθητικό χαρτί No. 1 Whatman και ελέγχεται η συγκέντρωση βαρέων μετάλλων σε επαγωγικά συζευγμένο πλάσματος φασματοφωτόμετρο μάζας (ICP/MS) (Πίνακας 2) (Jayarabha et al., 2014; Maciel et al., 2014).

Πίνακας 2: Παράμετροι λειτουργίας ICP-MS (Maciel et al., 2014)

Parameters	ICP-MS
RF ισχύς W	1400
Ρυθμός ροής αέριου πλάσματος (L/min)	15
Ρυθμός ροής βοηθητικού αερίου (L/min)	1.2
Ρυθμός ροής αερίου νεφελοποιητή (L/min)	1.09
Χρόνος παραμονής (ms)	50
Sweeps/αναγνώριση	5
Αναγνώριση /επαναλήψεις	3
Επαναλήψεις	3
Τρόπος συλλογής δεδομένων	Peak hopping
Δειγματολήπτης και κεφαλή κώνου	Pt
Ισότοπα (m/z)	⁷⁵ As, ¹¹¹ Cd, ⁵⁹ Co, ⁵³ Cr, ⁶⁵ Cu, ⁵⁶ Fe, ⁵⁵ Mn, ⁹⁶ Mo, ⁶⁰ Ni, ⁸² Se and ⁶⁶ Zn

2.5 Περιοχή μελέτης

Για την απομόνωση μικροοργανισμών από την *P. oceanica* πραγματοποιήθηκαν 3 δειγματοληψίες στις ακόλουθες περιοχές: Παλαιό Λιμάνι-Λεμεσός και Κάβο Γκρέκο. Τα χαρακτηριστικά κάθε δειγματοληψίας παρουσιάζονται λεπτομερώς στον πίνακα 3. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν από το Τμήμα Αλιείας και Θαλάσσιων Ερευνών του Υπουργείου Περιβάλλοντος στην παρουσία μελών του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου.

Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά δειγματοληπτικών περιοχών

Περιοχή	Συντεταγμένες	Θερμοκρασία νερού (°C)	Βάθος Δειγματοληψίας (m)
Παλαιό Λιμάνι-Λεμεσός	34°41.150'N- 33°05.114'E	27	14
Κάβο Γκρέκο	34°58.074'N- 34°04.926'E	28	13

2.6 Απομόνωση μικροοργανισμών από την *P. oceanica*

2.6.1 Προετοιμασία θρεπτικών υποστρωμάτων

Για την απομόνωση των μικροοργανισμών είναι απαραίτητη η ετοιμασία θρεπτικών υποστρωμάτων για ανάπτυξη των διάφορων μικροοργανισμών. Παρασκευάστηκαν τέσσερα διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα: 1) GPY με κυκλοεξαμίδιο, 2) GPY με ριφαμπισίνη, 3) ONR7a, θρεπτικό υπόστρωμα για την απομόνωση ολιγοτροφικών μικροοργανισμών και 4) θαλασσινό άγαρ. Το κυκλοεξαμίδιο και η ριφαμπισίνη είναι αντιβιοτικά τα οποία αναστέλλουν την ανάπτυξη ευκαρυωτικών μικροοργανισμών και βακτηρίων αντίστοιχα. Τα δύο αυτά αντιβιοτικά προστίθενται στα θρεπτικά υποστρώματα μετά την αποστείρωση τους. Οι πίνακες 4, 5, 6 και 7 παρουσιάζουν τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των θρεπτικών υποστρωμάτων καθώς και τις ποσότητες σε γραμμάρια.

Πίνακας 4: Χημικά για την παρασκευή του GPYc

GPYc	
Χημικά	Βάρος σε γραμμάρια (g)
Ένυδρη γλυκόζη	1,0
Εκχύλισμα μαγιάς	0,1
Πεπτόνη	0,5
Άγαρ	15,0
Κυκλοεξαμίδιο διαλυμένο σε 1 mL αιθανόλη	0,1
Θαλασσινό νερό 800 mL	

Πίνακας 5: Χημικά για την παρασκευή του GPYr

GPYr	
Χημικά	Βάρος σε γραμμάρια (g)
Ένυδρη γλυκόζη	1,0
Εκχύλισμα μαγιάς	0,1
Πεπτόνη	0,5
Άγαρ	15,0
Ριφαμπισίνη διαλυμένη σε 3 mL μεθανόλη	0,3
Θαλασσινό νερό 800 mL	

Για το θρεπτικό υπόστρωμα ONR7a παρασκευάστηκαν τρία διαλύματα ξεχωριστά (πίνακας 6). Ο λόγος είναι γιατί εάν όλα τα χημικά μεταφερθούν μαζί κατά την αποστείρωση λόγω της θερμοκρασίας κάποια μπορούν να αντιδράσουν. Επομένως, φτιάχνονται τρία διαφορετικά διαλύματα και ενώνονται όταν έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου.

Πίνακας 6: Χημικά για την παρασκευή του ONR7a

ONR7a		
	Χημικά	Βάρος σε γραμμάρια (g)
Διάλυμα 1	NaCl	22,79
	Na ₂ SO ₄	3,98
	KCl	0,72
	NaBr	0,083
	NaHCO ₃	0,031
	H ₃ BO ₃	0,027
	NaF	0,0026
	NH ₄ Cl	0,27
	Agar	15,00
	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	0,089
	TAPSO	1,30
	Γλυκόζη	2.0
	Απιονισμένο νερό 800 mL	
Διάλυμα 2	MgCl ₂ ·6H ₂ O	11,18
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,46
	SrCl ₂ ·6H ₂ O	0,024
	Απιονισμένο νερό 100 mL	
Διάλυμα 3	FeCl ₂ ·4H ₂ O	0,002
	Απιονισμένο νερό 100 mL	

Πίνακας 7: Χημικά για την παρασκευή του θαλασσινού άγαρ

Χημικά	Βάρος σε γραμμάρια (g)
Χλωριούχο νάτριο	19,40
Χλωριούχο μαγνήσιο	8,80
Χλωριούχο στρόντιο	0,034
Βακτηριολογική πεπτόνη	5,0
Βορικό οξύ	0,022
Θεικό νάτριο	3,24
Χλωριούχο ασβέστιο	1,80
Εκχύλισμα μαγιάς	1,0
Φθοριούχο νάτριο	0,0024
Χλωριούχο κάλιο	0,55
Νιτρικό αμμώνιο	0,0016
Διττανθρακικό νάτριο	0,16
Βακτηριολογικό άγαρ	15,0
Απιονισμένο νερό 1000 mL	

2.6.2 Διαδικασία απομόνωσης

Αμέσως μετά τη δειγματοληψία, τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο σε αποστειρωμένες πλαστικές σακούλες σε παγοθήκη. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε αυστηρά αποστειρωμένες συνθήκες σε καμπίνα συνεχούς ροής. Σε ποτήρια ζέσεως των 250 mL τοποθετήθηκαν 100 mL θαλασσινού νερού και 20 μ L Tween 20. Ζυγίστηκαν 5g από τα τέσσερα τμήματα του φυτού: φύλλα, ρίζα, ρίζωμα και μάτε δηλαδή ξερά φύλλα φυτού και τοποθετήθηκαν στα αντίστοιχα ποτήρια ζέσεως. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε 3 φορές για την παραγωγή περισσοτέρου όγκου αρχικού διαλύματος. Τα ποτήρια ζέσεως

τοποθετήθηκαν για επώαση στις 200 rpm για 30 λεπτά. Στην συνέχεια, 100 mL από το υγρό διάλυμα και από κάθε μέρος του φυτού μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια των 50 mL με ίσους όγκους και γραμμάρια. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 5000 rpm για 7 λεπτά. Το παραγόμενο ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε 10 mL υπερκείμενου και έγιναν διαδοχικές αραιώσεις (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) με θαλασσινό νερό. Ακολούθησε επίστρωση σε τρυβλία με τη μεταφορά 100 μ L από κάθε αραιώση στα διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα. Επίσης, 10g από το ίζημα της *P. oceanica* μεταφέρθηκαν σε κωνική φιάλη των 250 mL με 90 mL με υγρό θρεπτικό υπόστρωμα ONR7a. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 27 βαθμούς κελσίου και καθημερινά πραγματοποιείται έλεγχος για ανάπτυξη. Για την επίτευξη αμιγών αποικιών πραγματοποιήθηκαν τρεις ανακαλλιέργειες.

2.6.3 Προετοιμασία δειγμάτων για ICP/MS

Πραγματοποιήθηκε οξίνιση του νερού της *P. oceanica* με 10 mL θαλασσινό νερό και 1,7 mL νιτρικό οξύ για έλεγχο μετάλλων με τη χρήση του οργάνου ICP/MS. Τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -20 βαθμούς κελσίου για περαιτέρω επεξεργασία. Επίσης ζυγίστηκαν 5 g από τα φύλλα του φυτού και διαλυτοποιήθηκαν με νιτρικό οξύ και φιλτραρίστηκαν για ανάλυση με το όργανο ICP/MS.

2.7 Εξαγωγή Γενετικού υλικού

2.7.1 Εξαγωγή Γενετικού υλικού από βακτήρια

Μετά την επίτευξη αμιγών αποικιών δηλαδή γινόταν συνεχώς ανακαλλιέργια μιας αποικίας μέχρι να παραμένει μόνο ένα είδος μικροοργανισμού στο τρυβλίο πραγματοποιήθηκε εξαγωγή του γενετικού υλικού. Από κάθε τρυβλίο επιλέχθηκε μια αποικία και τοποθετήθηκε σε μικρό σωληνάριο των 2 mL το οποίο περιείχε 20 μ L διάλυμα λύσης. Τα μικρά σωληνάρια των 2 mL τοποθετήθηκαν στους 95°C για 10 λεπτά. Ακολούθως, φυγοκεντρήθηκαν για 2 λεπτά στις 3000 rpm και προστέθηκαν 180 μ L Tris-HCl buffer. Στην συνέχεια, έγινε φυγοκέντρωση για 20 λεπτά στις 3000 rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε άλλο μικρό σωληνάριο των 2 mL και φυλάχθηκε στους -20°C. Η συγκέντρωση του DNA μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο nanodrop στα 260 nm.

Το διάλυμα λύσης φτιάχνεται ως εξής:

- 1) 50 μ L SDS 25% (απορρυπαντικό) βοηθά στην αποδιάταξη των λιπιδίων και των πρωτεϊκών μεμβράνης.

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$15xV_1=0,25x3\text{mL} \rightarrow V_1=50 \mu\text{L}$$

2) Υδροξείδιο του νατρίου NaOH 0,05N ρίζη κυττάρου.

$$0,1\text{N} \rightarrow 4\text{g σε } 1\text{L}$$

$$x=? \text{ σε } 100 \text{ mL} \rightarrow x=0,4 \text{ g}$$

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$0,1xV_1=0,05x3\text{mL}$$

$$V_1=1,5\text{mL NaOH}$$

Tris – HCl 10mM σταθερό διάλυμα βοηθά στην μη διάσπαση του DNA.

2.7.2 Διαδικασία CTAB

Για την εξαγωγή γενετικού υλικού από μικροοργανισμούς της *P. oceanica* ακολουθήθηκε η πιο κάτω διαδικασία:

- 1) Από τα 4 τμήματα του φυτού ξύνεται 1g σε 1 mL θαλασσινού νερού και μεταφέρθηκε σε μικρό σωληνάριο των 2 mL.
- 2) Προστέθηκαν 564 μL Tris-EDTA για επανααιώρηση του ιζήματος κυττάρων.
- 3) Προστέθηκαν 10 μL λυσοζύμης για λύση του κυττάρου και τα δείγματα επωάστηκαν για μια ώρα στους 37°C. Ακολούθως, προστέθηκαν 6 μL πρωτεϊνάσης K για απενεργοποίηση των νουκλεασών και 30 μL 20% SDS. Τα δείγματα επωάστηκαν στους 37°C μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές. Στην συνέχεια, προστέθηκαν 100 μL NaCl 5M και επωάστηκαν στους 65°C για 2 λεπτά.
- 4) Στο διάλυμα προστέθηκαν 80 μL CTAB/NaCl και επωάστηκε για 10 λεπτά στους 65 °C.
- 5) Ακολούθως, 800 μL χλωροφόρμιο/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) τοποθετήθηκε στο διάλυμα και φυγοκεντρήθηκε στις 5000rpm για 20 λεπτά.
- 6) Το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκε σε νέο μικρό σωληνάριο των 2 mL και εκχυλίστηκε με 800 μL φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) και φυγοκέντρήθηκε στις 5000 rpm για 10 λεπτά.
- 7) Το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκε σε νέο μικρό σωληνάριο των 2 mL και προστέθηκαν 800 μL χλωροφόρμιο/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και φυγοκέντρήθηκε στις 5000 rpm για 10 λεπτά.

- 8) Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο μικρό σωληνάριο των 2 mL και προστέθηκαν 500 μ L ισοπροπανόλης για κατακρήμνιση του DNA. Το διάλυμα φυγοκέντρήθηκε στις 5000 rpm για για μια ώρα.
- 9) Το διάλυμα αφήνεται όλη νύκτα σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια, αφαιρέθηκε η ισοπροπανόλη.
- 10) Στο ίζημα προστέθηκαν 500 μ L 70% αιθανόλη και φυγοκεντρήθηκαν στις 5000 rpm για 25 λεπτά. Ακολούθως, αφαιρέθηκε η αιθανόλη.
- 11) Τέλος, προστέθηκαν 50 μ L TE-buffer και μένει όλοι νύκτα στους 37°C.
- 12) Η συγκέντρωση του DNA μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο στα 260 nm.

2.7.3 Εξαγωγή Γενετικού υλικού από μύκητες

Μετά την επίτευξη αμιγών αποικιών μυκήτων δηλαδή γινόταν συνεχώς ανακαλλιέργια μιας αποικίας μέχρι να παραμένει μόνο ένα είδος μικροοργανισμού στο τρυβλίο πραγματοποιήθηκε εξαγωγή του γενετικού υλικού. Από κάθε τρυβλίο επιλέχθηκε μια αποικία και τοποθετήθηκε σε μικρό σωληνάριο των 2 mL το οποίο περιείχε 500 μ L διάλυμα λύσης. Το διάλυμα λύσης είναι απορρυπαντική ουσία που καταστρέφει την κυτταρική μεμβράνη των μικροοργανισμών. Τα μικρά σωληνάρια των 2 mL αφέθηκαν να ηρεμήσουν για 10 λεπτά. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν 150 μ l διάλυμα οξικού καλίου. Αναδεύεται με το μηχάνημα Vortex για 1 min. Μεταφέρεται το υπερκείμενο σε άλλο μικρό σωληνάριο των 1,5 mL αναδεύεται για 1 min τοποθετείται ίσου όγκου ισοπροπυλική αλκοόλη. Αναδεύεται το μικρό σωληνάριο των 1,5 mL και φυγοκεντρείται στους 10000 x g για 2 λεπτά και αφαιρείται το υπερκείμενο. Πλένεται το ίζημα με 300 mL 70% αιθανόλη. Φυγοκεντρείται ξανά το δείγμα για 2 λεπτά και αφαιρείται το υπερκείμενο. Στεγνώνεται το ίζημα και διαλύεται σε 50 mL TE buffer. Το δείγμα φυλάγεται στους - 20 °C.

2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR)

2.8.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για βακτήρια

Αφού έγινε η εξαγωγή του γενετικού υλικού πραγματοποιήθηκε πολλαπλασιασμός του γενετικού υλικού με τη χρήση της μεθόδου PCR. Για το σκοπό αυτό, η συγκέντρωση του γενετικού υλικού κάθε δείγματος προσαρμόστηκε στα 10 ng/ μ L με τη χρήση αποστειρωμένου απιονισμένου νερού. Ένα τυπικό PCR μίγμα (master mix) προετοιμάστηκε

με βάση τον πίνακα 8. Το τυπικό μείγμα PCR φυγοκεντρήθηκε για 2 λεπτά. Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις των 30 μL και προστέθηκαν 29 μL από το μείγμα PCR και 1 μL από το δείγμα.

Πίνακας 8: Χημικά αντιδραστήρια για PCR βακτηρίων

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση	Όγκος (μL)
Ρυθμιστικό διάλυμα B (10X)	1X	3
dNTPs 10mM	0.2 mM	0.6
Πριμεράσες 25μM	Mix 0.8 μM	2,4
KAPA Taq (5U/μl)	1 U	0.12
DNA		1
H₂O		25.28
Total		31

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή σύμφωνα με τις συνθήκες που παρουσιάζονται στον πίνακα 9. Αρχικά, το γενετικό υλικό του δείγματος αποδιατάσσεται στους 95 °C και οι δύο κλώνοι του DNA χωρίζονται. Στη συνέχεια, οι εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές αλληλουχίες (5'CGGTTACCTTGGTACGACTT'3 και 5'AGAGTTTGGATCMTGGCTGAG'3) του εκμαγείου στους 57° C. Ακολουθεί η σύνθεση των νέων κλώνων DNA μέσω της Taq πολυμεράση στους 72° C. Τέλος, ακολουθεί ψύξη του δείγματος στους 4° C.

Πίνακας 9: Συνθήκες PCR για βακτήρια

Βήμα	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95	3 min	1
Αποδιάταξη	95	30 sec	34
Προσαρμογή εκκινήτων	των 57	45 sec	
Επιμήκυνση	72	60 sec	
Τελική επιμήκυνση	72	60 sec	1
Ψύξη	4	hold	1

2.8.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για μύκητες

Αφού έγινε η εξαγωγή του γενετικού υλικού πραγματοποιήθηκε πολλαπλασιασμός του γενετικού υλικού με τη χρήση της μεθόδου PCR. Για το σκοπό αυτό, η συγκέντρωση του γενετικού υλικού κάθε δείγματος προσαρμόστηκε στα 10 ng/μL με τη χρήση αποστειρωμένου απιονισμένου νερού. Το τυπικό μείγμα PCR προετοιμάστηκε με βάση τον πίνακα 10. Το τυπικό μείγμα PCR φυγοκεντρήθηκε για 2 λεπτά. Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις των 30 μL και προστέθηκαν 29 μL από το μείγμα PCR και 1 μL από το δείγμα.

Πίνακας 10: Χημικά αντιδραστήρια για PCR μυκήτων

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση	Όγκος (μL)
Ρυθμιστικό διάλυμα B (10X)	1X	3
dNTPs 10mM	0.2 mM	0.6
Πριμεράσες 25uM	Mix 0.8 μM	2,4
ΚΑΡΑ Taq (5U/ul)	1 U	0.12
DNA		1
H₂O		25.28
Total		31

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή σύμφωνα με τις συνθήκες που παρουσιάζονται στον πίνακα 11. Αρχικά, το γενετικό υλικό του δείγματος αποδιατάσσεται στους 95 °C και οι δύο κλώνοι του DNA χωρίζονται. Στη συνέχεια, οι εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του εκμαγείου (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC'3 και 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG'3) στους 54° C. Ακολουθεί η σύνθεση των νέων κλώνων DNA μέσω της Taq πολυμεράσης στους 72° C. Τέλος, ακολουθεί ψύξη του δείγματος στους 4° C.

Πίνακας 11: Συνθήκες PCR για μύκητες

Βήμα	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95	3 min	1
Αποδιάταξη	95	30 sec	34
Προσαρμογή εκκινητών	των 54	45 sec	
Επιμήκυνση	72	60 sec	
Τελική επιμήκυνση	72	60 sec	1
Ψύξη	4	hold	1

2.9 Ηλεκτροφόρηση

Μετά την PCR ακολούθησε ηλεκτροφόρηση έτσι ώστε να γίνει οπτικοποίηση των παραγόμενων προϊόντων. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε 1% ηκητή αραρόζης. Για την παρασκευή 100 mL ηκητώματος αραρόζης χρησιμοποιήθηκαν 100 mL 1X TAE ρυθμιστικό διάλυμα και 1 g αραρόζης. Το διάλυμα τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρις ότου να γίνει διαυγές. Στη συνέχεια, το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθονται 7,5 μL χρωστικής SYBR. Το διάλυμα χύνεται στη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης και αφήνεται το πήκτωμα να πολυμεριστεί, αφού προηγουμένως έχει σκεπαστεί γιατί η χρωστική είναι φωτοευαίσθητη.

Σε νέα σωληνάρια PCR μεταφέρθηκαν 5 μl από παραγόμενο προϊόν και 1 μl χρωστικής φόρτωσης. Το πήκτωμα τοποθετήθηκε στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστέθηκε ο κατάλληλος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος 1X TAE. Ακολούθως, 6.5 μL από κάθε δείγμα φορτώθηκε στα σχηματιζόμενα ηγαδάκια. Το ηλεκτρικό ρεύμα εφαρμόστηκε (100V, 240MB, 1 ώρα). Η οπτικοποίηση των ζωνών DNA έγινε κάτω από υπεριώδες φως.

2.10 Καθαρισμός προϊόντων PCR

Από το τελικό προϊόν της PCR θα γίνει απομάκρυνση των συστατικών που περίσσεψαν όπως εκκινητές, νουκλεοτίδια, αλκοόλη και φαινόλη. Ο καθαρισμός πρέπει να γίνει για να διασφαλιστεί ότι θα παραμείνει καθαρό το DNA και η ταυτοποίηση θα είναι επιτυχής. Στο PCR προϊόν προστέθηκε 25 μl ισοπροπανόλης και 5 μl οξικού νατρίου 3M, pH 5,2 και έγινε καλή ανάδευση. Τα ειδικά σωληνάρια τοποθετήθηκαν για 10 λεπτά στους -80 °C και στην συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 20 λεπτά στους -4 °C. Το υπερκείμενο αφερέθηκε προσεχτικά και προστέθηκαν 100 μl αιθανόλης 70%. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στους -4 °C και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο. Τα δείγματα αφέθηκαν στους 50 °C για 5 λεπτά. Τέλος προστέθηκαν 20 μl αποστειρωμένου νερού και φυλάχθηκαν τα δείγματα στους -20 °C μέχρι να εξεταστούν περεταίρω.

Για να διασφαλιστεί ότι το δείγμα καθαρίστηκε επιτυχώς γίνεται ξανά ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης και μετράται η συγκέντρωση νουκλεϊκών οξέων στο καθαρό PCR δείγμα με την χρήση του οργάνου Nanodrop 1000 φασματοφωτόμετρο.

2.11 Ενζυμική δραστηριότητα μυκήτων

Διερευνήθηκε η ικανότητα των απομονωθέντων μυκήτων να παράγουν λακκάσες και μαγγανάσες. Γι' αυτό το σκοπό παρασκευάστηκε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα με τις βαφές Remazol Brilliant Blue (RBBR) και methyl-red (πίνακας 12, 13, 14, 15). Δύο θρεπτικά υποστρώματα RBBR και methyl-red παρασκευάστηκαν με διαφορετική συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου 3 g και βαφών 0,2, 0,1 και 0,05 g.

Στην συνέχεια, έγινε προετοιμασία των φιαλών και σε κάθε φιάλη τοποθετήθηκαν 25 mL της βαφής και έγινε μέτρηση στα 597 nm (μήκος κύματος απορρόφησης του RBBR) και 472 nm (μήκος κύματος απορρόφησης του methyl-red). Ακολούθως, σε κάθε φιάλη τοποθετήθηκαν οι μύκητες που είχαν απομονωθεί και έγινε επώαση στους 27°C για 7 ημέρες. Με το πέρας των 7 ημερών μετρήθηκε η απορρόφηση. Το ποσοστό βιοαποχρωματισμού της βαφής υπολογίστηκε με τον ακόλουθο τύπο: ποσοστό βιοαποικοδόμησης = 100 (Απορρόφηση στις 0 μέρες – Απορρόφηση στις 7 ημέρες)/ Απορρόφηση στις 0 μέρες. Η ίδια διαδικασία έγινε και για το θρεπτικό υπόστρωμα RBBR30.

Επίσης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα αρνητικού και θετικού ελέγχου με τη βαφή και το μύκητα *Phanerochaete chrysosporium* αντίστοιχα.

Πίνακας 12: Χημικά για την παρασκευή του Methyl-red0

Methyl-red	
Χημικά	Βάρος σε γραμμάρια (g)
Ένυδρη γλυκόζη	20,0
Methyl-red	0,2
Εκχύλισμα βόνης	20,0
Πεπτόνη	2,0
Απιονισμένο νερό 1000 mL	

Πίνακας 13: Χημικά για την παρασκευή του Methyl-red30

Methyl-red	
Χημικά	Βάρος σε γραμμάρια (g)
Ένυδρη γλυκόζη	20,0
Methyl-red	0,2
NaCl	3,0
Εκχύλισμα βόνης	20,0
Πεπτόνη	2,0
Απιονισμένο νερό 1000 mL	

Πίνακας 14: Χημικά για την παρασκευή του RBBR0

RBBR	
Χημικά	Βάρος σε γραμμάρια (g)
Ένυδρη γλυκόζη	20,0
RBBR	0,2
Εκχύλισμα βόνης	20,0
Πεπτόνη	2,0
Απιονισμένο νερό 1000 mL	

Πίνακας 15: Χημικά για την παρασκευή του RBBR30

RBBR	
Χημικά	Βάρος σε γραμμάρια (g)
Ένυδρη γλυκόζη	20,0
RBBR	0,2
NaCl	3,0
Εκχύλισμα βύνης	20,0
Πεπτόνη	2,0
Απιονισμένο νερό 1000 mL	

3 Αποτελέσματα

3.1 Απομόνωση μικροοργανισμών

Ο συνολικός αριθμός βακτηριών που απομονώθηκαν από τα διάφορα μέρη του φυτού στα διάφορα θρεπτικά υποστρώματα είναι ίσος με 151 απομονώσεις βακτηριών. Το μεγαλύτερο βακτηριακό φορτίο που παρουσιάστηκε είναι ίσο με $0,4 \times 10^8$ και αντιστοιχεί για την περιοχή Λεμεσού στο θρεπτικό υπόστρωμα Marine agar στο μάτε του φυτού. Το ελάχιστο είναι ίσο με $0,8 \times 10^2$ και αντιστοιχεί για την περιοχή Λεμεσού και στα τρία θρεπτικά υποστρώματα GPY, θαλασσινό άγαρ και ONR7a στο ρίζωμα, μάτε και ρίζες αντίστοιχα. Η περιοχή Κάβο Γκρέκο παρουσιάζει μεγάλη βακτηριακή ανάπτυξη στο υπόστρωμα Marine agar $0,4 \times 10^8$ στο μάτε του φυτού και ελάχιστη στο θρεπτικό υπόστρωμα GPY ίση με $1,94 \times 10^3$ στο ρίζωμα του φυτού.

