



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

---

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη των επιδράσεων της θερμοκρασίας,  
της οξύτητας και της διαθεσιμότητας των θρεπτικών  
στις αλληλεπιδράσεις θαλάσσιων βακτηρίων-βακτηριοφάγων

Πολυξένη Κ. Παπάζογλου

Επιβλέπων καθηγητής:  
Φλεμετάκης Εμμανουήλ, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ, 2024

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

---

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη των επιδράσεων της θερμοκρασίας,  
της οξύτητας και της διαθεσιμότητας των θρεπτικών  
στις αλληλεπιδράσεις θαλάσσιων βακτηρίων-βακτηριοφάγων

«Study of the effects of temperature, acidity, and nutrient availability  
on marine bacteria-bacteriophage interactions»

Πολυξένη Κ. Παπάζογλου

Εξεταστική Επιτροπή:

Φλεμετάκης Εμμανουήλ, Καθηγητής Γ.Π.Α (Επιβλέπων)

Βλαχάκης Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Δάρας Γεράσιμος, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

## Μελέτη των επιδράσεων της θερμοκρασίας, της οξύτητας και της διαθεσιμότητας των θρεπτικών στις αλληλεπιδράσεις θαλάσσιων βακτηρίων-βακτηριοφάγων

ΠΜΣ Βιολογία Συστημάτων  
Τμήμα Βιοτεχνολογίας  
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας

### Περίληψη

Οι προσαρμογές των μικροβίων στην κλιματική αλλαγή θα έχουν καθοριστική σημασία για τη μελλοντική κατανόηση της θαλάσσιας οικολογίας. Οι αυξανόμενες θερμοκρασίες θα μπορούσαν να επηρεάσουν τις βιολογικές διεργασίες καθώς και την κυκλοφορία και τη στρωμάτωση, επηρεάζοντας τον τρόπο διασποράς των οργανισμών και τη μεταφορά των θρεπτικών ουσιών. Η σύνθεση και η λειτουργία των μικροβιακών κοινοτήτων επηρεάζονται επίσης από τις εισροές θρεπτικών ουσιών από πηγές όπως ο αέρας, τα ποτάμια και οι εκβολές ποταμών, οι οποίες υπόκεινται στην κλιματική αλλαγή. Επίσης, τα αυξημένα επίπεδα διοξειδίου του άνθρακα στους ωκεανούς μπορεί να οδηγήσουν σε οξίνιση των υδάτων. Στο πλαίσιο αυτό, η κλιματική αλλαγή θα μπορούσε να επηρεάσει τις αλληλεπιδράσεις των βακτηρίων με τους φυσικούς θηρευτές τους. Οι αλληλεπιδράσεις βακτηριοφάγων-βακτηρίων είναι από τις πιο συχνές αλληλεπιδράσεις στα θαλάσσια ενδιαιτήματα, συμβάλλοντας στους κύκλους της βιοχημείας του θαλάσσιου βασιλείου. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε ένα μεσογειακό θαλάσσιο βακτηριακό είδος, το *Vibrio alginolyticus*, και δύο λυτικούς βακτηριοφάγους *Caudoviricetes*, οι οποίοι διαθέτουν μορφότυπο ηγονίγυς, αλλά έχουν διαφορετικό μέγεθος γονιδιώματος. Δοκιμάστηκαν διαφορετικές θερμοκρασίες, επίπεδα pH και διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών κατά τη διάρκεια μιας πολυφασικής καμπύλης ανάπτυξης των βακτηριοφάγων, καθώς και χρησιμοποιήθηκε μια δοκιμασία rt-QPCR για την παρακολούθηση των μοτίβων διαφοροποιημένης έκφρασης τόσο των γονιδίων του ξενιστή όσο και των γονιδίων του φάγου. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι οι βακτηριοφάγοι με μεγαλύτερο μέγεθος γονιδιώματος θα μπορούσαν να χρησιμοποιήσουν ποικίλα μοριακά εργαλεία για να αντέξουν τις αβιοτικές αλλαγές και να συνεχίσουν την αποτελεσματική λύση του ξενιστή. Αυτό το πλεονέκτημα θα μπορούσε να ευνοήσει την αφθονία τους σε θαλάσσια ενδιαιτήματα υπό μελλοντικές κλιματικές αλλαγές.

**Επιστημονική περιοχή:** Περιβαλλοντική βιοτεχνολογία

**Λέξεις κλειδιά:** Αλληλεπιδράσεις ξενιστή-μικροβίων, *Vibrio*, Βακτηριοφάγοι, Θαλάσσια Μικροβιολογία, Κλιματική Αλλαγή

## **Study of the effects of temperature, acidity, and nutrient availability on marine bacteria-bacteriophage interactions**

*MSc in Systems Biology  
Department of Biotechnology  
Laboratory of Molecular Biology*

### **Abstract**

Climate change adaptations of microbes are going to be pivotal for the future understanding of marine ecology. Increasing temperatures could affect biological processes, as well as circulation and stratification, influencing how organisms are dispersed and nutrients are transported. Microbial community composition and function are also affected by nutrient inputs from sources, such as air, rivers, and estuaries, all of which are subjected to climate change. In addition, increased levels of carbon dioxide in the oceans can lead to acidification of water. Climate change could influence bacterial interactions with their natural predators. Bacteriophage-bacteria interactions are among the most frequent engagements in marine habitats, contributing to the marine realm biochemistry circles. In this study, we used a Mediterranean marine abundant bacterial species, *Vibrio alginolyticus*, and two Caudoviricetes lytic bacteriophages, both possessing a myovirus morphotype but with different genome sizes. Different temperatures, pH levels, and nutrient availability were tested during a two-step growth curve of the bacteriophages, and an rt-qPCR assay was employed to monitor the differentially expressed patterns of both host and phage genes. These results suggest that bacteriophages with a larger genome size could employ diverse molecular tools to withstand abiotic changes and continue efficient lysis of the host. This advantage could favor their abundance in marine habitats under future climate shifts.

**Scientific area:** Environmental Biotechnology

**Key words:** Host-microbe interactions, *Vibrio*, Bacteriophages, Marine Microbiology, Climate Change

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή περιλαμβάνονται στις παρακάτω επιστημονικές δημοσιεύσεις και ομιλίες σε συνέδρια:

Συνέδρια:

**Papazoglou P.**, Skliros D., Katharios P., Flemetakis E. (2023). The effect of temperature, acidity, and the availability of nutrients on the interactions between marine bacteria and bacteriophages, Aquatic and Coastal Ecosystems: Challenges and Opportunities towards Sustainable Development, Rostock, Germany, 16 - 17 November 2023.

**Papazoglou P.**, Skliros D., Katharios P., Flemetakis E. (2023). The impact of temperature, acidity, and nutrient availability on marine bacteria-bacteriophage interactions, 10th International Conference of Mikrobiokosmos, Larissa, Greece 30 Nov-2 Dec 2023

Δημοσιεύσεις:

**Papazoglou P.**, Skliros D., Katharios P., Flemetakis E.

Exploring Temperature, Acidity, and Nutrient Availability in Marine Bacteria-Bacteriophage Interactions

*In preparation*

## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	3
Abstract .....	4
Πρόλογος και Ευχαριστίες .....	8
Εισαγωγή .....	9
Γενικά .....	9
Η κλιματική αλλαγή του πλανήτη στα θαλάσσια οικοσυστήματα .....	10
Η Μεσόγειος θάλασσα.....	13
Μεταβολές της θερμοκρασίας στη Μεσόγειο Θάλασσα.....	13
Μεταβολές του pH στη Μεσόγειο Θάλασσα .....	15
Ολιγοτροφισμός στη Μεσόγειο Θάλασσα.....	16
Ιοί μικροβίων στη θάλασσα .....	16
Βακτηριοφάγοι.....	17
Ιστορική αναδρομή .....	17
Γενικά χαρακτηριστικά.....	18
Οικογένειές-Ταξινόμηση .....	18
Πολλαπλασιασμός βακτηριοφάγων .....	21
Λυτικός κύκλος .....	21
Λυσιγονικός κύκλος.....	22
Χαρακτηριστικά των βακτηριοφάγων μεγάλου και μικρού γονιδιώματος.....	23
Συνεισφορά των βακτηριοφάγων στην εναπόθεση θρεπτικών στοιχείων στη θάλασσα..	25
Το γενος <i>Vibrio</i> .....	26
Το βακτήριο <i>Vibrio alginolyticus</i> .....	27
Αλληλεπιδράσεις ιών-μικροοργανισμών .....	29
Υλικά και Μέθοδοι .....	31
Πειραματικός σχεδιασμός.....	31
Βακτηριακό στέλεχος, θρεπτικό υπόστρωμα και συνθήκες ανάπτυξης.....	31
Θρεπτικά υποστρώματα .....	32
Βακτηριακή χλόη.....	32
Συνθήκες ανάπτυξης .....	33
Βακτηριοφάγοι.....	33
Multiplicity of infection (MOI).....	36
Πολλαπλασιασμός βακτηριοφάγων .....	36
Τιτλοδότηση βακτηριοφάγων .....	37

Καμπύλες ανάπτυξης βακτηρίων με microplate reader στις διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης .....	37
Πολυφασική καμπύλη ανάπτυξης και προσδιορισμός βιολογικών χαρακτηριστικών βακτηριοφάγων στις διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης.....	39
Απομόνωση ολικού RNA από υγρή συγκαλλιέργεια βακτηριοφάγου-βακτηρίου .....	39
Απομάκρυνση DNA από δείγματα RNA .....	40
Φωτομετρικός προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων .....	41
Δημιουργία cDNA.....	41
Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR-qrt PCR) .....	42
Αποτελέσματα .....	46
Επίδραση της θερμοκρασίας, της διαθεσιμότητας άνθρακα και του pH στον υπό μελέτη βακτηριακό ξενιστή <i>Vibrio alginolyticus</i> .....	46
Επίδραση της θερμοκρασίας στον ρυθμό ανάπτυξης του ξενιστή.....	46
Επίδραση της διαθεσιμότητας του άνθρακα στον ρυθμό ανάπτυξης του ξενιστή .....	46
Επίδραση του pH στον ρυθμό ανάπτυξης του ξενιστή .....	47
Πολυφασικές καμπύλες ανάπτυξης των βακτηριοφάγων Athena1 και φSt2 υπό εργαστηριακές συνθήκες .....	48
Πολυφασικές καμπύλες ανάπτυξης των φάγων Athena1 και φSt2 υπό διαφορετικές θερμοκρασίες.....	49
Πολυφασικές καμπύλες ανάπτυξης των φάγων Athena1 και φSt2 υπό διαφορετικά επίπεδα pH.....	51
Πολυφασικές καμπύλες ανάπτυξης των φάγων Athena1 και φSt2 υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις θρεπτικών ουσιών .....	52
Μελέτη των επιπέδων σχετικής έκφρασης βακτηριοφαγικών γονιδίων κατά την διάρκεια της μόλυνσης.....	54
Τα Μοτίβα Έκφρασης των Γονιδίων του φαγού Athena1 .....	54
Τα Μοτίβα Έκφρασης των Γονιδίων του φαγού φSt2 .....	59
Συζήτηση .....	69
Βιβλιογραφία .....	73

## Πρόλογος και Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Φλεμετάκη Εμμανουήλ. Θα ήθελα πρώτα από όλους να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Φλεμετάκη για την ευκαιρία που μου δόθηκε να μελετήσω και πρακτικά ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τη βοήθεια καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου μελέτης.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, κ. Βλαχάκης Δημήτριος και κ. Δάρας Γεράσιμος, για το χρόνο που αφιέρωσαν να αναγνώσουν την παρούσα εργασία.

Ευχαριστώ όλο το προσωπικό του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας για την πολύτιμη βοήθεια και στήριξη σε ό,τι χρειάστηκα, αλλά και για το όμορφο κλίμα που φρόντιζαν να υπάρχει πάντα στο εργαστήριο! Μαριέλα Ζωγραφάκη, Σοφία Μαρκά, Κατερίνα Κωλέττη, Rodica Efroze, Εμμανουήλ Ζοανός, Κατερίνα Καλιαμπάκου, Χρυσάνθη Καλλιονάτη.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ χρωστάω στον μετά-διδάκτορα Δημήτρη Σκληρό για την βοήθεια και την καθοδήγηση του καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου μελέτης καθώς και για τις γνώσεις που φρόντισε να μου μεταλαμπαδεύσει σχετικά με τους βακτηριοφάγους.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους και στην οικογένεια μου που ήταν πάντα εκεί και με στήριξαν με κάθε δυνατό τρόπο.



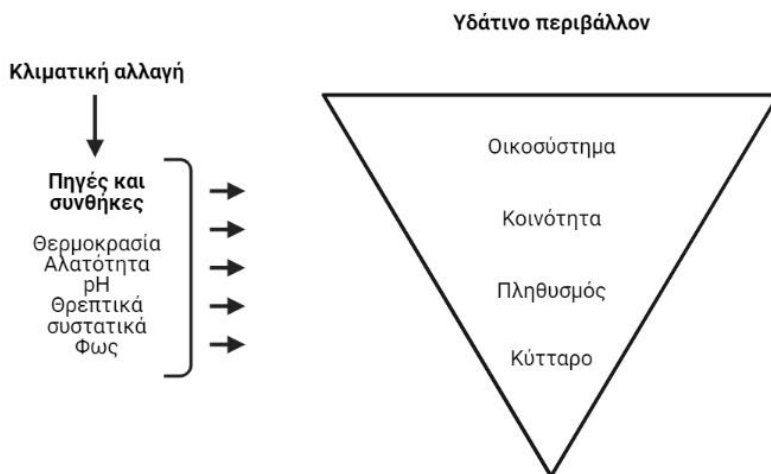
# Εισαγωγή

## Γενικά

Περισσότερο από το 70% της Γης καλύπτεται από ωκεανούς. Όταν σκεφτόμαστε τη ζωή στον ωκεανό, συχνά σκεφτόμαστε τα ψάρια και τις φάλαινες, τη ζωή που είναι ορατή με γυμνό μάτι. Τα μικρόβια αντιπροσωπεύουν περισσότερο από το 90% της βιομάζας των ωκεανών και αποτελούν την κρυφή πλειοψηφία της ζωής που ευδοκμεί στη θάλασσα. Αυτό που προκαλεί ακόμη μεγαλύτερη έκπληξη είναι ότι ένα μεγάλο μέρος αυτής της μικροβιακής ζωής παραμένει άγνωστο επειδή δεν μπορούμε να την καλλιεργήσουμε σε δοκιμαστικό σωλήνα και είναι δύσκολο να την παρατηρήσουμε στη φύση.

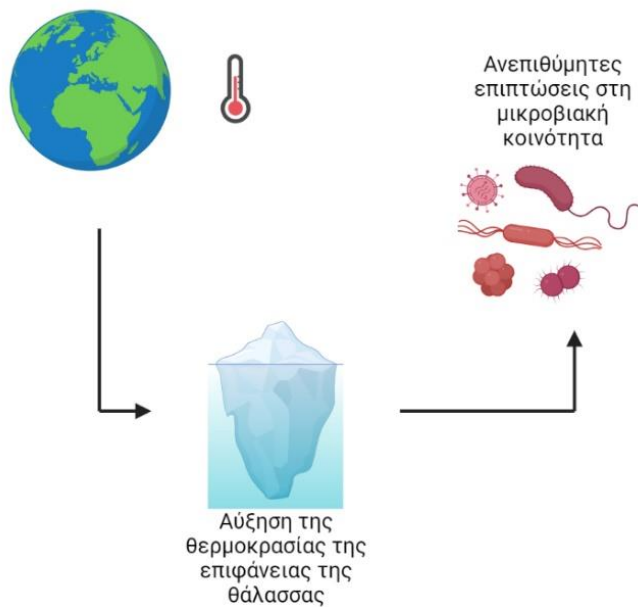
Ο μικροβιακός πληθυσμός αντιπροσώπευε όλες τις γνωστές μορφές ζωής για σχεδόν το 50-90% της ιστορίας της Γης. Τα θαλάσσια μικρόβια κατέχουν πολλούς σημαντικούς ρόλους: επηρεάζουν το κλίμα μας, είναι οι κύριοι πρωτογενείς παραγωγοί στον ωκεανό, καθορίζουν μεγάλο μέρος της ροής της θαλάσσιας ενέργειας και των θρεπτικών συστατικών και μας παρέχουν μια πηγή φαρμάκων και φυσικών προϊόντων. Τα μικρόβια (στα οποία περιλαμβάνονται τα βακτήρια, τα αρχαία, οι μονοκύτταροι ευκαρυώτες και οι σχετιζόμενοι με αυτά ιοί) είναι τόσο ποικίλα όσο και τα θαλάσσια περιβάλλοντα από τα οποία προέρχονται.

Η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ειδών επηρεάζουν τη δομή και τη δυναμική των βιολογικών κοινοτήτων σε χωροχρονικό επίπεδο αποτελεί βασικό στόχο της οικολογίας των κοινοτήτων. Μια προσέγγιση για τη διαλεύκανση αυτής της πολυπλοκότητας περιλαμβάνει τη μελέτη μικρότερων κοινοτήτων που αποτελούνται από μικρότερο αριθμό αλληλεπιδρώντων ειδών, τις λεγόμενες "μονάδες κοινότητας" (Bohannan & Lenski, 2000; Holt, 1995; Holt et al., 1994). Στις κοινότητες θηρευτών και των θηραμάτων τους, η εξέταση τέτοιων ενοτήτων έχει οδηγήσει σε βαθύτερη κατανόηση των περιπτώσεων στις οποίες διαφορετικά είδη θηραμάτων επηρεάζουν αρνητικά το ένα το άλλο μέσω ενός κοινού θηρευτή, καθώς και των συνθηκών υπό τις οποίες ένας θηρευτής παίζει ρόλο "κλειδί" στη διατήρηση της ποικιλότητας (Holt, 1977, 1995; Holt et al., 1994; Leibold, 1996).



Εικόνα 1: Απλουστευμένη επισκόπηση του αντίκτυπου της κλιματικής αλλαγής στο υδάτινο περιβάλλον. Η κλιματική αλλαγή επηρεάζει τους οικολογικούς πόρους και τις συνθήκες που απαιτούν τα βιολογικά είδη.

## Η κλιματική αλλαγή του πλανήτη στα θαλάσσια οικοσυστήματα



Εικόνα 2: Επισκόπηση της αύξησης της θερμοκρασίας και των επιπτώσεών της στη μικροβιακή κοινότητα

Η κλιματική αλλαγή αναφέρεται σε μια σημαντική και μακροχρόνια μεταβολή της στατιστικής κατανομής των καιρικών συνθηκών σε περιόδους που κυμαίνονται από δεκαετίες έως εκατομμύρια χρόνια. Μπορεί να προκληθεί από φυσικούς παράγοντες όπως ηφαιστειακές εκρήξεις, αλλαγές στην τροχιά της Γης και την ηλιακή ακτινοβολία, καθώς και από ανθρώπινες δραστηριότητες όπως η καύση ορυκτών καυσίμων, η αποψίλωση των δασών και η γεωργία (Australian Academy of Science, 2021). Ο όρος "κλιματική αλλαγή" χρησιμοποιείται συχνά εναλλακτικά με τον όρο "υπερθέρμανση του πλανήτη", αλλά δεν είναι ακριβώς το ίδιο γεγονός. Ενώ η υπερθέρμανση του πλανήτη αναφέρεται συγκεκριμένα στη σταδιακή αύξηση της μέσης επιφανειακής θερμοκρασίας της Γης, η κλιματική αλλαγή περιλαμβάνει ένα ευρύτερο φάσμα αλλαγών στα κλιματικά πρότυπα, συμπεριλαμβανομένων των αλλαγών στη θερμοκρασία, τις βροχοπτώσεις, τα πρότυπα των ανέμων και την άνοδο της στάθμης της θάλασσας (NASA, 2017).

Η κλιματική αλλαγή προβλέπεται ότι θα αυξήσει το ποσοστό ανθεκτικότητας ορισμένων ανθρώπινων παθογόνων οργανισμών στα αντιβιοτικά. Δεδομένα από το 2013-2015 δείχνουν ότι μια αύξηση της ημερήσιας ελάχιστης θερμοκρασίας κατά 10°C (η οποία είναι πιθανή για ορισμένες περιοχές των ΗΠΑ μέχρι το τέλος του αιώνα) θα οδηγήσει σε αύξηση των ποσοστών ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά των *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* και *Staphylococcus aureus* κατά 2-4% (έως και 10% για ορισμένα αντιβιοτικά) (MacFadden et al., 2018). Οι πιθανοί υποκείμενοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν τις αυξημένες θερμοκρασίες που διευκολύνουν την οριζόντια γονιδιακή μεταφορά κινητών γενετικών στοιχείων ανθεκτικότητας και τους αυξημένους ρυθμούς ανάπτυξης των παθογόνων που προάγουν την περιβαλλοντική παραμονή, μεταφορά και μετάδοση (MacFadden et al., 2018). Η αύξηση του πληθυσμού, η οποία ενισχύει την κλιματική αλλαγή, είναι επίσης σημαντικός παράγοντας που συμβάλλει στην ανάπτυξη της ανθεκτικότητας (MacFadden et al., 2018).

Η κλιματική αλλαγή έχει σημαντικό αντίκτυπο στους ωκεανούς και τις θάλασσες του κόσμου. Ενδεικτικά ακολουθούν μερικοί από τους τρόπους με τους οποίους η κλιματική αλλαγή επηρεάζει τους ωκεανούς:

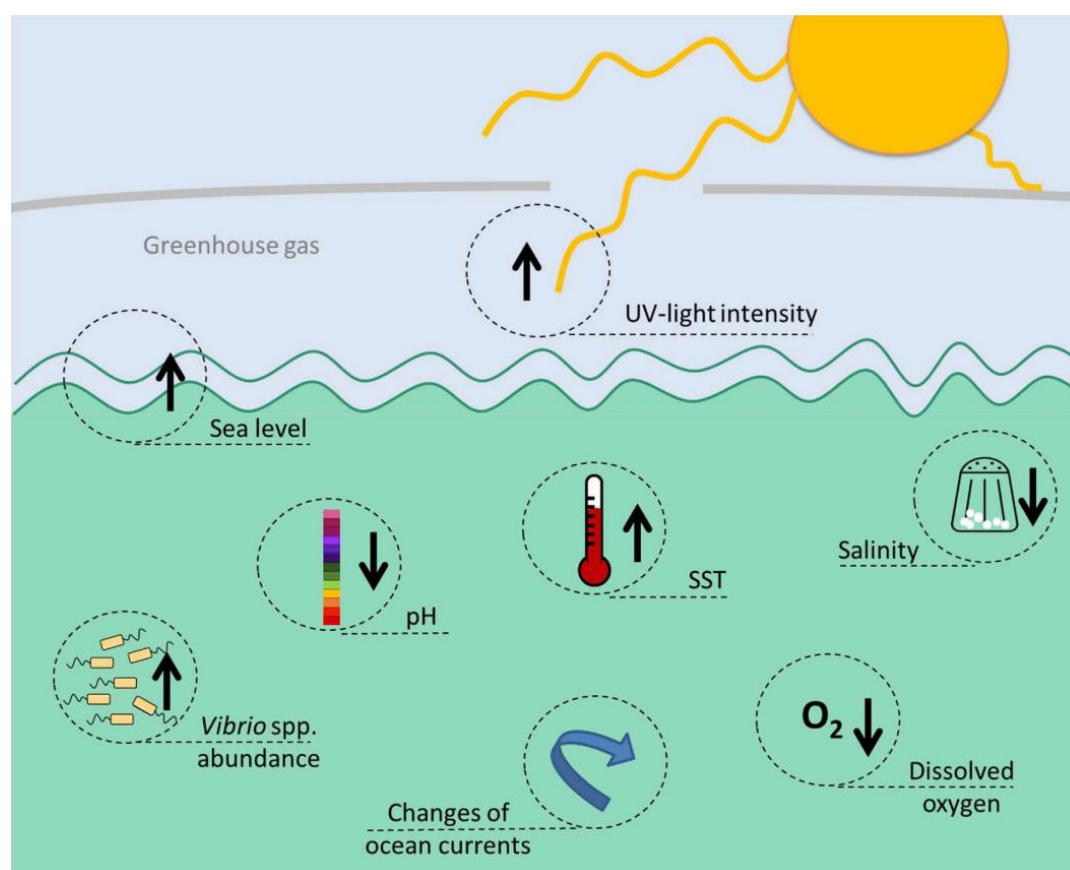
- Θέρμανση των ωκεανών: Καθώς η ατμόσφαιρα της Γης θερμαίνεται, οι ωκεανοί απορροφούν μεγάλο μέρος της πλεονάζουσας θερμότητας. Αυτό οδηγεί σε αύξηση της θερμοκρασίας των ωκεανών, η οποία μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στα ωκεάνια ρεύματα, άνοδο της στάθμης της θάλασσας και άλλες επιπτώσεις.
- Οξίνιση των ωκεανών: Η απορρόφηση διοξειδίου του άνθρακα από την ατμόσφαιρα από τους ωκεανούς προκαλεί μια χημική αντίδραση που αυξάνει την οξύτητα του θαλασσινού νερού. Αυτό μπορεί να έχει διάφορες επιπτώσεις στη θαλάσσια ζωή, συμπεριλαμβανομένης της πιθανής απώλειας των κοραλλιογενών υφάλων.
- Αύξηση της στάθμης της θάλασσας: Καθώς η θερμοκρασία της Γης αυξάνεται, οι παγετώνες και οι πάγοι λιώνουν, γεγονός που προκαλεί άνοδο της στάθμης της θάλασσας. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε πλημμύρες παράκτιων περιοχών, διάβρωση των παραλιών και άλλες επιπτώσεις.
- Αλλαγές στα ωκεάνια ρεύματα: Οι αλλαγές στις θερμοκρασίες και τη χημεία των ωκεανών μπορούν να μεταβάλουν τα ωκεάνια ρεύματα, τα οποία μπορούν να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στα κλιματικά πρότυπα σε όλο τον κόσμο.
- Επιπτώσεις στα θαλάσσια οικοσυστήματα: Η κλιματική αλλαγή μπορεί επίσης να έχει σημαντικές επιπτώσεις στα θαλάσσια οικοσυστήματα, συμπεριλαμβανομένων των αλλαγών στα πρότυπα μετανάστευσης των ψαριών, της εξάπλωσης χωροκατακτητικών ειδών και της απώλειας της βιοποικιλότητας.

Πίνακας 1: Παράγοντες που επηρεάζουν τη θαλάσσια μικροβιακή ποικιλομορφία.

<b>ΠΑΡΆΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΆΖΟΥΝ ΤΗ ΘΑΛΆΣΣΙΑ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ</b>
Φως
Θερμοκρασία
Θρεπτικά συστατικά
pH
Οξειδοαναγωγικό δυναμικό
Μέταλλα
Αναταράξεις
Αλατότητα
UV και ηλιακή ροή
Παρουσία μακροοργανισμών, όπως ασπόνδυλα και μικροφύκη

Η κλιματική αλλαγή στα θαλάσσια οικοσυστήματα μεταβάλλει τη θερμοκρασία, την οξίνιση, την περιεκτικότητα σε οξυγόνο, την κυκλοφορία, τη διαστρωμάτωση και τις εισροές θρεπτικών ουσιών. Οι μικροοργανισμοί κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στους παγκόσμιους βιογεωχημικούς κύκλους που είναι ζωτικής σημασίας για τη βιωσιμότητα του πλανήτη. Δεδομένου ότι οι μικροβιακές κοινότητες εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τον παράγοντα θερμοκρασία, οι διακυμάνσεις του θα οδηγήσουν σε δυσμενείς μεταβολές της οργάνωσης των μικροβιακών κοινοτήτων. Σε ολόκληρο τον ωκεανό, η αύξηση των ρυθμών εξάτμισης προκαλεί την επιφανειακή μείωση του μεικτού στρώματος. Αυτή η ενισχυμένη στρωμάτωση εμποδίζει την κατακόρυφη μεταφορά των θρεπτικών ουσιών. Τέτοιες διεργασίες λόγω πυκνότητας θα μειώσουν τη διαλυτότητα του οξυγόνου στα επιφανειακά ύδατα, οδηγώντας σε σημαντική μείωση του διαθέσιμου οξυγόνου από τον μελλοντικό ωκεανό. Ο μεταβολισμός και η ποικιλομορφία των μικροβίων μαζί με τη βιογεωχημεία των ωκεανών θα διατρέχουν μεγάλο κίνδυνο λόγω της υπερθέρμανσης του πλανήτη και των συναφών

επιπτώσεών της. Ως απόκριση στις μεταβολές της θερμοκρασίας, παρατηρείται μεταβολή στην κατανομή των φυτοπλαγκτικών κοινοτήτων σε όλο τον πλανήτη, δημιουργώντας αλλαγές στην πρωτογενή παραγωγή του ωκεανού προκαλώντας μαζικές επιπτώσεις στη βιόσφαιρα. Οι θαλάσσιες μικροβιακές κοινότητες προσπαθούν να προσαρμοστούν στις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες των ωκεανών ανταποκρινόμενες με μετατοπίσεις βιογεωγραφικών περιοχών, τροποποιήσεις της δομής της κοινότητας και προσαρμοστική εξέλιξη. Η επιμονή αυτής της κλιματικής αλλαγής στα ωκεάνια οικοσυστήματα, στο μέλλον, θα αποτελέσει σοβαρή απειλή για τον μεταβολισμό και την κατανομή των θαλάσσιων μικροβίων, οδηγώντας σε διακυμάνσεις στους βιογεωχημικούς κύκλους, επηρεάζοντας έτσι τη συνολική λειτουργία του οικοσυστήματος (Abirami et al., 2021).



Εικόνα 3: Επιπτώσεις της υπερθέρμανσης του πλανήτη στα υδάτινα συστήματα (Montánchez & Kaberdin, 2020).

Για να εκτιμηθούν οι επιπτώσεις της κλιματικής αλλαγής στο θαλάσσιο τροφικό πλέγμα, είναι ζωτικής σημασίας η κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν τη δομή και την παραγωγικότητα του τροφικού πλέγματος. Τα βακτήρια και το φυτοπλαγκτόν είναι βασικοί οργανισμοί στη βάση του θαλάσσιου τροφικού πλέγματος, παρέχοντας παραγωγή βιομάζας από την οποία εξαρτάται το υπόλοιπο τροφικό πλέγμα. Προσλαμβάνουν θρεπτικά συστατικά μέσω διάχυσης και είναι έτσι οι πρώτοι οργανισμοί που ανταποκρίνονται στις αλλαγές στη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών. Η αλληλεπίδρασή τους επηρεάζει έντονα τη δομή και την αποτελεσματικότητα του τροφικού πλέγματος και, συνεπώς, την παραγωγή σε υψηλότερα τροφικά επίπεδα (Andersson et al., 2015).

Αυτό το οργανικό υλικό τροφοδοτεί το τροφικό πλέγμα, στο οποίο κυριαρχούν στα βάθη της θάλασσας μικροβιακά συστατικά, κυρίως βακτήρια και αρχαία. Οι ιοί ακολουθούν σε

βιομάζα και κυριαρχούν σε πληθυσμούς. Η μικροβιακή αφθονία στη βαθιά θάλασσα υποδηλώνει μεγαλύτερη σχετική σημασία για τις διεργασίες του οικοσυστήματος απ' ό,τι στα περισσότερα περιβάλλοντα, και η μικροβιακή και ιογενής διαμεσολάβηση της ροής και του μετασχηματισμού της χημικής ενέργειας επηρεάζει όλα τα επίπεδα της βιολογικής οργάνωσης. Πράγματι, η φυσική επιλογή που ασκούν οι ιοί στα βακτήρια και τα αρχαία του βυθού ως φυσικοί θηρευτές τους μπορεί να μειώσει σημαντικά τη ροή ενέργειας προς τα υψηλότερα τροφικά επίπεδα (Andersson et al., 2015).

### Η Μεσόγειος Θάλασσα

Ως Μεσόγειος είναι γνωστή από τα αρχαιότερα χρόνια μεγάλη κλειστή θάλασσα, που βρίσκεται ανάμεσα σε δύο ηπείρους: την Ευρασία και την Αφρική.

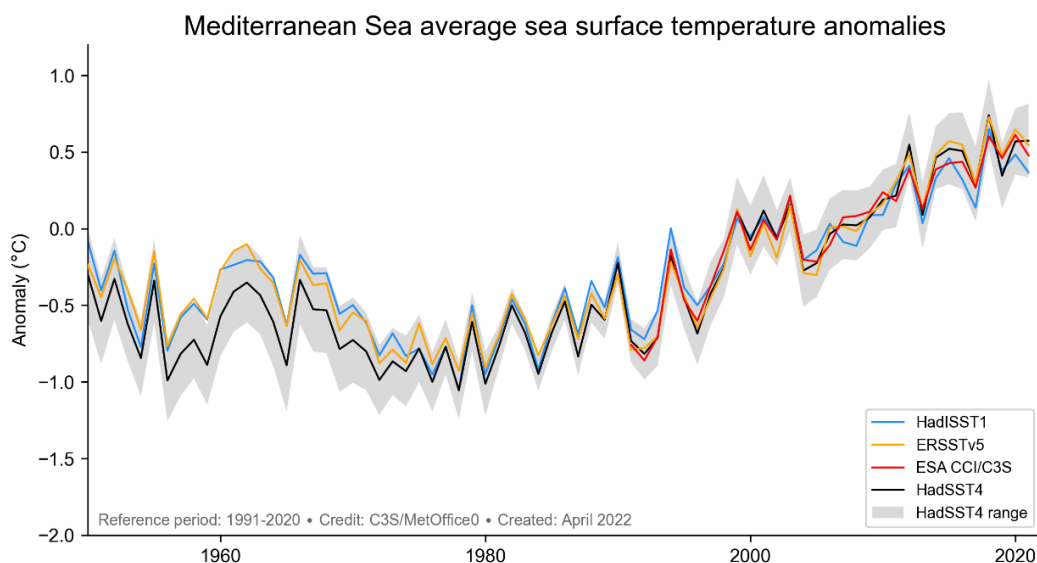
Η Μεσόγειος Θάλασσα είναι μοναδική, καθώς είναι μια ημίκλειστη θάλασσα, με μια στενή σύνδεση με τον Ατλαντικό Ωκεανό μέσω του Στενού του Γιβραλτάρ, την τεχνητή σύνδεση με την Ερυθρά Θάλασσα μέσω της Διώρυγας του Σουέζ και το Στενό του Βοσπόρου που τη συνδέει με τη μικρότερη κλειστή Μαύρη Θάλασσα. Αναγνωρίζεται γενικά ως μια ολιγοτροφική θαλάσσια περιοχή με αρκετά χαρακτηριστικά, όπως η υψηλή καλοκαιρινή εξάτμιση και η περιορισμένη εισροή γλυκού νερού, που την καθιστούν ιδιαίτερα ευαίσθητη στις κλιματικές αλλαγές (Zaccone & Caruso, 2019).

Η Μεσόγειος Θάλασσα χωρίζεται σε γενικές γραμμές στη δυτική και την ανατολική λεκάνη, οι οποίες συνδέονται μέσω του σχετικά ρηχού καναλιού της Σικελίας. Οι δύο λεκάνες μπορεί να διαφέρουν ελαφρώς ως προς τη θερμοκρασία τους, αλλά γενικά παρουσιάζουν ήπιους χειμώνες με θερμοκρασίες επιφανείας της θάλασσας που κυμαίνονται μεταξύ 16-20°C, αν και σε ορισμένες από τις βορειότερες περιοχές οι θερμοκρασίες μπορεί να είναι χαμηλότερες. Το καλοκαίρι, οι τυπικές θερμοκρασίες κυμαίνονται μεταξύ 24-28°C, με σημαντική διάκριση ότι η ανατολική λεκάνη παρουσιάζει γενικά υψηλότερες τιμές έως και 2°C σε σύγκριση με τη δυτική λεκάνη (Marras et al., 2015).

Λόγω του φαινομένου του θερμοκηπίου, οι ωκεανοί έχουν θερμανθεί κατά 0,7°C και η απορρόφηση περίπου 30% του ανθρωπογενούς διοξειδίου του άνθρακα προκάλεσε μείωση του pH κατά 0,1 μονάδα (Byrne & Przeslawski, 2013; IPCC, 2022; Kroeker et al., 2013). Κατά τη διάρκεια του 21ου αιώνα, η αύξηση της θερμοκρασίας και η οξίνιση θα συνεχιστούν, και μάλιστα σε παγκόσμια κλίμακα.

### Μεταβολές της θερμοκρασίας στη Μεσόγειο Θάλασσα

Η μέση θερμοκρασία της Γης τείνει να αυξάνεται από τον 19ο αιώνα, ιδίως από τη δεκαετία του 1920 (Brohan et al., 2006; Folland, 2002; Hansen et al., 2006). Η περιοχή της Μεσογείου δεν αποτέλεσε εξαίρεση, καθώς παρατηρήθηκε αύξηση της μέσης θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια του 20ού αιώνα (Béthoux et al., 1998; Camuffo et al., 2010; Repapis & Philandras, 1988). Όλες οι μελέτες για την περιοχή δείχνουν μια τάση προς υψηλότερες θερμοκρασίες. Έτσι, οι αναφορές για την αύξηση της θερμοκρασίας σε ολόκληρη την περιοχή κατά τα τελευταία 100 έτη κυμαίνονται από 1 έως 4,5°C (Alpert et al., 2008; Brunetti et al., 2004).