Πίνακας 16: Βακτηριακό φορτίο και αριθμός απομονώσεων από ρίζα, ρίζωμα, μάτε και φύλλα το φυτό *Posidonia oceanica* από τις περιοχές Λεμεσού και Κάβο Γκρέκο σε διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα

	ΡΙΖΕΣ	#	ΡΙΖΩΜΑ	#	ΦΥΛΛΑ	#	MATTE	#	ΣΥΝΟΛΙ
	CFU/g p	of i	CFU/g p	of i	CFU/g p	of i	CFU/g p	of i	ΚΑ
GPY									
Κάβο Γκρέκο	4.0×10^3	20	1.94×10^3	16	3.8×10^3	19	5.0×10^3	25	80
Λεμεσός	1.4×10^3	7	0.8×10^2	4	7.0×10^2	8	1.2×10^3	6	25
M.A									
Κάβο Γκρέκο	0.2×10^7	1	0.6×10^7	3	X.A	X.A	0.4×10^8	2	6
Λεμεσός	1.6×10^2	8	2.4×10^2	12	1.4×10^2	7	0.8×10^2	4	31
ONR7A									
Λεμεσός	0.8×10^2	4	X.A	X.A	1.0×10^3	5	X.A	X.A	9

CFU= Αριθμός αποικιών, P= Φυτό , i= Απομονώσεις, M.A: Marine agar, X.A= Χωρίς Ανάπτυξη

Ο συνολικός αριθμός μυκήτων που απομονώθηκαν από τα διάφορα μέρη του φυτού στα διάφορα θρεπτικά υποστρώματα είναι ίσος με 43 απομονώσεις μυκήτων. Το μεγαλύτερο μυκητιακό φορτίο παρουσιάζεται στο Κάβο Γκρέκο για το θρεπτικό υπόστρωμα GPY και

είναι ίσο με 1.20×10^3 στα φύλλα του φυτού. Το ελάχιστο μυκητιακό φορτίο παρουσιάζεται στο Κάβο Γκρέκο στο θρεπτικό υπόστρωμα ONR7a και είναι ίσο με 0.20×10 στα φύλλα του φυτού. Από την Λεμεσό δεν απομονώθηκαν μύκητες και χρίζει περαιτέρω μελέτη.

Πίνακας 17: Μυκητιακό φορτίο και αριθμός απομονώσεων από ρίζα, ρίζωμα, μάτε και φύλλα από το φυτό *Posidonia oceanica* από την περιοχή Κάβο Γκρέκο σε διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα

	ΡΙΖΕΣ	#	ΡΙΖΩΜΑ	#	ΦΥΛΛΑ	#	MATTE	#	ΣΥΝΟΛΙΚΑ
	CFU/g p	of i	CFU/g p	of i	CFU/g p	of i	CFU/g p	of i	
Κάβο Γκρέκο									
GPY	0.60×10^2	3	2.60×10^1	13	1.20×10^3	6	2.20×10^2	11	33
ONR7a	0.40×10	2	0.80×10^3	14	0.20×10	1	0.60×10^3	3	10

CFU= Αριθμός αποικιών, P= Φυτό , i= Απομονώσεις

3.2 Απομόνωση DNA

3.2.1 Απομόνωση βακτηριακού DNA

Στην παρούσα μελέτη απομονώθηκαν συνολικά 134 βακτήρια. 78 απομονώσεις βακτηρίων από την περιοχή του Κάβο Γκρέκο και 56 απομονώσεις βακτηρίων από την περιοχή της Λεμεσού. Έγινε εκχύλιση του βακτηριακού DNA και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση νουκλεϊκών οξέων (ng/ul) με την μέτρηση τους στα 260 nm με την χρήση του φασματοφωτομέτρου. Στον πίνακα 17 παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποιες συγκεντρώσεις γονιδιωμάτων από μερικά δείγματα. Επίσης φαίνονται οι λόγοι 260/280, 260/230 που δείχνουν την καθαρότητα των δειγμάτων από φαινόλες και διάφορα άλλα συστατικά που μπορεί να παρέμειναν στο δείγμα. Οι συγκεντρώσεις γονιδιωμάτων κυμαίνονται από 7,14-168,69 ng/ul.

Πίνακας 18: Συγκέντρωση γενετικού υλικού ng/ul από την εξαγωγή DNA βακτηρίων

#	Όνομασία	Ng/ul	260/280	260/230
1	f11	7,14	1,51	0,43
2	f31	23,30	1,52	0,38
3	f78	14,07	1,58	0,43
4	f29	25,94	1,53	0,49
5	f53	115,57	1,43	4,90
6	f37	21,39	1,48	0,51
7	f10	12,00	1,53	0,40
8	f28	12,04	1,57	0,56
9	f17	20,27	1,58	0,47
10	f41	15,54	1,61	0,47
11	f74	14,17	1,63	0,50
12	M.A LIM Rh 8	56,33	1,42	0,70
13	M.A LIM Rh 4	79,29	1,53	0,75
14	M.A LIM Rh 11	168,69	1,40	0,72
15	M.A LIM Rh 12	125,93	1,46	0,70
16	M.A LIM Rh 3	45,83	1,40	0,66
17	M.A LIM Rh 5	43,27	1,46	0,67
18	M.A LIM Rh 2	95,92	1,52	0,70
19	M.A LIM Rh 1	34,17	1,69	0,73

3.2.2 Απομόνωση μυκητιακού DNA

Υπήρξαν 43 απομονώσεις μύκητων από την περιοχή του Κάβο Γκρέκο. Έγινε εκχύλιση του μυκητιακού DNA και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση νουκλεικών οξέων (ng/ul) με την μέτρηση τους στα 260 nm με την χρήση του φασματοφωτομέτρου. Στον πίνακα 19 παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποιες συγκεντρώσεις γονιδιωμάτων από μερικά δείγματα. Επίσης φαίνονται οι λόγοι 260/280, 260/230 που δείχνουν την καθαρότητα των δειγμάτων από φαινόλες και διάφορα άλλα συστατικά που μπορεί να παρέμειναν στο δείγμα. Οι συγκεντρώσεις γονιδιωμάτων κυμαίνονται από 52,43-1203,87 ng/ul.

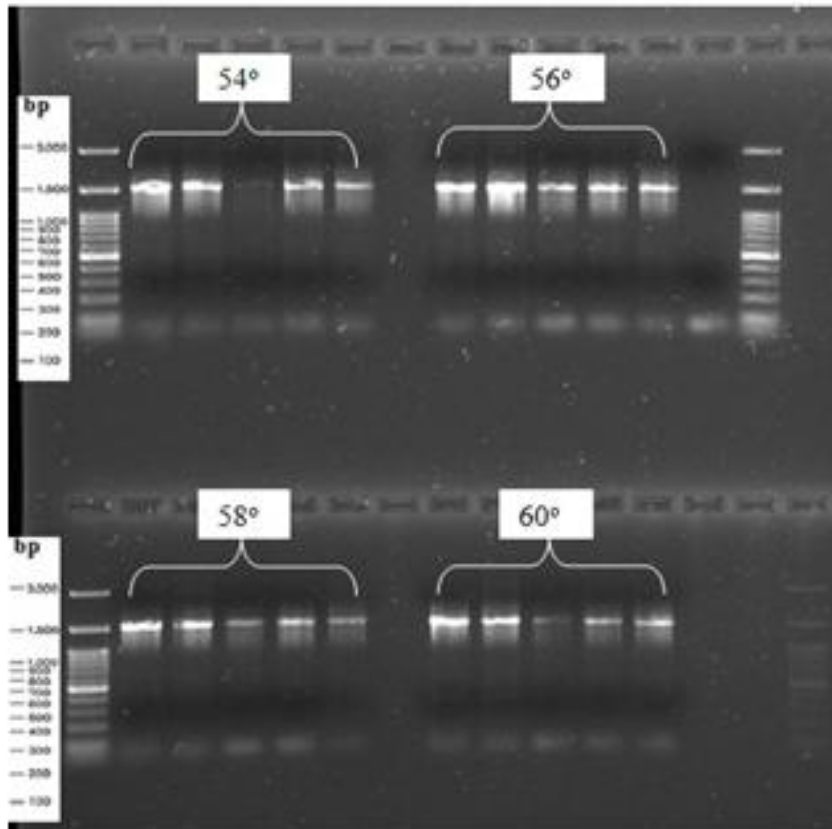
Πίνακας 19: Συγκέντρωση γενετικού υλικού ng/ul από την εξαγωγή DNA μυκήτων

#	Ng/ul	260/280	260/230
1	52,43	1,65	0,87
2	416,64	1,78	1,48
3	1103,83	2,05	2,14
4	1203,87	2,06	1,98
5	54,64	1,76	1,01
6	1042,38	1,89	1,55
8	75,27	1,72	0,79
9	313,92	1,80	1,36
10	430,69	1,80	1,66
11	219,89	1,58	0,84

3.2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

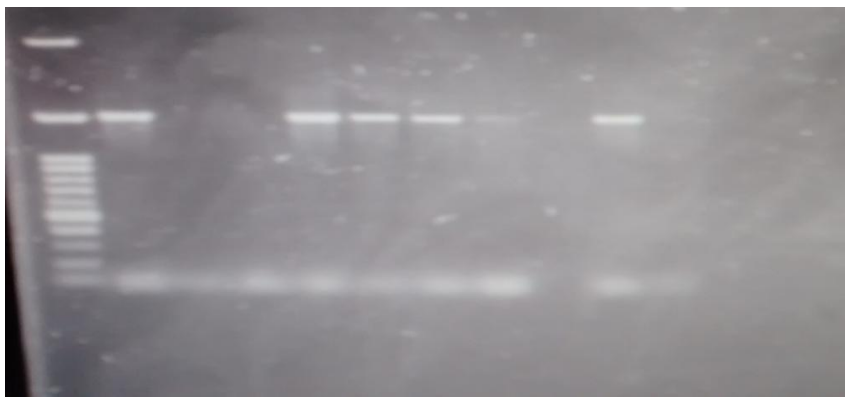
3.2.3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για βακτήρια

Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης έγιναν αντιδράσεις με διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης εκκινητών ούτως ώστε να βρεθεί η βέλτιστη θερμοκρασία. Οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιήθηκαν είναι 54, 56, 58 και 60 °C. Πιο κάτω παρουσιάζεται το πηκτωμα αγαρόζης της ηλεκτροφόρισης που χρησιμοποιήθηκε. Από την εικόνα 6 φαίνεται ότι οι πιο έντονες ζώνες εμφανίζονται στους 56 °C. Η αντίδραση PCR ήταν επιτυχής και στις υπόλοιπες θερμοκρασίες αλλά με πιο αχνές ζώνες.



Εικόνα 6: πήκτωμα αγαρόζης με τις διάφορες θερμοκρασίες για εύρεση της βέλτιστης για ανάπτυξη βακτηρίων.

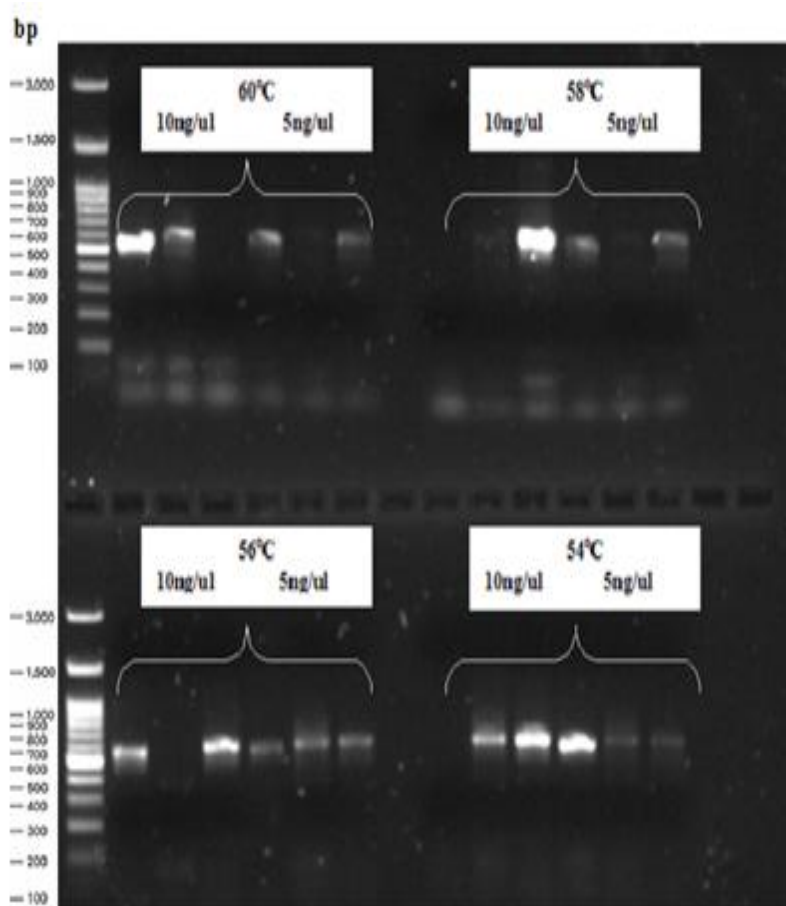
Η κατάλληλη θερμοκρασία είναι 56 °C και όλα τα βακτήρια πολλαπλασιάστηκαν με αυτές τις συνθήκες. Στην εικόνα 7 παρουσιάζονται ενδεικτικά δείγματα πηκτής αγαρόζης μετά από την ηλεκτροφόρηση.



Εικόνα 7: πήκτωμα αγαρόζης με γονιδιώματα βακτηρίων στους 56 °C.

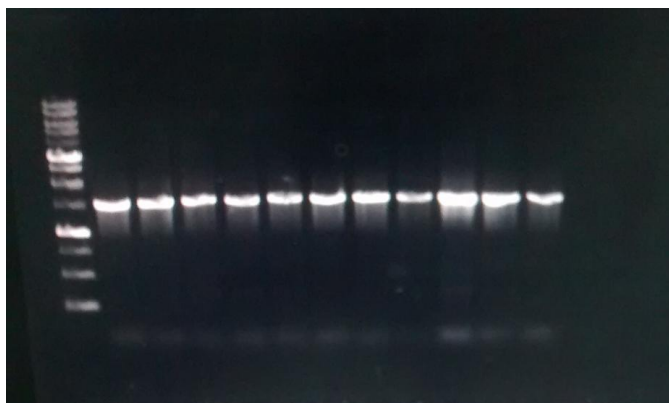
3.2.3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για μύκητες

Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης έγιναν αντιδράσεις με διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης εκκινητών ούτως ώστε να βρεθεί η βέλτιστη θερμοκρασία. Οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιηθήκαν είναι 54, 56, 58 και 60 °C. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν δύο συγκεντρώσεις εκχυλισμένου γονιδιώματος 5 και 10 ng/ul. Πιο κάτω παρουσιάζεται το πήκτωμα αγαρόζης της ηλεκτροφόρισης που χρησιμοποιήθηκε. Από την εικόνα 8 φαίνεται ότι οι πιο έντονες μπάντες γονιδιώματος δημιουργούνται για θερμοκρασία ίση με 54 °C με συγκέντρωση γονιδιώματος 10 ng/ul.



Εικόνα 8: πήκτωμα αγαρόζης με τις διάφορες θερμοκρασίες και συγκεντρώσεις γονιδιώματος για εύρεση των βέλτιστων συνθηκών.

Η κατάλληλη θερμοκρασία είναι οι 54 °C με συγκέντρωση 10 ng/u. Στην εικόνα 9 όλοι οι μύκητες πολλαπλασιάστηκαν με αυτές τις συνθήκες και ενδεικτικά παρουσιάζονται δείγματα πηκτής αγαρόζης μετά από ηλεκτροφόριση.



Εικόνα 9: δείγμα πηκτής αγαρόζης γονιδιωμάτων μυκήτων στους 54 °C με συγκέντρωση 10 ng/ul.

3.2.4 Καθαρισμός προϊόντος PCR

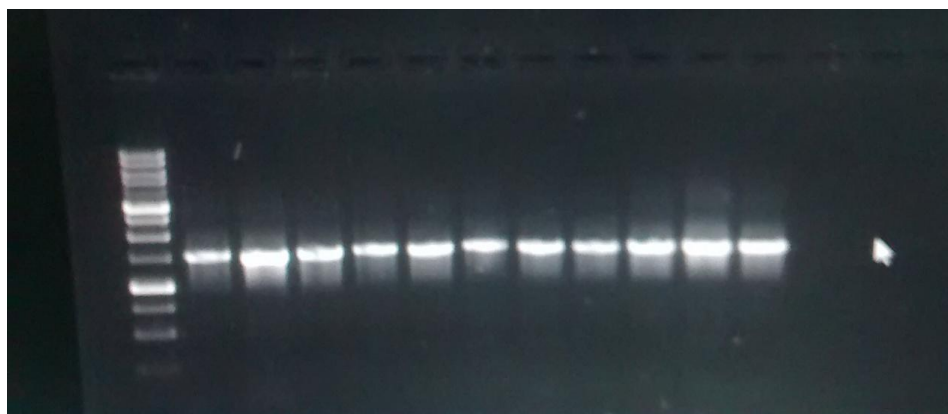
3.2.4.1 Καθαρισμός προϊόντος PCR για βακτήρια

Προκειμένου να έχουμε υψηλής ποιότητας προϊόντων PCR απομακρύνθηκε η περίσσεια εκκινητών, νουκλεοτιδίων και πριμερασών. Τα δείγματα μετά το καθαρισμό μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο και έγινε ηλεκτροφόριση για να εξασφαλιστεί η καθαρότητα των δειγμάτων. Ο πίνακας 20 παρουσιάζει ενδεικτικά τις μετρήσεις των καθαρισμένων προϊόντων στο φασματοφωτόμετρο

Πίνακας 20: Μετρήσεις καθαρισμένων προϊόντων βακτηρίων στο φασματοφωτόμετρο.

#	Όνομασία	Ng/ul	260/280
1	M.A LIM Rh 9	25,57	1,56
2	M.A LIM Rh 10	68,52	1,56
3	M.A LIM Rh7	22,36	1,54
4	M.A LIM Rh6	148,86	1,59
5	M.A LIM Rh 8	56,33	1,42
6	M.A LIM Rh 4	79,29	1,53
7	M.A LIM Rh 11	168,69	1,40
8	M.A LIM Rh 12	125,93	1,46
9	M.A LIM Rh 3	45,83	1,40

Η εικόνα 10 παρουσιάζει το πήκτωμα αγαρόζης με τα καθαρισμένα δείγματα βακτηριακού γονιδιώματος.



Εικόνα 10: πήκτωμα αγαρόζης με καθαρά δείγματα γονιδιώματος βακτηρίων

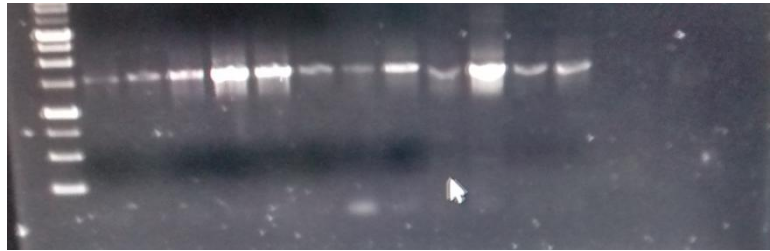
3.2.4.2 Καθαρισμός προϊόντος PCR για μύκητες

Προκειμένου να έχουμε υψηλής ποιότητας προϊόντων DNA PCR απομακρύνθηκε η περίσσια εκκινητών, νουκλεοτιδίων και πριμερασών. Τα δείγματα μετά το καθαρισμό μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο και έγινε ηλεκτροφόριση για να εξασφαλιστεί η καθαρότητα των δειγμάτων. Ο πίνακας 21 παρουσιάζει ενδεικτικά τις μετρήσεις των καθαρισμένων προϊόντων στο φασματοφωτόμετρο

Πίνακας 21: Μετρήσεις καθαρισμένων προϊόντων μυκήτων στο φασματοφωτόμετρο

#	Ονομασία	Ng/ul	260/280
1	M1	43,27	1,46
2	M2	95,92	1,52
3	M3	34,17	1,69
4	M4	19,73	1,49
5	M5	22,54	1,51
6	M6	25,01	1,54
7	M7	15,63	1,68
8	M8	58,43	2,19
9	M9	83,59	2,24
10	M10	31,05	2,28

Η εικόνα 11 παρουσιάζει το πήκτωμα αγαρόζης με τα καθαρισμένα δείγματα μυκητιακού γονιδιώματος.



Εικόνα 11: πήκτωμα αγαρόζης με καθαρισμένα γονιδιώματα μυκήτων.

3.2.5 Αλληλούχιση

3.2.5.1 Αλληλούχιση βακτηρίων

Τα δείγματα στάλθηκαν στην εταιρεία macrogen για αλληλούχιση των βάσεων. Στον πίνακα 22 παρουσιάζονται ενδεικτικά 6 από τα 107 αποτελέσματα της αλληλούχισης των βακτηρίων

Πίνακας 22: Αποτελέσματα αλληλούχισης βακτηρίων

#	Ονομασία	Είδος	Μέγιστο αποτέλεσμα	Query cover	Ident
1	F4P_GPY_L_A1_27F	<i>Vibrio sp.</i>	2095	98%	97%
2	F9_MA_L_A10_27F	<i>Bacillus koralensis</i>	1655	99%	98%
3	R180_GPY_CG_A13_27F	<i>Vibrio sp.</i>	1679	99%	99%
4	R2_GPY_CG_A14_27F	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1210	77%	95%
5	M102_GPY_CG_A15_27F	<i>Vibrio sp.</i>	1847	100%	98%
6	R13_GPY_CG_A16_27F	<i>Vibrio splendidus</i>	1709	100%	99%

Η αλληλούχιση των δειγμάτων έδειξε ότι το κυρίαρχο γένος είναι το *Vibrio* με τις περισσότερες ταυτοποιήσεις να είναι *Vibrio gallaecicus* ακόμη υπάρχουν επίσης τα γένη *Bacillus* και ένα *Achromobacter, Ustilago*. Υπάρχουν 2 είδη που ανήκουν στο γένος *Bacillus* και ένα *Achromobacter, Ustilago*. Τα δύο είδη *Bacillus* εμφανίζονται στα φύλλα, το είδος που ανήκει στο γένος *Achromobacter* εμφανίστηκε στις ρίζες και το είδος που ανήκει στο γένος *Ustilago* παρουσιάστηκε στο μάτε του φυτού. Τη μεγαλύτερη ποικιλότητα μικροοργανισμών όσο αφορά τα μέρη του φυτού παρουσιάζει το μάτε με 12 διαφορετικά είδη τα οποία ανήκουν στα γένη *Ustilago* και *Vibrio*. Ακολουθούν οι ρίζες με 9 διαφορετικά είδη και ανήκουν στα γένη *Achromobacter* και *Vibrio*. Στην συνέχεια τα φύλλα με 8 διαφορετικά είδη μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί αποτελούνται από 2 διαφορετικά γένη το *Bacillus* και το *Vibrio*. Τέλος, το ρίζωμα με 6 διαφορετικούς μικροοργανισμούς οι μικροοργανισμοί αποτελούνται από 1 γένος το *Vibrio*. Τα πιο πάνω παρουσιάζονται στο πίνακα 23.

Πίνακας 23: Αποτελέσματα αλληλούχισης βακτηρίων από Κάβο Γκρέκο και Λεμεσό

Species	MATTE	ΦΥΛΛΑ	ΡΙΖΕΣ	ΡΙΖΩΜΑ	#
<i>Achromobacter insolitus</i>			+		1
<i>Bacillus koralensis</i>		+			1
<i>Bacillus megaterium</i>		+			1
<i>Ustilago maydis</i>	+				1
<i>Vibrio alginolyticus</i>	+		+		2
<i>Vibrio atlanticus</i>				+	1
<i>Vibrio brasiliensis</i>	+				1
<i>Vibrio chagasii</i>		+			1
<i>Vibrio communis</i>	+		+	+	3
<i>Vibrio crassostreae</i>	+				1
<i>Vibrio cyclitrophicus</i>				+	1
<i>Vibrio gallaecicus</i>	+	+	+	+	13
<i>Vibrio harveyi</i>	+				1
<i>Vibrio hepatarius</i>	+				2
<i>Vibrio kanaloae</i>			+		1
<i>Vibrio neptunius</i>		+			2
<i>Vibrio owensii</i>	+			+	2
<i>Vibrio pomeroyi</i>	+		+		2
<i>Vibrio splendidus</i>	+	+	+		3
<i>Vibrio tapetis</i>	+	+	+		3
<i>Vibrio tubiashii</i>		+			1
<i>Vibrio xuii</i>			+	+	3

#= Αριθμός ταυτοποιήσεων

Τα γένη βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα: *Achromobacter*, *Vibrio*, *Bacillus* και *Ustilago*. Συνολικά βρέθηκαν 22 διαφορετικά είδη βακτηρίων. Το κυρίαρχο είδος βακτηρίου είναι το *Vibrio gallaecicus* με 13 ταυτοποιήσεις.

3.2.5.2 Αλληλούχιση μυκήτων

Στον πίνακα 24 παρουσιάζονται ενδεικτικά 7 από τα 43 αποτελέσματα της αλληλουχισής των μυκήτων.

Πίνακας 24: Αποτελέσματα αλληλούχισής μυκήτων

#	Όνομασία	Είδη	Identity	Max score	Total score	Accession number
1	M1	<i>Engyodontium album</i>	99%	918	918	KJ767113.1
2	M2	<i>Cladosporium herbarum</i>	100%	931	931	HG530747.1
3	M3	<i>Engyodontium album</i>	99%	904	904	KJ767113.1
4	M4	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100%	857	857	KM877468.1
5	M5	<i>Cladosporium uredinicola</i>	99%	880	880	FJ025160.1
6	M6	<i>Cladosporium uredinicola</i>	95%	931	931	FJ025160.1
7	M7	<i>Engyodontium album</i>	99%	894	894	KJ767113.1

Η αλληλούχιση των δειγμάτων έδειξε ότι το κυρίαρχο γένος είναι το *Cladosporium*. Επίσης, βρέθηκαν τα γένη *Penicillium*, *Aspergillus* και *Engyodontium*. Το γένος *Penicillium* παρουσιάστηκε στο μάτε και στο ρίζωμα, το γένος *Aspergillus* παρουσιάστηκε στις ρίζες και στα φύλλα και το γένος *Engyodontium* παρουσιάστηκε στο μάτε του φυτού και στα φύλλα. Την μεγαλύτερη ποικιλότητα μικροοργανισμών παρουσιάζει το μάτε του φυτού με 7 διαφορετικά είδη μυκήτων τα οποία ανήκουν στα γένη *Cladosporium*, *Engyodontium* και *Penicillium*. Ακολουθεί το ρίζωμα με 4 διαφορετικά είδη τα οποία κατηγοριοποιούνται στα γένη *Cladosporium* και *Penicillium*. Στην συνέχεια τα φύλλα με 2 διαφορετικά είδη από τα γένη *Aspergillus* και *Engyodontium*. Τέλος, οι ρίζες με 1 είδος μύκητα από το είδος *Aspergillus*. Παρουσιάζονται δύο κυρίαρχα είδη το *Cladosporium cladosporioides* και *Engyodontium album* με 4 διαφορετικές ταυτοποιήσεις. Τα πιο πάνω παρουσιάζονται στον πίνακα 25.