Εικόνα 4: Ετήσιες μέσες αποκλίσεις SST (°C), σε σχέση με το μέσο όρο 1991-2020, για τη Μεσόγειο Θάλασσα. Πηγή δεδομένων: ESA CCI/C3S SST Climate Data Record v2.1 (κόκκινο), HadSST.4.0.1.0 (μαύρο, η γκριζα σκίαση υποδεικνύει το εύρος αβεβαιότητας), ERSSTv5 (πορτοκαλί) και HadISST1 (μωβ). Πηγή: C3S/MetOffice.Figure.

Τα θαλάσσια ύδατα γύρω από την Ευρώπη έχουν θερμανθεί από το 1850 που ξεκίνησαν οι καταγραφές. Ωστόσο, ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας δεν ήταν ομοιόμορφος και η εξέλιξη της θερμοκρασίας ήταν διαφορετική στις επιμέρους θάλασσες και, σε κάποιο βαθμό, στο εσωτερικό κάθε θάλασσας.

Κατά μέσο όρο στην Ευρώπη, υπήρξαν περίοδοι ταχύτερης αύξησης της θερμοκρασίας μεταξύ των δεκαετιών 1920 και 1940 και μεταξύ των δεκαετιών 1990 και 2000 και περίοδοι βραδύτερης αύξησης της θερμοκρασίας ή ψύξης μεταξύ του 1900 και της δεκαετίας του 1920 και μεταξύ των δεκαετιών 1940 και 1980. Ένα παρόμοιο μοτίβο μεταβολών παρατηρήθηκε για τις επιφανειακές θερμοκρασίες του αέρα πάνω από την ξηρά.

Από τις αρχές της δεκαετίας του 2000, ο μέσος ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας για τις Ευρωπαϊκές SST έχει μειωθεί, αλλά οι θερμοκρασίες παραμένουν σε ιστορικά υψηλά επίπεδα. Ο τελευταίος μέσος όρος πενταετίας είναι 0,2-0,3°C πάνω από την περίοδο αναφοράς 1991-2020 και 0,4-0,6°C πάνω από την περίοδο αναφοράς 1981-2010.

Οι μελέτες για την κλιματική αλλαγή αφορούν κυρίως την υπερθέρμανση του πλανήτη, η οποία προκαλείται κυρίως από ανθρωπογενείς δραστηριότητες από την αρχή της βιομηχανικής εποχής. Οι μελέτες δείχνουν αύξηση της μέσης παγκόσμιας επιφανειακής θερμοκρασίας κατά 0,3-4,8°C έως το 2100 (Collins et al., 2013). Όχι μόνο το χερσαίο οικοσύστημα, αλλά και το υδάτινο οικοσύστημα επηρεάζεται έντονα από την κλιματική αλλαγή από την αρχή της βιομηχανικής εποχής.

Η θερμοκρασία της επιφάνειας της θάλασσας (Sea Surface Temperature, SST) είναι ένας δείκτης της θερμοκρασίας του νερού κοντά στην επιφάνεια του ωκεανού (δηλαδή από 10μm έως 20m κάτω από την επιφάνεια της θάλασσας) στην ωκεανογραφία. Το στρώμα αυτό παίζει σημαντικό ρόλο για τις φυσικές και χημικές συνθήκες των ωκεανών λόγω της ανάμιξης του ατμοσφαιρικού CO<sub>2</sub> στο θαλασσινό νερό (Bricaud et al., 2002). Επιπλέον, η SST έχει ισχυρή αλληλεπίδραση με τον άνθρακα βιογεωχημικό κύκλο μεταξύ της ατμόσφαιρας και

των θαλάσσιων οικοσυστημάτων. Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι η παγκόσμια μέση θερμοκρασία έχει αυξηθεί κατά σχεδόν 0,8°C από τα τέλη του 19ου αιώνα και έχει αυξηθεί κατά περίπου 0,2°C ανά δεκαετία κατά τα τελευταία 25 χρόνια (Corneicis, 2023).

#### *Μεταβολές του pH στη Μεσόγειο Θάλασσα*

Ταυτόχρονα με την υπερθέρμανση του πλανήτη, η αύξηση του ατμοσφαιρικού CO<sub>2</sub> λόγω των ανθρωπογενών δραστηριοτήτων προκαλεί προοδευτική οξίνιση των θαλασσών και των ωκεανών της Γης λόγω της συνεχιζόμενης απορρόφησης του CO<sub>2</sub> από τους ωκεανούς. Μόλις τα μόρια του CO<sub>2</sub> εισέλθουν στη θάλασσα, συμμετέχουν σε μια σειρά χημικών εξισορροπήσεων. Αυτό μεταφράζεται σε (1) αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων υδρογόνου και επομένως μείωση του pH και (2) μείωση της συγκέντρωσης των ανθρακικών ιόντων, τα οποία είναι τα βασικά συστατικά που χρησιμοποιούν οι ασβεστοποιητικοί οργανισμοί, όπως τα κοράλλια, τα μύδια, τα κοκκολιθοφόρα και τα πτερόποδα, για να οικοδομήσουν τον σκελετό ή τη δομή τους. Αυτοί οι οργανισμοί αναμένεται επομένως να επηρεαστούν από την οξίνιση, καθώς η αλλαγή αυτή πιθανόν να επηρεάσει την ανάπτυξή τους. Οι αλλαγές στη χημεία του θαλασσινού νερού λόγω του διαλυόμενου CO<sub>2</sub> που παράγεται από τις ανθρωπογενείς δραστηριότητες είναι αρκετά μεγάλες ώστε να επηρεάσουν άλλες χημικές, βιολογικές και διαδικασίες ανταλλαγής αερίων. Οι πιθανές επιπτώσεις της σταδιακής οξίνισης των θαλασσών και των ωκεανών εκτείνονται από τις επιπτώσεις στους μεμονωμένους οργανισμούς έως εκείνες στα οικοσυστήματα και τους βιογεωχημικούς κύκλους (Fabry et al., 2008; Guinotte & Fabry, 2008; Pelejero et al., 2010).

Η Μεσόγειος Θάλασσα έχει ορισμένα χαρακτηριστικά που την καθιστούν ιδιαίτερα ευαίσθητη και ευάλωτη στις μεταβολές του ατμοσφαιρικού CO<sub>2</sub> και στη σταδιακή οξίνιση. Επιπλέον, η Μεσόγειος Θάλασσα είναι πιο αλμυρή και πιο αλκαλική από τους ωκεανούς του πλανήτη και, ως εκ τούτου, έχει μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης CO<sub>2</sub>. Μια πρόσφατη μελέτη που ποσοτικοποίησε τις μεταβολές της ποσότητας του ανθρωπογενούς άνθρακα που εισήλθε στη Μεσόγειο κατά την προηγούμενη δεκαετία (Touratier & Goyet, 2009) έδειξε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα διείδυσης του CO<sub>2</sub> σε σχέση με εκείνα που βρέθηκαν για τον Βόρειο Ατλαντικό Ωκεανό. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η απορρόφηση του CO<sub>2</sub> στη Μεσόγειο Θάλασσα, και συνεπώς η οξίνιση των υδάτων της, συντελείται ταχύτερα από ό,τι στον Βόρειο Ατλαντικό, όπου εντοπίζονται οι υψηλότερες κάθετα ενσωματωμένες συγκεντρώσεις ανθρωπογενούς CO<sub>2</sub> (Sabine et al., 2004).

Τα περιβάλλοντα με τιμές pH κάτω από 7,0 θεωρούνται όξινα, ενώ εκείνα με τιμές pH πάνω από 7,0 θεωρούνται βασικά. Το ακραίο pH επηρεάζει τη δομή όλων των μακρομορίων. Οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν τις αλυσίδες του DNA διασπώνται σε υψηλό pH. Τα λιπίδια υδρολύονται από ένα εξαιρετικά βασικό pH. Η κινητήρια δύναμη πρωτονίων που είναι υπεύθυνη για την παραγωγή ATP στην κυτταρική αναπνοή εξαρτάται από τη βαθμίδα συγκέντρωσης του H<sup>+</sup> κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης. Εάν τα ιόντα H<sup>+</sup> εξουδετερωθούν από ιόντα υδροξειδίου, η βαθμίδα συγκέντρωσης καταρρέει και εμποδίζει την παραγωγή ενέργειας. Σε κάθε περίπτωση τα συστατικά που είναι πιο ευαίσθητα στο pH του κυττάρου είναι οι πρωτεΐνες (Cunha et al., 2010). Οι μέτριες μεταβολές του pH τροποποιούν τον ιονισμό των λειτουργικών ομάδων των αμινοξέων και διαταράσσουν τους δεσμούς υδρογόνου, οι οποίοι, με τη σειρά τους, προωθούν αλλαγές στην αναδίπλωση του μορίου, προάγοντας τη μετουσίωση και καταστρέφοντας τη δραστικότητα.

Το βέλτιστο pH ανάπτυξης είναι το πιο ευνοϊκό pH για την ανάπτυξη ενός οργανισμού. Η χαμηλότερη τιμή pH που μπορεί να ανεχθεί ένας οργανισμός ονομάζεται ελάχιστο pH ανάπτυξης και το υψηλότερο pH είναι το μέγιστο pH ανάπτυξης. Τα περισσότερα βακτήρια

είναι ουδετερόφιλα, δηλαδή αναπτύσσονται βέλτιστα σε pH εντός μιας ή δύο μονάδων pH από το ουδέτερο pH 7.

#### Ολιγοτροφισμός στη Μεσόγειο Θάλασσα

Η Μεσόγειος Θάλασσα είναι ένα ημίκλειστο οικοσύστημα με αντίστροφη εκβολική κυκλοφορία που έχει ως αποτέλεσμα την εισροή επιφανειακών υδάτων φτωχών σε θρεπτικά συστατικά και την εκροή βαθύτερων υδάτων πλούσιων σε θρεπτικά συστατικά μέσω των Στενών του Γιβραλτάρ (Bethoux et al., 1992).

Η άνοδος των θερμοκρασιών δεν επηρεάζει μόνο τις βιολογικές διεργασίες, αλλά μειώνει επίσης την πυκνότητα του νερού και συνεπώς τη στρωμάτωση και την κυκλοφορία, που επηρεάζουν τη διασπορά των οργανισμών και τη μεταφορά θρεπτικών ουσιών. Οι βροχοπτώσεις, η αλατότητα και οι άνεμοι επηρεάζουν επίσης τη στρωμάτωση, την ανάμιξη και την κυκλοφορία. Οι εισροές θρεπτικών συστατικών από τον αέρα, τα ποτάμια και τις εκβολές επηρεάζουν επίσης τη σύνθεση και τη λειτουργία της μικροβιακής κοινότητας και η κλιματική αλλαγή επηρεάζει όλους αυτούς τους φυσικούς παράγοντες (Cavicchioli et al., 2019).

Τα *Vibrio* διαθέτουν ποικίλους γονιδιωματικούς τόπους που κωδικοποιούν για πολύπλοκους μεταβολικούς μηχανισμούς που τους επιτρέπει να χρησιμοποιούν ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων και να αναζητούν "θερμά σημεία" θρεπτικών συστατικών μέσω της χημειοταξίας και της κίνησης των μαστιγίων τους (Polz et al., 2006).

Η Μεσόγειος Θάλασσα αναγνωρίζεται γενικά ως μια ολιγοτροφική λεκάνη με αρκετές διακριτικά χαρακτηριστικά, όπως η υψηλή καλοκαιρινή εξάτμιση και η περιορισμένη εισροή γλυκού νερού, τα οποία την καθιστούν ιδιαίτερα ευαίσθητη στις κλιματικές αλλαγές (Turley, 1999). Τα κύρια χαρακτηριστικά της είναι:

- ο η μείωση της συγκέντρωσης θρεπτικών ουσιών από τα δυτικά προς τα ανατολικά, με αύξηση των ολιγοτροφικών συνθηκών στην ανατολική λεκάνη (Turley, 1999). Τα επίπεδα των φωσφορικών αλάτων είναι στην πραγματικότητα ο κύριος περιοριστικός παράγοντας για τη βιολογική παραγωγικότητα στην ανατολική Μεσόγειο,
- ο η εισροή υδάτων από τον Ατλαντικό ωκεανό με χαμηλή αλατότητα και θερμοκρασία στη δυτική λεκάνη και η έντονη εξάτμιση του νερού στη λεκάνη της Λεβαντίνης (Malanotte-Rizzoli et al., 1997; Powley et al., 2017),
- ο ένα σχετικά θερμότερο (περίπου 13°C) νερό στις βαθιές ζώνες σε σύγκριση με τους βαθιούς ωκεανούς,
- ο η επικράτηση μικρών ετερότροφων και μικρών φωτότροφων με μικροβιακό τροφικό πλέγμα που κυριαρχεί (Siokou-Frangou et al., 2010; Zaccone et al., 2018), η παρουσία των ενδιάμεσων υδάτων της Λεβαντίνης [σε βάθος περίπου 300-400m] και τα φαινόμενα σχηματισμού πυκνών υδάτων που εμφανίζονται σε συγκεκριμένες περιοχές όπως ο Κόλπος των Λεόντων, η Αδριατική Θάλασσα και το Αιγαίο Πέλαγος (Civitaresse et al., 2010).

#### Ιοί μικροβίων στη θάλασσα

Ο αριθμός των ιών που βρίσκονται στα θαλάσσια ύδατα φαίνεται να είναι εξαιρετικά υψηλός. Τοποθεσίες που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα έχουν αποκαλύψει αριθμούς ιών της τάξης των 10.000.000 ανά ml νερού. Ωστόσο, οι αριθμοί αυτοί προκαλούν λιγότερη έκπληξη αν αναλογιστεί κανείς τον αριθμό των υποψήφια μικροβιακών ξενιστών που είναι



διαθέσιμοι σε αυτούς τους ιούς. Περίπου 1.000.000 μικρόβια βρίσκονται σε ένα ml θαλασσινού νερού, καθιστώντας την αναλογία ιών προς ξενιστές περίπου 10:1, μια λογική αναλογία για να εξασφαλιστεί ότι ένας ιός θα συναντήσει υποψήφιους ξενιστές αρκετά συχνά για να πολλαπλασιαστεί (Hunter-Cevera et al., 2005).

Οι θαλάσσιοι ιοί παίζουν πιθανότατα διάφορους σημαντικούς ρόλους στην οικολογία των θαλάσσιων μικροβίων. Ρόλοι οι οποίοι ως σήμερα ήταν αρκετά παραμελημένοι στη θαλάσσια οικολογία. Προφανώς, δρουν ως θηρευτές, προκαλώντας τη θνησιμότητα των θαλάσσιων μικροβίων, αλλά μέσω λυσιγονικών φαινομένων είναι ικανοί να συνεισφέρουν και στη γενετική ποικιλομορφία των ξενιστών τους. Οι ιοί επίσης συμβάλλουν στη διατήρηση των υψηλών επιπέδων μικροβιακής γενετικής ποικιλομορφίας που παρατηρείται στα θαλάσσια οικοσυστήματα, καθώς ευνοούνται μεταλλάξεις στα γονιδιώματα των ξενιστών τους προκειμένου να αποφύγουν την ιική μόλυνση (Hunter-Cevera et al., 2005).

## Βακτηριοφάγοι

### Ιστορική αναδρομή

Οι πρώτες αναφορές για την ύπαρξη φάγων γίνεται το 1896 από τον βρετανό βακτηριολόγο Ernest Hanbury Hankin ο οποίος παρατήρησε μια απροσδιόριστη ουσία που μπορούσε να περιορίσει την εξάπλωση της χολέρας στην Ινδία (Hankin, 1896). Δύο χρόνια αργότερα ο βακτηριολόγος Gamaleya παρατήρησε μία παρόμοια δραστηριότητα έναντι του *Bacillus subtilis* (Samsygin & Boni, 1984) καθώς και αρκετοί άλλοι ερευνητές έναντι διαφόρων άλλων βακτηρίων (van Helvoort, 1992). Το 1915 ο Άγγλος βακτηριολόγος Frederick Twort ανέφερε ένα παρόμοιο φαινόμενο προωθώντας την υπόθεση ότι πιθανότατα οφείλεται σε ιό (Twort, 1915), κάτι που όμως δεν κατάφερε να αποδείξει για διάφορους λόγους (Summers, 1999; Twort, 1915). Το 1917 ο Γαλλο-Καναδός μικροβιολόγος Felix d'Herelle έκανε μία παρόμοια παρατήρηση. Αναφέρθηκε σε ιούς οι οποίοι παρασιτούν σε βακτήρια και τα καταστρέφουν (d'Herelle, 1917), τους οποίους είχε καταφέρει να απομονώσει ένα χρόνο πριν. Ταυτόχρονα πρότεινε και την ονομασία τους σε "βακτηριοφάγους", που στη συνέχεια καθιερώθηκε.

Ο d'Herelle συνέχισε να ερευνά τους βακτηριοφάγους πραγματοποιώντας δοκιμές σε ζώα και ανθρώπους. Σειρά από μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε νοσοκομείο του Παρισιού το 1919 (Summers, 1999) για την αντιμετώπιση της δυσεντερίας και είχαν εντυπωσιακά αποτελέσματα. Θετικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και από τη χρήση σκευασμάτων βακτηριοφάγων έναντι και άλλων σοβαρών ασθενειών όπως η χολέρα και η πανώλη (Summers, 1999). Η πρώτη αναφορά των βακτηριοφάγων για τη θεραπεία μολυσματικών ασθενειών που δημοσιεύθηκε έγινε το 1921 από τους Bruynoghe και Maisin για τη θεραπεία της σταφυλοκοκκικής δερματικής λοίμωξης. Μετά από πολλές μελέτες που ακολούθησαν υπήρξε μαζική παρασκευή προϊόντων βακτηριοφάγων από τις διάφορες φαρμακευτικές εταιρείες. Ωστόσο, υπήρξαν και ορισμένες κλινικές αποτυχίες των σκευασμάτων βακτηριοφάγων είτε εξαιτίας της μεγάλης εξειδίκευσης που παρουσιάζουν οι φάγοι, την οποία οι ερευνητές αγνοούσαν, είτε λόγω περιορισμένης καθαρότητας των προϊόντων. Μετά την ανακάλυψη του πρώτου αντιβιοτικού, της πενικιλίνης, και μετά την εμφάνιση των πρώτων αντιβιοτικών τη δεκαετία του 1940, η εμπορική παραγωγή θεραπευτικών φάγων σταμάτησε στο μεγαλύτερο μέρος του δυτικού κόσμου αλλά και στις ΗΠΑ. Παρ' όλα αυτά, οι βακτηριοφάγοι συνέχισαν να χρησιμοποιούνται μαζί με τα αντιβιοτικά ή αντί αυτών στην ανατολική Ευρώπη και στην πρώην Σοβιετική Ένωση. Αρκετά ιδρύματα στις χώρες αυτές συμμετέχουν ακόμα και τώρα στην έρευνα και στην παραγωγή θεραπευτικών φάγων με τα φαρμακευτικά παρασκευάσματα να διατίθενται προς πώληση σε φαρμακεία, σε εξειδικευμένα ερευνητικά κέντρα και κλινικές. Δύο από τα πιο σημαντικά ερευνητικά κέντρα

είναι το Ερευνητικό Ινστιτούτο Eliava στην Τιφλίδα της Γεωργίας και στο Ινστιτούτο Ανοσολογίας Hirsfeld στην Πολωνία.

Σήμερα, το ενδιαφέρον της επιστημονικής και πολιτικής κοινότητας της Ε.Ε. και των Η.Π.Α. για τη θεραπευτική χρήση των βακτηριοφάγων έχει ανανεωθεί λόγω των σοβαρών προβλημάτων που έχουν προκληθεί από την χρήση των αντιβιοτικών. Η έρευνα γύρω από τις δυνητικές ιδιότητες των βακτηριοφάγων ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου παθογόνων έχει αναδείξει και τη συνεισφορά τους σε όλα τα περιβαλλοντικά ενδιαιτήματα, καθότι φαίνεται ότι ευθύνονται για τη λύση πάνω από το 40% των μικροβιακών πληθυσμών σε μερικά από αυτά ανάμεσα τους και η θάλασσα.

#### Γενικά χαρακτηριστικά

Οι βακτηριοφάγοι ή οι φάγοι είναι οι πιο άφθονοι οργανισμοί της βιόσφαιρας υπερέχοντας σε αριθμό τα βακτήρια, ζουν παρασιτικά και υπάρχουν με φυσικό τρόπο στα οικοσυστήματα όπως ακριβώς και τα βακτήρια (Clokic et al., 2011a). Ένας βακτηριοφάγος είναι ένας ιός που μολύνει ένα βακτήριο. Χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό ποικιλομορφίας και μπορούν να βρεθούν σχεδόν σε οποιοδήποτε περιβάλλον όπου υπάρχουν οι φυσικοί εχθροί τους, τα βακτήρια, συμπεριλαμβανομένου του εδάφους, του νερού και του ανθρώπινου σώματος. Μία από τις πυκνότερες φυσικές πηγές φάγων αποτελεί το θαλασσινό νερό, στο οποίο υπολογίζονται πως υπάρχουν  $9 \cdot 10^8$  ιοσωμάτια ανά ml νερού, ενώ το μέγεθος του συνολικού πληθυσμού τους εκτιμάται περίπου στα  $10^{31}$  (Wommack & Colwell, 2000).

Οι φάγοι μπορούν να γίνουν ένα κλινικά χρήσιμο θεραπευτικό εργαλείο μέσω της κατανόησης του τρόπου ελέγχου των ανθεκτικών σε αυτούς βακτηρίων (Jones et al., 2007). Μερικά από τα πλεονεκτήματα τους είναι ότι:

- έχουν την ικανότητα να λύνουν βακτήρια,
- τείνουν να διαταράσσουν μόνο ελάχιστα την φυσιολογική χλωρίδα,
- είναι εξίσου αποτελεσματικοί εναντίον βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά,
- είναι συνήθως εύκολη η απομόνωση τους,
- μπορούν να έχουν χαμηλές ενδογενείς τοξικότητες, και
- αντιγράφονται στο σημείο της λοίμωξης ή οπουδήποτε υπάρχουν ξενιστές, ενώ απουσιάζουν στις αποστειρωμένες περιοχές.

Ωστόσο, παρά την υψηλή αφθονία τους και τη σπουδαιότητα των φάγων σε διάφορα οικοσυστήματα, η κατανόηση τους εξακολουθεί να είναι πολύ περιορισμένη. Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων που υποστηρίζεται από το Εθνικό Κέντρο Βιοτεχνολογικών Πληροφοριών (National Center for Biotechnology Information, NCBI), ο αριθμός των αναγνωρισμένων φάγων μεταβλήθηκε από 5.860 το 2015 σε 14.819 το 2022 στη βάση δεδομένων RefSeq, η οποία έχει τριπλασιαστεί σε μέγεθος (Zhu et al., 2022). Εκτός από τα γονιδιώματα αναφοράς, υπάρχουν περίπου 10.004.207 γονιδιώματα φάγων στη βάση δεδομένων Genbank το 2022, δηλαδή σχεδόν δεκαπλάσια αύξηση σε σύγκριση με το 2015 (1.893.134) (Zhu et al., 2022). Πλέον ο μικροβιολογικός χαρακτηρισμός των φάγων δεν μπορεί να συμβαδίσει με την ταχεία αύξηση των δεδομένων αλληλούχισης.

#### Οικογένειές-Ταξινόμηση

Η ταξινόμηση των ιών βασίζεται στη συλλογή και σύγκριση διαφόρων χαρακτηριστικών που περιγράφουν τον ιό και μπορούν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση ενός ιού από έναν άλλο. Τα χαρακτηριστικά μπορεί να αποτελούνται από οποιαδήποτε ιδιότητα ή χαρακτηριστικό του ιού και περιλαμβάνουν τη μοριακή σύνθεση του γονιδιώματος, τη δομή

του καψιδίου του ιού και το, το σύστημα έκφρασης που χρησιμοποιείται για την μεταγραφή και μετάφραση των πρωτεϊνών του ιού, το εύρος ξενιστών, την παθογένεια και την ομοιότητα αλληλουχιών. Ενώ όλοι οι χαρακτήρες είναι σημαντικοί για τον προσδιορισμό των ταξινομικών σχέσεων, οι συγκρίσεις αλληλουχιών με χρήση τόσο της ομοιότητας των αλληλουχιών ανά ζεύγη όσο και των φυλογενετικών σχέσεων έχουν γίνει ένα από τα κύρια σύνολα χαρακτήρων που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό και τη διάκριση των ταξινομικών ομάδων των ιών.

Όσον αφορά το γενετικό υλικό, μπορεί να είναι μονόκλωνο ή δίκλωνο, DNA ή RNA και γραμμικό ή κυκλικό όπως και σε όλους τους ιούς. Το μέγεθος του κυμαίνεται από πολύ μικρό, όπως του φάγου L5 που αποτελείται από 2.435 ζεύγη βάσεων (Hatfull, 2008a) ως και 498.000 ζεύγη βάσεων στη περίπτωση του φάγου G (Burton et al., 2005). Πρόσφατα, ένας αυξανόμενος αριθμός βακτηριοφάγων με σχετικά μεγάλα γονιδιώματα (>200kb) έχει αλληλουχηθεί, επιδεικνύοντας μοναδικά γονιδιωματικά χαρακτηριστικά (Yuan & Gao, 2017). Λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας των γονιδιωμάτων, οι φάγοι που μολύνουν διαφορετικούς ξενιστές έχουν συνήθως χαμηλή νουκλεοτιδική ομολογία. Ωστόσο, και οι φάγοι που μολύνουν τον ίδιο ξενιστή μπορεί επίσης να έχουν σημαντικές διαφορές στα γονιδιώματά τους (Hatfull, 2008b; Krupovic et al., 2011). Πλέον υπάρχουν παραδείγματα ερευνών που δείχνουν ότι η νουκλεοτιδική ομολογία ανάμεσα στους βακτηριοφάγους είναι ανεξάρτητη από το γένος ή και είδος του ξενιστή. Ανεξάρτητα μεγέθους γονιδιώματος, σε όλους τους φάγους απουσιάζουν τα στοιχεία βασικής κυτταρικής λειτουργίας όπως τα ριβοσώματα, κάτι που τους καθιστά υποχρεωτικά παρασιτικούς οργανισμούς. Το ισοβάτιο ενός φάγου αποτελείται από το γονιδίωμα του, περιβαλλόμενο από ένα πρωτεϊνικό ή λιποπρωτεϊνικό έλυτρο και μπορεί να φέρει ουρά, να είναι πολυεδρικό, νηματοειδές ή πλειομορφικό (Ackermann, 2011).

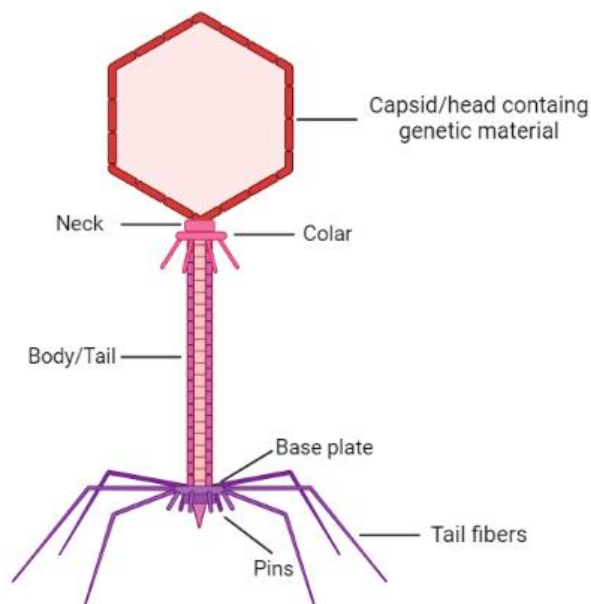
Ο ρόλος του πρωτεϊνικού ελύτρου είναι η προστασία του νουκλεϊκού οξέος, του γονιδιώματος του ιού, καθώς μετακινεί το γονιδίωμα από το μολυσμένο κύτταρο στο νεοαποκτημένο κύτταρο. Η απόκτηση κυττάρων είναι η άλλη εργασία του καψιδίου, η προσκόλληση του ιού στην επιφάνεια του κυττάρου που ακολουθείται από τη μετακίνηση του γονιδιώματος του ιού μέσα στο κύτταρο. Εκεί εκφράζονται γονίδια του ιού, προκαλώντας εκτροπή του μεταβολισμού του κυττάρου (χημικές αντιδράσεις) προς την παραγωγή νέου ιού. Ένας επιτυχημένος ιός είναι τόσο αποτελεσματικός στην εύρεση κυττάρων προς μόλυνση όσο και ικανός να υπερνικήσει τις άμυνες σε επίπεδο κυττάρων ή οργανισμού (συλλογικά, ανοσία) έναντι της μόλυνσης από τον ιό (Scott, 2021).

Οι βακτηριοφάγοι κατηγοριοποιούνται μορφολογικά με βάση το σχήμα και το μέγεθός τους.

- Φάγοι με ουρά: Αυτοί οι φάγοι έχουν σύνθετη δομή που αποτελείται από μια κεφαλή, μια ουρά και ίνες ουράς. Η κεφαλή περιέχει το γενετικό υλικό του φάγου, ενώ η ουρά είναι υπεύθυνη για την προσκόλληση και την έγχυση του γενετικού υλικού στο βακτήριο-ξενιστή. Παραδείγματα φάγων με ουρά περιλαμβάνουν τους φάγους T4 (GCF\_000836945.1) και Lambda (GCA\_000840245.1).
- Σφαιρικοί φάγοι: Αυτοί οι φάγοι έχουν εικοσαεδρικό σχήμα, το οποίο είναι ένα πολύεδρο με 20 ισόπλευρα τρίγωνα ως όψεις. Το γενετικό υλικό περικλείεται εντός του εικοσαεδρικού καψιδίου. Παραδείγματα σφαιρικών φάγων είναι οι φάγοι PhiX174 (PRJNA687267) και MS2 (PRJNA647137).
- Νηματοειδείς φάγοι: Αυτοί οι φάγοι είναι μακριές και λεπτές, μοιάζοντας με νήμα ή ράβδο. Έχουν γονιδίωμα μονόκλωνου DNA που περικλείεται μέσα σε πρωτεϊνικό

περίβλημα. Παραδείγματα νηματοειδών φάγων είναι οι φάγοι M13 (PRJNA397152) και f1 (J02448).

- ο Πλεόμορφοι φάγοι: Αυτοί οι φάγοι έχουν ακανόνιστο σχήμα και στερούνται καθορισμένης δομής. Μπορεί να έχουν ένα συνδυασμό σφαιρικών, ουροειδών ή νηματοειδών χαρακτηριστικών. Παραδείγματα πλειομορφικών φάγων περιλαμβάνουν τους φάγους PRD1 (M69077) και P22 (NC\_002371).



Εικόνα 5: Η βασική ανατομία ενός βακτηριοφάγου με ουρά.

Η μορφολογική ταξινόμηση είναι σημαντική επειδή μπορεί να προσφέρει πληροφορίες σχετικά με τη γενετική σύσταση και τον κύκλο ζωής του φάγου. Μπορεί επίσης να είναι χρήσιμη για τον εντοπισμό και τον χαρακτηρισμό νέων φάγων.

Η Διεθνής Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) είναι ο οργανισμός που είναι υπεύθυνος για την επίσημη ταξινόμηση των ιών, συμπεριλαμβανομένων των βακτηριοφάγων. Η ICTV ταξινομεί τους ιούς με βάση το γενετικό υλικό, τη μορφολογία και άλλα χαρακτηριστικά τους. Η ICTV χρησιμοποιεί ένα ιεραρχικό σύστημα ταξινόμησης, το οποίο οργανώνει τους ιούς σε τάξεις, οικογένειες, υποοικογένειες, γένη και είδη. Οι βακτηριοφάγοι ταξινομούνται σε διάφορες οικογένειες με βάση τα μορφολογικά και γενετικά χαρακτηριστικά τους. Η ταξινόμηση της ICTV ενημερώνεται τακτικά καθώς καθίστανται διαθέσιμες νέες πληροφορίες και χρησιμοποιείται ευρέως από επιστήμονες και ερευνητές που μελετούν ιούς και βακτηριοφάγους.

Στο πλαίσιο της ICTV, η υποεπιτροπή Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee (BAVS) είναι υπεύθυνη για την ταξινόμηση των φάγων (Lefkowitz et al., 2018). Η BAVS ταξινομεί τους φάγους με βάση διάφορες ιδιότητες των φάγων, συμπεριλαμβανομένης της μοριακής σύνθεσης του γονιδιώματος (ss/ds, DNA ή RNA), της μορφολογίας, της δομής του καψιδίου και του εύρους ξενιστών. Πρόσφατα, με την αυξανόμενη διαθεσιμότητα των γονιδιωμάτων των ιών, η χρήση των γονιδιωμάτων για την ταξινόμηση έχει γίνει ευρύτερα αποδεκτή (Lefkowitz et al., 2018). Λόγω των εκτεταμένων προσπαθειών αλληλούχισης για την ανακάλυψη ιών, η ICTV δεν μπορεί να καλύψει τον τεράστιο αριθμό των νεοταυτοποιημένων φάγων, και έτσι πολλοί ιοί εξακολουθούν να μην έχουν ταξινομηθεί. Μια πρόκληση πίσω

από αυτή την καθυστέρηση είναι η έλλειψη τυποποιημένων, ακριβών και ολοκληρωμένων εργαλείων ταξινομικής για τους φάγους. Η υψηλή ποικιλομορφία, η αφθονία και οι περιορισμένοι γνωστοί φάγοι μπορούν να αποτελέσουν σημαντικές προκλήσεις για την ταξινομική ανάλυση. Επιπλέον, πολλοί νεοανακαλυφθέντες φάγοι δεν διαθέτουν ομόλογα γονίδια με τα γονιδιώματα αναφοράς, γεγονός που μπορεί να δυσχεράνει τα εργαλεία που βασίζονται στην ευθυγράμμιση. Το ζήτημα αυτό γίνεται πιο σοβαρό όταν μόνο contigs, και όχι πλήρη ή σχεδόν πλήρη γονιδιώματα, μπορούν να συναρμολογηθούν από μεταγονιδιωμιακά δεδομένα, επειδή τα contigs μπορεί να περιέχουν μόνο μερικό ORF. Ως εκ τούτου, η επίτευξη ακριβούς και ολοκληρωμένης ταξινομικής ταξινόμησης των φάγων παραμένει μια πρόκληση.

#### Πολλαπλασιασμός βακτηριοφάγων

Ο βακτηριοφάγος βασίζεται για την αντιγραφή του στους μηχανισμούς του ξενιστή μετά την επιτυχή μόλυνση του βακτηριακού κυττάρου. Ο φάγος προσκολλάται στον βακτηριακό ξενιστή ειδικά σε έναν υποδοχέα που βρίσκεται στην επιφάνεια του βακτηρίου και εισάγει το γενετικό του υλικό στο κύτταρο. Το κύτταρο-ξενιστής παρέχει τα μοριακά δομικά στοιχεία και τα ένζυμα που απαιτούνται για την αντιγραφή του γενετικού υλικού του φάγου και την παραγωγή απογόνων του φάγου (Doss et al., 2017). Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τους φαγούς, όπως η ενδολυσίνη και η χολίνη, λύνουν το κύτταρο-ξενιστή από το εσωτερικό του (Doss et al., 2017). Οι χολίνες είναι μικρές πρωτεΐνες που συσσωρεύονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του ξενιστή και επιτρέπουν στην ενδολυσίνη να αποικοδομεί την πεπτιδογλυκάνη, επιτρέποντας τη διαφυγή των απογόνων φάγων (Doss et al., 2017). Ανάλογα με τον τρόπο αναπαραγωγής τους, οι βακτηριοφάγοι χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: στους λυτικούς (virulent), που ακολουθούν το λυτικό κύκλο, και στους ήπιους (temperate), οι οποίοι ακολουθούν το λυσιγονικό κύκλο αναπαραγωγής.