Πίνακας 25: Αποτελέσματα αλληλούχισης μυκήτων από Κάβο Γκρέκο

Species	M	L	R	Rh	#
<i>Aspergillus versicolor</i>		+	+		2
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	+			+	4
<i>Cladosporium macrocarpum</i>	+				1
<i>Cladosporium oxysporum</i>	+				1
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	+				2
<i>Cladosporium tenuissimum</i>				+	1
<i>Cladosporium uredinicola</i>	+			+	3
<i>Engyodontium album</i>	+	+			4
<i>Penicillium chrysogenum</i>				+	2
<i>Penicillium olsonii</i>	+				1

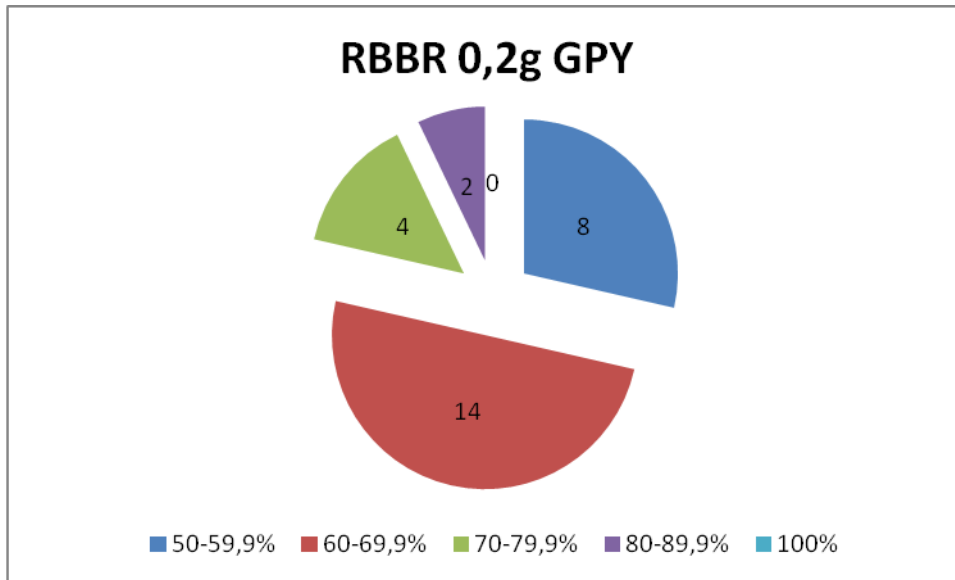
#= Αριθμός ταυτοποιήσεων

3.2.6 Ενζυματική αποικόνιση μυκήτων

3.2.6.1 Μύκητες GPY

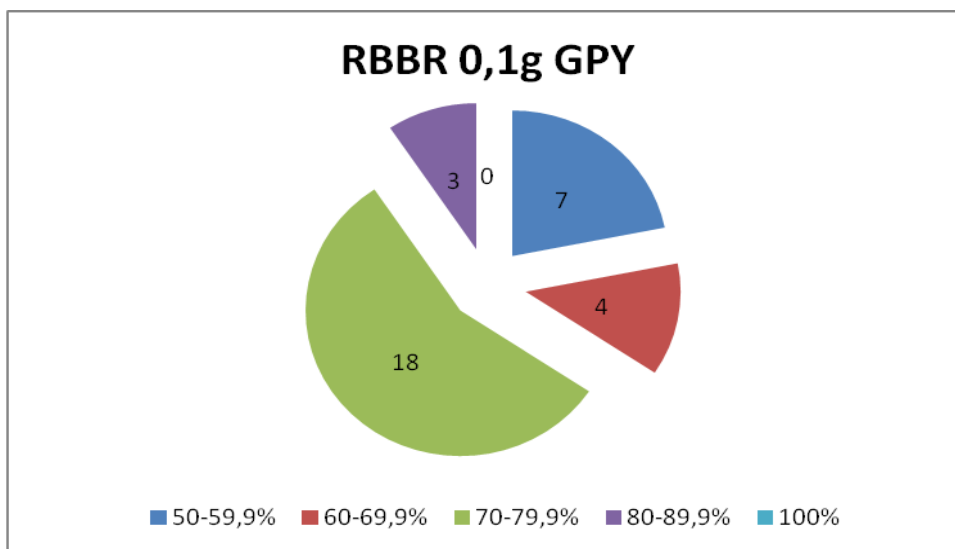
3.2.6.1.1 RBBR

Οι μύκητες που απομονώθηκαν από το θρεπτικό υπόστρωμα GPY για συγκέντρωση 0,2 g βαφής RBBR υπάρχουν 8 μύκητες που βιοδιασπούν την βαφή σε ποσοστό 50-59,9%, 14 μύκητες 60-69,9%, 4 μύκητες 70-79,9% και 2 μύκητες 80-89,9 % γράφημα 1.



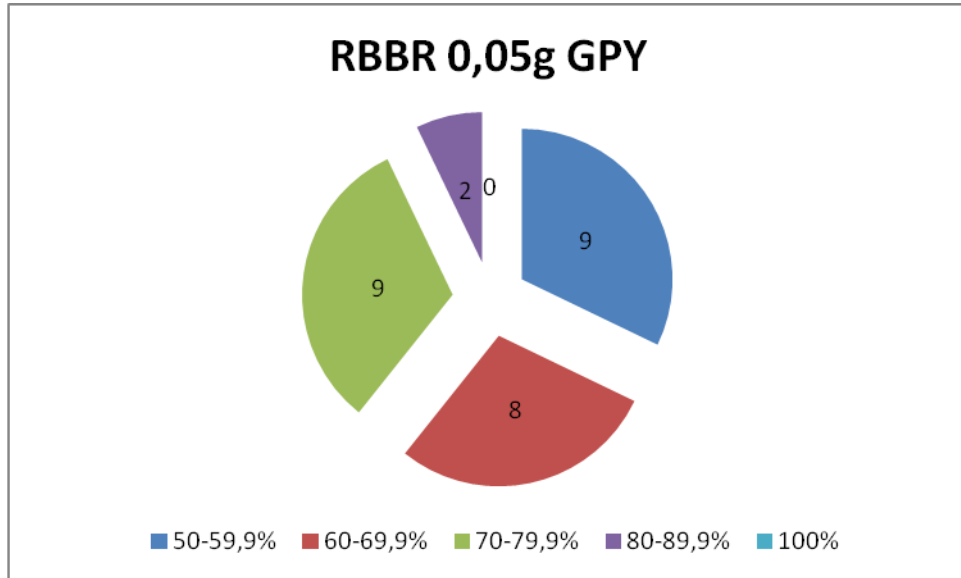
Γράφημα 1: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής RBBR 0,2g για το θρεπτικό υπόστρωμα GPY.

Για συγκέντρωση 0,1 g RBBR 7 μύκητες βιοδιασπούν την βαφή σε ποσοστό 50-59,9%, 4 μύκητες 60-69,9%, 18 μύκητες 70-79,9% και 3 μύκητες 80-89,9% γράφημα 2.



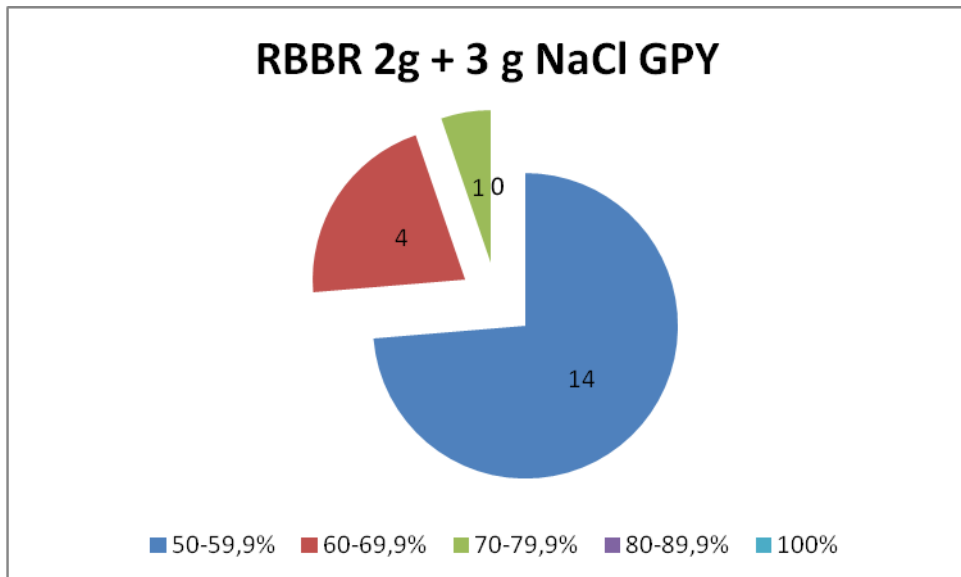
Γράφημα 2: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής RBBR 0,1g για το θρεπτικό υπόστρωμα GPY.

Για συγκέντρωση 0,05 g RBBR 9 μύκητες βιοδιασπούν την βαφή σε ποσοστό 50-59,9%, 8 μύκητες 60-69,9%, 9 μύκητες 70-79,9% και 2 μύκητες 80-89,9% γράφημα 3.



Γράφημα 3: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής RBBR 0,05 g για το θρεπτικό υπόστρωμα GPY.

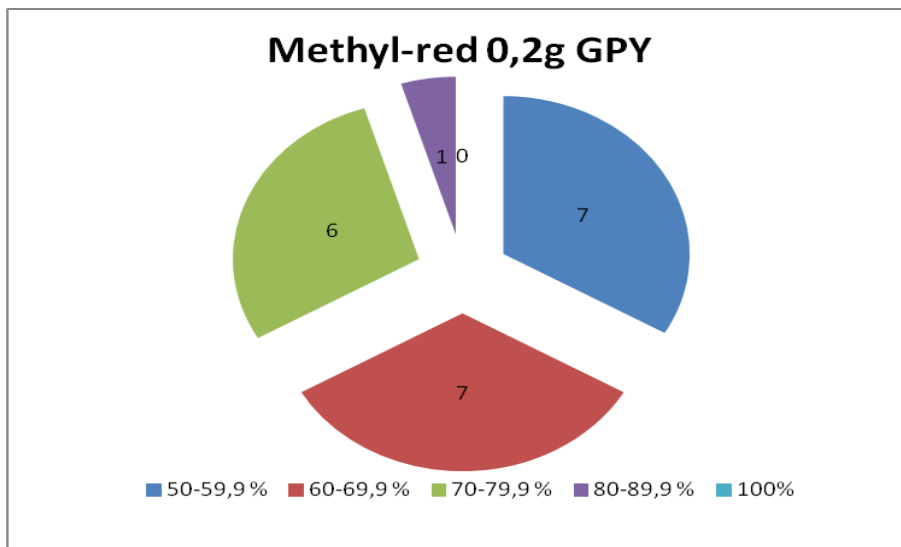
Για συγκέντρωση 0,2 g RBBR + 3g NaCl 14 μύκητες βιοδιασπούν την βαφή σε ποσοστό 50-59,9%, 4 μύκητες 60-69,9%, 1 μύκητας 70-79,9% γράφημα 4.



Γράφημα 4: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής RBBR 0,2 g + 3 g NaCl για το θρεπτικό υπόστρωμα GPY.

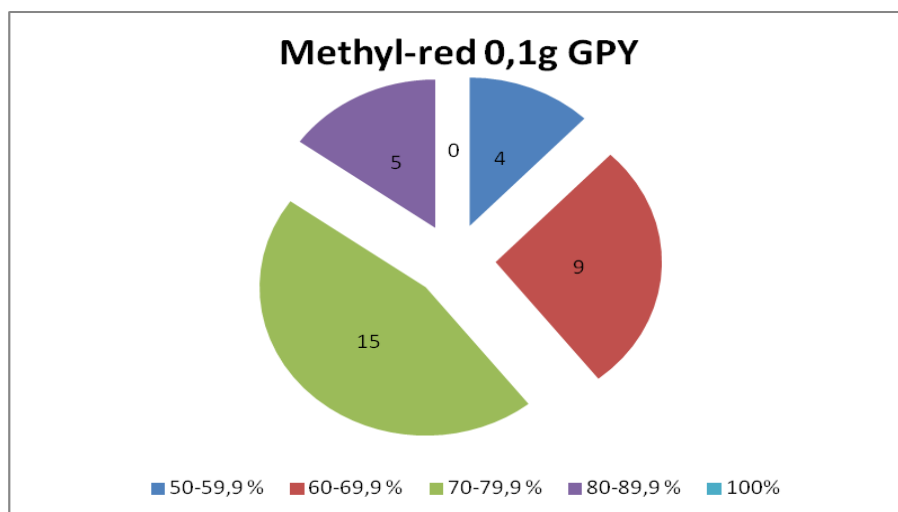
3.2.6.1.2 Methyl-red

Για 0,2 g βαφής Methyl- red 7 μύκητες βιοδιασπούν την βαφή σε ποσοστό 50-59,9%, 7 μύκητες 60-69,9%, 6 μύκητες 70-79,9% και 1 μύκητας 80-89,9 γράφημα 5.



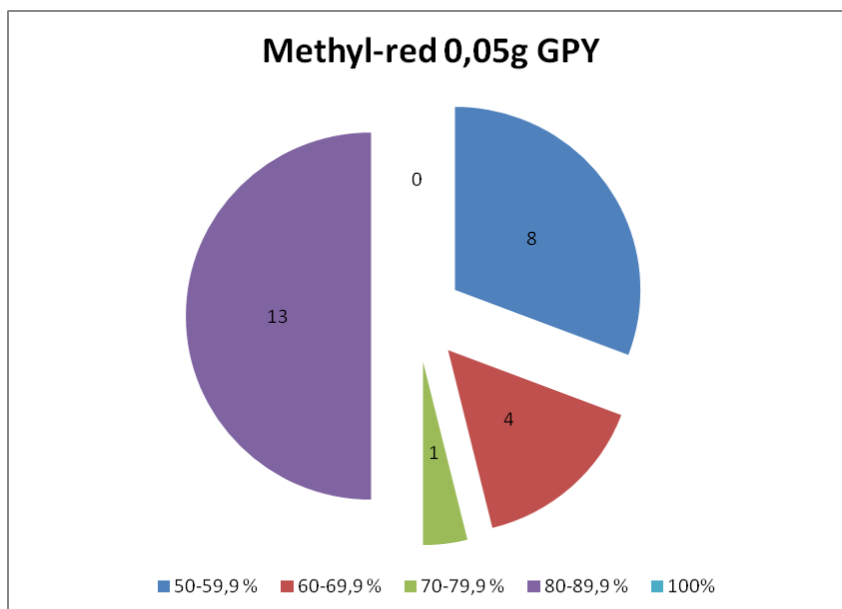
Γράφημα 5: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής Methyl-red 0,2 g για το θρεπτικό υπόστρωμα GPY.

Για συγκέντρωση 0,1g Methyl-red 4 μύκητες βιοδιασπούν την βαφή σε ποσοστό 50-59,9%, 9 μύκητες 60-69,9%, 15 μύκητες 70-79,9% και 5 μύκητες 80-89,9 γράφημα 6.



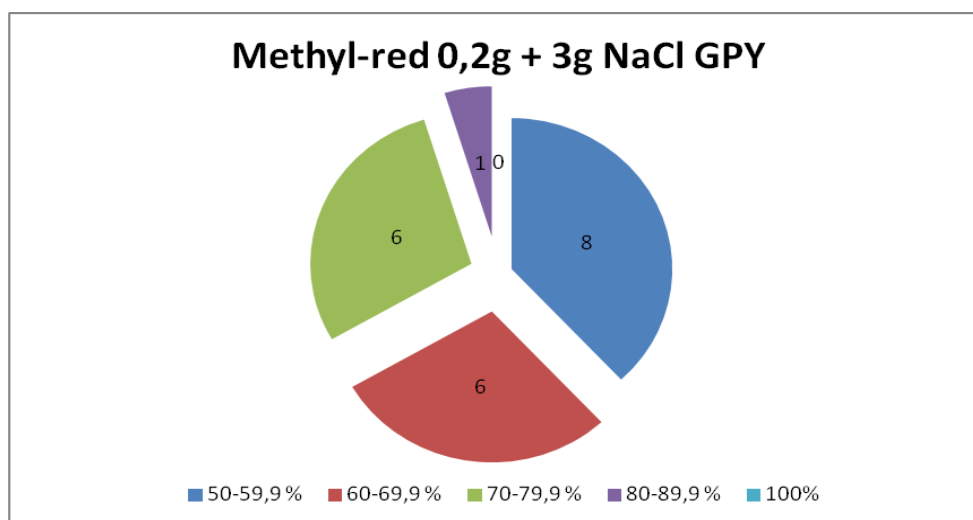
Γράφημα 6: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής Methyl-red 0,1 g για το θρεπτικό υπόστρωμα GPY.

Για συγκέντρωση 0,05 g Methyl-red 8 μύκητες βιοδιασπούν την βαφή σε ποσοστό 50-59,9%, 4 μύκητες 60-69,9%, 1 μύκητας 70-79,9% και 13 μύκητες 80-89,9% γράφημα 7.



Γράφημα 7: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής Methyl-red 0,05 g για το θρεπτικό υπόστρωμα GPY.

Για συγκέντρωση 0,2 g Methyl-red + 3 g NaCl 8 μύκητες βιοδιασπούν την βαφή σε ποσοστό 50-59,9%, 6 μύκητες 60-69,9%, 6 μύκητες 70-79,9% και 1 μύκητας 80-89,9% γράφημα 8.

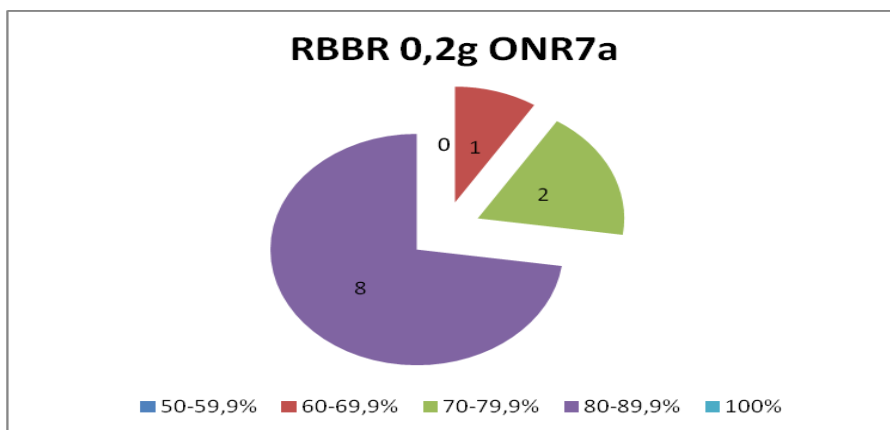


Γράφημα 8: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής Methyl-red 0,2 g + 3g NaCl για το θρεπτικό υπόστρωμα GPY.

3.2.6.2 Μύκητες ONR7a

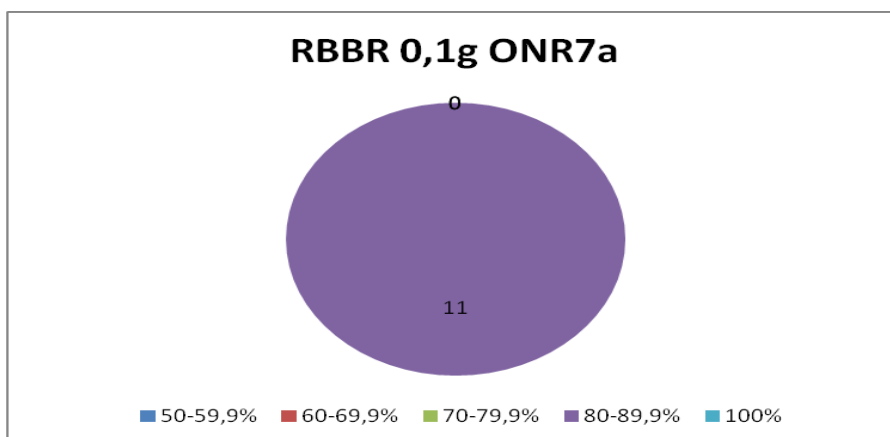
3.2.6.2.1 RBBR

Οι μύκητες που απομονώθηκαν από το θρεπτικό υπόστρωμα ONR7a για συγκέντρωση βαφής 0,2g RBBR υπάρχουν 1 μύκητας που βιοδιασπά την βαφή σε ποσοστό 60-69,9%, 2 μύκητες 70-79,9% και 8 μύκητες 80-89,9% γράφημα 9.



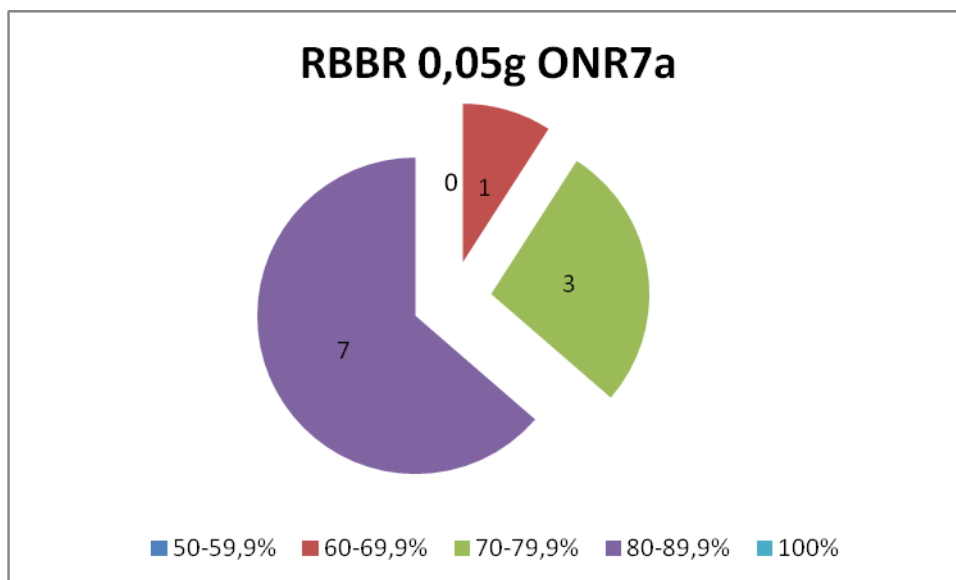
Γράφημα 9: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής RBBR 0,2 g για το θρεπτικό υπόστρωμα ONR7a.

Για συγκέντρωση 0,1 g RBBR υπάρχουν 11 μύκητες που βιοδιασπούν την βαφή σε ποσοστό 80-89,9% γράφημα 10.



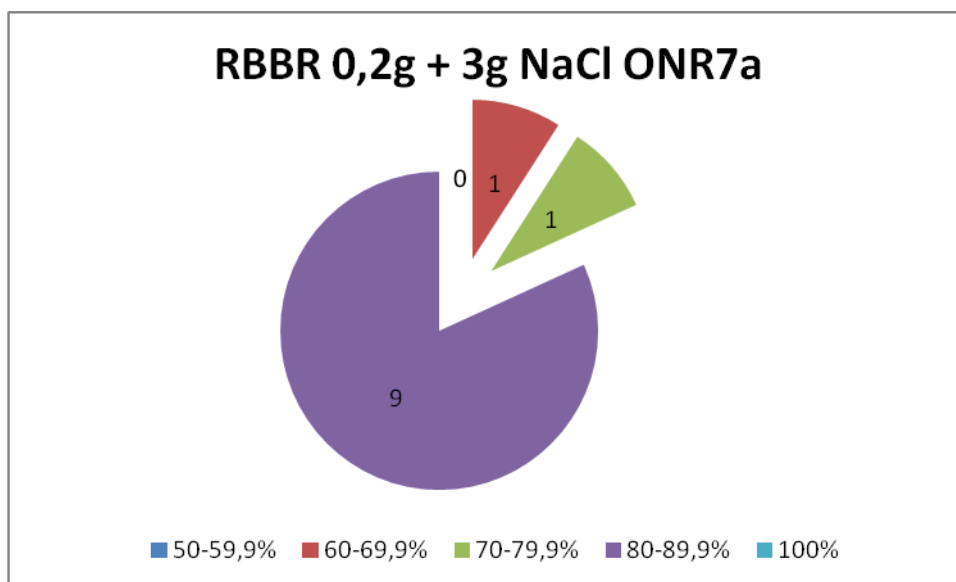
Γράφημα 10: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής RBBR 0,1 g για το θρεπτικό υπόστρωμα ONR7a.

Για συγκέντρωση 0,05g RBBR υπάρχουν 1 μύκητας που βιοδιασπά την βαφή σε ποσοστό 60-69,9%, 3 μύκητες 70-79,9% και 7 μύκητες 80-89,9% γράφημα 11.



Γράφημα 11: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής RBBR 0,05 g για το θρεπτικό υπόστρωμα ONR7a.

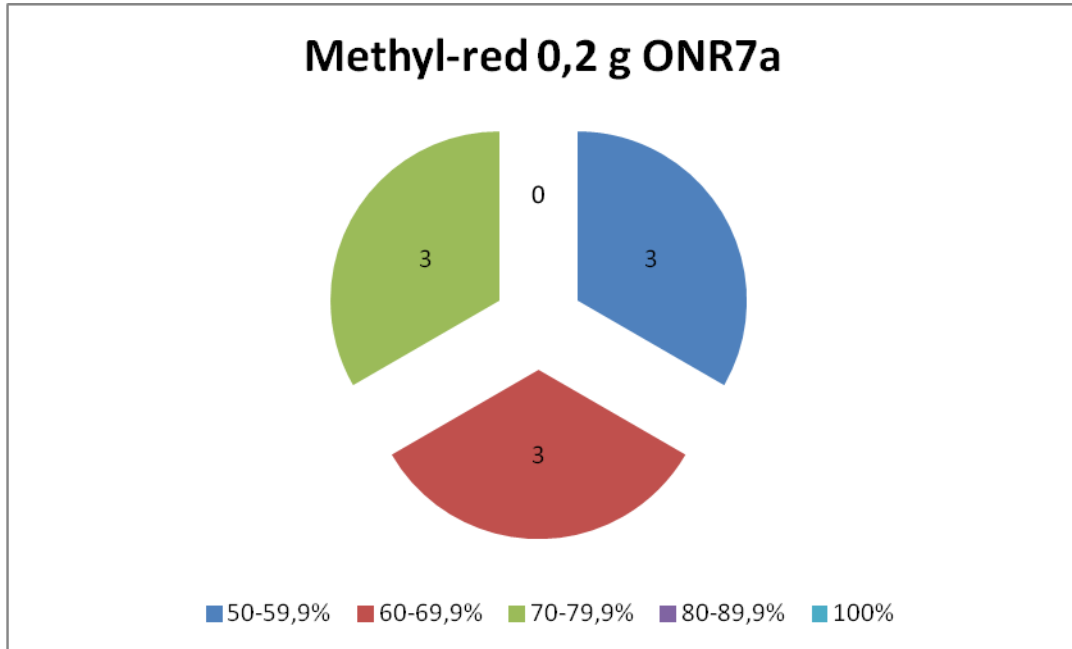
Για συγκέντρωση 0,2 g RBBR + 3g NaCl υπάρχουν 1 μύκητας που βιοδιασπά την βαφή σε ποσοστό 60-69,9%, 1 μύκητας 70-79,9% και 9 μύκητες 80-89,9% γράφημα 12.



Γράφημα 12: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής RBBR 0,2 g + 3g NaCl για το θρεπτικό υπόστρωμα ONR7a.