#### Λυτικός κύκλος

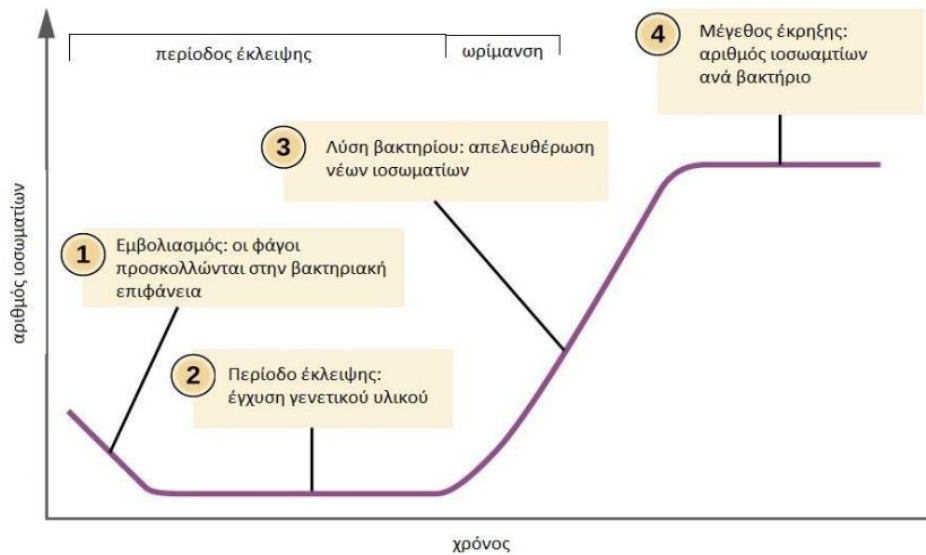
Ο λυτικός κύκλος ζωής είναι ταχύτερος και ολοκληρώνεται με την λύση του βακτηρίου-ξενιστή. Οι "λυτικοί βακτηριοφάγοι" ανήκουν στην κατηγορία των «φυσικών αντιμικροβιακών μέσων ελέγχου» και είναι αναμφίβολα οι πιο άφθονες βιολογικές οντότητες στον πλανήτη. Βρίσκουν εφαρμογή σε διάφορους τομείς της βιοτεχνολογίας, συμπεριλαμβανομένης της ταχείας ανίχνευσης βακτηρίων (Favrin et al., 2001; Jassim et al., 2012; Jassim & Griffiths, 2007; Stewart et al., 1998, 1993), της βιολογικής επεξεργασίας των τροφίμων (Jassim et al., 2012) και της απομάκρυνσης των βακτηριακών βιοφίλμ (Hibma, 1997; Jassim et al., 2012). Με τη μόλυνση του βακτηρίου-ξενιστή ο λυτικός βακτηριοφάγος χρησιμοποιεί τους κυτταρικούς μηχανισμούς για να ξεκινήσει τη διαδικασία της αναπαραγωγής, διακόπτει τον βακτηριακό μεταβολισμό και προκαλεί τη λύση του βακτηρίου.

Ο κύκλος ζωής ενός λυτικού φάγου περιλαμβάνει τα εξής 5 στάδια:

1. Προσκόλληση (προσρόφηση) του ιοσώματος στο κύτταρο-ξενιστή.
2. Διείσδυση και εισαγωγή του ιικού γενετικού υλικού (DNA ή RNA) στο κύτταρο-ξενιστή.
3. Σύνθεση νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών, απαραίτητων στοιχείων για το σχηματισμό νέων ιοσωμάτων, από τον μηχανισμό του ξενιστή.
4. Συναρμολόγηση των πρωτεϊνών και πακετάρισμα του γενετικού υλικού στις κεφαλές μέσω της διαδικασίας της ωρίμανσης.

5. Λύση των βακτηριακών κυττάρων και απελευθέρωση των νέων ιών από το κύτταρο στο περιβάλλον.

Η μονοφασική καμπύλη ανάπτυξης (one-step growth curve) αποτελεί τη γραφική απεικόνιση των βιολογικών χαρακτηριστικών του κάθε βακτηριοφάγου που προκύπτουν από τα παραπάνω βήματα του κύκλου ζωής του.



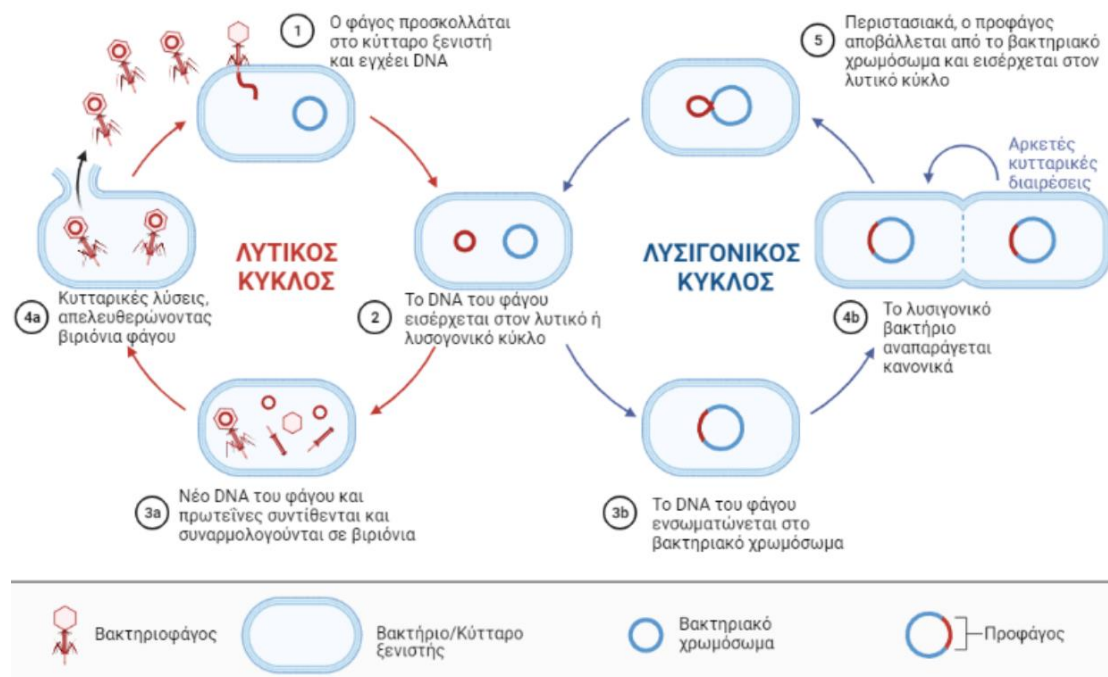
Εικόνα 6: Η μονοφασική καμπύλη ανάπτυξης του βακτηριοφάγου όπου παρατηρούμε τα βιολογικά του χαρακτηριστικά.

Η περίοδος έκλειψης (eclipse time) αναφέρεται στον χρόνο μεταξύ της προσκόλλησης των φάγων στην βακτηριακή επιφάνεια και την δημιουργία του πρώτου απογονικού ιού. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου λαμβάνει χώρα η αντιγραφή του γενετικού υλικού και η συναρμολόγηση νέων φάγων. Η λανθάνουσα περίοδος (latend period) περιλαμβάνει την περίοδο έκλειψης και την ωρίμανση των βακτηριοφάγων εντός των βακτηρίων μέχρι τη δημιουργία αρκετών ιοσωματιδίων που θα προκαλέσουν και την λύση του ξενιστή και την απελευθέρωση αυτών στο περιβάλλον όπου θα ξεκινήσουν έναν νέο κύκλο μόλυνσης και αναπαραγωγής. Το μέγεθος έκρηξης (burst size), που ποικίλλει ανάλογα με τον εκάστοτε ιό και το εκάστοτε κύτταρο-ξενιστή, ορίζει τον αριθμό των νέων φάγων. Η περίοδος έκλειψης, η λανθάνουσα φάση ανάπτυξης καθώς και το μέγεθος έκρηξης αποτελούν χαρακτηριστικά του κάθε βακτηριοφάγου.

#### Λυσιγονικός κύκλος

Οι λυσιγονικοί βακτηριοφάγοι είναι «ήπιοι» ή αδρανείς βακτηριοφάγοι οι οποίοι μπορεί να λάβουν τη μορφή ενός «προφάγου» με ένθεση του ιικού DNA στο χρωμόσωμα του ξενιστή. Γίνονται μέρος του κυττάρου-ξενιστή και αναπαράγονται μαζί με το χρωμόσωμα του για πολλές γενιές. Σε αντίθεση με τους λυτικούς φάγους δεν προκαλούν τη λύση του κυττάρου-ξενιστή (Jassim & Limoges, 2013). Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται λυσιγονία (lysogeny), το οποίο παρέχει κατά περίπτωση και ανοσία έναντι μόλυνσης από άλλους διαφορετικούς βακτηριοφάγους του ίδιου τύπου, εξασφαλίζοντας ότι υπάρχει μόνο ένα αντίγραφο φάγου ανά βακτηριακό κύτταρο. Τα μοναδικά χαρακτηριστικά των λυσιγονικών βακτηριοφάγων και οι δυνατότητές τους για εκμετάλλευση παρατηρούνται με αντιστροφή της αντοχής των παθογόνων και εν τέλει την αποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών σε αυτά (Edgar et al., 2012).

Το σύστημα δεν βασίζεται στην ικανότητα του να σκοτώνει παθογόνους παράγοντες στον μολυσμένο ξενιστή, αλλά στην ικανότητά του να παραδίδει γονιδιακές κατασκευές μέσα στα βακτήρια και έτσι να τα καθιστά ευαίσθητα στα αντιβιοτικά πριν από τη μόλυνση του ξενιστή. Οι λυσιγονικοί βακτηριοφάγοι οδηγούν στην προσαρμοστική εξέλιξη των βακτηρίων για την επίτευξη πιο ισχυρών παραγόντων μολυσματικότητας κληρονομούμενων από βακτήρια προηγουμένως μολυσμένα μέσω ενσωμάτωσης, δηλαδή της μεταφοράς γενετικού υλικού σε βακτηριακό κύτταρο μέσω μόλυνσης με φάγο (Campbell, 1988; Verheust et al., 2010). Ο λυσιγονικός κύκλος μπορεί να είναι σταθερός για χιλιάδες γενεές και ο βακτηριοφάγος μπορεί να μεταβάλλει τον φαινότυπο του βακτηρίου εκφράζοντας γονίδια που δεν εκφράζονται στη συνηθισμένη πορεία της μόλυνσης (Clokic et al., 2011b).



Εικόνα 7: Λυτικός και λυσιγονικός τρόπος πολλαπλασιασμού των βακτηριοφάγων (Pearson Education, Inc. Publishing as Benjamin Cummings, 2005).

### Χαρακτηριστικά των βακτηριοφάγων μεγάλου και μικρού γονιδιώματος

Οι βακτηριοφάγοι παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ποικιλομορφία όσον αφορά το μέγεθος του γονιδιώματος, το οποίο μπορεί σε γενικές γραμμές να ταξινομηθεί σε δύο κατηγορίες: βακτηριοφάγοι μεγάλου γονιδιώματος και βακτηριοφάγοι μικρού γονιδιώματος. Οι βακτηριοφάγοι μεγάλου γονιδιώματος διαθέτουν συνήθως εκτεταμένο γενετικό υλικό, που συχνά υπερβαίνει τα 200 χιλιάδες ζεύγη βάσεων (kb), επιτρέποντάς τους να κωδικοποιούν πληθώρα λειτουργικών γονιδίων. Αυτοί οι φάγοι μπορεί να φέρουν πολύπλοκους μοριακούς μηχανισμούς, όπως περίπλοκα ρυθμιστικά συστήματα και ποικίλα βοηθητικά μεταβολικά γονίδια (Abedon, 2011; Hatfull & Hendrix, 2011). Αντίθετα, οι βακτηριοφάγοι μικρού γονιδιώματος έχουν πιο συμπαγείς γενετικές δομές, συνήθως κάτω από 50 χιλιάδες ζεύγη βάσεων (kb). Παρά τους περιορισμούς στο μέγεθός τους, οι φάγοι μικρού γονιδιώματος είναι ικανοί για ταχεία αντιγραφή και ανάπτυξη βασικών λειτουργιών. Τα αντιθετικά χαρακτηριστικά μεταξύ βακτηριοφάγων μεγάλου και μικρού γονιδιώματος αναδεικνύουν την ευελιξία αυτών των ιικών οντοτήτων στην προσαρμογή σε ποικίλες οικολογικές θέσεις και στη συμμετοχή σε δυναμικές αλληλεπιδράσεις με βακτηριακούς ξενιστές. Η μελέτη

αυτών των χαρακτηριστικών όχι μόνο ενισχύει την κατανόηση της βιολογίας των φάγων αλλά υπογραμμίζει τις πιθανές εφαρμογές τους σε διάφορους τομείς, συμπεριλαμβανομένης της βιοτεχνολογίας και της θεραπείας με φάγους.

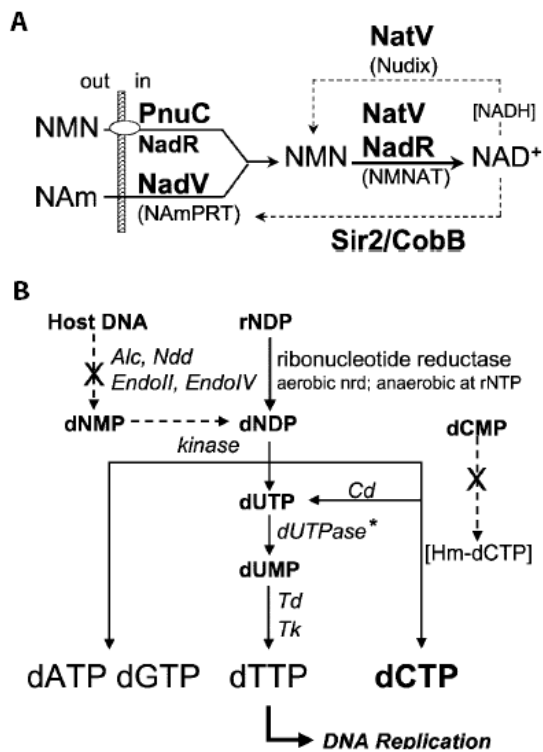
Οι βακτηριοφάγοι μεγάλου γονιδιώματος παρουσιάζουν συχνά μεγαλύτερη γονιδιωματική πολυπλοκότητα, φιλοξενώντας ποικίλες μονάδες, όπως ιντεγκράσες, συστήματα ανασυνδυασμού και πολλαπλές πρωτεΐνες καψιδίου (Abedon, 2011; Yuan & Gao, 2017). Αυτός ο γενετικός πλούτος τους επιτρέπει να περιηγούνται σε πολύπλοκα περιβάλλοντα, να προσαρμόζονται σε διάφορους βακτηριακούς ξενιστές και να χρησιμοποιούν εξελιγμένες στρατηγικές επιβίωσης. Επιπλέον, οι φάγοι μεγάλου γονιδιώματος μπορεί να φέρουν γονίδια υπεύθυνα για την τροποποίηση των βακτηριακών φαινοτύπων των ξενιστών ή τη διαμεσολάβηση για αλληλεπιδράσεις εντός μικροβιακών κοινοτήτων, συμβάλλοντας στον οικολογικό τους αντίκτυπο (Abedon, 2011; Yuan & Gao, 2017).

Από την άλλη πλευρά, οι βακτηριοφάγοι μικρού γονιδιώματος, αν και περιορισμένοι σε μέγεθος, υπερέχουν ως προς την αποδοτικότητα των πόρων και τους γρήγορους κύκλους ζωής (Hatfull & Hendrix, 2011). Τα συμπαγή γονιδιώματά τους είναι εξορθολογισμένα για βασικές λειτουργίες όπως η αναγνώριση του ξενιστή, η αντιγραφή του DNA και η συναρμολόγηση του ιού. Οι φάγοι μικρού γονιδιώματος συχνά αξιοποιούν μια πιο απλή γονιδιωματική αρχιτεκτονική, δίνοντας έμφαση στην ταχύτητα και την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας μόλυνσης. Αυτή η προσαρμοστικότητα τους καθιστά ισχυρούς υποψηφίους για τη διερεύνηση εφαρμογών θεραπείας με φάγους.

Γενικά οι βακτηριοφάγοι τείνουν να κατέχουν μωσαϊκά γονιδίων που συμπληρώνουν ή παρακάμπτουν βιοχημικά μονοπάτια στους ξενιστές τα οποία ονομάζονται βοηθητικά μεταβολικά γονίδια (Auxiliary Metabolic Genes, AMGs). Μια σημαντική πλευρά των βακτηριοφάγων μεγάλου γονιδιώματος είναι η ικανότητά τους να χειρίζονται τον κυτταρικό μηχανισμό του ξενιστή προς όφελός τους. Συγκεκριμένα, ορισμένοι βακτηριοφάγοι μεγάλου γονιδιώματος παρουσιάζουν μια μοναδική ικανότητα να εκμεταλλεύονται τους ενεργειακούς πόρους NAD<sup>+</sup> (νικοτιναμιδικό αδενινικό δινουκλεοτίδιο) του βακτηρίου-ξενιστή. Το NAD<sup>+</sup> είναι ένα σημαντικό συνένζυμο στις κυτταρικές αντιδράσεις οξειδοαναγωγής και κατέχει κεντρικό ρόλο σε διεργασίες όπως η γλυκόλυση και ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA). Αυτοί οι βακτηριοφάγοι έχουν αναπτύξει εξελιγμένους μηχανισμούς για να εκμεταλλεύονται του NAD<sup>+</sup> του ξενιστή, ενισχύοντας δυναμικά τη δική τους αντιγραφή και επιβίωση. Η αλληλεπίδραση αυτή αναδεικνύει την περίπλοκη σχέση μεταξύ των ιών και των βακτηριακών ξενιστών τους, αναδεικνύοντας τις περίπλοκες μοριακές στρατηγικές που χρησιμοποιούν αυτοί οι βακτηριοφάγοι μεγάλου γονιδιώματος για την επιτυχή μόλυνση και τον πολλαπλασιασμό τους. Όπως ο T4 και ο KVP40, έτσι και ο βακτηριοφάγος φSt2 (Skliros et al., 2016) κατέχει γονίδια που χρησιμοποιεί για να χειραγωγήσει κατάλληλα τις βιοχημικές διεργασίες του ξενιστή κατά τη διάρκεια της μόλυνσης για δικό του όφελος. Η ύπαρξη γονιδίων που έχουν τη δυνατότητα να βιοσυνθέσουν NAD<sup>+</sup> στο γονιδίωμα του βακτηριοφάγου KVP40 έχει προηγουμένως περιγραφεί και σχολιαστεί σαν ένα πολύ ενδιαφέρον βιοχημικό μονοπάτι (Miller et al., 2003). Πιστεύεται ότι τα μεγάλα φαγικά γονιδιώματα προϋποθέτουν και έναν βιοχημικό επαναπρογραμματισμό του ξενιστή λόγω των αυξημένων αναγκών σε ενέργεια που απαιτεί η αντιγραφή του DNA. Για αυτόν τον λόγο θα πρέπει να υπάρχει η κατάλληλη γονιδιακή δεξαμενή, ώστε να ενισχυθούν τα βιοχημικά μονοπάτια που ευθύνονται για την βιοσύνθεση όλων των νουκλεοτιδίων (De Smet et al., 2017).