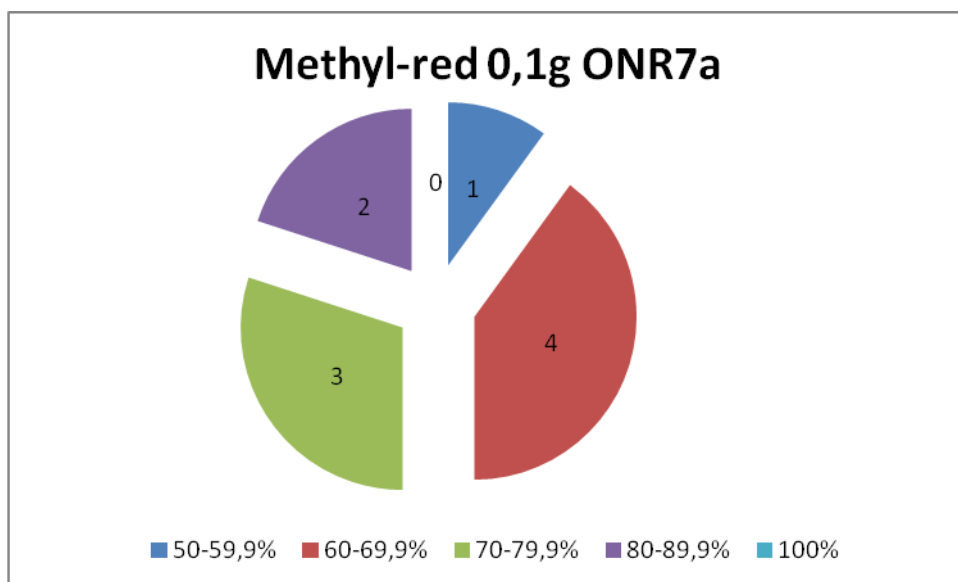
3.2.6.2.2 Methyl-red

Για συγκέντρωση βαφής 0,2 g Methyl-red υπάρχουν 3 μύκητες που βιοδιασπούν την βαφή σε ποσοστό 50-59,9%, 3 μύκητες 60-69,9% και 3 μύκητες 70-79,9% γράφημα 13.



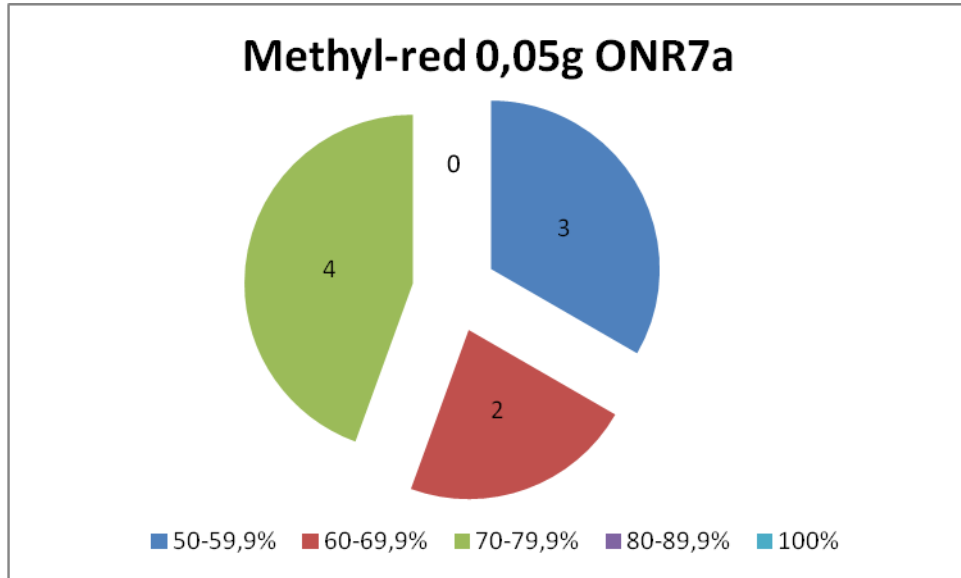
Γράφημα 13: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής Methyl-red 0,2 g για το θρεπτικό υπόστρωμα ONR7a.

Για συγκέντρωση 0,1 g Methyl-red υπάρχουν 1 μύκητας που βιοδιασπά την βαφή σε ποσοστό 50-59,9%, 4 μύκητες 60-69,9%, 3 μύκητες 70-79,9% και 2 μύκητες 80-89,9% γράφημα 14.



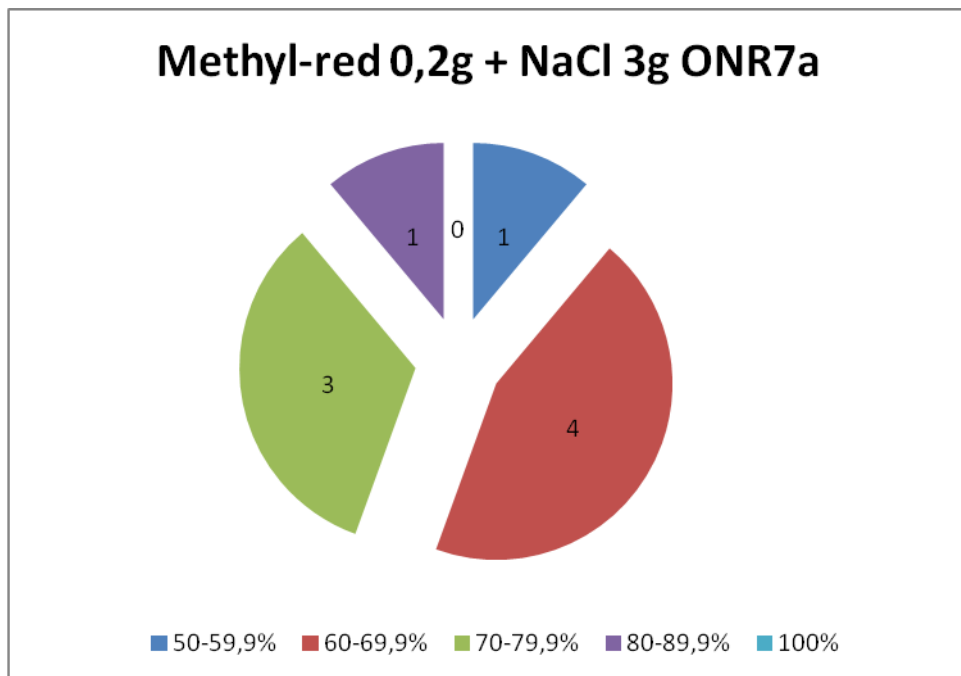
Γράφημα 14: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής Methyl-red 0,1 g για το θρεπτικό υπόστρωμα ONR7a.

Για συγκέντρωση 0,05 g Methyl-red υπάρχουν 3 μύκητες που βιοδιασπούν την βαφή σε ποσοστό 50-59,9%, 2 μύκητες 60-69,9% και 4 μύκητες 70-79,9% γράφημα 15.



Γράφημα 15: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής Methyl-red 0,05 g για το θρεπτικό υπόστρωμα ONR7a.

Για συγκέντρωση 0,2 g Methyl-red + 3 g NaCl υπάρχουν 1 μύκητας που βιοδιασπά την βαφή σε ποσοστό 50-59,9%, 4 μύκητες 60-69,9%, 3 μύκητες 70-79,9% και 1 μύκητας 80-89,9% γράφημα 16.

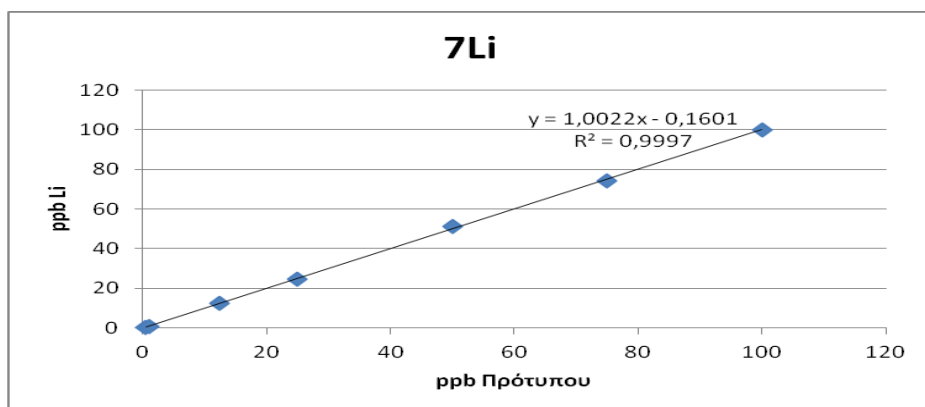


Γράφημα 16: αριθμός διάφορων μυκήτων με το ποσοστό βιοαποικοδόμησης της βαφής Methyl-red 0,2 g + 3g NaCl για το θρεπτικό υπόστρωμα ONR7a.

3.3 Ανάλυση βαρέων μετάλλων

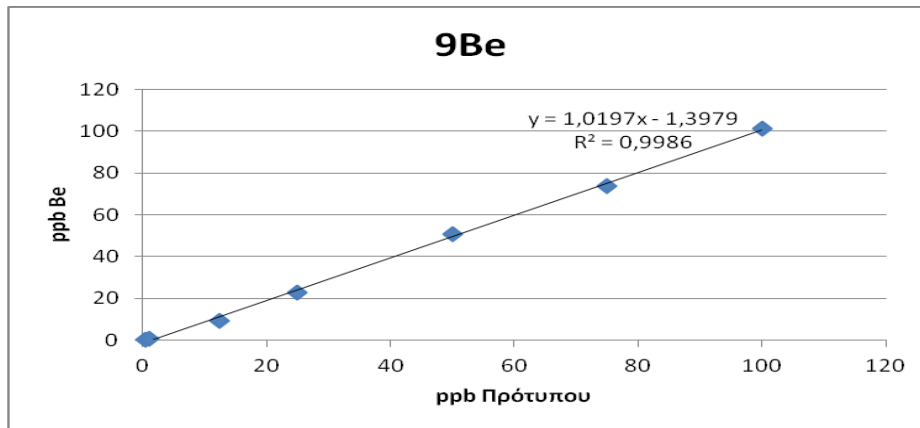
3.3.1 Ανάλυση βαρέων μετάλλων πρότυπες καμπύλες

Αρχικά έγιναν οι πρότυπες καμπύλες όλων των βαρέων μετάλλων προς εξέταση. Πιο κάτω παρουσιάζονται σε γραφικές οι πρότυπες καμπύλες κάθε στοιχείου. Από τις γραφικές παραστάσεις το σημείο 5 ppb αφαιρέθηκε γιατί δεν παρουσίασε καλές τιμές και χαλούσε η γραμμικότητα των καμπυλών. Όλες οι πρότυπες καμπύλες παρουσιάζουν καλή γραμμικότητα η οποία είναι αρκετά κοντά στο 1 και σε μια περίπτωση του στοιχείου Mn είναι ακριβώς ίσο με 1. Επίσης όλες οι πρότυπες καμπύλες αποτελούνται από 6 στοιχεία και σε συνδυασμό με τη καλή γραμμικότητα υπάρχει μικρό ποσοστό απόκλισης από την πραγματική τιμή.



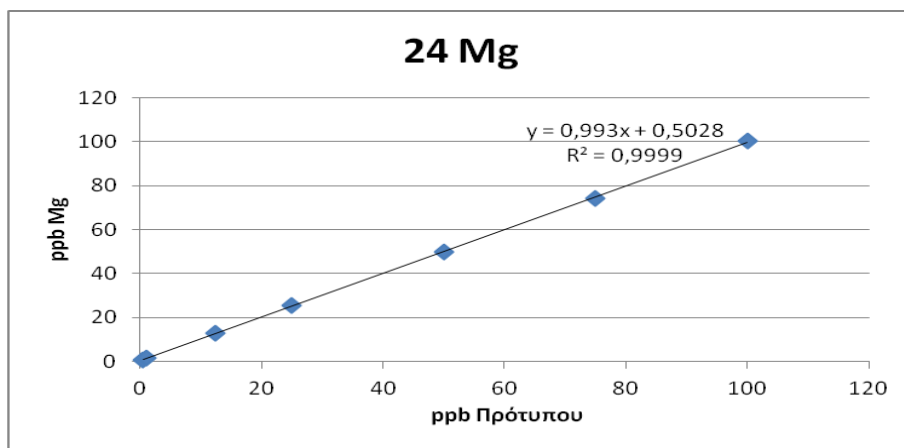
Γραφική Παράσταση 1: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Li

Στην γραφική παράσταση 1 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Li που η γραμμικότητα της είναι ίση με 0,9997. Η γραφική αποτελείται από 6 στοιχεία και είναι σχεδόν ευθεία. Από την γραφική φαίνεται ότι θα προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις του στοιχείου Li.



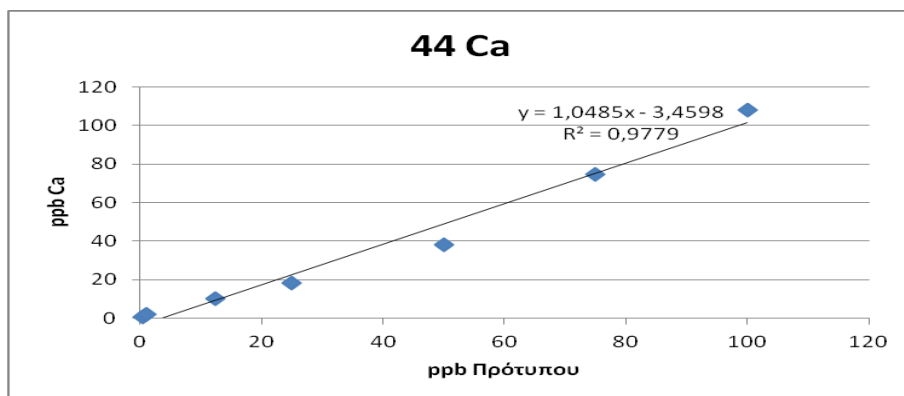
Γραφική Παράσταση 2: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Be.

Στην γραφική παράσταση 2 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Be που η γραμμικότητα της είναι ίση με 0,9986. Η γραφική αποτελείται από 6 στοιχεία και είναι σχεδόν ευθεία. Από την γραφική φαίνεται ότι θα προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις του στοιχείου Be.



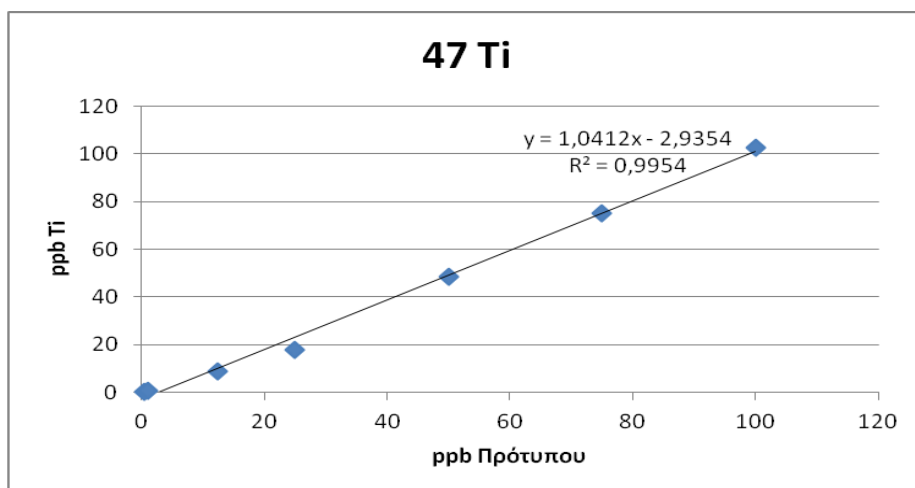
Γραφική Παράσταση 3: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Mg.

Στην γραφική παράσταση 3 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Mg που η γραμμικότητα της είναι ίση με 0,9999. Η γραφική αποτελείται από 6 στοιχεία και είναι σχεδόν ευθεία. Από την γραφική φαίνεται ότι θα προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις του στοιχείου Mg.



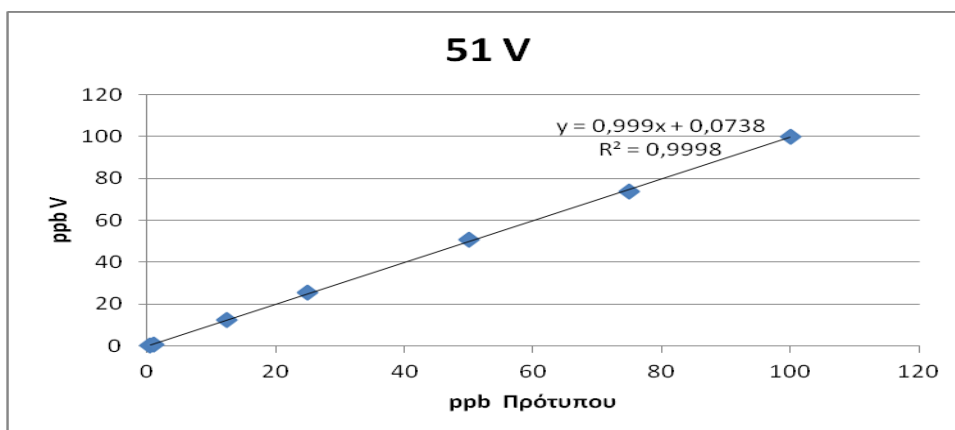
Γραφική Παράσταση 4: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Ca.

Στην γραφική παράσταση 4 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Ca που η γραμμικότητα της είναι ίση με 0,9779. Η γραφική αποτελείται από 6 στοιχεία και είναι σχεδόν ευθεία. Από την γραφική φαίνεται ότι θα προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις του στοιχείου Ca.



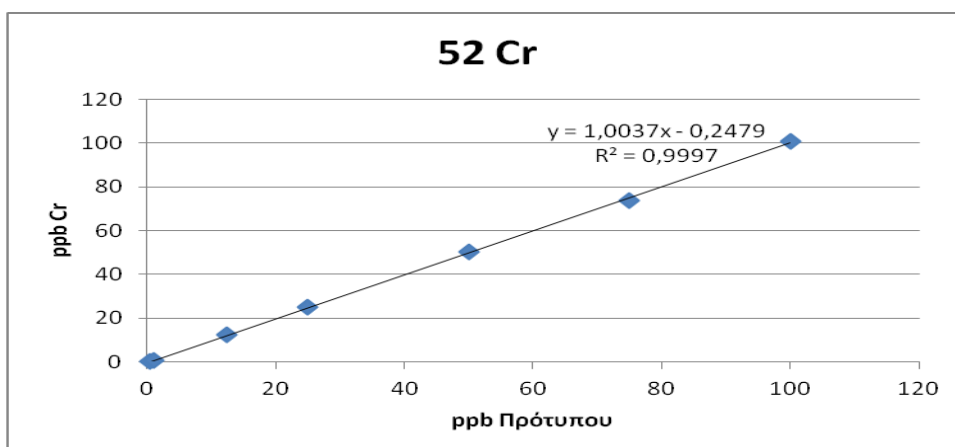
Γραφική Παράσταση 5: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Ti.

Στην γραφική παράσταση 5 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Ti που η γραμμικότητα της είναι ίση με 0,9954. Η γραφική αποτελείται από 6 στοιχεία και είναι σχεδόν ευθεία. Από την γραφική φαίνεται ότι θα προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις του στοιχείου Ti.



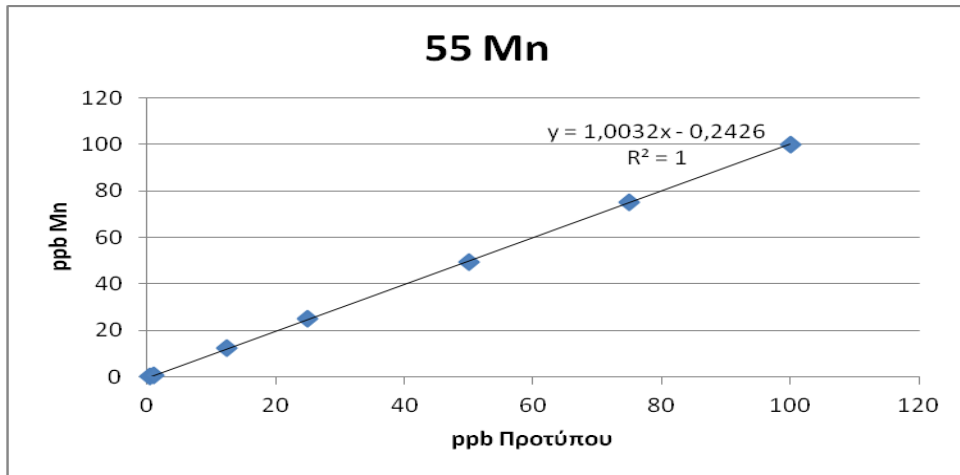
Γραφική Παράσταση 6: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου V.

Στην γραφική παράσταση 6 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη του στοιχείου V που η γραμμικότητα της είναι ίση με 0,9998. Η γραφική αποτελείται από 6 στοιχεία και είναι σχεδόν ευθεία. Από την γραφική φαίνεται ότι θα προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις του στοιχείου V.



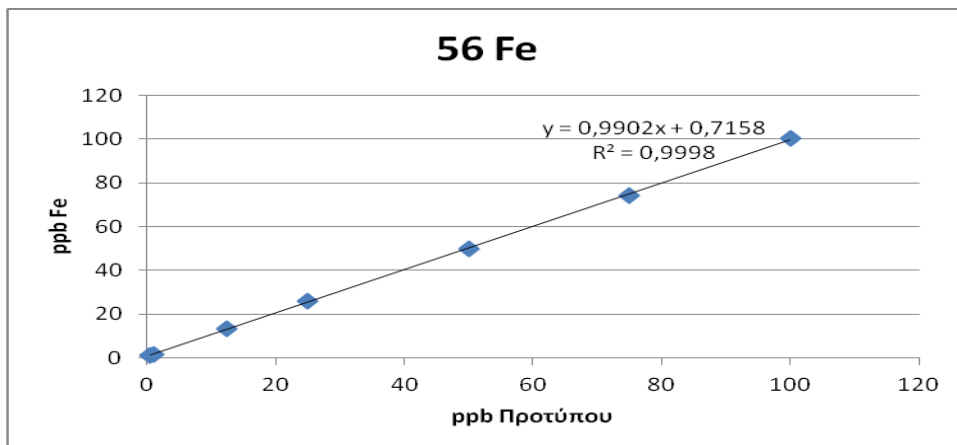
Γραφική Παράσταση 7: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Cr.

Στην γραφική παράσταση 7 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Cr που η γραμμικότητα της είναι ίση με 0,9997. Η γραφική αποτελείται από 6 στοιχεία και είναι σχεδόν ευθεία. Από την γραφική φαίνεται ότι θα προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις του στοιχείου Cr.



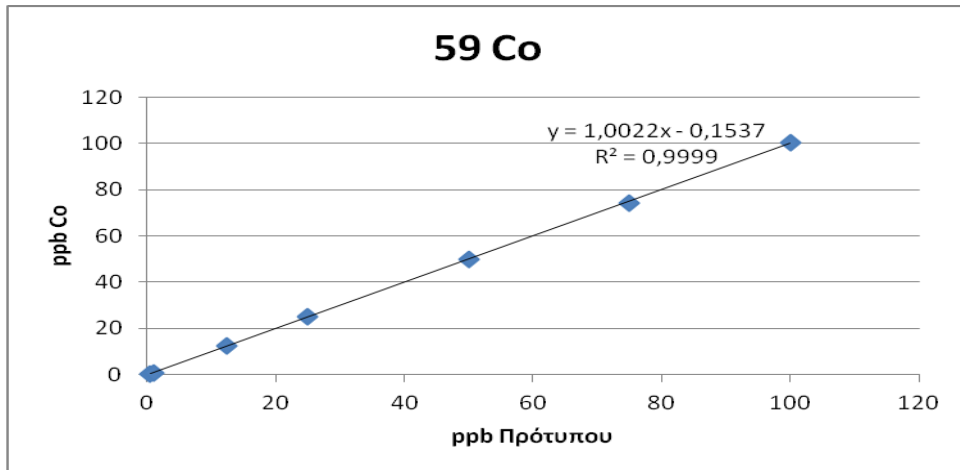
Γραφική Παράσταση 8: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Mn.

Στην γραφική παράσταση 8 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Mn που η γραμμικότητα της είναι ίση με 1. Η γραφική αποτελείται από 6 στοιχεία και είναι ευθεία. Από την γραφική φαίνεται ότι θα προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις του στοιχείου Mn.



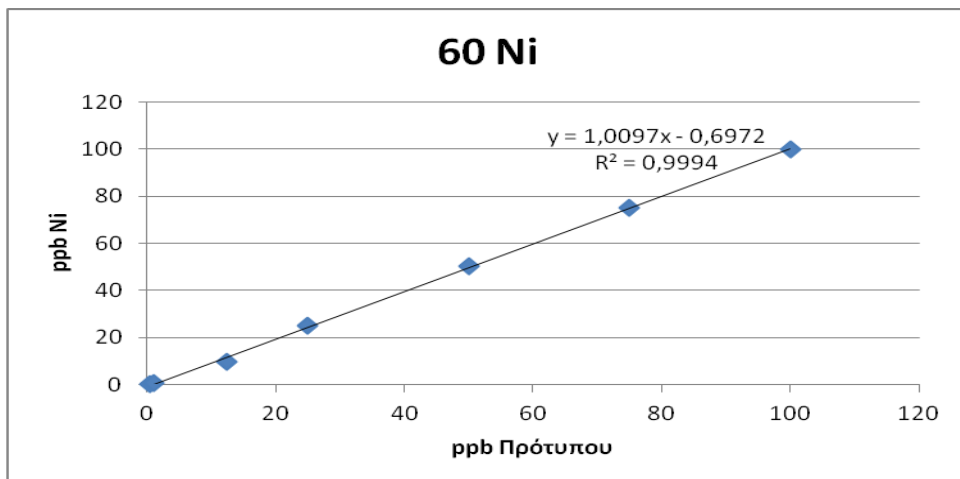
Γραφική Παράσταση 9: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Fe.

Στην γραφική παράσταση 9 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Fe που η γραμμικότητα της είναι ίση με 0,9998. Η γραφική αποτελείται από 6 στοιχεία και είναι σχεδόν ευθεία. Από την γραφική φαίνεται ότι θα προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις του στοιχείου Fe.



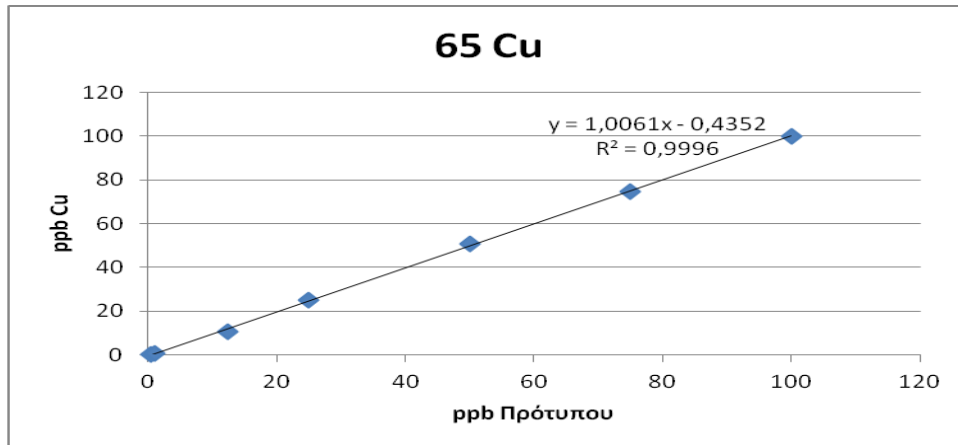
Γραφική Παράσταση 10: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Co.

Στην γραφική παράσταση 10 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Co που η γραμμικότητα της είναι ίση με 0,9999. Η γραφική αποτελείται από 6 στοιχεία και είναι σχεδόν ευθεία. Από την γραφική φαίνεται ότι θα προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις του στοιχείου Co.



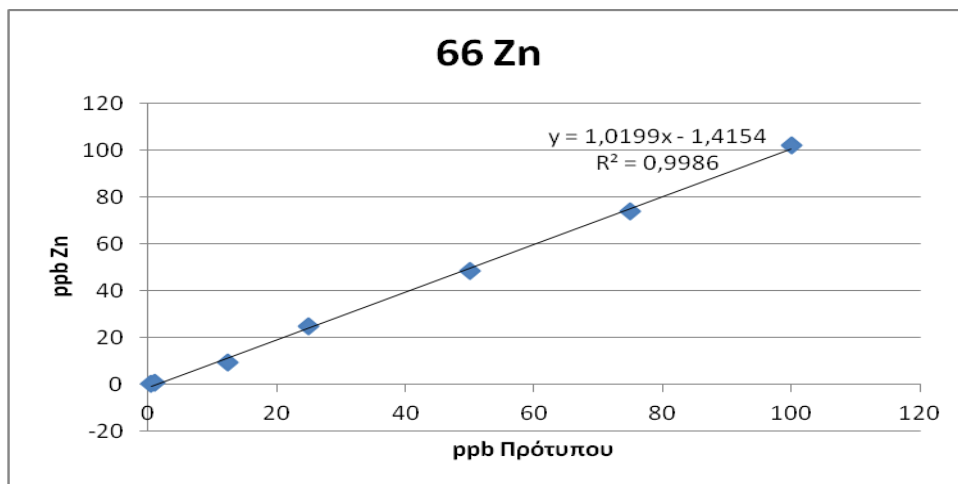
Γραφική Παράσταση 11: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Ni.

Στην γραφική παράσταση 11 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Ni που η γραμμικότητα της είναι ίση με 0,9994. Η γραφική αποτελείται από 6 στοιχεία και είναι σχεδόν ευθεία. Από την γραφική φαίνεται ότι θα προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις του στοιχείου Ni.



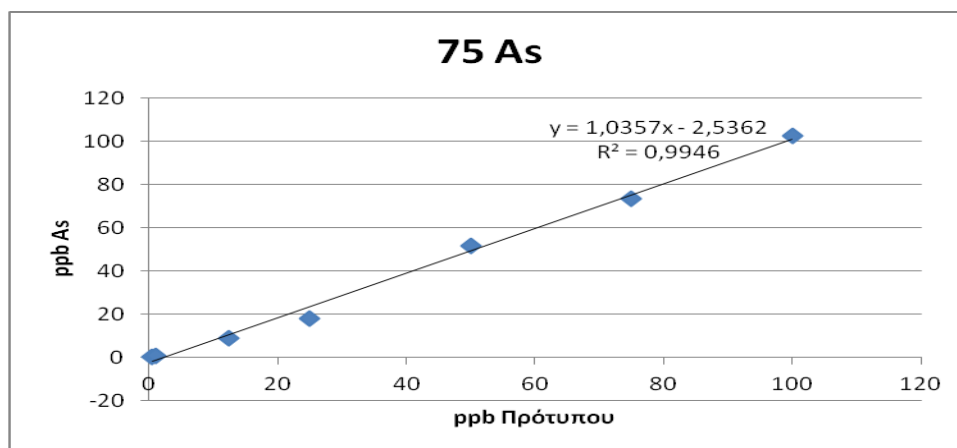
Γραφική Παράσταση 12: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Cu.

Στην γραφική παράσταση 12 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Cu που η γραμμικότητα της είναι ίση με 0,9996. Η γραφική αποτελείται από 6 στοιχεία και είναι σχεδόν ευθεία. Από την γραφική φαίνεται ότι θα προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις του στοιχείου Cu.



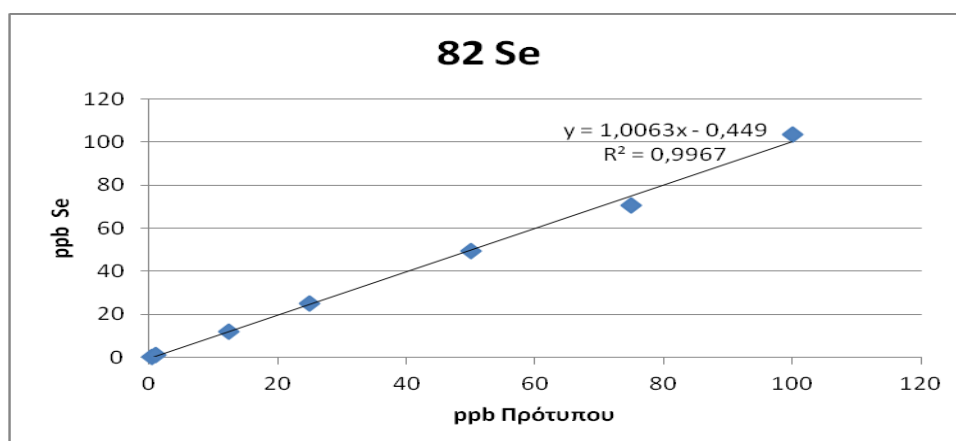
Γραφική Παράσταση 13: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Zn.

Στην γραφική παράσταση 13 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Zn που η γραμμικότητα της είναι ίση με 0,9986. Η γραφική αποτελείται από 6 στοιχεία και είναι σχεδόν ευθεία. Από την γραφική φαίνεται ότι θα προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις του στοιχείου Zn.



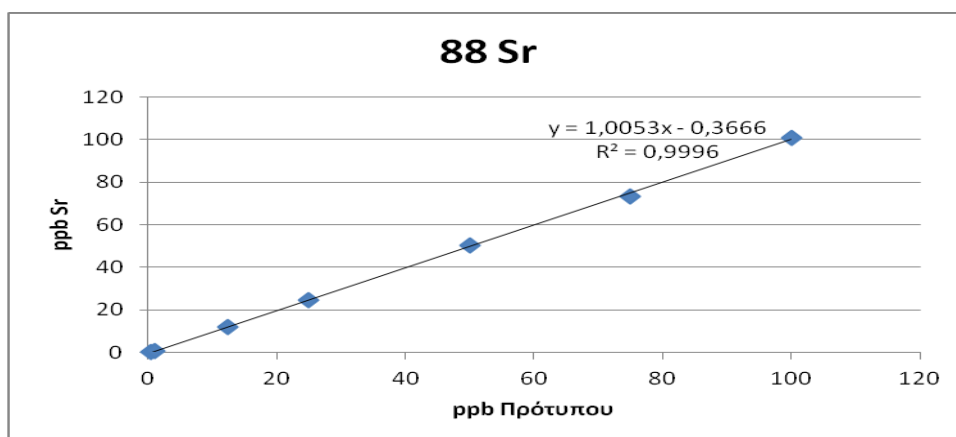
Γραφική Παράσταση 14: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου As.

Στην γραφική παράσταση 14 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη του στοιχείου As που η γραμμικότητα της είναι ίση με 0,9946. Η γραφική αποτελείται από 6 στοιχεία και είναι σχεδόν ευθεία. Από την γραφική φαίνεται ότι θα προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις του στοιχείου As.



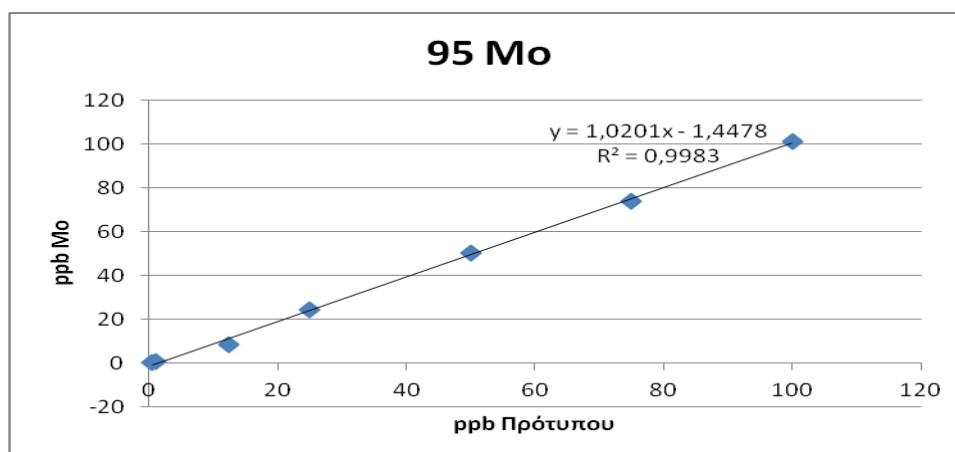
Γραφική Παράσταση 15: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Se.

Στην γραφική παράσταση 15 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Se που η γραμμικότητα της είναι ίση με 0,9967. Η γραφική αποτελείται από 6 στοιχεία και είναι σχεδόν ευθεία. Από την γραφική φαίνεται ότι θα προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις του στοιχείου Se.



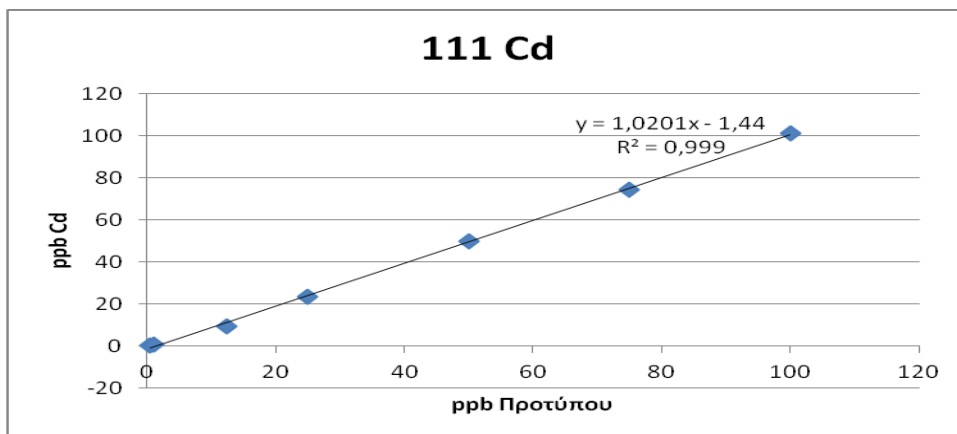
Γραφική Παράσταση 16: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Sr.

Στην γραφική παράσταση 16 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Sr που η γραμμικότητά της είναι ίση με 0,9996. Η γραφική αποτελείται από 6 στοιχεία και είναι σχεδόν ευθεία. Από την γραφική φαίνεται ότι θα προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις του στοιχείου Sr.



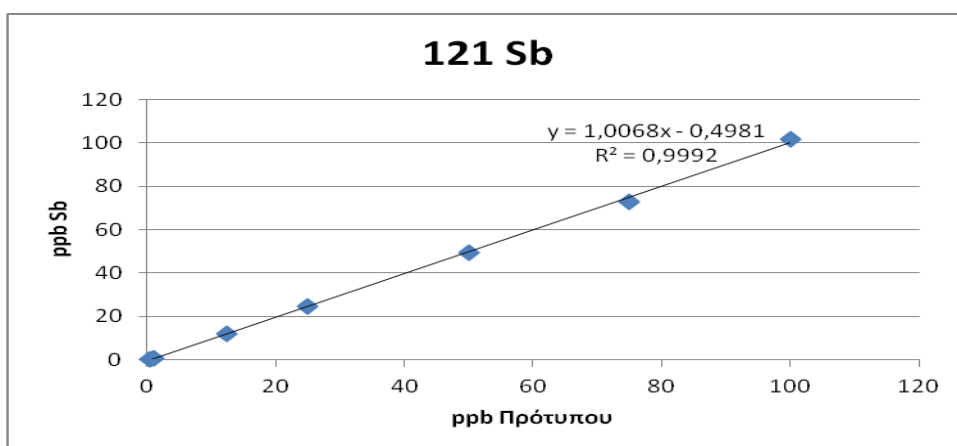
Γραφική Παράσταση 17: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Mo.

Στην γραφική παράσταση 17 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Mo που η γραμμικότητά της είναι ίση με 0,9983. Η γραφική αποτελείται από 6 στοιχεία και είναι σχεδόν ευθεία. Από την γραφική φαίνεται ότι θα προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις του στοιχείου Mo.



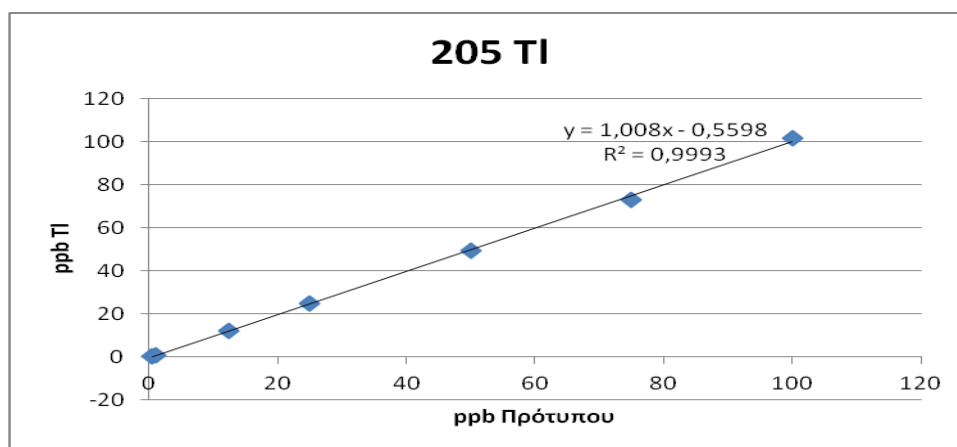
Γραφική Παράσταση 18: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Cd.

Στην γραφική παράσταση 18 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Cd που η γραμμικότητα της είναι ίση με 0,999. Η γραφική αποτελείται από 6 στοιχεία και είναι σχεδόν ευθεία. Από την γραφική φαίνεται ότι θα προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις του στοιχείου Cd.



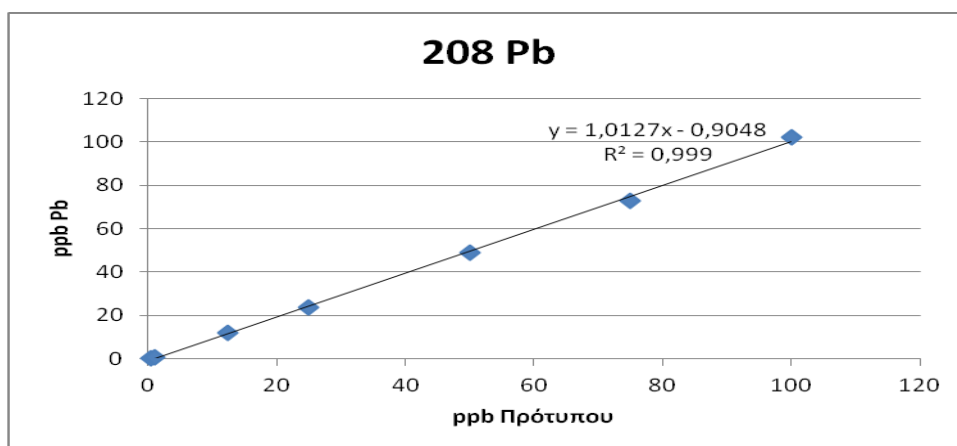
Γραφική Παράσταση 19: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Sb.

Στην γραφική παράσταση 19 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Sb που η γραμμικότητα της είναι ίση με 0,9992. Η γραφική αποτελείται από 6 στοιχεία και είναι σχεδόν ευθεία. Από την γραφική φαίνεται ότι θα προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις του στοιχείου Sb.



Γραφική Παράσταση 20: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Tl.

Στην γραφική παράσταση 20 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Tl που η γραμμικότητα της είναι ίση με 0,9993. Η γραφική αποτελείται από 6 στοιχεία και είναι σχεδόν ευθεία. Από την γραφική φαίνεται ότι θα προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις του στοιχείου Tl.



Γραφική Παράσταση 21: πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Pb.

Στην γραφική παράσταση 21 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη του στοιχείου Pb που η γραμμικότητα της είναι ίση με 0,999. Η γραφική αποτελείται από 6 στοιχεία και είναι σχεδόν ευθεία. Από την γραφική φαίνεται ότι θα προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις του στοιχείου Pb.

Από τις γραφικές προέκυψε το LOD και LOQ όπου είναι το κατώτερο όριο ανίχνευσης και κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης αντίστοιχα. Στον πίνακα 26 παρουσιάζονται τα LOD και LOQ για κάθε μέταλλο. Το LOD βρέθηκε από την τυπική απόκλιση πολλαπλών μετρήσεων του χαμηλότερου προτύπου σε συγκέντρωση. Για το LOD η τυπική απόκλιση πολλαπλασιάζεται με 3 και για το LOQ με 10.

Πίνακας 26: LOD και LOQ για κάθε μέταλλο

Run	lod	loq
7Li	0,03	0,1
9Be	0,027	0,09
24Mg	0,084	0,28
44Ca	0,21	0,7
47Ti	0,03	0,1
51V	0,027	0,09
52Cr	0,021	0,07
55Mn	0,003	0,01
56Fe	0,123	0,41
59Co	0,018	0,06
60Ni	0,006	0,02
65Cu	0,009	0,03
66Zn	0,039	0,13
75As	0,03	0,1
82Se	0,18	0,6
88Sr	0,003	0,01
95Mo	0,012	0,04
111Cd	0,024	0,08
121Sb	0,012	0,04
205Tl	0,006	0,02
208Pb	0	0

Όταν η τιμή είναι μεγαλύτερη του LOD τότε η συγκέντρωση μετάλλου είναι αυτή που βρέθηκε από το όργανο. Όταν η τιμή είναι μικρότερη δεν μπόρεσε η συγκεκριμένη μέθοδος να αναγνωρίσει το συγκεκριμένο μέταλλο και όταν η τιμή είναι $LOD < C < LOQ$ τότε γίνεται ανίχνευση του μετάλλου χωρίς να μπορεί να γίνει ποσοτικοποίηση του.

3.3.2 Ανάλυση βαρέων μετάλλων στα ψάρια

3.3.2.1 Ανάλυση βαρέων μετάλλων στο ψάρι *Boops boops*

Στον πίνακα 27 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων για το ψάρι *Boops boops* για το σκυώτι, τα βράγχια και τους μύες. Είναι εκφρασμένες όλες οι συγκεντρώσεις σε $\mu\text{g/g}$ υγρού βάρους.

Πίνακας 27: Συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων στο ψάρι *Boops boops* µg/g υγρού βάρους.

Στοιχεία	Συκώτι (µg/g)	Βράγχια (µg/g)	Μύες (µg/g)
7Li	11,46667±0,001	79,2±0,02	32,26667±0,006
24Mg	53253,33±2,1	78320±11,72	91066,67±9,226
47Ti	672,1333±0,028	4165,333±0,69	1734,533±0,672
51V	6,8±0	27,2±0,004	7,866667±0,001
52Cr	16,66667±0,002	33,73333±0,008	23,46667±0,004
55Mn	157,7333±0,006	769,3333±0,095	218±0,026
56Fe	9445,333±0,204	7124±1,4	2443,733±0,414
59Co	5,066667±0	1,066667±0	4,8±0,001
60Ni	20±0,002	41,2±0,002	20±0,01
65Cu	190,1333±0,002	230,4±0,0032	78,93333±0,013
66Zn	2570,267±0,071	2736,533±0,456	2607,067±0,354
75As	288,1333±0,012	144,2667±0,027	208,9333±0,01
82Se	373,0667±0,03	272±0,035	80±0,001
88Sr	1284,667±0,041	10397,33±0,895	4561,333±3,355
95Mo	4±0,001	0±0	3,866667±0
111Cd	29,33333±0	1,6±0	0,533333±0
208Pb	0±0,001	0±0	0±0,001

Τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις για το συκώτι παρουσιάζουν τα στοιχεία μαγνησίου, τιτανίου, μαγγανίου, χαλκού, σιδήρου, σεληνίου, στροντίου, αρσενικού και ψευδαργύρου. Οι τιμές κυμαίνονται από 157 µg/g υγρού βάρους που είναι το μαγγάνιο έως 53253,3 µg/g υγρού βάρους που είναι το μαγνήσιο. Τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις για το συκώτι παρουσιάζουν τα στοιχεία λιθίου 11,4 µg/g υγρού βάρους, βαναδίου 6,8 µg/g υγρού βάρους, χρωμίου 16,6 µg/g υγρού βάρους, κοβαλτίου 5 µg/g υγρού βάρους, νικελίου 20 µg/g υγρού βάρους, μολυβδαινίου 4 µg/g υγρού βάρους και καδμίου 29 µg/g υγρού βάρους. Το μέταλλο μόλυβδος δεν ανιχνεύτηκε με την συγκεκριμένη μέθοδο.

Τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις για τα βράγχια παρουσιάζουν τα στοιχεία μαγνησίου 78320 µg/g υγρού βάρους, τιτανίου 4165 µg/g υγρού βάρους, μαγγανίου 769 µg/g υγρού βάρους, χαλκού 230 µg/g υγρού βάρους, σιδήρου 7124 µg/g υγρού βάρους, σεληνίου 272 µg/g υγρού βάρους, στροντίου 10397 µg/g υγρού βάρους, αρσενικού 144 µg/g υγρού βάρους και ψευδαργύρου 2736 µg/g υγρού βάρους. Οι τιμές κυμαίνονται από 144 µg/g υγρού βάρους που είναι το αρσενικό έως 78320 µg/g υγρού βάρους που είναι το μαγνήσιο. Τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις για τα βράγχια παρουσιάζουν τα στοιχεία λιθίου 79 µg/g υγρού βάρους, βαναδίου 6,8 µg/g υγρού βάρους, χρωμίου 33 µg/g υγρού βάρους, κοβαλτίου 1 µg/g υγρού βάρους, νικελίου 41 µg/g υγρού βάρους και καδμίου 1,6 µg/g υγρού βάρους. Τα μέταλλα μόλυβδος και μολυβδαίνιο δεν ανιχνεύτηκαν με την συγκεκριμένη μέθοδο.

Τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις για τους μύες παρουσιάζουν τα στοιχεία μαγνησίου 91066 μg/g υγρού βάρους, τιτανίου 1734 μg/g υγρού βάρους, μαγγανίου 218 μg/g υγρού βάρους, χαλκού 78,9 μg/g υγρού βάρους, σιδήρου 2443 μg/g υγρού βάρους, σεληνίου 80 μg/g υγρού βάρους, στροντίου 4561 μg/g υγρού βάρους, αρσενικού 208 μg/g υγρού βάρους και ψευδαργύρου 2607 μg/g υγρού βάρους. Οι τιμές κυμαίνονται από 208 μg/g υγρού βάρους που είναι το αρσενικό έως 91066,6 μg/g υγρού βάρους που είναι το μαγνήσιο. Τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις για τους μύες παρουσιάζουν τα στοιχεία λιθίου 32 μg/g υγρού βάρους, βαναδίου 7,8 μg/g υγρού βάρους, χρωμίου 23,4 μg/g υγρού βάρους, κοβαλτίου 4,8 μg/g υγρού βάρους, νικελίου 20 μg/g υγρού βάρους, μολυβδαινίου 3,8 μg/g υγρού βάρους και καδμίου 0,5 μg/g υγρού βάρους. Το μέταλλο μόλυβδος δεν ανιχνεύτηκε με την συγκεκριμένη μέθοδο.

3.3.2.2 Ανάλυση βαρέων μετάλλων στο ψάρι *Diplodus sargus sargus*

Στον πίνακα 28 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων για το ψάρι *Diplodus sargus sargus* για το συκώτι, τα βράγχια και τους μύες. Είναι εκφρασμένες όλες οι συγκεντρώσεις σε μg/g υγρού βάρους.

Πίνακας 28: Συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων στο ψάρι *Diplodus sargus sargus* µg/g υγρού βάρους.

Στοιχεία	Συκώτι (µg/g)	Βράγχια (µg/g)	Μύες (µg/g)
7Li	0±0	18,8±0,009	11,2±0,002
24Mg	23617,33±1,3	91386,67±43,94	127106,7±11,87
47Ti	326,4±0,071	5594,667±2,399	1876±0,415
51V	76,66667±0,008	235,7333±0,21	143,8667±0,004
52Cr	0±0,002	4,8±0,009	38,53333±0
55Mn	41,33333±0,004	1167,2±0,606	289,2±0,002
56Fe	10557,33±0,676	9236±5,175	3925,733±0,146
59Co	10,26667±0	8,8±0,007	10,93333±0,001
60Ni	23,06667±0	62,53333±0,039	122,9333±0,004
65Cu	50,13333±0,016	14,66667±0,048	146,2667±0,012
66Zn	628,4±0,089	2476,667±1,306	4710,667±0,174
75As	238,8±0,033	235,6±0,105	1673,2±0,005
82Se	79,2±0,007	70,53333±0,023	162,2667±0
88Sr	1071,2±0,067	17826,67±4,53	9966,667±0,259
95Mo	0,266667±0,003	0±0	0,933333±0,001
111Cd	6±0	5,333333±0	7,6±0
208Pb	0±0,001	2,8±0,002	0±0,001

Τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις για το συκώτι παρουσιάζουν τα στοιχεία μαγνησίου 23617 µg/g υγρού βάρους, τιτανίου 326 µg/g υγρού βάρους, σιδήρου 10557 µg/g υγρού βάρους, στροντίου 1071 µg/g υγρού βάρους, αρσενικού 238 µg/g υγρού βάρους και ψευδαργύρου 628 µg/g υγρού βάρους. Οι τιμές κυμαίνονται από 238 µg/g υγρού βάρους που είναι το αρσενικό έως 23617,3 µg/g υγρού βάρους που είναι το μαγνήσιο. Τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις για το συκώτι παρουσιάζουν τα στοιχεία βαναδίου 76 µg/g υγρού βάρους, μαγγάνιου 41 µg/g υγρού βάρους, κοβαλτίου 10 µg/g υγρού βάρους, νικελίου 23 µg/g υγρού βάρους, χαλκού 50 µg/g υγρού βάρους, σεληνίου 79 µg/g υγρού βάρους, μολυβδαινίου 0,26 µg/g υγρού βάρους και καδμίου 6 µg/g υγρού βάρους. Τα μέταλλα λιθίου, χρωμίου και μολύβδου δεν ανιχνεύτηκαν με την συγκεκριμένη μέθοδο.

Τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις για τα βράγχια παρουσιάζουν τα στοιχεία μαγνησίου 91386 µg/g υγρού βάρους, τιτανίου 5594 µg/g υγρού βάρους, βόριου 235 µg/g υγρού βάρους, μαγγάνιου 1167 µg/g υγρού βάρους, σιδήρου 9236 µg/g υγρού βάρους, σεληνίου 70,5 µg/g υγρού βάρους, στροντίου 17826 µg/g υγρού βάρους, αρσενικού 235 µg/g υγρού βάρους και ψευδαργύρου 2476 µg/g υγρού βάρους. Οι τιμές κυμαίνονται από 235 µg/g υγρού βάρους που είναι το αρσενικό και το βόριο έως 91386,6 µg/g υγρού βάρους που είναι το μαγνήσιο. Τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις για τα βράγχια παρουσιάζουν τα στοιχεία λιθίου 18,8 µg/g υγρού βάρους, χρωμίου 4,8 µg/g υγρού βάρους, κοβαλτίου 8,8 µg/g υγρού βάρους, νικελίου

62,5 μg/g υγρού βάρους, χαλκού 14,6 μg/g υγρού βάρους, σεληνίου 70,5 μg/g υγρού βάρους, καδμίου 5,3 μg/g υγρού βάρους και μόλυβδου 2,8 μg/g υγρού βάρους. Το μέταλλο μολυβδαίνιο δεν ανιχνεύτηκε με την συγκεκριμένη μέθοδο.

Τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις για τους μύες παρουσιάζουν τα στοιχεία μαγνησίου 127106 μg/g υγρού βάρους, τιτανίου 1876 μg/g υγρού βάρους, βόριου 143 μg/g υγρού βάρους, μαγγανίου 289 μg/g υγρού βάρους, χαλκού 146 μg/g υγρού βάρους, σιδήρου 3925 μg/g υγρού βάρους, νικελίου 122 μg/g υγρού βάρους, σεληνίου 162 μg/g υγρού βάρους, στροντίου 9966 μg/g υγρού βάρους, αρσενικού 1673 μg/g υγρού βάρους και ψευδαργύρου 4710 μg/g υγρού βάρους. Οι τιμές κυμαίνονται από 143 μg/g υγρού βάρους που είναι το βόριο έως 127106,7 μg/g υγρού βάρους που είναι το μαγνήσιο. Τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις για τους μύες παρουσιάζουν τα στοιχεία λιθίου 11,2 μg/g υγρού βάρους, χρωμίου 38,5 μg/g υγρού βάρους, κοβαλτίου 10,9 μg/g υγρού βάρους, μολυβδαινίου 0,9 μg/g υγρού βάρους και καδμίου 7,6 μg/g υγρού βάρους. Το μέταλλο μόλυβδος δεν ανιχνεύτηκε με την συγκεκριμένη μέθοδο.

3.3.3 Ανάλυση βαρέων μετάλλων στο φυτό *Posidonia oceanica*

Στον πίνακα 28 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων για το θαλάσσιο φυτό *Posidonia oceanica*. Το δείγμα που εξετάστηκε προήλθε μόνο από τα φύλλα του φυτού. Είναι εκφρασμένες όλες οι συγκεντρώσεις σε μg/g.

Πίνακας 29: Συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων για τις περιοχές Κάβο Γκρέκο και Λεμεσό στο θαλάσσιο φυτό *Posidonia oceanica* µg/g.

Στοιχεία	Κάβο Γκρέκο φύλλα (µg/g)	Λεμεσό φύλλα(µg/g)
7Li	0,396±0,007	0,396±0,01
9Be	0±0	0±0
24Mg	3328,6±50,51	2965±3,62
44Ca	9408±79,21	11318±61,01
47Ti	3,4±0,046	4,928±0,03
51V	6,162±0,055	13,494±0,032
52Cr	1,818±0,02	2,724±0,011
55Mn	26,398±0,279	31,662±0,125
56Fe	396,52±3,568	540,8±2,359
59Co	0,812±0,005	1,384±0,015
60Ni	3,9±0,174	7,046±0,071
65Cu	2,136±0,038	4,398±0,058
66Zn	10,736±0,109	12,138±0,049
75As	0,454±0,009	0,47±0,002
82Se	0±0,029	0±0,012
88Sr	186,62±0,599	205,96±0,569
95Mo	1,196±0,011	1,334±0,003
111Cd	0,326±0	0,308±0,001
121Sb	0,134±0,001	0,122±0,001
208Pb	0,128±0,004	0,094±0,003

Για την περιοχή του Κάβο Γκρέκο στο θαλάσσιο φυτό *Posidonia oceanica* το στοιχείο που παρουσιάζει μέγιστη συγκέντρωση είναι το ασβέστιο 9408 µg/g. Το μέταλλο βηρυλλίου και σεληνίου δεν ανιχνεύτηκαν με την συγκεκριμένη μέθοδο..

Για την περιοχή της Λεμεσού στο θαλάσσιο φυτό *Posidonia oceanica* το στοιχείο που παρουσιάζει μέγιστη συγκέντρωση είναι το ασβέστιο 11318 µg/g. Το μέταλλο βηρυλλίου και σεληνίου δεν ανιχνεύτηκε με την συγκεκριμένη μέθοδο.

Η ανάλυση των φυτών στις δύο περιοχές δείχνει για το κάθε στοιχείο να βρίσκονται κοντά οι συγκεντρώσεις τους άσχετα αν βρίσκονται σε διαφορετικές τοποθεσίες. Οι τιμές αρκετών στοιχείων όπως του λιθίου, αρσενικού, μολυβδαίνιου, καδμίου, αντιμονίου, μολύβδου και ψευδαργύρου είναι σχεδόν οι ίδιες με μικρές διαφορές στα δεκαδικά της τιμής. Τα υπόλοιπα βαρέα μέταλλα μαγνήσιο, ασβέστιο, τιτάνιο, βόριο, χρώμιο, μαγγάνιο, σίδηρο, κοβάλτιο, νικέλιο, χαλκό και στρόντιο παρουσιάζουν διαφορετικές τιμές η μια περιοχή από την άλλη αλλά δεν είναι σημαντική η διαφορά στις τιμές.

3.3.4 Ανάλυση βαρέων μετάλλων στο θαλασσινό νερό από την περιοχή των φυτών *Posidonia oceanica*.

Στον πίνακα 30 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων για το θαλάσσιο νερό κοντά στο φυτό *Posidonia oceanica*. Το δείγμα που εξετάστηκε προήλθε από τις περιοχές Κάβο Γκρέκο και Λεμεσό. Είναι εκφρασμένες όλες οι συγκεντρώσεις σε $\mu\text{g/mL}$.

Πίνακας 30: Συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων για τις περιοχές Κάβο Γκρέκο και Λεμεσό στο θαλάσσιο νερό κοντά στο φυτό *Posidonia oceanica* $\mu\text{g/mL}$.

Στοιχεία	Κάβο Γκρέκο νερό ($\mu\text{g/mL}$)	Λεμεσός νερό ($\mu\text{g/mL}$)
7Li	1,370667 \pm 0,198	1,491833 \pm 0,015
9Be	0,000167 \pm 0,002	0,000667 \pm 0,002
24Mg	7758,333 \pm 623	8715 \pm 66,41
44Ca	10431,67 \pm 885,5	10768,33 \pm 405,4
47Ti	1,088667 \pm 0,026	0,938167 \pm 0,062
51V	0,4975 \pm 0,001	0,426333 \pm 0,034
52Cr	0,0635 \pm 0,001	0,049833 \pm 0,004
55Mn	0,044 \pm 0	0,019 \pm 0
56Fe	2,3505 \pm 0,336	1,087167 \pm 0,142
59Co	0,018833 \pm 0	0,0125 \pm 0,001
60Ni	0,435833 \pm 0,013	0,433667 \pm 0,019
65Cu	1,216833 \pm 0,08	1,019333 \pm 0,012
66Zn	0,565 \pm 0,003	0,338333 \pm 0
75As	0 \pm 0,001	0 \pm 0,002
82Se	0 \pm 0,001	0 \pm 0,001
88Sr	196,5333 \pm 23,17	201,7 \pm 5,59
95Mo	0,2125 \pm 0,005	0,2085 \pm 0,013
111Cd	0,002167 \pm 0,001	0,002167 \pm 0,001
121Sb	0,030167 \pm 0,005	0,0315 \pm 0,006
208Pb	0 \pm 0,001	0 \pm 0,002

Για την περιοχή του Κάβο Γκρέκο στο θαλάσσιο νερό κοντά στο φυτό *Posidonia oceanica* το στοιχείο που παρουσιάζει μέγιστη συγκέντρωση είναι το ασβέστιο 10431 $\mu\text{g/mL}$. Τα στοιχεία βηρυλλίου, κοβαλτίου, αρσενικού σεληνίου, καδμίου και μολύβδου δεν ανιχνεύτηκαν με την συγκεκριμένη μέθοδο.

Για την περιοχή της Λεμεσού στο θαλάσσιο νερό κοντά στο φυτό *Posidonia oceanica* το στοιχείο που παρουσιάζει μέγιστη συγκέντρωση είναι το ασβέστιο 10768 $\mu\text{g/mL}$. Τα στοιχεία βηρυλλίου, κοβαλτίου, αρσενικού σεληνίου, καδμίου και μολύβδου δεν ανιχνεύτηκαν με την συγκεκριμένη μέθοδο.

Η ανάλυση των νερών που λήφθηκαν κοντά από τα θαλάσσια φυτά στις δύο περιοχές δείχνει για το κάθε στοιχείο να βρίσκονται κοντά οι συγκεντρώσεις τους άσχετα αν βρίσκονται σε διαφορετικές τοποθεσίες. Οι τιμές αρκετών στοιχείων όπως του λιθίου, τιτανίου, βορίου, νικελίου, χαλκού, μολυβδαίνιου και αντιμονίου είναι σχεδόν οι ίδιες με μικρές διαφορές στα δεκαδικά της τιμής. Τα υπόλοιπα βαρέα μέταλλα μαγνήσιο, ασβέστιο, χρώμιο, μαγγάνιο, σίδηρο, ψευδάργυρος, και στρόντιο παρουσιάζουν διαφορετικές τιμές η μια περιοχή από την άλλη αλλά δεν είναι σημαντική η διαφορά στις τιμές.

4 Συζήτηση

Τα θαλάσσια λιβάδια *Posidonia oceanica* θεωρούνται ένας σημαντικός οικοτόπος γιατί υποδηλώνουν καλή οικολογική ποιότητα για το θαλάσσιο οικοσύστημα ως προς την προστασία και την διατήρηση της βιοποικιλότητας και την πρωτογενή παραγωγικότητα (Piazzi, Balata, Ceccherelli, Piazzi, & Piandanna, 2016). Αποτελούν ενδιαίτημα για πληθώρα οργανισμών όπως ασπόνδυλους οργανισμούς, ψάρια, μικροάλγη και διάφορους τύπους μικροβίων. Σε αυτή την μελέτη έγινε μια πρώτη προσέγγιση ως προς τα κυρίαρχα γένη μικροοργανισμών, βακτηρίων και μυκήτων, σε περιοχές που υφίσταται ανάπτυξη του θαλάσσιου φυτού *Posidonia oceanica*. Οι περιοχές που εξετάστηκε το θαλάσσιο φυτό ως προς τη βιοποικιλότητα της μικροβιακής κοινότητας είναι οι περιοχές Κάβο Γκρέκο και Λεμεσός. Τα γένη βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα: *Achromobacter*, *Vibrio*, *Bacillus* και *Ustilago*. Συνολικά βρέθηκαν 22 διαφορετικά είδη βακτηρίων. Το κυρίαρχο είδος βακτηρίου είναι το *Vibrio gallaecicus* με 13 ταυτοποιήσεις. Στο άρθρο (Garcias-Bonet, Arrieta, de Santana, Duarte, & Marbà, 2012) μελετήθηκαν οι διάφορες βακτηριακές κοινότητες που παρουσιάζονται στην επιφάνεια ιστών (φύλλα, ρίζα και ρίζωμα) της *Posidonia oceanica* στις Βαλεαρίδες Νήσοι. Στο άρθρο βρέθηκαν ως κυριότερη βακτηριακή κοινότητα ενδοφυτικών τα πρωτεοβακτήρια (*Desulfovibrio*). Ομοίως, οι (Jose, Shanmuga, Sivakala, Robinson, & Jebakumar, 2014) εξέτασαν την φυλογενετική ποικιλότητα βακτηριακών πληθυσμών που σχετίζονται με τις ρίζες θαλάσσιου φυτού *Cymodosea serrulata*. Τα ευρήματα της μελέτης έδειξαν 6 διαφορετικά γένη βακτηρίων ανάμεσα σε αυτά και τα γένη *Vibrio* και *Bacillus*.

Επιπρόσθετα, σε αυτή την εργασία εξετάστηκε και η μυκητιακή κοινότητα του θαλάσσιου φυτού *Posidonia oceanica*. Τα αποτελέσματα έδειξαν τα γένη *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Engyodontium* και *Penicillium*. Το κυρίαρχο γένος είναι το *Cladosporium* με 12 διαφορετικές ταυτοποιήσεις. Παρουσιάζονται δύο κυρίαρχα είδη το *Cladosporium cladosporioides* και *Engyodontium album* με 4 διαφορετικές ταυτοποιήσεις. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τους (Shoemaker & Wyllie-Echeverria, 2013) οι οποίοι εξέτασαν τους ενδοφυτικούς μύκητες που αποικίζουν το ρίζωμα τριών διαφορετικών θαλάσσιων λιβαδιών *Zostera marina*, *Zostera japonica* και *Phyllospadix scouleri*. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι τα κυρίαρχα είδη μυκήτων ήταν *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus flavus* και *Cladosporium sp.*. Επίσης οι (Panno et al., 2013) βρήκαν ότι τα κυρίαρχα γένη μυκήτων στο

φυτό *Posidonia oceanica* ήταν *Penicillium*, *Cladosporium* και *Acremonium*. Τα γένη μυκήτων *Aspergillus* και *Penicillium* έχουν καταγραφεί και από τους (Venkatachalam, Thirunavukkarasu, & Suryanarayanan, 2014) σε δέκα διαφορετικά θαλάσσια φυτά.

Αρκετοί θαλάσσιοι μύκητες έχουν την ικανότητα να παράγουν ένζυμα ικανά να βιοδιασπούν διαφόρων ειδών ρύπων. Οι βαφές Methyl-red και Remazol Brilliant Blue χρησιμοποιούνται ευρέως στις βιομηχανίες υφασμάτων, πλαστικών και βαφών ως χρωστικές (M. C. Silva et al., 2013). Ο αποχρωματισμός τέτοιων βαφών συνδέεται με την παραγωγή λακκασών και μαγγανασών από τους μύκητες (M. Da Silva, Passarini, Bonugli, & Sette, 2008). Τα είδη των μυκήτων που παρουσιάζουν ποσοστό βιοαποικοδόμησης και στις δύο βαφές πάνω από 80% είναι τα ακόλουθα: *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium uredinicola*, *Engyodontium album*, *Cladosporium sphaerospermum* και *Aspergillus sydowii*. Επίσης έγινε έλεγχος αποχρωματισμού στις δύο βαφές με χλωριούχο νάτριο για αύξηση του αποχρωματισμού αλλά δεν παρατηρήθηκε κάποια αύξηση στο ποσοστό αποχρωματισμού όπως σε άλλα άρθρα (Panno et al., 2013). Μύκητες που ανήκουν στο γένος *Aspergillus* έχουν βρεθεί να αποχρωματίζουν διάφορων ειδών βαφές με ποσοστό πάνω από 50% σε διάστημα 8 ημερών (Ali, Hameed, Ahmed, & Khan, 2007). Το είδος *Cladosporium cladosporioides* βρέθηκε να έχει παραγωγή λακκασών και αποχρωματισμών διάφορων βαφών με ποσοστό που κυμαίνεται από 50-100% (Muthezhilan, Yogananth, Vidhya, & Jayalakshmi, 2008); (Halaburgi, Sharma, Sinha, Singh, & Karegoudar, 2011). Ακόμη το γένος *Cladosporium* βρέθηκε να μεταβολίζει υδρογονάνθρακες με εφαρμογή στην βιοαποκατάσταση ρυπασμένων περιοχών από πετρέλαιο. Επίσης τα γένη *Cladosporium* και *Aspergillus* έχουν βρεθεί να είναι ανθεκτικά σε οργανικές χλωριωμένες ενώσεις (PCBs) καθώς και σε άλλες σύνθετες οργανικές ενώσεις (Goltapeh, Danesh, & Varma, 2013).

Γενικότερα ο αποχρωματισμός διάφορων βαφών με τους συγκεκριμένους μύκητες της παρούσας εργασίας χρειάζεται περισσότερη έρευνα ούτως ώστε να μπορέσει να εφαρμοστεί με μεγάλο ποσοστό βιοαποικοδόμησης σε μεγάλη κλίμακα που περιέχει τόνους βαφής και όχι μικρές ποσότητες.

Η παρουσία του θαλάσσιου φυτού *Posidonia oceanica* υποδηλώνει και ταυτόχρονα καλή ποιότητα του θαλάσσιου νερού που βρίσκεται το φυτό. Στην μελέτη αυτή εξετάστηκε θαλασσινό νερό κοντά στα φυτά ως προς τις συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων στις περιοχές Κάβο Γκρέκο και Λεμεσό. Βρέθηκε για την περιοχή του Κάβο Γκρέκο στο θαλάσσιο νερό κοντά στο φυτό *Posidonia oceanica* το στοιχείο που παρουσιάζει μέγιστη συγκέντρωση είναι

το ασβέστιο 10431 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Για την περιοχή της Λεμεσού στο θαλάσσιο νερό κοντά στο φυτό *Posidonia oceanica* το στοιχείο που παρουσιάζει μέγιστη συγκέντρωση είναι το ασβέστιο 10768 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Με βάση το άρθρο (Inui et al., 2012) τα επίπεδα βαρέων μετάλλων είναι υψηλότερα στην δυτική και κεντρική Μεσόγειο. Για την νότια ακτή της Μεσογείου δεν υπάρχουν αξιόπιστες εκτιμήσεις για να περισσότερα βαρέα μέταλλα. Με βάση το άρθρο (Inui et al., 2012) τα μέταλλα κοβαλτίου και νικελίου έχουν τις ίδιες συγκεντρώσεις με της συγκεντρώσεις που βρέθηκαν σε αυτή την εργασία. Οι συγκεντρώσεις είναι 0,12 και 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αντίστοιχα. Οι ερευνητές (Humbaton, Ahmadov, Balayev, & Suleymanov, 2015) έκαναν ανάλυση θαλασσινού νερού από την Κασπία θάλασσα και οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων χρωμίου 0,11 $\mu\text{g}/\text{mL}$, χαλκού 0,36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και ψευδαργύρου 0,73 $\mu\text{g}/\text{mL}$ είναι κοντινές με της παρούσας εργασίας. Ο χαλκός παρουσιάζει μόνο μια μικρή διαφορά αφού βρέθηκε να έχει συγκέντρωση 1,2 και 1,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ στην περιοχή Κάβο Γκρέκο και Λεμεσό αντίστοιχα.

Επίσης έγινε έλεγχος βαρέων μετάλλων και στο ίδιο το φυτό *Posidonia oceanica*. Λήφθηκε δείγμα από τα φύλλα του φυτού και από τις δύο περιοχές. Για την περιοχή του Κάβο Γκρέκο στο θαλάσσιο φυτό *Posidonia oceanica* το στοιχείο που παρουσιάζει μέγιστη συγκέντρωση είναι το ασβέστιο 9408 $\mu\text{g}/\text{g}$. Για την περιοχή της Λεμεσού στο θαλάσσιο φυτό *Posidonia oceanica* το στοιχείο που παρουσιάζει μέγιστη συγκέντρωση είναι το ασβέστιο 11318 $\mu\text{g}/\text{g}$. Σε παρόμοια επιστημονική έρευνα βρέθηκε ότι τα μέταλλα Cd, Se και Hg έχουν την χαμηλότερη συγκέντρωση στο φυτό και το μέταλλο Zn την μεγαλύτερη συγκέντρωση. Τα μέταλλα As, Cr, Cu, Pb και Ni κυμαίνονται μεταξύ 1,5 έως 2,6 $\mu\text{g}/\text{g}$ ξηρής βιομάζας. Έρευνα που έγινε στην Ιταλία στο νησί Ουστίκα στο φυτό *Posidonia oceanica* για τα μέταλλα Cd, Cu, Pb, Zn και Cr βρέθηκαν να έχουν συγκεντρώσεις $6,25 \pm 1,7$, $24,75 \pm 13$, $1,6 \pm 0,7$, 222 ± 52 και $0,16 \pm 0,21$ $\mu\text{g}/\text{g}$ αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φαίνεται να εμπίπτουν στα όρια του χαλκού και του μολύβδου αλλά αποκλίνουν από τα όρια των μετάλλων καδμίου, ψευδαργύρου και χρωμίου να παρουσιάζουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Το φυτό *Posidonia oceanica* μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως βιολογικός δείκτης μόλυνσης βαρέων μετάλλων στα παράκτια οικοσυστήματα. Σε περιοχές με μόλυνση βαρέων μετάλλων παρουσιάστηκε μείωση τους στο νερό αλλά αύξηση στα φυτά *Posidonia oceanica* καλυτερεύοντας την ποιότητα των νερών (Delile, 2012).

Τέλος έγινε έλεγχος βαρέων μετάλλων και σε ψάρια που ζουν κοντά στο φυτό *Posidonia oceanica*. Εξετάστηκαν ψάρια μόνο από την περιοχή της Λεμεσού. Τα είδη που εξετάστηκαν

είναι *Boops boops* και *Diplodus sargus sargus*. Από τα ψάρια εξετάστηκαν τα βράγχια, το συκώτι και οι μύες με το δέρμα. Για το είδος *Boops boops* την μεγαλύτερη συγκέντρωση στο συκώτι έχει το μαγνήσιο 53253,3 μg/g υγρού βάρους. Παρουσιάζονται τα μέταλλα κατά αυξανόμενη σειρά ως προς την συγκέντρωση τους Mo<Co<V<Li<Cr<Ni<Cd<Mn<Cu<As<Se<Ti<Sr<Zn<Fe<Mg. Για τα βράγχια την μεγαλύτερη συγκέντρωση έχει το μαγνήσιο 78320 μg/g υγρού βάρους. Παρουσιάζονται τα μέταλλα κατά αυξανόμενη σειρά ως προς την συγκέντρωση τους Co<Cd<V<Cr<Ni<Li<As<Cu<Se<Mn<Zn<Ti<Fe<Sr<Mg. Για τους μύες με το δέρμα την μεγαλύτερη συγκέντρωση στο συκώτι έχει το μαγνήσιο 91066,67 μg/g υγρού βάρους. Παρουσιάζονται τα μέταλλα με αυξανόμενη σειρά ως προς την συγκέντρωση τους Cd<Mo<Co<V<Ni<Cr<Li<Cu<Se<As<Mn<Ti<Fe<Zn<Sr<Mg. Σε μελέτη για βαρέα μέταλλα για το είδος *Boops boops* στην θάλασσα του Αιγαίου βρέθηκε για το κάδμιο να έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση στο συκώτι ακολούθως στα βράγχια και λιγότερη στο δέρμα του μυ η τιμή του καδμίου στην μελέτη κυμαίνεται κοντά στο 1,1ppb που συμφωνούν και τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης με μια μικρή απόκλιση στην τιμή για το συκώτι που είναι 29,3 μg/g υγρού βάρους ενώ για τα βράγχια είναι 1,6 και για τους μύες 0,53 μg/g υγρού βάρους. Στην μελέτη το είδος *Boops boops* έχει την μεγαλύτερη συγκέντρωση χαλκού σε σχέση με το άλλο είδος που εξετάστηκε αυτό παρατηρείται και σε αυτήν την έρευνα (Zyadah & Chouikhi, 2009). Έρευνα που έγινε για 5 διαφορετικά είδη ψαριών της Μεσογείου θάλασσας λαμβάνοντας βρώσιμο μέρος για ανάλυση (μύες) παρουσίασαν συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων κατά αυξανόμενη σειρά ως προς την συγκέντρωση τους Cd<Pb<Cr<Ni<V<Mn<As<Zn. Τα αποτελέσματα των επιστημών (Copat et al., 2013) συνάδουν με αυτά της παρούσας μελέτης με μικρές διαφοροποιήσεις στις συγκεντρώσεις. Για παράδειγμα σε αυτήν την μελέτη η αυξανόμενη σειρά των βαρέων μετάλλων για τους μύες είναι Cd<Cr<Ni<V<As<Mn. Για το είδος *Diplodus sargus sargus* την μεγαλύτερη συγκέντρωση στο συκώτι έχει το μαγνήσιο 23617,3 μg/g υγρού βάρους. Παρουσιάζονται τα βαρέα μέταλλα κατά αυξανόμενη σειρά ως προς την συγκέντρωση τους Mo<Cd<Co<Ni<Mn<Cu<V<Se<As<Ti<Zn<Sr<Fe<Mg. Για τα βράγχια την μεγαλύτερη συγκέντρωση έχει το μαγνήσιο 91386,67 μg/g υγρού βάρους. Παρουσιάζονται τα βαρέα μέταλλα κατά αυξανόμενη σειρά ως προς την συγκέντρωση τους Pb<Cd<Co<Cu<Li<Ni<Se<As=V<Cr<Mn<Zn<Ti<Fe<Sr<Mg. Τέλος για τους μύες την μεγαλύτερη συγκέντρωση έχει το μαγνήσιο 127106,7 μg/g υγρού βάρους. Παρουσιάζονται τα βαρέα μέταλλα κατά αυξανόμενη σειρά ως προς την συγκέντρωση τους

Mo<Co<Li<Cr<Cd<Ni<V<Cu<Se<Mn<As<Ti<Fe<Zn<Sr<Mg. Σε παρόμοια μελέτη (Abdulali K.A. Taweel, M. Shuhaimi-Othman, 2012) εξετάστηκαν το συκώτι, τα βράγχια και οι μύες βρέθηκαν μεγάλες συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων καδμίου, μολύβδου και κοβαλτίου στο συκώτι ακολούθως στα βράγχια και τέλος στους μύες. Τα ψάρια που εξετάστηκαν ήταν του είδους *Oreochromis niloticus* στην Μαλαισία και λήφθηκαν από τοπικά ψαροπωλεία. Τα δύο είδη ψαριών που εξετάστηκαν δεν παρουσιάζουν συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων οι οποίες θα μπορούσαν να έχουν αρνητικές επιπτώσεις στον άνθρωπο. Επίσης τα δύο είδη ψαριών δεν αλιεύονται όλο τον χρόνο από την θάλασσα της Λεμεσού. Επομένως η κατανάλωση τους δεν είναι συχνή και με αυξημένα επίπεδα μετάλλων δεν θα υπήρχε πρόβλημα για τους ανθρώπους. Στο πίνακα 30 παρουσιάζονται 20 άρθρα με τις τεχνικές ανάλυσης διάφορων ειδών ψαριών σε διάφορες τοποθεσίες, τα χαρακτηριστικά των χωνεύσεων των δειγμάτων και τα αποτελέσματά τους.