Ο βακτηριοφάγος φSt2 διαθέτει το γονίδιο που κωδικοποιεί για την φωσφορυβολμεταφοράση του νικοταμιδίου (nicotamide phosphoribosyltransferase, *NAMPT*) το οποίο χρησιμοποιεί το νικοτιναμίδιο ως υπόστρωμα και το μετατρέπει σε μονονουκλεοτιδί του νικοτιναμιδίου, κάνοντας μια συντόμευση στη βιοχημική οδό για τη βιοσύνθεση του NAD+. Διαθέτει επίσης το γονίδιο που κωδικοποιεί τον μεταφορέα μονονουκλεοτιδίου νικοτιναμιδίου (nicotinamide mononucleotide transporter, *pnuC*) (Εικόνα 8), ο οποίος εμπλέκεται στη μεταφορά μονονουκλεοτιδίου νικοτιναμιδίου διαμέσου της εσωτερικής μεμβράνης.



Εικόνα 8: Τα δύο βιοχημικά μονοπάτια βιοσύνθεσης NAD+ και μεταβολισμού νουκλεοτιδίων μαζί με τα γονίδια του βακτηριοφάγου που συμμετέχουν (έντονα γράμματα), όπως περιγράφηκαν στον βακτηριοφάγο KVP40 (Miller et al., 2003).

Οι βακτηριοφάγοι προσπαθούν να ενισχύσουν την παραγωγή NAD+, με αυτόνομο τρόπο και για δικό τους όφελος. Πολύ πιθανό ένα τέτοιο φαινόμενο να λαμβάνει χώρα για να τροφοδοτήσουν NAD+-εξαρτώμενα ένζυμα του ξενιστή (K. Lee et al., 2017) με στόχο να τα χρησιμοποιήσουν εκείνοι ή να τροφοδοτήσουν δικά τους ένζυμα. Αν και πολλά βακτηριοφαγικά ένζυμα NAD+-εξαρτώμενα (NAD+-dependent) έχουν αναφερθεί να συμμετέχουν στην αντιγραφή του φαγικού DNA (για παράδειγμα η DNA λιγάση) στους T4 βακτηριοφάγους (Hertveldt et al., 2005), τα ένζυμα που συμμετέχουν στην βιοχημεία του συστήματος εδώ είναι όλα ATP-εξαρτώμενα (ATP-dependent) ή NADPH-εξαρτώμενα (NADPH-dependent).

## Συνεισφορά των βακτηριοφάγων στην εναπόθεση θρεπτικών στοιχείων στη θάλασσα

Λόγω του μικρού τους μεγέθους, η συντριπτική πλειοψηφία των ιών εμπίπτει στην ωκεανογραφική έννοια του DOM (που ορίζεται ως η ικανότητα διέλευσης από ένα φίλτρο 0,2μm) (Breitbart et al., 2018). Δεδομένου ότι οι ιοί σαφώς δεν είναι " διαλυτοί", αυτό δημιουργεί ένα αίνιγμα και η συμβολή των ιογενών σωματιδίων στη διάλυση του άνθρακα,

καθώς και των μακρο- και μικρο- θρεπτικών συστατικών έχει γίνει μόλις πρόσφατα αντικείμενο ενδιαφέροντος (Bonnain et al., 2016; Jover et al., 2014). Προεκτείνοντας τις εκτιμήσεις του άνθρακα, του αζώτου και του φωσφόρου που περιέχονται μέσα σε μεμονωμένα σωματίδια φάγων στην κλίμακα του θαλάσσιου οικοσυστήματος, οι Jover et al. πρότειναν ότι οι ιοί θα μπορούσαν να συνεισφέρουν σημαντικά στη δεξαμενή φωσφόρου σε περιβάλλοντα όπου ο φώσφορος είναι περιορισμένος. Η μελέτη αυτή κατέδειξε επίσης μια στοιχειομετρική αναντιστοιχία μεταξύ των σωματιδίων των φάγων και των βακτηριακών ξενιστών τους, με τους φάγους να εμπεριέχουν περισσότερο άζωτο και φώσφορο σε σχέση με τον άνθρακα σε σύγκριση με τους βακτηριακούς ξενιστές τους. Επιπλέον, μια πρόσφατη μελέτη από τους Bonnain et al. υπέθεσε ότι οι φάγοι θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως οργανικοί σύνδεσμοι για το σίδηρο, λειτουργώντας ως σημαντική δεξαμενή των ιχνοστοιχείων του σιδήρου που συχνά περιορίζουν την πρωτογενή παραγωγή.

Ο οικολογικός ρόλος των βακτηριοφάγων επηρεάζει την βακτηριακή ύπαρξη, την ποικιλομορφία στον ωκεανό, τους βιογεωχημικούς κύκλους, τη ρύθμιση των θρεπτικών συστατικών και είναι οι βασικοί παράγοντες της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων και του ελέγχου του μεγέθους του βακτηριακού πληθυσμού (Breitbart et al., 2018).

Η απελευθέρωση συστατικών του ξενιστή μετά τη λύση από τους φάγους μπορεί να μεταβάλει τη βιοδιαθεσιμότητα και τη σύνθεση των οργανικών ουσιών και των θρεπτικών συστατικών, η οποία θεωρείται βασικός παράγοντας και επηρεάζει τη δομή της κοινότητας και τη μικροβιακή σύνθεση (W. M. Hassan et al., 2020). Τα επίπεδα αυτά επηρεάζονται από τη διαθεσιμότητα του ξενιστή (πυκνότητα και δραστηριότητα), τη θερμοκρασία, τον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων του ξενιστή, την ηλιακή ακτινοβολία και την ανοξία. Με αυτόν τον τρόπο ενισχύεται η συνύπαρξη εντός των κοινοτήτων ή αποτρέπεται η κυριαρχία ειδών που μπορεί να καθορίσει την ποικιλότητα και τη δομή της κοινότητας (Pradeep Ram & Sime- Ngando, 2010). Η κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ξενιστών και των βακτηριοφάγων είναι απαραίτητη για την πρόβλεψη της επίδρασης του περιβάλλοντος στη βιοδιαθεσιμότητα θρεπτικών στη θάλασσα.

### Το γένος *Vibrio*

Τα βακτήρια του γένους *Vibrio* είναι κατά κανόνα μικρά σε μέγεθος (0,5-0,8 x 1,4-2,6μm), ραβδόμορφα Gram-αρνητικά βακτήρια, με ικανότητα μεταβολισμού καταλάσης, οξειδάσης και ευαισθησία στον *Vibrio*-στατικό παράγοντα O/129 (Austin, 2010a). Όπως σε όλα τα Gram αρνητικά βακτήρια, η σύσταση του τοιχώματος των *Vibrio* αποτελείται από 3 λιποπολυσακχαρίτες (LPS): ένα κεντρικό πολυσακχαρίτη, ένα λιπίδιο A και μια πλευρική αλυσίδα O-πολυσακχαρίτη, η οποία διαφοροποιείται μεταξύ των ειδών και καθορίζει και τον ορρότυπό τους.

Χαρακτηρίζονται από έντονη κινητικότητα (motility) η οποία οφείλεται στα πολλά και πολικά μαστίγια που διαθέτουν. Τα μαστίγια αυτά μπορούν να βρίσκονται είτε μεμονωμένα στο άκρο του βακτηρίου (μονότριχα, monotrichous) είτε να καλύπτουν περιμετρικά όλη την επιφάνειά τους (περίτριχα, multitrichous). Ορισμένα είδη μπορούν να αναπτύξουν επιπλέον πλήθος πλευρικών μαστιγίων, όταν βρεθούν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Ως προς τις απαιτήσεις τους σε οξυγόνο, είναι δυνητικά αναερόβια και, επίσης, δεν έχουν την δυνατότητα απονιτροποίησης (Farmer et al. 2005). Πολύ λίγα είδη παρουσιάζουν βιοφωσφορισμό (bioluminescence).

Τα *Vibrio* αποτελούν βασικό τμήμα της φυσικής μικροβιακής χλωρίδας στα παράκτια και παραποτάμια συστήματα, καθώς επίσης και στην εντερική μικροχλωρίδα των θαλάσσιων

ζών. Πρόκειται κατά κύριο λόγο για βακτήρια του υδάτινου περιβάλλοντος των οποίων η κατανομή εξαρτάται από τα επίπεδα  $\text{Na}^+$ , την διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων και την θερμοκρασία ( $>18^\circ\text{C}$ ). Έχουν παγκόσμια εξάπλωση και κάποια είδη μπορούν να έχουν έντονα αρνητική επίδραση τόσο στον άνθρωπο όσο και στις ανθρώπινες χρήσεις των οικοσυστημάτων, όπως στην περίπτωση των υδατοκαλλιεργειών (Pruzzo et al., n.d.). Πάνω από 80 είδη έχουν περιγραφεί και τουλάχιστον 12 από αυτά είναι ανθρώπινα παθογόνα, με σημαντικότερα εξ' αυτών τα *Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* (Oliver, 2013). Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα περιστατικά οργανικής σηψαιμίας που σημειώθηκαν στην Ν. Κορέα λόγω της κατανάλωσης ωμών στρειδιών που ήταν μολυσμένα από *Vibrio vulnificus* (Chu et al., 2011).

Τα *Vibrios* θεωρούνται παγκοσμίως σημαντική αιτία ασθενειών σε ανθρώπους και υδρόβια ζώα. Λόγω του γρήγορου πολλαπλασιασμού τους και των έντονης εποχικότητας, τα *Vibrios* έχουν ονομαστεί ζωτικό μικροβιακό βαρόμετρο της κλιματικής αλλαγής στα θαλάσσια συστήματα (Baker-Austin et al., 2017). Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, η άνοδος της θερμοκρασίας της επιφάνειας της θάλασσας θεωρείται ως σημαντικός παράγοντας που προκαλεί την αύξηση των λοιμώξεων από *Vibrio* (Kim & Chun, 2021). Τα τελευταία χρόνια, οι καύσωνες οδηγούν σε αυξημένες αναφορές για λοιμώξεων από *Vibrio* σε πολλές χώρες (Brehm et al., 2021). Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα *Vibrios* αντιλαμβάνονται τις αβιοτικές καταπονήσεις και ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων μολυσματικότητας είναι ακόμη ασαφείς.

Είναι γνωστό ότι οι πληθυσμοί των *Vibrio* επηρεάζονται από περιβαλλοντικές κλίσεις όπως η θερμοκρασία, η αλατότητα και η αφθονία του πλαγκτόν, αλλά αυτό δεν εξηγεί πλήρως την κατανομή τους (Takemura et al., 2014; Turner et al., 2009).

Το γένος *Vibrio* είναι μέλος της οικογένειας *Vibrionaceae* που περιλαμβάνει 142 είδη μιας εξαιρετικά ποικιλόμορφης ομάδας ετερότροφων θαλάσσιων βακτηρίων, των οποίων ο κοινός πρόγονος εκτιμάται ότι υπήρχε πριν από 600 εκατομμύρια χρόνια (Sawabe et al., 2007, 2013). Κατά τη διάρκεια αυτής της μακράς εξελικτικής ιστορίας τα *Vibrio* έχουν εξελιχθεί ώστε να κατοικούν σε ένα ευρύ φάσμα οικολογικών θέσεων, συμπεριλαμβανομένων των βενθικών ιζημάτων, να ζουν ελεύθερα σε παράκτια και ανοικτά ωκεάνια περιβάλλοντα και κυρίως σε συνδυασμό με ένα πλήθος οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των φυκών, των θαλάσσιων ζώων και των ανθρώπων (Thompson et al., 2004). Η βιογεωγραφία, η οικολογία και η γενετική του *Vibrio* αποτελούν σημαντικό πεδίο διερευνητικής έρευνας, κυρίως λόγω της σημασίας τους στις ασθένειες του ανθρώπου και των θαλάσσιων ζώων (Grimes et al., 2009). Η λοίμωξη από *Vibrio*, χαρακτηρίζεται στον άνθρωπο κυρίως από διάρροια, πρωτοπαθή σηψαιμία ή μόλυνση τραύματος (Newton et al., 2014). Υπάρχουν τουλάχιστον 12 είδη *Vibrio* που είναι γνωστά ως παθογόνα για τον άνθρωπο, με τα *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* και *V. vulnificus* να ευθύνονται για την πλειονότητα των ανθρώπινων μολύνσεων παγκοσμίως και το *V. alginolyticus* να αναδύεται ως σημαντικό παθογόνο που σχετίζεται με τον άνθρωπο και τα ψάρια (Grimes et al., 2009; Kustusch et al., 2011; Newton et al., 2014).

#### Το βακτήριο *Vibrio alginolyticus*

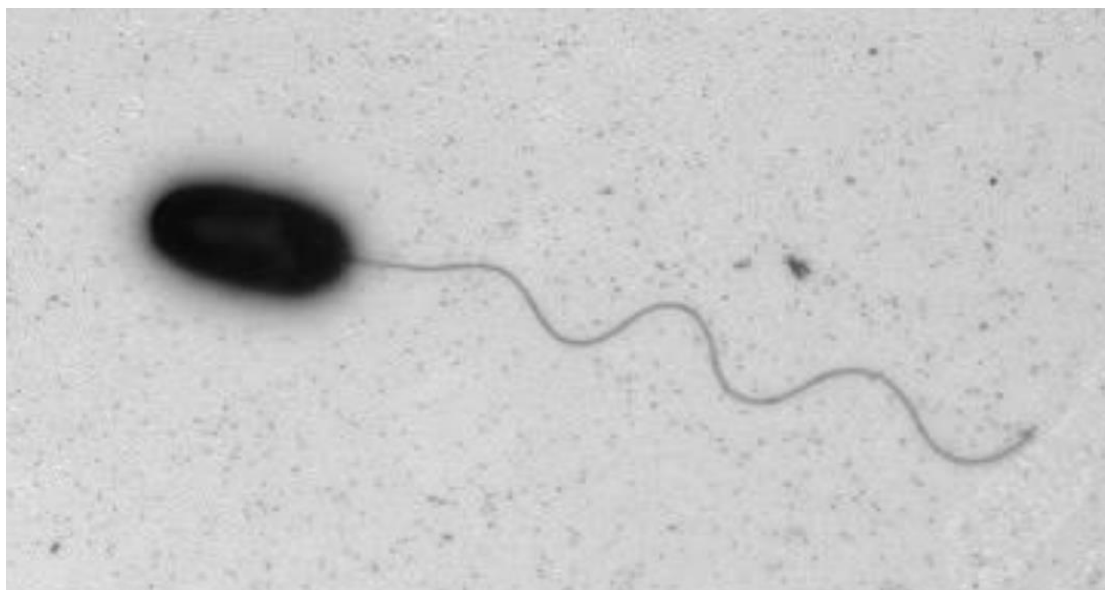
Το *V. alginolyticus*, ένα ευκαιριακό παθογόνο, μολύνει τα θαλάσσια ζώα με αποτέλεσμα τη δημιουργία και προκαλεί λοιμώξεις ανθρώπινων τραυμάτων (Parmar et al., 2020; Yin et al., 2021; Zhang et al., 2021). Τα τελευταία χρόνια, η βιμπρίωση έχει αρχίσει να εμφανίζεται σε ακραία θαλάσσια περιβάλλοντα, π.χ. σε θερμές πηγές και υδροθερμικές πηγές που μπορεί

να φτάσουν τους 42°C ή ακόμη υψηλότερα (Hasan et al., 2015; Ulitzur, 1975; Wang et al., 2021).

Το αερόβιο κατά προτίμηση *V. alginolyticus* αναπτύσσεται ελάχιστα ή καθόλου σε αναερόβιες συνθήκες. Αναπτύσσεται καλά σε συνηθισμένα θρεπτικά υλικά στους 10°C και 40°C (μεσόφιλο και ψυχρόφιλο), ένα pH λίγο πάνω από το 7 είναι βέλτιστο για την καλλιέργειά τους (ουδετερόφιλο και αλκαλόφιλο).

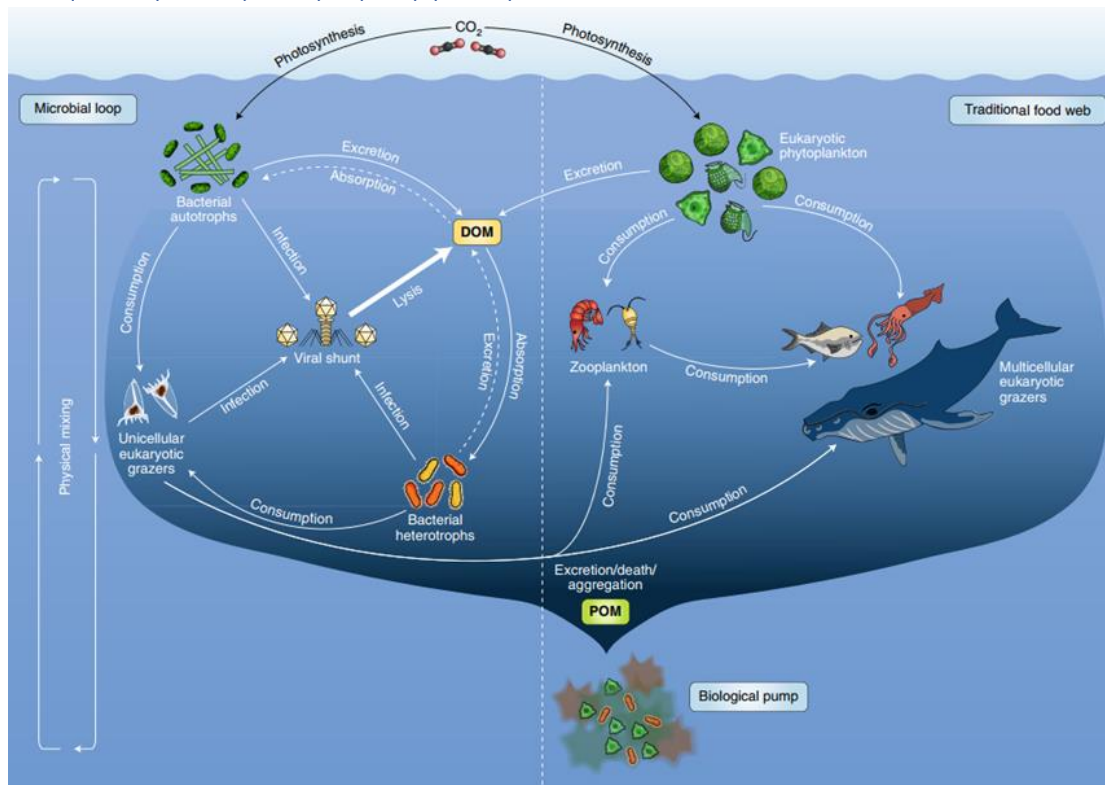
Από τα βακτήρια του γένους *Vibrio* είναι αυτό με την μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην αλατότητα, μπορεί και αναπτύσσεται ακόμα και σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις άλατος που φτάνουν το 10% (J.-K. Lee et al., 2008). Συνήθως μπορεί να απομονωθεί από θερμά παραλιακά νερά καθώς επίσης και εκβολές ποταμών και συνδέεται άμεσα με ασθένειες τόσο σε θαλάσσια είδη όσο και στον άνθρωπο προκαλώντας κυρίως ζημιές στον ιστό του δέρματος και λιγότερο στα εσωτερικά όργανα.