Πίνακας 31: άρθρα με τεχνικές ανάλυσης βαρέων μετάλλων ICP/MS σε διάφορες τοποθεσίες και τα αποτελέσματά τους

A/A	Μέταλλα για εξέταση Είδη ψαριών	Περιοχή δειγμάτων Μέρη ψαριού Χαρακτηρ. δείγματος	Χαρακτηρ. χώνευσης	Τεχνικά χαρακτηριστικά οργάνου	Κυριότερα αποτελέσματα	Βιβλιογραφία
1	As, Cd, Cr, Pb, Mn, Ni, V, Zn <i>D. trunculus</i> <i>A. laterna</i> <i>M. barbatus</i> <i>E. encrasicolus</i> <i>T. trachurus</i> <i>S. scombrus</i>	From local fishermen in the Catania fish market, Italy Muscles 150 simples from 5 different species fish 250 g eat meat 0,5g x 2 times	-digestion solution: 6 mL HNO ₃ 65% and 2 mL H ₂ O ₂ 30% For 50 minutes at 200 °C -the solution put in falcon with 30 mL deionized water.	- Mean recoveries for As, Cd, Cu and Zn were 97.4%, 94.6%, 110% and 90.4% respectively of the certified values. -The method detection limits (MDL) estimated with 3 replicates of the procedure blanks were (mg/kg w.w.): As 0.013, Cd 0.0003, Cr 0.003, Pb 0.0001, Mn 0.055, Ni 0.007, V 0.002, and Zn 0.109. The limits of as 0.13, Cd 0.003, Cr 0.03, Pb 0.001, Mn 0.55, Ni 0.07, V 0.02, and Zn 1.09 quantification (LOQ) estimated with the MDL 10 were (mg/kg w.w.) -Analytical blanks were run in the same way as the samples, and concentrations were determined using standard solutions prepared in the same acid matrix. -Standards for the instrument calibration were prepared on the basis of mono element certified reference solution ICP Standard (Merck).	-Values of estimated daily intake per meal size of seafood for humans were higher than those suggested by JECFA for inorganic As in <i>M. barbatus</i> for children age class, and lower for Zn for both adults and children age classes	(Copat et al., 2013)
2	As, Cd,Pb, Hg <i>Crucian</i>	-Fresh fish was collected in the fishing pier along coastal areas of		-Standard solutions were prepared from stock standard solutions of the metals. -The relative standard deviations of	-Levels of Cu, Zn, Cd and Cr were found to be higher in the liver and gills than in muscle	(Liu et al., 2015)

	<p><i>carp (Carassius auratus)</i>, <i>Yellow catfish (Pelteobagrus fulvidraco)</i>, <i>Bighead carp (Hypophthalmichthys molitrix)</i></p>	<p>Hainan. -Fish collected from the local fishermen at the capturing day. Muscles, liver, flap, gills A total of 94 fish samples, comprising 14 species, 0,2g</p>		<p>duplicate samples were less than 10 %.</p>	<p>-Pb was preferentially accumulated in the gills.</p>	
3	<p>As, Pb, Cd, Hg <i>A. Anguilla</i>, <i>L. Abramis brama</i>, <i>C. carpio</i>, <i>Silurus glanis</i>, <i>R. rutilus</i>, <i>Perca fluviatilis</i>, <i>Esox lucius</i>, <i>Sander lucioperca</i></p>	<p>-The fish species were caught by the French National Agency for Water and Aquatic Environments (ONEMA), as a part of the national PCB action plan in 2008 and 2009 Muscles with skin Collected 76 samples from the most contaminated sites and 73 samples from the least contaminated sites, for a total of 149 samples, 0,2-0,6 g wet weight</p>	<p>-microwave digestion system Multiwave 3000. -solution 3mL deionized water and 3 mL HNO₃ 67% -put the sample in falcon 50 mL with internal standard</p>	<p>- 5 standards with standard linear regression and internal standardization were prepared at levels ranging from 0 to 20 µg/L for As, Cd, Hg and Pb. -The calibration curve was plotted from six points, including the calibration blank. -All test batches were evaluated using an internal quality approach and validated if they satisfied the defined Internal Quality Controls (IQCs). - For each experiment, a run included blank, CRM, standard spiked solutions on samples randomly selected, samples analysed in duplicate to eliminate any batch-specific error, plus a mid-range standard analysed for every eight samples and at the end of the sequence. The CRMs ERM CE-278 and IAEA 407 were used to check the trueness of measurements. -limits of detection</p>	<p>-The average content and the standard deviation in fish muscle samples was 0.007 ± 0.012, 0.102 ± 0.077, 0.142 ± 0.097 and 0.035 ± 0.053 mg/kg of wet mass for Cd, As, Hg and Pb, respectively.</p>	<p>(Noël et al., 2013)</p>

				(LOD) or quantification (LOQ). According to international guidelines (GEMS/ Food, 1995), to calculate mean concentrations, it was assumed that the values below the LOD or the LOQ were equal to half the LOD or the LOQ (middle bound approach).		
4	Fe,Zn, Cu, Pb, Cd <i>Hirundichthyscoromandelensis</i> <i>Cypselurusspilopterus</i>	landing centres of Pondicherry and Cuddalore, Southeast coast of India Muscles 1g dry weight	-muscles put for 14 hours in 70 °C. -concentrate solution HNO ₃ and H ₂ O ₂ (4:1) -put in hot plate heating 120 °C. -put deionized water and HNO ₃ (4:1) 20 mL. -filtering with Whatman no. 1	-Metal concentrations and the corresponding mean standard deviations (expressed as µg g ⁻¹ dry weight) were measured in tissues	-Concentrations of toxic metals such as Pb and Cd were well below the permissible limits proposed by the World Health Organization -Cd showed the lowest concentrations in all fish samples followed by Pb.	(Jayaprabha, 2014)
5	Cd ,Cr, Cu,Zn, Pb, As <i>Lutjanuserythropterus</i> <i>Ephippusorbis</i> <i>Parargyropsedita</i> <i>Sparusberda</i> <i>Navodonxanthopterus</i> <i>Lethrinusrubrioperculatus</i>	-Nansi Lake - net with mesh size 16mm Gills, liver, muscles In total, 136 fish were caught from the lake, all fish were 1–3 years old. 0.5 g of muscle, liver, gill or fin tissue for	-simple drying with ice. -3 mL concentrate nitric acid 65%. -put the simple in MK-10G at 80 °C for 24 hours. -dilution with Milli-Q water 50 mL.	-The metal analysis of Cd and Pb were carried out by using ICP-700ES -The absorption wavelengths were 228.8 nm for Cd and 217.0 nm for Pb, respectively. The concentration of Hg was analyzed by cold vapor atomic absorption spectrometry (Model F732-V, China), wave length was 253.7 nm. -Concentration of As was analyzed by Atomic Fluorescence Spectrometry (AFS-930, China), wave length was 193.7 nm. -The detection limits for Pb, Cd, Hg and	-Health hazard assessment showed no health risk from exposure to Pb, As, Cd, and Hg by consuming fish from this lake.	(Li et al., 2015)

	<p><i>Siganus fuscescens</i> <i>Pneumatophorus japonicas</i> <i>Therapon jarbua</i> <i>Epinephelus areolatus</i>, <i>Siganus guttatus</i>, <i>Cynoglossus robustus</i>, <i>Chorinemus lysan</i>, <i>Caranx kalla</i></p>			As were 20, 2, 0.2 and 0.04 lg/L.		
6	<p>As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, and Zn <i>Engraulis anchoita</i></p>	<p>Southwestern Atlantic ocean -Eight samples of <i>E. anchoita</i> were collected in October 2010 -10 kg fish were collected in each sampling point -subsample (about 1.0 kg) was manually filleted, homogenised and frozen at -20 °C</p>	<p>-500 mg fish were weighted inside quartz vessels and 6 mL of 14 mol HNO₃ were added -The heating program was carried out as follows: 1000W for 10 min 1400W for 10 min and 0 W for 20 min. -Digests were diluted with ultrapure water. - vessels were soaked in concentrated HNO₃ for 10 min and rinsed with ultrapure</p>	<p>-RF power (W) 1400, -Plasma gas flow rate (L min⁻¹) 15, -Auxiliary gas flow rate (L min⁻¹) 1.2, -Nebulizer gas flow rate (L min⁻¹) 1.09, - Dwell time (ms) 50, -Sweeps/reading 5, -Readings/replicate 3, Replicates 3</p>	<p>- As, Cd and Cr presented values higher than the maximum limits (1.0, 0.1 and 0.1 µg g⁻¹, respectively) - As, Cd and Cr ranged from 5.49 to 6.53, 0.221 to 0.271 and 48.5 to 58.4 µg g⁻¹ - Co, Cu, Fe, Mn, Se and Zn in the samples under study ranged from 0.101 to 0.150, 6.08 to 6.98, 201 to 251, 5.62 to 6.08, 2.22 to 2.76 and 64.7 to 88.9 µg g⁻¹</p>	(Maciel et al., 2014)

			water		- Mo and Ni ranged from 1.64 to 1.98 and 0.912 to 1.20 µg g/1, respectively	
7.	Li, B, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Se, Rb, Sr, Mo, Ag, Cd, Sn, Sb, Te, Ba, Ti, Pb, Bi, U, As, Na, Mg, K and Ca <i>Parapimelodus valenciennis</i> and <i>Prochilodus lineatus</i>	Chascomus Lake in Argentina muscle, skin and scales -December 2011 - 3 layer 3 × 3 cm mesh net of 10 m length -tissues were dissected with ceramic knife	-The dry samples were pulverized in a coffee-mill. -0.1 g aliquots of the samples were digested in a microwave digestion system with 5 mL of concentrated nitric acid	-Dogfish muscle was used for quality control	-Higher metal concentrations were found in skin and scales rather than in muscle, except for Se and Rb - All the toxic elements were found to be below the international and national legislation in tissue samples -High values of Pb were observed -The levels of As, Cu and Pb in <i>P. valenciennis</i> were found to be higher than the observed values in other Siluriforms species	(Schenone et al., 2014)
8.	Al, As, Be, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Pb, Mn, Mo, Ni, Sb, Tl, V and Zn <i>Pomadasys sp.</i> , <i>Haemulidae</i> , <i>Platycephalus sp.</i> ,	Persian Gulf in the south east of Iran muscles and livers 141 fishes	-lyophilized fish samples were homogenized with ceramic mortar -Aliquots (about 0.15 g) of tissues were transferred into 50 mL digestion vessels, followed by acid	-The detection limits for Al, As, Be, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Sb, Pb, Tl, V and Zn are 0.74, 0.002, 0.001, 0.003, 0.092, 0.003, 0.070, 0.74, 0.016, 0.006, 0.023, 0.003, 0.036, 0.0002, 0.002 and 0.36 µg L ⁻¹ , respectively	-metal accumulation in the liver tissue were higher than in muscle for almost all elements -Negative length dependent relationships were observed for almost all elements in the muscle of flathead, greasy grouper and tiger-tooth fish species	(Agah et al., 2009)

	<i>Platycephalidae</i> , <i>Epinephelus tauvina</i> , <i>Serranidae</i> , <i>Otolithes rubber</i> , <i>Sciaenidae</i> , <i>Pampus argenteus</i> , <i>Stromateidae</i>		digestion using 6 mL 65% HNO ₃ and 1mL 30% H ₂ O ₂ -vessels were put in a microwave oven. - 150 °C 15 min -10 min cooling down. -extractions were diluted to a final volume of 50 mL using Milli-Q water.		-The concentrations of elements in fishes in the -Northern coastal waters of the Persian Gulf were lower than maximum allowable concentrations	
9.	Cd, Cu, Hg and Pb <i>Cyprinidae</i> , <i>Salmonidae</i> and <i>Mugilidae</i> fish species	Neretva river in Bosnia and Herzegovina Dorsal muscle and liver	-5 mL of concentrated HNO ₃ and 0.5 mL of concentrated H ₂ O ₂ were added to 0.25 g of test sample in the digestion vessel. -vessels placed in the microwave oven. -The digestates were left to cool and transferred to 100 mL volumetric flasks, diluted to the mark with Milli-Q water and stored in a refrigerator	-Spray chamber Scott double-pass, - Nebulizer RF power (W) Concentric, - Plasma gas flow rate (l min ⁻¹) 1000, -Nebulizer gas (Ar) 15.0, flow rate (l min ⁻¹) 0.7–0.9 (optimised daily)	-The average content of metals in fish muscle samples was 0.013–0.055, 0.068–16.059, 0.050–0.401 and 0.055–0.703 mg/kg for Cd, Cu, Hg and Pb, respectively.	(Djedjibegović et al., 2012)
10.	As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, and Zn	Danube River muscle, gills, spleen,	-Samples were freeze-dried	-RF power (W) 1550, -Cooling gas flow 14 L/min,	- The maximum overall metal accumulation	(Jovičić et al., 2015)

	<p><i>Silurus glanis</i></p>	<p>liver, kidneys, intestine, gizzard, heart, brain, gallbladder, swim bladder, vertebra, operculum, and gonads</p> <p>13 wels catfish specimens</p>	<p>-0.3 g dry weight were processed in a microwave digestion system.</p> <p>-Samples were mineralized by adding 6 mL of 65 % HNO₃ and 4 mL of 30 % H₂O₂</p> <p>-Microwave program: 5 min-160 °C; 15 min-190 °C; and 20 min-100 °C.</p> <p>- After cooling, samples were transferred into 100-mL volumetric flasks and diluted with ultrapure water.</p> <p>-five reagent blank samples were prepared</p> <p>.</p>	<p>-Nebulizer flow 1L/min,</p> <p>-Collision gas flow 1mL/min,</p> <p>- Operating mode KED,</p> <p>-Dwell time 10 ms,</p>	<p>was observed in the vertebra, followed by the kidneys and liver, with the metal pollution index (MPI) values of 0.26, 0.25, and 0.24, respectively</p> <p>- Average metal concentrations in the fish muscle were below the maximum allowed concentrations for human consumption</p> <p>- The minimum values were observed in the gallbladder, muscle, brain, and swim bladder, with MPI values of 0.03, 0.06, 0.07, and 0.09, respectively.</p> <p>- As, Cd, Pb, Cu, Fe, and Zn concentrations in the muscle were 0.028, 0.001, 0.001, 0.192, 3.966, and 3.969 µg/g wet weight</p> <p>-Se concentration in the liver (7.930±2.203 µg/g dw), exceeded the lower precautionary threshold</p>
--	------------------------------	--	--	---	---

					<p>-the highest Fe concentrations were observed in the kidneys, spleen, and heart</p> <p>-The gonads had the highest As and Zn concentrations</p> <p>-gallbladder had the lowest overall metal concentrations</p> <p>-muscle was the tissue with the second lowest overall accumulation levels</p>	
11.	<p>Cd, Zn, Pb, Ni, Co</p> <p><i>Oreochromis niloticus</i></p>	<p>-Selangor, Peninsular Malaysia</p> <p>-Serdang night market, Bangi night and wet markets and Kajang wet market</p> <p>- liver, gill, muscle</p>	<p>-Organs were removed with stainless steel knife</p> <p>-homogenized</p> <p>-dry at 80 °C for 2d</p> <p>-fine powder with ceramic mortar</p> <p>-0,5g DW from muscle and gill</p> <p>-0,1g DW from liver</p> <p>- microwave digestion system using 65% HNO₃ and 35% H₂O₂ mixture 3:1 at 150°C for 20 min</p>	<p>-RF generator 40 MHz</p> <p>-RF power 1000 W</p> <p>-Spray chamber Rytton scott,</p> <p>-Nebulizer cross flow,</p> <p>-Plasma gas flow 15 L/min,</p> <p>-Auxiliary gas flow 1 L/min,</p> <p>-Nebulizer gas flow 0,60 L/min</p>	<p>- The highest Cd, Pb and Co concentration in fish liver were observed in Kajang wet market which is 0.44, 0.72 and 0.86 µg g⁻¹ DW, respectively</p> <p>- in fish gill, levels of Pb and Co in Serdang night market were the lowest among all sites which is 0.34 and 0.31 µg g⁻¹ DW, while the highest in gill from Bangi wet market which is 0.63 and 0.41 µg g⁻¹ DW, respectively</p>	(Taweel et al., 2012)

			<p>-cooling at room temperature for 35m</p> <p>-digested samples were diluted with deionized water up to 25 mL for liver and 50 mL for muscles and gills</p> <p>-samples filtered 0.45 µm Whatman filter</p>			
12.	<p>Cd, Pb,Cr, Ni, and Cu</p> <p><i>Atherina boyeri</i>, <i>Alosa pontica</i>, <i>Sprattus sprattus</i>, <i>Mullus barbatus</i></p>	<p>Romanian Black Sea muscular tissue</p> <p>At least 10 individuals</p>	<p>-Samples were homogenized, weighed (0.3–0.5 g) and digested with nitric acid 65% ultrapure and H₂O₂ in sealed Teflon dishes, using microwave digestion system (MWS-2)</p> <p>- Cooling</p> <p>- Diluted with 50 mL deionised water.</p>		<p>-Pb, Cu and Ni had the highest values in <i>M. barbatus</i> tissue</p> <p>-<i>A. boyeri</i>, <i>A. pontica</i> and <i>S. sprattus</i> species recorded values lower than the accepted limits EC No 1881/2006</p> <p>-Molluscs have higher bioconcentration factors for Cu and Cd for sediments and for Cu and Ni for water</p>	(Jitar et al., 2015)
13.	<p>Mn, Zn, Cr, Co, Cu, and Se</p> <p><i>Cyprinus carpio</i> , <i>Masto symbolon</i>, <i>Labeo rohita</i> <i>Masto symbolon</i>, <i>Rastrelliger kanagurta</i> ,</p>	<p>Hyderabad and Secunderabad muscle</p>	<p>-Microwave digestion system (CEM-MARS-USA) -0.5 and 1.5 g placed in a Teflon digestion vessel with 3 mL of ultrapure HNO₃ and 1 mL of H₂O₂</p>	<p>-Nebulizer gas flow 0.91 L/min</p> <p>- Radio frequency (RF) 1200 W</p> <p>-Lens voltage 1.6 V</p> <p>-Cool gas 13.0 L/min</p> <p>- Auxiliary gas 0.70 L/min.</p>	<p>-The Cr levels in the present study were shown in the range of 0.24–1.68 mg/kg in <i>Cyprinus carpio</i> and <i>Masto symbolon</i></p> <p>- The levels of Mn in fresh water fish analyzed</p>	(Jarapala et al., 2014)

	<p><i>Pampus argenteus</i>, <i>Penaeus monodon</i>, <i>Macrobrachium rosenbergii</i></p>		<p>- Digestion program: power, 1600 W (100%); ramp time, 15 mins; temperature, 200°C; hold time, 15 mins; and cooling time, 15 mins</p> <p>-cooling</p> <p>-made up to 25 mL with double distilled deionized water</p>		<p>in the present study ranged from 0.20 to 7.52 mg/kg in <i>Labeo rohita</i> and <i>Mastomys sibilon</i></p> <p>- The levels of cobalt content in analyzed fish were shown in the range of 0.006–0.070 mg/kg in <i>Rastrelliger Kanagurta</i> and <i>Pampus argenteus</i></p> <p>- copper in fresh water fish were found to be in the range of 0.31–2.24 mg/kg in <i>Labeo rohita</i> and <i>Penaeus monodon</i></p> <p>- Zinc levels in the present study revealed that the values ranged from 3.25–14.56 mg/kg in <i>Cyprinus corpio</i> and <i>Macrobrachium rosenbergii</i></p> <p>- Se in fresh water fish analyzed ranged from 0.10 to 2.05 mg/kg in <i>Rastrelliger kanagurta</i> and <i>Pampus argenteus</i>.</p>	
--	--	--	--	--	--	--

14.	Al, Bi, Cd, Co, Cu, Ga, Mn, Ni, Pb, V, and Zn American eel- <i>Anguilla rostrata</i>	Hudson River Otoliths All containers were made of Teflon or polystyrene and soaked in 5% nitric acid (HNO ₃) and rinsed with deionized water (18 M_cm_1)	-Otoliths were soaked in deionized water and then 3% H ₂ O ₂ solution for 5 min to hydrate -Then immersed into 1% HNO ₃ solution for 5 min -flooded with deionized water - weighed, stored in plastic vials -Otoliths were placed in a Teflon beaker and dissolved by concentrated HNO ₃ and heated at 80°C -The residue was dissolved and diluted to 10 mL by 0.1% HNO ₃ .	- Preconcentration was performed in the pH range 4.9 and 5.2 to minimize Ca retention. -Calibration was carried out by external method using aqueous standard solutions (0.01–5 ng mL/1 multi elements in 0.1% HNO ₃). -Two replicate measurements were made for each solution at pH 4.9–5.2	-The concentrations of all elements in <i>A. rostrata</i> otoliths were above the limits of detection that ranged from 0.2 ng g/1 for Co to 7 ng g/1 for Zn.	(Arslan and Secor, 2005)
15.	Cr, Cd, Hg, Cu, Zn, Pb and As The 469 fish and crayfish samples	Yangtze River, China dorsal muscle	-Samples of fish tissue (0.5- 0.01 g) were weighed directly into acid-washed Teflon		-The highest concentrations of Cu, Zn, and Hg were found in <i>Eriocheir sinensis</i> .	(Yi et al., 2011)

	together		<p>digestion vessels.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 10 mL of ultra pure HNO₃ were added and heated to 100 °C using pretreatment heater - 4 mL aliquot of concentrated HNO₃:HF (1:1 v/v) acid mixture was added before microwave digestion <p>-Each digestion batch included at least one reagent blank, a representative reference standard and, typically, a sample replicate to check for homogeneity and process efficacy.</p> <p>-Microwave digestion consisted of three steps: 0.5 MPa for 1 min, 1.0 MPa for 2 min, and 1.5 MPa for 3 min</p> <ul style="list-style-type: none"> - cooling for 1 h -the digested sample was transferred to a graduated plastic test tube and the 		<p><i>-Hemimyzon abbreviata</i> had the highest concentrations of Pb and Cd</p> <p><i>-Leptobotia elongata</i>, and <i>Coreius guichenoti</i> had the highest concentrations of Cr, and <i>Rhinogobio typus</i> had the highest concentrations of As.</p>	
--	----------	--	---	--	---	--

			volume was made up to 100 mL with Milli-Q water.			
16.	Sn , Pb, Zn, Cu, As 15 fish samples <i>Osteochilus hasselti</i> <i>Osteochilus vittatus</i> <i>Chela anommalura</i> <i>Labiobarbus cuvieri</i> <i>Hampala macrolepidota</i> <i>Cyclocheilichthys apogon</i> <i>Rasbora sumatrana</i> <i>Rasbora elegans</i> <i>Pristopilepis fasciatus</i> <i>Acanthopsis choirohyhchos</i> <i>Oxyeleotris marmorata</i> <i>Mastacembelus</i>	Bestari Jaya, Selangor Muscles 0.5 g dry muscle samples	Two digestion procedures: 1) For dry ashing analysis 1 g was placed in porcelain crucible. -temperature was slowly increased from R.T to 450 °C in 1 h. The samples were ashed for 4 h (white or grey ash residue) - The ash was dissolved in 5 ml of 25% HNO ₃ and the mixture was heated dissolve the residue. -The solution was transferred to a 25 ml volumetric flask and made up to volume -A blank digest 2) For wet ashing analysis, the samples were solubilized using high-pressure decomposition vessels. -1 g was placed into		-Tin mean concentrations were the highest as compared to other metals and ranged from 56.34 to 153.45 mg/kg. -Metals accumulation in fish was found in the order of Sn>Pb>As>Zn>Cu. -Metals concentration in fish tissues were detected at small variations. -Zinc and copper tended to be the least concentrated in the fish as compared to other elements measured. Concentrations of copper varied from <1.51 to 36.31 -5 of the 15 fish tissue samples having a total arsenic concentration above the detection limit of 0.11 mg/kg.	(Ashraf et al., 2011)

	<p><i>armatus</i></p> <p><i>Channa striatus</i></p> <p><i>Macrobrachium resenbergii</i></p> <p><i>Trichogaster trichopterus</i></p>		<p>Teflon container and 5 ml of concentrated HNO₃.</p> <p>-The system was heated to 130 °C for 90 min and diluted to 25 ml with deionized water.</p> <p>-The sample solution was clear.</p>			
17.	<p>Cd, Cu, Zn, Pb and Cr</p> <p><i>C. gibelio</i>, <i>E. Lucius</i></p>	<p>Anzali Wetland muscle, gill, liver, kidney and intestine</p> <p>dried muscle, gill and intestine tissues, 0.5 g of liver tissue and 0.25 g of kidney tissue</p>	<p>-Accurately weighed into 100 mL Erlenmeyer flasks, 10 mL nitric acid (65%) was added to each sample, and the samples were left overnight to be slowly digested</p> <p>-5 mL perchloric acid (70%) was added to each sample. Digestion was performed on a hot plate (sand bath) at 150 °C, for about 6 h or until solutions were cleared and near to dry. After cooling, the solution was quantitatively</p>	<p>The detection limits for each metal were: Cd (0.013), Cu (0.015), Zn (0.01), Pb (0.07), Cr (0.05). The concentrations of metals in fish tissues presented in lg g⁻¹ dry weight (dw).</p>	<p><i>E. lucius</i> liver has the highest mean concentration of Cd, Cu, Zn and Cr</p>	<p>(Ebrahimipour et al., 2011)</p>

			<p>transferred to 100 mL polyethylene bottles and made up to 50 mL with distilled water.</p> <p>-Then the solution was filtered using 0.45 μm nitrocellulose membrane filter</p>			
18.	<p>Cu, Cd, Pb, Cr and Zn</p> <p><i>Mystus vittatus</i>, <i>Tilapia mossambica</i>, <i>Heteropneustus fossilis</i>, <i>Ctenopharyngodon idella</i> and <i>Saurida undosquamis</i></p>	<p>Kollidam River</p> <p>Liver, Gill, Kidney, Intestine, Muscle</p>	<p>-The selected fish tissues were removed and put it in Petri dishes</p> <p>-dry at 120° until reaching a constant weight.</p> <p>-The dried tissue was placed into digestion flask and ultra pure concentrated nitric acid and hydrogen peroxide [1:1 V/V] were added.</p> <p>-The digestion flask was heated to 130°C until all the material was dissolved</p> <p>-digest was diluted with double distilled water appropriately.</p>		<p>The distribution of heavy metals in selected organs analyzed were in the order of magnitude as liver > Gill > Kidney > Intestine > Muscle. The distribution of heavy metal in the all fish organs analyzed were in the order of Cu > Cd > Pb > Cr and Zn.</p>	<p>(Ambedkar and Muniyan, 2011)</p>

19.	Cr, Zn, Cu, Fe, Mn, Cd, Pb <i>Clarias gariepinus</i> and <i>Tilapia zilli</i>	From the fishermen at the bank of River Benue gills, intestine and tissues 10 g from each samples	-samples with 10mL HNO ₃ and 2mL HClO ₄ were heated on a hot plate for one hour. -After complete digestion, the residue was dissolved and diluted with 0.2% v/v HNO ₃ to 20mL. - Digest was stored in pre-cleaned polyethylene bottles until analysis using atomic absorption spectrophotometer		The pattern of metal concentration in <i>Tilapia zilli</i> was Cr > Zn > Cu > Fe > Mn > Cd > Pb, while that <i>Clarias gariepinus</i> was Cr > Zn > Fe > Cu > Mn > Cd > Pb	(Eneji et al., 2011)
20.	Cu, Zn, Cr, Ni, Cd, Pb <i>Phytoplankton</i> and eight fish species (<i>Erythroculter ilishaefor</i> , <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> , <i>Coilia ectenes</i> , <i>Protosalnax hyalocranius</i> , <i>Aristichthys</i>)	Entire Taihu lake, China The average dry weight to wet weight ratio was 10:1 for planktons, 5.2:1 for benthos and 5.4:1 for fishes.	-Dried samples of 0.3 g (for planktons) and 0.5 g (for zoobenthos and fishes) were put into 50 ml Bunsen beakers -10 ml HNO ₃ and 1 ml perchloric acid were added -12 h of digestion -beakers were moved to hot plate at 150 °C	The total concentration of metals for each sample was tested using flame atomic absorbance spectrophotometry (AAS, Hitachi Z-2000) for Cu, Zn, Cr and using ICP-MS (Agilent, 7500 CX) for Ni, Pb, Cd.	-Zn concentration in phytoplankton was the highest among all measured elements -Cu is the second highest element in the phytoplankton, ranging from 11.32 to 76.09 mg/kg -The Zn concentration in all fish species was the highest (47.62–122.84 mg) and much	(Tao et al., 2012)

	<p><i>nobilis, Carassius auratus, Pelteobagrus fulvidraco, Cyprinus carpio</i></p>		<p>until the digestion solution turn achromatic or pale yellow.</p> <p>-cooled down to R.T - 5 ml hydrochloric acid was added</p> <p>-the digestion solution was transferred to 50 ml volumetric flasks for analysis</p>		<p>higher than other metals</p> <p>-Cu was the second highest metal in all fish, its concentration ranging from 1.33 (in <i>Aristichthys nobilis</i>) to 5.25 mg/kg (in <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>), with the mean of 3.45 ± 1.41 mg/kg. Pb concentration was higher than Cr, Ni, and Cd in most fish species</p> <p>-The lowest metal concentration in all fish species was Cd, ranging from 0.04 to 0.38 mg/kg</p> <p>-The bio-concentration factor (<i>BCF</i>) for all aquatic organisms in the food chain indicated that it was generally highest in planktons, followed by zoobenthos, and lowest in fish.</p>	
--	--	--	--	--	---	--

Με βάση τα άρθρα του πίνακα 30 τα κυριότερα μέταλλα τα οποία εξετάζαν ήταν το Cr, Cd, Hg, Cu, Zn, Pb, Fe και As. Αναλύθηκαν διάφορα είδη ψαριών από την ψαραγορά, άγρια, του γλυκού νερού και ψάρια ιχθυοτροφείων. Αξίζει να σημειωθεί σε αρκετές περιπτώσεις τα δείγματα λαμβάνονταν από ρυπασμένες περιοχές. Τα κυριότερα μέρη που εξετάζαν από τα ψάρια ήταν οι μύες με λιπώδη ιστό, βράγχια, συκώτι, εγκέφαλο και νεφρούς. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε πολλά αναφέρεται η αφαίρεση των κοκάλων. Οι χωνεύσεις γίνονταν με ξήρανση

των δειγμάτων, προσθήκη διαλύματος υπεροξειδίου με νιτρικό οξύ στην συνέχεια, ξήρανση και διάλυση του υπολείμματος με διάλυμα υπεροξειδίου με απιονισμένο νερό και φιλτράρισμα με διηθητικό χαρτί. Σε κάποιες περιπτώσεις γινόταν η χρήση μικροκυμάτων για την επίτευξη καλύτερης χώνευσης.