Συνήθως προσβάλλει καλλιέργειες μυδιών αλλά έχει απομονωθεί τόσο από ψάρια αλλά και από άλλα θαλάσσια είδη (Covazzi Harriague et al., 2008). Σε διάφορες βιβλιογραφικές μελέτες αναφέρεται ότι το *Vibrio alginolyticus* είναι υπεύθυνο για κρούσματα σηψαιμίας σε καλλιέργεια τσιπούρας (*Sparus aurata*), εξοφθαλμίας και αδιαφάνεια του κερατοειδή στη σφυρίδα (*Epinephelus malabaricus*), λήθαργου και μελάνωσης στο σκουμπρί (*Rachycentron canadum*) και εξελκώσεων (Austin, 2010b; Brian Austin & Dawn A. Austin, 2016).



Εικόνα 9: Βακτήριο *Vibrio alginolyticus*, όπου διακρίνονται εύκολα η ραβδόμορφη μορφολογία και ένα κολυμβητικό μαστίγιο (Kwangmin Son, Jeffrey S. Guasto and Roman Stocker, Stocker LAB, CEE, MIT.).

## Αλληλεπιδράσεις ιών-μικροοργανισμών



Εικόνα 10: Το θαλάσσιο τροφικό πλέγμα, με έμφαση στον μικροβιακό κύκλο και την ιϊκή διακλάδωση στην ανακύκλωση της διαλυμένης οργανικής ύλης (Breitbart et al., 2018).

Η συνέργεια της εξελικτικής και της οικολογικής προσέγγισης μπορεί να προσφέρει χρήσιμα εργαλεία για τη βαθύτερη κατανόηση των βιολογικών συστημάτων. Η συνέργεια αυτή είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για τη μελέτη των βακτηριοφάγων λόγω των σύντομων χρόνων δημιουργίας τους, των μεγάλων πληθυσμών τους, των ετερογενών περιβαλλόντων και των ποικίλων βιοτικών αλληλεπιδράσεων. Συμπληρωματικά, τα συστήματα βακτηριοφάγων αποτελούν ιδανικά μοντέλα για τη διερεύνηση της διασταύρωσης της οικολογίας και της εξέλιξης: τα συστήματα αυτά όχι μόνο καταδεικνύουν τις βασικές αρχές της οικολογίας, αλλά διευρύνουν την οικολογική μας προοπτική ώστε να συμπεριλάβει την εξελικτική δυναμική.

Είναι σαφές ότι τόσο τα βακτήρια όσο και οι φάγοι εξελίσσονται στο να ανταγωνίζονται το ένα το άλλο. Έτσι, τα βακτήρια αναπτύσσουν μηχανισμούς για να αποτρέψουν τη μόλυνση από τους φάγους και οι φάγοι σε απάντηση συν-εξελίσσονται για να τους ξεπεράσουν (Hampton et al., 2020). Οι ιοί αλληλεπιδρούν με πολλές κυτταρικές οδούς για να επιτύχουν τον κύκλο αντιγραφής τους. Η είσοδος στο κύτταρο-ξενιστή, η μεταφορά στις θέσεις αντιγραφής του ιού ή η έξοδος του ιού από το κύτταρο-ξενιστή είναι βήματα που απαιτούν συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ιού και του ξενιστή του. Επιπλέον, η αποφυγή της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή απαιτεί πολλές ιικές πρωτεΐνες να συσχετίζονται και να αναστέλλουν κυτταρικές πρωτεΐνες με αντι-ιικές λειτουργίες.

Η θνησιμότητα των βακτηριακών κυττάρων από τους φάγους είναι ο σημαντικότερος παράγοντας που ελέγχει την παρουσία και την ποικιλομορφία της μικροβιακής κοινότητας στα θαλάσσια συστήματα. Στην πλειονότητά τους οι φάγοι επηρεάζουν την απελευθέρωση και την κράτηση οργανικής ύλης στο πελαγικό σύμπαν. Σύμφωνα με το γεγονός του ανασυνδυασμού μεταξύ των γονιδίων του ξενιστή και του φάγου, καθώς και της εξάπλωσης

των βιολογικών λειτουργιών που κωδικοποιούνται από τους φάγους, οι πληθυσμοί των φάγων είναι σημαντικοί για την αποθήκευση γονιδίων που συμμετέχουν στη κυτταρική μίτωση των μικροβίων στο θαλάσσιο περιβάλλον. Επιπλέον, αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό εργαλείο για την εξέλιξη των γονιδίων στο φυσικό περιβάλλον και θα μπορούσαν να διαδραματίσουν ουσιαστικό ρόλο στη γενετική ποικιλομορφία των μικροβιακών πληθυσμών (Sime-Ngando, 2014).

Τα βακτήρια και οι ιοί αλληλεπιδρούν με δύο τρόπους: με άμεση αλληλεπίδραση (οι ιοί εκμεταλλεύονται τα βακτήρια) και με έμμεση αλληλεπίδραση (τα βακτήρια εκμεταλλεύονται τις ιογενείς λοιμώξεις). Ο μηχανισμός (οι μηχανισμοί) που ευνοούν τη διείσδυση του ιού πραγματοποιείται (πραγματοποιούνται) κατά κύριο λόγο μέσω άμεσων αλληλεπιδράσεων, μέσω (i) της δέσμωσης του ιού σε ένα βακτηριακό κύτταρο, ή (ii) της χρήσης ενός βακτηριακού προϊόντος από τον ιό (Almand et al., 2017). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις προάγουν τη μόλυνση του ιού, χωρίς γνωστό όφελος για το βακτηριακό είδος. Αντίθετα, τα βακτηριακά πλεονεκτήματα αποκτώνται συνήθως μέσω έμμεσων αλληλεπιδράσεων, στις οποίες ο ιός προκαλεί βλάβη στο κύτταρο του ξενιστή που είναι κρίσιμη για τη μόλυνση από τον ιό, αλλά με τη σειρά της είναι επωφελής για άλλα παθογόνα. Σε αυτές τις περιπτώσεις, δεν υπάρχει άμεση φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ του ιού και των βακτηρίων- μάλλον, η ιογενής λοίμωξη καθιστά έναν ή περισσότερους τύπους κυττάρων ξενιστών πιο ευαίσθητους στον βακτηριακό αποικισμό (Almand et al., 2017).

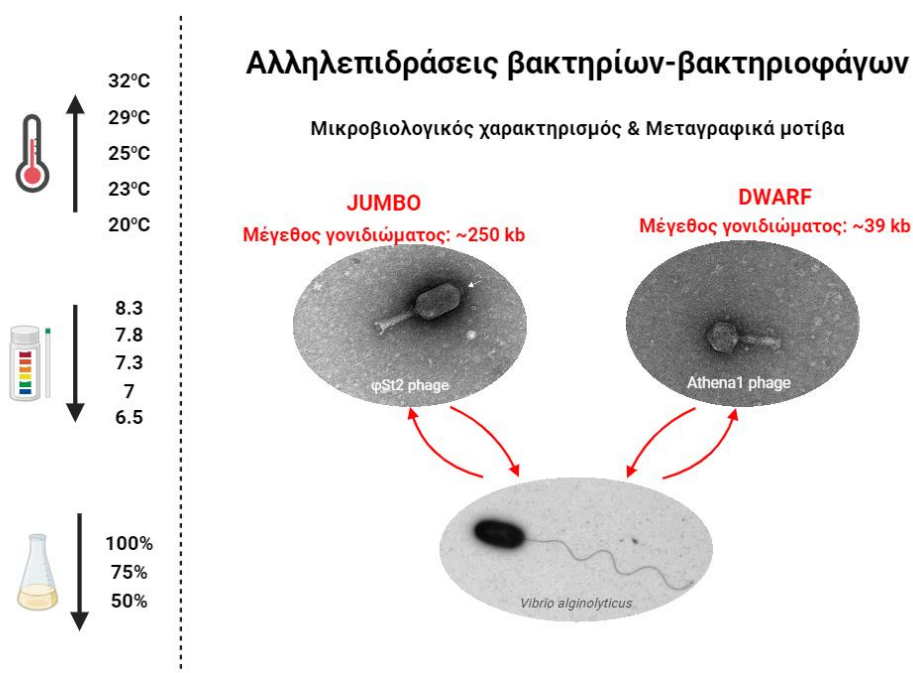
Οι συνεχείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ βακτηρίων και ιών οδηγούν στην εξέλιξη των βακτηριακών μηχανισμών άμυνας καθώς και των μηχανισμών αντεπίθεσης των ιών, δημιουργώντας έτσι ποικιλομορφία και στους δύο (συν-εξέλιξη) (Koonin et al., 2017).

Μέσα σε αυτό το πλαίσιο η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή διερευνά τις αλληλεπιδράσεις βακτηρίων-λυτικών βακτηριοφάγων χρησιμοποιώντας συνθήκες προσομοίωσης της κλιματικής αλλαγής *in vitro*. Χρησιμοποιώντας ως «εργαλεία» ένα μεσογειακό είδος βακτηρίου του γένους *Vibrio* και δύο διακριτούς βακτηριοφάγους που ανήκουν στην τάξη *Caudoviricetes*, χρησιμοποιούν παρόμοιο μηχανισμό μόλυνσης, αλλά φέρουν διαφορετικό μέγεθος γονιδιώματος. Η αποσαφήνιση της μετατόπισης των αλληλεπιδράσεων ξενιστών με θαλάσσιους ιούς λόγω της κλιματικής κρίσης, θα μπορούσε να συνεισφέρει σε προβλεπτικά μοντέλα των πληθυσμών των βακτηριοφάγων ή/και των ξενιστών τους στη Μεσόγειο.

## Υλικά και Μέθοδοι

### Πειραματικός σχεδιασμός

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε ένα μεσογειακό θαλάσσιο βακτηριακό είδος, το *Vibrio alginolyticus*, και δύο λυτικούς βακτηριοφάγους *Caudoviricetes*, οι οποίοι διαθέτουν μορφότυπο ιγονίγυς, αλλά έχουν διαφορετικό μέγεθος γονιδιώματος. Δοκιμάστηκαν διαφορετικές θερμοκρασίες, επίπεδα pH και διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών κατά τη διάρκεια μιας καμπύλης ανάπτυξης των βακτηριοφάγων σε δύο στάδια, καθώς και χρησιμοποιήθηκε μια δοκιμασία rt-QPCR για την παρακολούθηση των μοτίβων διαφοροποιημένης έκφρασης τόσο των γονιδίων του ξενιστή όσο και των γονιδίων του φάγου.



Εικόνα 11: Γραφική περίληψη της πειραματικής πορείας.

### Βακτηριακό στέλεχος, θρεπτικό υπόστρωμα και συνθήκες ανάπτυξης

Το βακτήριο-ξενιστής που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι το *Vibrio alginolyticus*, το στέλεχος V1 και έχει απομονωθεί από επεισόδια δονακίωσης σε τσιπούρες από το Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.) στην περιοχή Γούρνες του νομού Ηρακλείου στην Κρήτη (NZ\_LCUM01000000) (Castillo et al., 2015). Το στέλεχος V1 του *V. alginolyticus* είχε συνολικό μήκος 5.255.839 bp και περιεκτικότητα σε G+C 44,5%. Από τον σχολιασμό του γονιδιώματος προέκυψαν 4.614 κωδικές αλληλουχίες (CDSs), 67 tRNAs, 59 ψευδογονίδια και 5 rRNAs (Castillo et al., 2015).

Όλα τα βακτηριακά στελέχη φυλάσσονται στους -80°C κάτω από υγρό διάλυμα θρεπτικού και 20% γλυκερόλης. Οι βακτηριακές καλλιέργειες V1 αναπτύχθηκαν σε τρυβλία πετρί με τη μέθοδο της επίστρωσης με χρήση πλαστικού μικροβιολογικού κρίκου μιας χρήσης με σκοπό την εμφάνιση μοναδιαίων αποικιών. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν ανάποδα στον επωαστήρα στους 25°C για τουλάχιστον 18 ώρες (overnight) και ανανεώνονταν κάθε 2 εβδομάδες ώστε να παραμένουν φρέσκες. Η επίστρωση των βακτηρίων γινόταν με τουλάχιστον 3 διαφορετικές κινήσεις, με ενδιάμεση αποστείρωση του κρίκου σε φλόγα, με απώτερο σκοπό τον σχηματισμό μοναδικών αποικιών (single colonies).

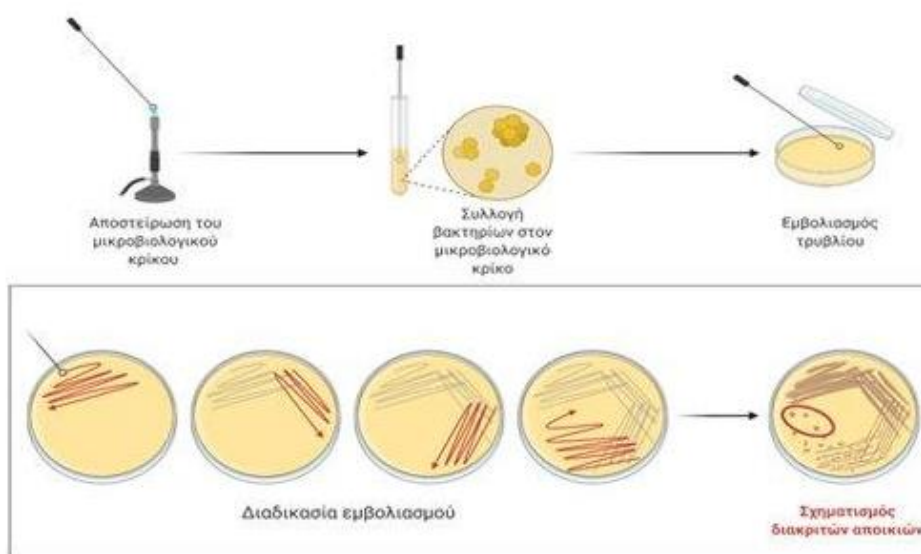
## Θρεπτικά υποστρώματα

Για την ανάπτυξη των βακτηριακών καλλιέργειών χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα LB (Lysogenia Broth, Luria Broth or Luria-Bertani) (Bertani, 2004). Η σύσταση του θρεπτικού υλικού είναι η εξής: 1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Tryptone, 0,5% (w/v) Yeast Extract, 0,1% (v/v)  $MgSO_4$  1M, 0,1% (v/v)  $CaCl_2$  1M.

Η προσθήκη των αλάτων,  $MgSO_4$  και  $CaCl_2$ , στα θρεπτικά δημιουργεί μεγάλη διαφορά ωσμωτικής πίεσης μεταξύ του εσωτερικού του φαγικού καψιδίου και του βακτηριακού κυτταροπλάσματος. Έτσι επιτυγχάνεται η έγχυση του γενετικού υλικού του βακτηριοφάγου στο εσωτερικό του βακτηρίου. Παράλληλα δημιουργείτε ένα περιβάλλον παρόμοιο με αυτό της θάλασσας που ευνοεί την ανάπτυξη των βακτηρίων και συνεπώς τον πολλαπλασιασμό των βακτηριοφάγων που ενδεχομένως υπάρχει στο δείγμα μας.

Όλα τα θρεπτικά πριν χρησιμοποιηθούν αποστειρώθηκαν πρώτα σε κλίβανο στους  $121^\circ C$  για 20 λεπτά.

Για τη δημιουργία υγρής καλλιέργειας V1, μολύναμε υγρό θρεπτικό LB με την καλλιέργεια από το τρυβλίο, σε σωλήνα τύπου falcon των 15mL και τοποθετήσαμε στον αναδευτήρα στις 150rpm (στροφές ανά λεπτό) και στους  $25^\circ C$  για 2-4 ώρες μέχρι τα βακτήρια να φτάσουν στην εκθετική τους φάση.



Εικόνα 12: Η διαδικασία streak plate με τη χρήση μικροβιολογικού κρίκου.

## Βακτηριακή χλόη

Σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB bottom agar (1,5% (w/w) agar) προσθέσαμε 3mL περίπου LB top agar (0.7% (w/w) agar) μαζί με 0.1mL υγρής βακτηριακής καλλιέργειας V1, μετά από καλή ανακίνηση στο vortex, με αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας λεπτής βακτηριακής χλόης, προσέχοντας τη θερμοκρασία του ημίρευστου θρεπτικού καθώς η υψηλή θερμοκρασία μπορεί να σκοτώσει τα βακτήρια και η χαμηλή να κάνει το θρεπτικό να πήξει πρόωρα και δεν θα έχουμε ομοιόμορφη στρώση. Η τεχνική αυτή ονομάζεται τεχνική διπλής στοιβάδας άγαρ.



## Συνθήκες ανάπτυξης

Το βακτήριο αναπτύχθηκε κάτω από διαφορετικές αβιοτικές συνθήκες έτσι ώστε να μελετηθεί η τυχόν αλλαγή στον τρόπο ανάπτυξης του. Οι διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης είναι οι παρακάτω:

Πίνακας 2: Οι αβιοτικές συνθήκες ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάπτυξη του βακτηρίου και στην αλληλεπίδραση βακτηριοφάγων-βακτηρίων.

Θερμοκρασία	pH	Ποσότητα θρεπτικού υλικού
20 °C	6,5	25% LB
23 °C	7	50% LB
25 °C	7,3	75% LB
29 °C	7,8	100% LB
32 °C	8,3	

Οι εργαστηριακές συνθήκες ανάπτυξης του βακτηρίου είναι οι 25°C με pH 7 και 100% ποσότητα LB. Όταν αλλάζουμε μία συνθήκη όλες οι υπόλοιπες παραμένουν σταθερές με βάση τις εργαστηριακές.

## Βακτηριοφάγοι

Οι βακτηριοφάγοι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, καθώς και τα χαρακτηριστικά τους, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

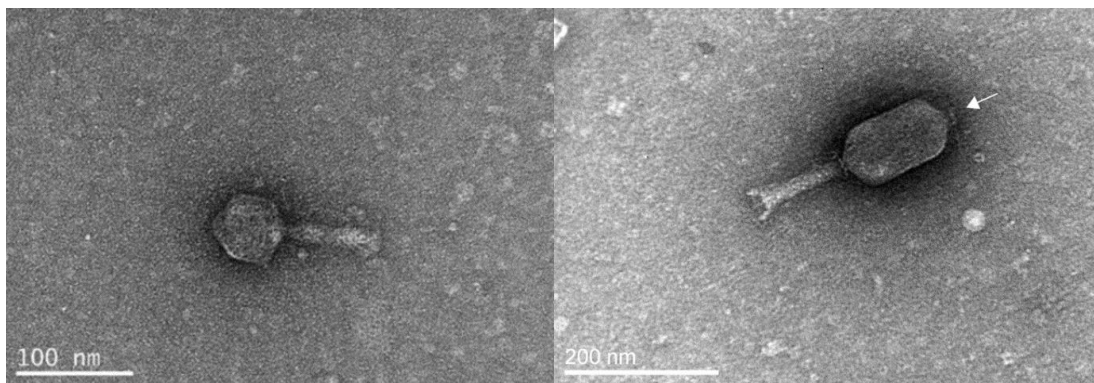
Πίνακας 3: Οι βακτηριοφάγοι που μελετήθηκαν και τα βασικά τους χαρακτηριστικά.