Τα περισσότερα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι μέγιστες συγκεντρώσεις παρουσιάζονταν στα βράγχια, μετά στο συκώτι, νεφρούς και ακολούθως στους μύες. Επίσης τα κυπρινοειδή είδη ψαριών έχουν την τάση συσσώρευσης των βαρέων μετάλλων στους λιπώδεις ιστούς τους.

5 Συμπεράσματα-Μελλοντικοί στόχοι

Με βάση τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής υπάρχει μια συμβολή στην κατανόηση της μικροβιακής κοινότητας των φυτών *Posidonia oceanica* το οποίο απειλείται προς εξαφάνιση στην περιοχή της Μεσογείου. Καθορίστηκαν τα κυρίαρχα γένη βακτηρίων και μυκήτων. Επίσης εξετάστηκαν οι μύκητες εάν παράγουν τα ένζυμα λακκάσες, μαγγανάσες και εάν μπορούν να έχουν κάποια εφαρμογή σε διάφορες βιομηχανίες όπως αποχρωματισμός των βαφών remazol brilliant blue και methyl-red. Επίσης εξετάστηκε η συγκέντρωση βαρέων μετάλλων στο φυτό *Posidonia oceanica*, στο θαλασσινό νερό κοντά στο φυτό *Posidonia oceanica* σε δύο περιοχές το Κάβο Γκρέκο, στην Λεμεσό και σε δύο είδη ψαριών το *Boops boops* και *Diplodus sargus sargus* τα οποία ζουν κοντά στο φυτό μόνο στην περιοχή Λεμεσού για μεγαλύτερη κατανόηση του τρόπου λειτουργίας, διατήρησης και παραγωγής του συγκεκριμένου οικοτόπου. Από την μελέτη απορρέουν τα πιο κάτω αποτελέσματα:

- Τα γένη βακτηρίων που βρέθηκαν στο φυτό *Posidonia oceanica* είναι: *Achromobacter*, *Vibrio*, *Bacillus* και *Ustilago*.
- Το κυρίαρχο είδος είναι το *Vibrio gallaecicus* με 13 ταυτοποιήσεις
- Τα γένη μυκήτων που βρέθηκαν στο φυτό *Posidonia oceanica* είναι: *Aspergillus*, *Cladosporium* *Engyodontium* και *Penicillium*
- Παρουσιάζονται δύο κυρίαρχα είδη το *Cladosporium cladosporioides* και *Engyodontium album* με 4 διαφορετικές ταυτοποιήσεις
- Οι μύκητες που παρουσιάζουν τα μέγιστα ποσοστά αποχρωματισμού >80% κατά συνέπεια και παραγωγή λακκάσων και μαγγανάσων είναι: *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium uredinicola*, *Engyodontium album*, *Cladosporium sphaerospermum* και *Aspergillus sydowii*.
- Το φυτό *Posidonia oceanica* στην περιοχή του Κάβο Γκρέκο στην ανάλυση μετάλλων που του έγινε παρουσιάζει πολύ κοντινές τιμές με το φυτό στην περιοχή της Λεμεσού.
- Το θαλασσινό νερό κοντά στο φυτό *Posidonia oceanica* στην περιοχή του Κάβο Γκρέκο παρουσιάζει επίσης πολύ κοντινές τιμές με το θαλασσινό νερό στην περιοχή της Λεμεσού.

- Για το είδος *Boops boops* παρουσιάζονται τα μέταλλα κατά αυξανόμενη σειρά ως προς τη συγκέντρωσή τους στο συκώτι Mo<Co<V<Li<Cr<Ni<Cd<Mn<Cu<As<Se<Ti<Sr<Zn<Fe<Mg.
- Για το είδος *Boops boops* παρουσιάζονται τα μέταλλα κατά αυξανόμενη σειρά ως προς τη συγκέντρωσή τους στα βράγχια Co<Cd<V<Cr<Ni<Li<As<Cu<Se<Mn<Zn<Ti<Fe<Sr<Mg.
- Για το είδος *Boops boops* παρουσιάζονται τα μέταλλα κατά αυξανόμενη σειρά ως προς τη συγκέντρωσή τους στους μύες Cd<Mo<Co<V<Ni<Cr<Li<Cu<Se<As<Mn<Ti<Fe<Zn<Sr<Mg.
- Για το είδος *Diplodus sargus sargus* παρουσιάζονται τα μέταλλα κατά αυξανόμενη σειρά ως προς τη συγκέντρωσή τους στο συκώτι Mo<Cd<Co<Ni<Mn<Cu<V<Se<As<Ti<Zn<Sr<Fe<Mg.
- Για το είδος *Diplodus sargus sargus* παρουσιάζονται τα μέταλλα κατά αυξανόμενη σειρά ως προς τη συγκέντρωσή τους στα βράγχια Pb<Cd<Co<Cu<Li<Ni<Se<As=V<Cr<Mn<Zn<Ti<Fe<Sr<Mg.
- Για το είδος *Diplodus sargus sargus* παρουσιάζονται τα μέταλλα κατά αυξανόμενη σειρά ως προς τη συγκέντρωσή τους στους μύες Mo<Co<Li<Cr<Cd<Ni<V<Cu<Se<Mn<As<Ti<Fe<Zn<Sr<Mg.

Συμπερασματικά τα αποτελέσματα της μελέτης αποτελούν την πρώτη αξιόπιστη πηγή για το θαλάσσιο φυτό *Posidonia oceanica* γιατί είναι η πρώτη μελέτη που γίνεται για τις περιοχές αυτές και γενικότερα για την περιοχή της Κύπρου. Ακόμη τα αποτελέσματα από τους μύκητες οι οποίοι παράγουν λακκάσες και μαγγανάσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ευρύτερες μελέτες για εξέταση εάν μπορούν να έχουν εφαρμογή σε βιομηχανίες υφαντουργίας, πλαστικών και βαφών αφού μπορούν να μειώνουν τον βαθμό τοξικότητας συγκεκριμένων βαφών. Τέλος η ανάλυση βαρέων μετάλλων στην *Posidonia oceanica*, στο θαλασσινό νερό κοντά στην *Posidonia oceanica* και σε δύο είδη ψαριών που ζουν κοντά στο θαλάσσιο φυτό ολοκληρώνουν την έρευνα με μια καλύτερη κατανόηση ως προς τις συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων που υπάρχουν για διατήρηση της βιοποικιλότητας του θαλάσσιου φυτού *Posidonia oceanica*.

Για μελλοντική έρευνα έχουν αναγνωρισθεί τα πιο κάτω πεδία.

- Περαιτέρω έρευνα ως προς την ταυτοποίηση της μικροβιακής κοινότητας άλλων θαλάσσιων φυτών εκτός το *Posidonia oceanica* όπως το *Zostera marina* ή το *Cymodocea nodosa* για να επεκταθεί η βιβλιογραφία.
- Περαιτέρω έρευνα ως προς την ταυτοποίηση αρχαίων, ιών και ενδοφυτικών μικροοργανισμών στο θαλάσσιο φυτό *Posidonia oceanica*.
- Περαιτέρω έρευνα ως προς τους μύκητες που βρέθηκαν να έχουν παραγωγή ενζύμων λακκάσων, μαγγανάσων ως προς τον χρόνο που αφήνονται για να αποχρωματίζουν τις βαφές, την αλατότητα σε χαμηλότερες ή μεγαλύτερες συγκεντρώσεις με στόχο την αύξηση της απόδοσης αποχρωματισμού και επίσης, μπορεί να γίνει έλεγχος και σε ψηλότερες συνθήκες θερμοκρασίας ανάπτυξης των μυκήτων που παράγουν λακκάσες και μαγγανάσες για τον λόγο ότι τα βιομηχανικά απόβλητα έχουν ψηλότερη θερμοκρασία από αυτή που εξετάστηκε. Εξετάστηκαν σε θερμοκρασία 25-27 °C λόγω θερμοκρασίας της θάλασσας.
- Ακόμη να γίνει έλεγχος της ποσότητας των ενζύμων λακκασών και μαγγανασών που παράγεται από τους μύκητες και πως αυτή μπορεί να αυξηθεί.
- Διερεύνηση για παραγωγή λιγνολυτικών ενζύμων από μύκητες που θα απομονωθούν από άλλα θαλάσσια λιβάδια όπως το *Zostera marina* ή το *Cymodocea nodosa*.
- Διερεύνηση για παραγωγή άλλων λιγνολυτικών ενζύμων από τους απομονωθέντες μύκητες με την χρήση διάφορων υποστρωμάτων. Κάποια υποστρώματα που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν είναι διάφορα υγρά απόβλητα είτε αστικά είτε βιομηχανικά.
- Διερεύνηση των συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων και σε άλλα είδη ψαριών τα οποία καταναλώνονται από τον άνθρωπο όπως το *A. hapsetus* και το *Diplodus bulgaris*.
- Διερεύνηση των συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων στο ρίζωμα, ρίζες του *Posidonia oceanica* και στην άμμο του βυθού κοντά στις ρίζες του φυτού.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdulali K.A. Taweel, M. Shuhaimi-Othman, A. . A. (2012). Journal of Biological Sciences. 138-145, 2012.
- Al Borum, D. A. T. (2009). Background Document for Zostera beds , Seagrass beds Biodiversity Series.
- Ali, N., Hameed, A., Ahmed, S., & Khan, A. G. (2007). Decolorization of structurally different textile dyes by *Aspergillus niger* SA1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), 1067–1072. doi:10.1007/s11274-007-9577-2
- Allowance, D. (1990). Zinc.
- Benloch, S., Donnelly, A., Cifuentes, A. N. A., Anto, J., Herbert, R. A., & Rodri, F. (2000). Prokaryotic Diversity in *Zostera noltii* -Colonized Marine Sediments, 66(4), 1715–1719.
- Copat, C., Arena, G., Fiore, M., Ledda, C., Fallico, R., Sclacca, S., & Ferrante, M. (2013). Heavy metals concentrations in fish and shellfish from eastern Mediterranean Sea: consumption advisories. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 53, 33–7. doi:10.1016/j.fct.2012.11.038
- Da Silva, M., Passarini, M. R. Z., Bonugli, R. C., & Sette, L. D. (2008). Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: isolation, characterisation and RBBR decolourisation screening. *Environmental Technology*, 29(12), 1331–9. doi:10.1080/09593330802379466
- Daw, K K, D. (2008). Nickel , its adverse health effects & amp ; oxidative stress.
- Delile, L. (2012). Evaluation of a temporal trend heavy metals contamination in *Posidonia*, (1813), 187–192. doi:10.1039/c1em10575b
- Disease, P., & Healthy, T. (2001). EXPOSURE TO ARSENIC : A MAJOR PUBLIC HEALTH CONCERN.
- Duarte, C. M., & Regaudie-de-gioux, A. (2009). Thresholds of gross primary production for the metabolic balance of marine planktonic communities, 54(3), 1015–1022.
- Espinosa, E., Marco-Noales, E., Gómez, D., Lucas-Elío, P., Ordax, M., Garcías-Bonet, N., ... Sanchez-Amat, A. (2010). Taxonomic study of *Marinomonas* strains isolated from the seagrass *Posidonia oceanica*, with descriptions of *Marinomonas balearica* sp. nov. and *Marinomonas pollencensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(Pt 1), 93–8. doi:10.1099/ijs.0.008607-0
- Finley, J. W. (2004). Does Environmental Exposure to Manganese Pose a Health Risk to Healthy Adults? *Nutrition Reviews*, 62(4), 148–153. doi:10.1301/nr.2004.apr.148-153
- Frumkin, Howard Louise, J. (2007). TOXICOLOGICAL PROFILE FOR LEAD, (August).

- Garcias-Bonet, N., Arrieta, J. M., de Santana, C. N., Duarte, C. M., & Marbà, N. (2012). Endophytic bacterial community of a Mediterranean marine angiosperm (*Posidonia oceanica*). *Frontiers in Microbiology*, 3(September), 342. doi:10.3389/fmicb.2012.00342
- Geir H. Mathiassen, Inger G. Alsos, Håvard Kauserud, Lennart Nilsen, Jenni Nordén, J. W. S. (2014). Diversity of marine wood-inhabiting fungi in North Norway.
- Gerberding Louise, J. (2003). TOXICOLOGICAL PROFILE FOR SELENIUM, (September).
- Gnavi, G., Ercole, E., Panno, L., Vizzini, A., & Varese, G. C. (2014). Dothideomycetes and Leotiomycetes sterile mycelia isolated from the Italian seagrass *Posidonia oceanica* based on rDNA data, 3(1), 1–11. doi:10.1186/2193-1801-3-508
- Goltapeh, E., Danesh, Y., & Varma, A. (2013). *Fungi as Bioremediators*.
- Halaburgi, V. M., Sharma, S., Sinha, M., Singh, T. P., & Karegoudar, T. B. (2011). Purification and characterization of a thermostable laccase from the ascomycetes *Cladosporium cladosporioides* and its applications. *Process Biochemistry*, 46(5), 1146–1152. doi:10.1016/j.procbio.2011.02.002
- HEMMINGA, M.A., A. C. M. D. (2002). Seagrass ecology. *European Neurology*, 47(1), 71–71. doi:10.1159/000047954
- Hovey, R. K., Cambridge, M. L., & Kendrick, G. A. (2011). Direct measurements of root growth and productivity in the seagrasses *Posidonia australis* and *P. sinuosa*, 56(1), 394–402. doi:10.4319/lo.2011.56.1.0394
- Humbatov, F. Y., Ahmadov, M. M., Balayev, V. S., & Suleymanov, B. A. (2015). Trace Metals in Water Samples Taken from Azerbaijan Sector of Caspian Sea. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 9(4), 288–295. doi:10.17265/1934-7375/2015.04.007
- Inui, T., Kosuge, A., Ohbuchi, A., Fujita, K., Koike, Y., & Kitano, M. (2012). Determination of Heavy Metals at Sub-ppb Levels in Water by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry Using a Direct Introduction Technique after Preconcentration with an Iminodiacetate Extraction Disk, 2012(October), 683–692.
- Jarup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68(1), 167–182. doi:10.1093/bmb/ldg032
- Jayaprabha, N. (2014). Bioaccumulation of heavy metals in flying fishes along southeast coast of India. *International Food ...*, 21(4), 1381–1386. Retrieved from [http://www.ifrj.upm.edu.my/21\(04\)2014/16IFRJ21\(04\)2014Jayaprabha547.pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/21(04)2014/16IFRJ21(04)2014Jayaprabha547.pdf)
- Jayaprabha, N., Balakrishnan, S., Purusothaman, S., Indira, K., Srinivasan, M., Anantharaman, P., & others. (2014). Bioaccumulation of heavy metals in flying fishes along southeast coast of India. *International Food Research Journal*, 21(4), 1381–1386.
- Jones, E. B. G., Suetrong, S., Sakayaroj, J., Bahkali, A. H., Abdel-Wahab, M. a., Boekhout, T., & Pang, K.-L. (2015). Classification of marine Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota and Chytridiomycota. *Fungal Diversity*, 73(1), 1–72. doi:10.1007/s13225-015-0339-4

- Jones, M., Schoenheit, J. E., & Weaver, A. D. (1979). Pretreatment and Heavy Metal LD50 Values, *4144*.
- Jose, P. A., Shanmuga, I., Sivakala, K. K., Robinson, S., & Jebakumar, D. (2014). Molecular phylogeny and plant growth promoting traits of endophytic bacteria isolated from roots of seagrass *Cymodocea serrulata* Molecular phylogeny and plant growth promoting traits of endophytic, (April 2016).
- Maciel, J. V, Knorr, C. L., Flores, E. M., Müller, E. I., Mesko, M. F., Primel, E. G., & Duarte, F. A. (2014). Feasibility of microwave-induced combustion for trace element determination in *Engraulis anchoita* by ICP-MS. *Food Chemistry*, *145*, 927–931.
- Mats Bjork, Fred Short, E. M. and S. B. B. (2008). MANAGING SEAGRASSES FOR RESILIENCE TO CLIMATE CHANGE, 1–48.
- Michel, L. N., Dauby, P., Dupont, A., Gobert, S., & Lepoint, G. (2015). Selective top-down control of epiphytic biomass by amphipods from *Posidonia oceanica* meadows : implications for ecosystem functioning, *145*(July), 83–93.
- Muthezhilan, R., Yogananth, N., Vidhya, S., & Jayalakshmi, S. (2008). Dye Degrading Mycoflora from Industrial Effluents.
- Nagasaki, K., Tomaru, Y., Katanozaka, N., Shirai, Y., Nishida, K., Itakura, S., & Yamaguchi, M. (2004). Isolation and Characterization of a Novel Single-Stranded RNA Virus Infecting the Bloom-Forming Diatom *Rhizosolenia setigera*, *70*(2), 704–711. doi:10.1128/AEM.70.2.704
- Orth, R. J., Carruthers, T. I. M. J. B., Dennison, W. C., Duarte, C. M., James, W., Jr, K. L. H., ... Williams, S. L. (2006). A Global Crisis for Seagrass Ecosystems, *56*(12), 987–996.
- Panno, L., Bruno, M., Voyron, S., Anastasi, A., Gnani, G., Miserere, L., & Varese, G. C. (2013). Diversity, ecological role and potential biotechnological applications of marine fungi associated to the seagrass *Posidonia oceanica*. *New Biotechnology*, *30*(6), 685–94. doi:10.1016/j.nbt.2013.01.010
- Papastergios, G. (2015). Environmental geochemical study of soils and sediments in coastal areas , east of Kavala (Macedonia , Greece) and production of geochemical maps via the use of GIS, (September).
- Piazzì, L., Balata, D., Ceccherelli, G., Piazzì, L., & Piandanna, V. (2016). Epiphyte assemblages of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica* : an overview, *37*(Table 1), 3–41. doi:10.1111/maec.12331
- Salwmidi, M. (2012). Δάση της θάλασσας.
- Shirai, Y., Tomaru, Y., Takao, Y., Suzuki, H., Nagumo, T., & Nagasaki, K. (2008). Isolation and characterization of a single-stranded RNA virus infecting the marine planktonic diatom *Chaetoceros tenuissimus* Meunier. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(13), 4022–7. doi:10.1128/AEM.00509-08
- Shoemaker, G., & Wyllie-Echeverria, S. (2013). Occurrence of rhizomal endophytes in three temperate northeast pacific seagrasses. *Aquatic Botany*, *111*, 71–73. doi:10.1016/j.aquabot.2013.05.010

- Short, F., Carruthers, T., Dennison, W., & Waycott, M. (2007). Global seagrass distribution and diversity : A bioregional model, *350*, 3–20. doi:10.1016/j.jembe.2007.06.012
- Silva, M. C., Torres, J. A., Vasconcelos de Sá, L. R., Chagas, P. M. B., Ferreira-Leitão, V. S., & Corrêa, A. D. (2013). The use of soybean peroxidase in the decolourization of Remazol Brilliant Blue R and toxicological evaluation of its degradation products. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *89*, 122–129. doi:10.1016/j.molcatb.2013.01.004
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Molecular, Clinical and Environmental Toxicology, *101*, 1–30. doi:10.1007/978-3-7643-8340-4
- Toxicity, H. M., & Species, F. (2014). *Pakistan Veterinary Journal*, *8318*.
- Valon, M., Valbona, A., Sula, E., Fahri, G., Dhurata, K., & Fatmir, C. (2013). Histopathologic Biomarker of Fish Liver as, *13*(5).
- Velcheva, I., Tomova, E., Arnaudova, D., Arnaudov, A., Tomova, E., Arnaudova, D., & Arnaudov, A. (2010). MORPHOLOGICAL INVESTIGATION ON GILLS AND LIVER OF FRESHWATER FISH FROM DAM LAKE “ STUDEN KLADENETS ,” *16*(3), 364–368.
- Venkatachalam, A., Thirunavukkarasu, N., & Suryanarayanan, S. T. (2014). Distribution and diversity of endophytes in seagrasses ScienceDirect Distribution and diversity of endophytes in, (February 2015). doi:10.1016/j.funeco.2014.07.003
- Xseries, T. (n.d.). Day 1 – ICP-MS Basics and Optimization.
- Yang, R., Yao, T., Xu, B., Jiang, G., & Xin, X. (2007). Accumulation features of organochlorine pesticides and heavy metals in fish from high mountain lakes and Lhasa River in the Tibetan Plateau. *Environment International*, *33*(2), 151–156. doi:10.1016/j.envint.2006.08.008
- Zeitoun, M. M., & Mehana, E. E. (2014). Impact of Water Pollution with Heavy Metals on Fish Health : Overview and Updates, *12*(2), 219–231. doi:10.5829/idosi.gv.2014.12.02.82219
- Zyadah, M., & Chouikhi, A. (2009). Heavy metal accumulation in *Mullus barbatus* , *Merluccius merluccius* and *Boops boops* fish from the Aegean Sea , Turkey, *7486*(Jul). doi:10.1080/096374899100996
- Αρβανίτης, Λ. (2006). Γεωχημική μελέτη σε επιφανειακά ιζήματα του επιβατικού τμήματος του Λιμένα Πειραιώς.
- Βαλαβανίδης, Α. (2014). Τα Κυριότερα Προβλήματα Περιβαλλοντικής Ρύπανσης στη Μεσόγειο Θάλασσα, 1–38.
- ΒΑΣΙΛΑΚΗ, Γ. (2012). ΧΗΜΙΚΟΣ ΚΑΙ ΟΡΥΚΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΙΖΗΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΕΛΕΥΣΙΝΑΣ ΚΑΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΡΥΠΑΝΣΗΣ ΒΑΣΕΙ ΔΕΙΚΤΩΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ.
- Ιωάννου, Γ., & Μιχαηλίδης, Ν. (n.d.). Τα 100 σημαντικότερα είδη ψαριών των κυπριακών θαλασσών.
- Κουρουτού, Π., Κάλης, Σ., Χατζησταύρου, Κ., & Λινού, Α. (2012). Επίδραση της επαγγελματικής έκθεσης σε βαρέα μέταλλα στη νοσηρότητα και στη θνησιμότητα.

ΛΑΔΑ, Ζ. (2012). ΤΟ ΓΕΝΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΝΙΤΡΙΚΟ ΔΥΣΠΡΟΣΙΟ(III) / ΥΠΕΡΧΛΩΡΙΚΟ ΚΟΒΑΛΤΙΟ(II) / 2- ΠΥΡΙΔΥΛΟ ΑΛΔΟΞΙΜΗ Ή ΦΑΙΝΥΛΟ 2- ΠΥΡΙΔΥΛΟΚΕΤΟΝΟΞΙΜΗ.

ΜΕΤΕΝΤΖΟΓΛΟΥ, Ε. (2009). ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΡΥΠΑΝΣΗΣ ΑΠΟ ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ ΤΟΥ Α.Η.Σ ΑΓΙΟΥ ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ ΚΟΖΑΝΗΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΑΥΤΟΦΥΩΝ ΦΥΤΩΝ.

ΜΙΧΑΗΛΙΔΗ, Μ. Κ. (2015). Βιολογική αναγωγή εξασθενούς χρωμίου.

ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ, Α. Ε. Π. (n.d.). ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ, ΟΡΓΑΝΟΧΛΩΡΙΩΜΕΝΑ και ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ, ΠΟΛΥΧΛΩΡΙΩΜΕΝΑ ΔΙΦΑΝΥΛΙΑ, ΔΙΟΞΙΝΕΣ, ΔΙΒΕΝΖΟΦΟΥΡΑΝΙΑ, ΠΕΤΡΕΛΑΙΟ ΚΑΙ ΠΑΥ, ΟΞΙΝΕΣ ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΕΙΣ
1. ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ: ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ (Pb, Hg, Cd), 309–384.

Χαλάρη, Δ. Μ. (2006). Κάδμιο: Οικοτοξικολογικές Έρευνες και Τοξικολογικές Επιπτώσεις, (Cd).