	Accession number	Ξενιστής	Τύπος γονιδιώματος	Μέγεθος γονιδιώματος	% GC	Κύκλος ζωής
<b>Athena1</b> (Skliros et al., 2022)	MG640035	<i>Vibrio alginolyticus</i> V1	dsDNA	39826 bp	43.4%	Λυτικός
<b>φSt2</b> (Kalatzis et al., 2016)	KT919973	<i>Vibrio alginolyticus</i> V1	dsDNA	250485 bp	42.6%	Λυτικός

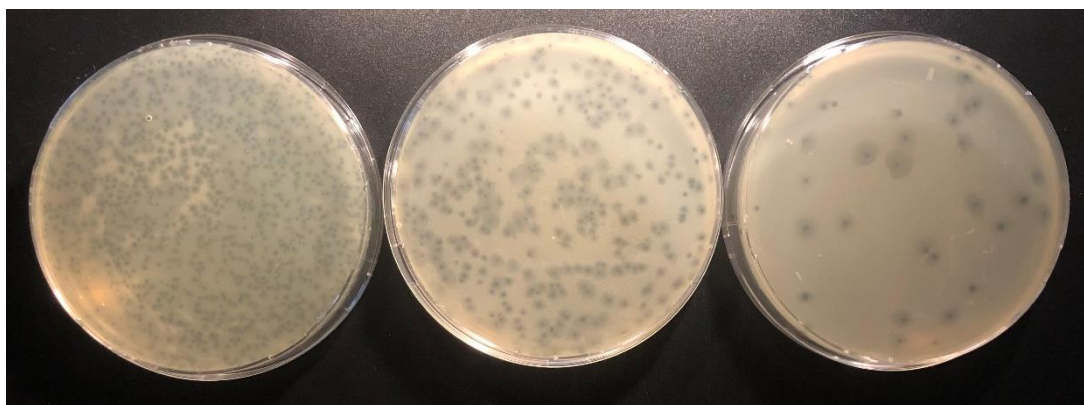
Ο βακτηριοφάγος φSt2 απομονώθηκε από ερευνητές του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.) μετά από εμπλουτισμούς σε δείγματα από την θαλάσσια περιοχή του Ηρακλείου Κρήτης. Έχει μακριά κεφαλή και συσπασώμενη ουρά ενώ διακρίνεται και σε

αυτόν ένα οργανίδιο στην κεφαλή που πιθανά είναι ένα νηματοειδούς φύσης προσάρτημα (Εικόνα 13), ικανό να βοηθάει τον βακτηριοφάγο να προσδένεται σε οργανίδια του ξενιστή αυξάνοντας τις πιθανότητες να έρθει σε επαφή με αυτόν και να ξεκινήσει η μόλυνση και ο πολλαπλασιασμός του. Η κεφαλή του βακτηριοφάγου είναι περίπου 81 nm σε πλάτος και 151 nm σε μήκος, ενώ η ουρά του περίπου 132 nm. Το μεγάλο μέγεθος κεφαλής από την πρώτη στιγμή ήταν ένδειξη και ενός μεγάλου σε μέγεθος γονιδιώματος (Cui et al., 2014).


Ο Athena1 βακτηριοφάγος έχει απομονωθεί από τις ακτές του Δήμου Πειραιά και πιο συγκεκριμένα από την περιοχή του Μικρολίμανου. Το μικρό μέγεθος της κεφαλής του σημαίνει και ένα μικρό σε μέγεθος γονιδίωμα.

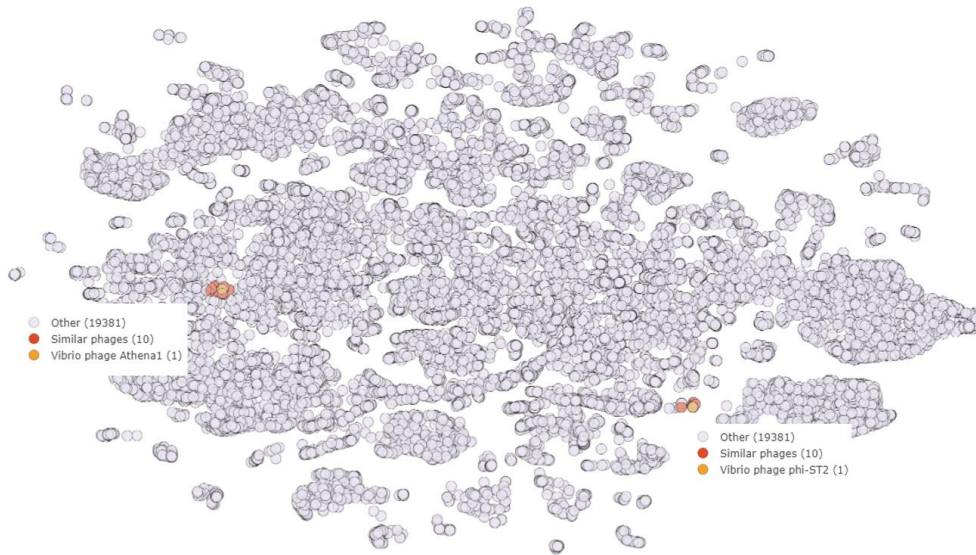



Εικόνα 183: Φωτογραφίες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης των Athena1 (Skliros et al., 2022) (αριστερά) και φSt2 (Kalatzis et al., 2016) (δεξιά).



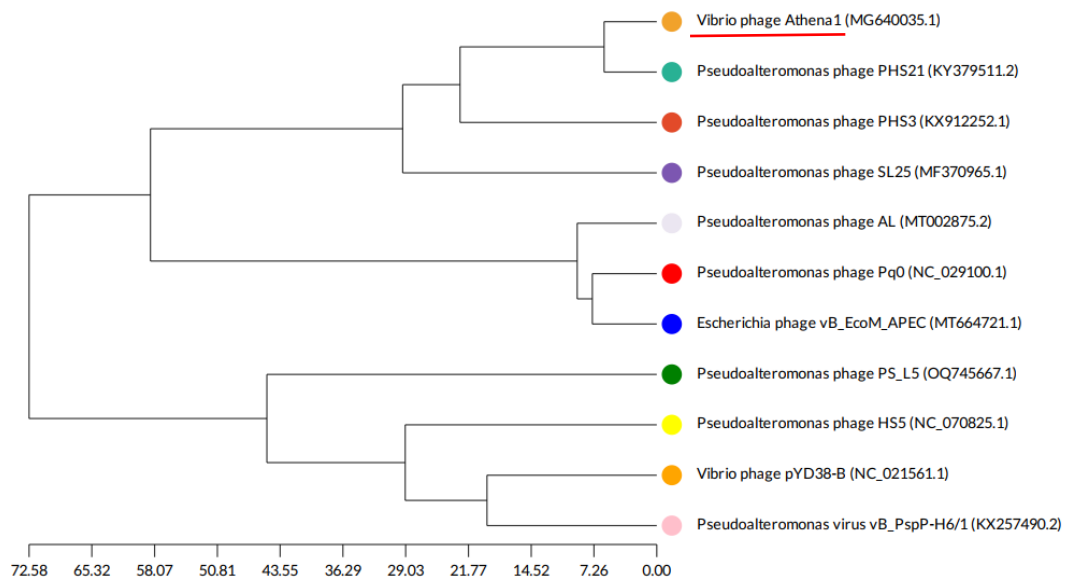
Εικόνα 194: Δεκαδικές αραιώσεις του βακτηριοφάγου Athena1 με την χρήση της τεχνικής της διπλής στοιβάδας κορυφής.

 **Vibrio phage Athena1**

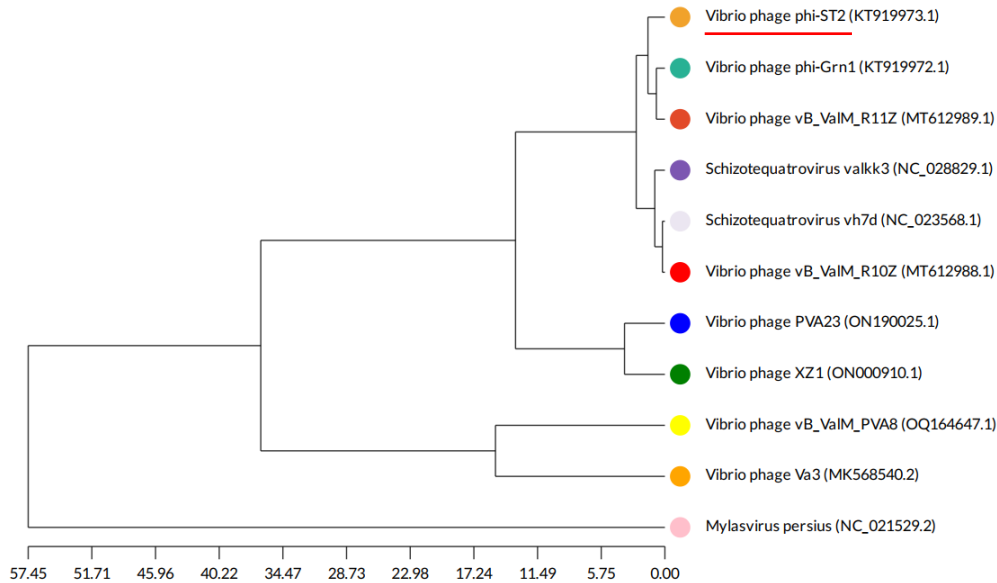


 **Vibrio phage phi-ST2**

Εικόνα 105: Διάγραμμα διασποράς 2D ομοιότητας βακτηριοφάγων (*PhageAI*).



Εικόνα 1611: Φυλογενετικό δέντρο με τους 10 πιο όμοιους βακτηριοφάγους με τον Athena1.



Εικόνα 17: Φυλογενετικό δέντρο με τους 10 πιο όμοιους βακτηριοφάγους με τον φt2.

### Multiplicity of infection (MOI)

Η αναλογία των προσροφημένων ή μολυσματικών φάγων προς το σύνολο των μολυσμένων βακτηρίων. Η πολλαπλότητα μόλυνσης, ωστόσο, συχνά χρησιμοποιείται εσφαλμένα για να περιγράψει την αναλογία των προστιθέμενων φάγων προς τα συνολικά βακτήρια. Η προσροφημένη αναλογία περιγράφεται επίσης ως MOI<sub>actual</sub> ενώ η προστιθέμενη αναλογία μπορεί να αναφέρεται ως MOI<sub>input</sub>. Αυτός είναι ο ορισμός από τον Adams (1959) (Adams, 1959).

Κάθε πλάκα τυπικά προέρχεται από μόλυνση ενός μεμονωμένου ιικού σωματιδίου και το μέγεθος της πλάκας αυξάνεται καθώς αναπτύσσονται τα βακτήρια και εμφανίζονται πολλαπλές μολύνσεις φάγων. Τα μεγέθη της πλάκας παύουν να αυξάνονται μόλις σταματήσουν να αναπτύσσονται τα κύτταρα, αν και τα ιικά σωματίδια μπορεί να συνεχίσουν να διαχέονται μέσω της επάνω στιβάδας άγαρ.

### Πολλαπλασιασμός βακτηριοφάγων

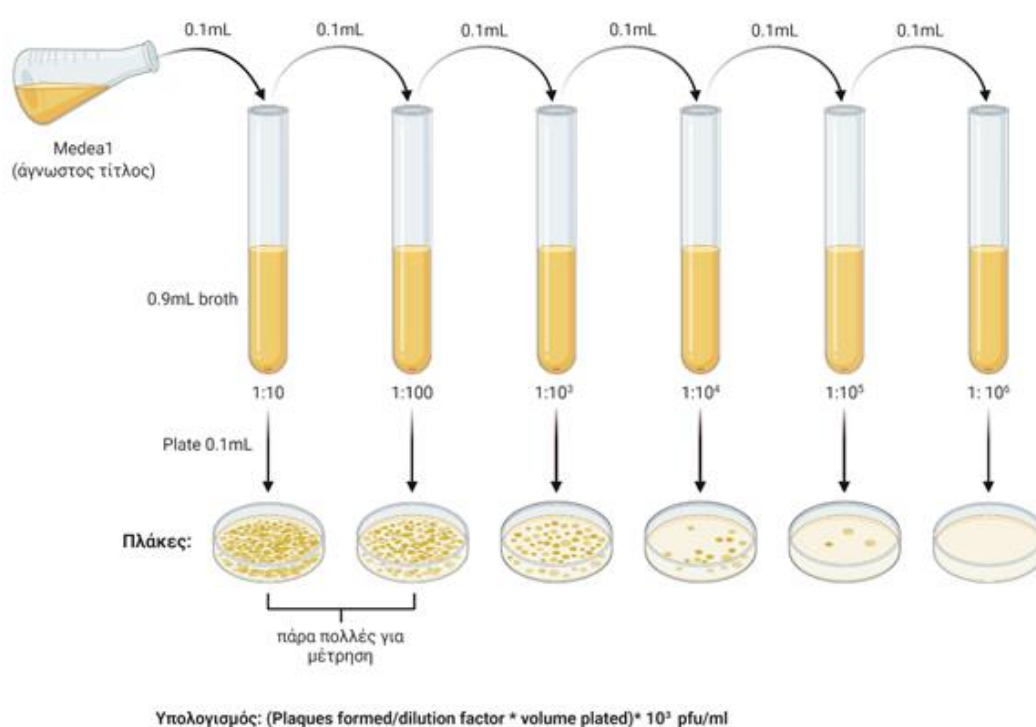
Σε σωλήνα τύπου falcon με υγρό θρεπτικό LB μολύνουμε με καλλιέργεια V1 και τοποθετούμε στον αναδευτήρα στις 150 rpm στους 25°C. Τη στιγμή που η ανάπτυξη των βακτηρίων στην υγρή καλλιέργεια είχε φτάσει την εκθετική τοποθετούμε τον βακτηριοφάγο σε αναλογία φάγου/βακτηρίου (MOI: Multiplication Of Infection factor) περίπου 100 (liquid propagation). Αφήνουμε την καλλιέργεια για επώαση στους 25°C overnight υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 11.000 rpm για 10 λεπτά. Τέλος φιλτράρετε το υπερκείμενο σε ηθμό με πόρους 0,22 μm ώστε να παραλάβουμε καθαρή και πυκνή καλλιέργεια φάγου και μεταφέρουμε σε καθαρούς σωλήνες προς αποθήκευση και περαιτέρω χρήση.

Διαφορετικά όταν θέλουμε να αυξήσουμε τον τίτλο του φάγου, προσθέτουμε 100 μL υγρή βακτηριακή καλλιέργεια που βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης, 50 μL φάγο και 3 mL LB Top και το μίγμα ανακινείται στο Vortex και επιστρώνεται σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό μέσο με την τεχνική της διπλής στοιβάδας (solid propagation). Αφήνουμε τα τρυβλία για

επώαση στους 25°C overnight και συλλέγουμε την βακτηριακή χλόη από την επιφάνεια των τρυβλίων μαζί με τις λυτικές πλάκες που έχουν σχηματιστεί. Προστίθεται 2-3 mL υγρού θρεπτικού LB και φυγοκεντρώνται για 20 λεπτά στις 10.000 rpm. Το υπερκείμενο συλλέγεται και φιλτράρεται όπως και στον πρώτο τρόπο.

### Τιτλοδότηση βακτηριοφάγων

Για την τιτλοδότηση του βακτηριοφάγου η διαδικασία που ακολουθούμε είναι η παρακάτω. Εκτελούμε διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις του φάγου και στρώνουμε σε τρυβλία με την τεχνική της διπλής στιβάδας άγαρ με σκοπό την αραιώση του φαγικού πληθυσμού έτσι ώστε οι πλάκες που σχηματίζονται να είναι μετρήσιμες. Ο τίτλος υπολογίζεται ως εξής: (Plaques formed/dilution factor \* volume plated) \*  $10^3$  pfu/mL.



Εικόνα 18: Η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων.

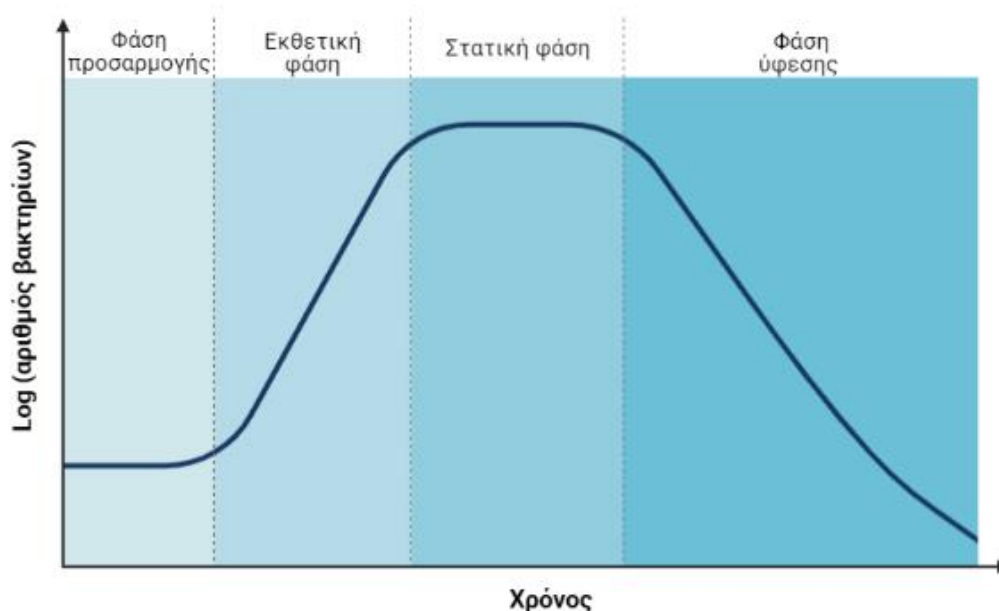
### Καμπύλες ανάπτυξης βακτηρίων με microplate reader στις διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης

Η καμπύλη ανάπτυξης του βακτηρίου παρουσιάζει την αύξηση μιας βακτηριακής καλλιέργειας στο χρόνο. Η μέτρηση της καμπύλης ανάπτυξης με βάση την οπτική πυκνότητα (OD) είναι μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους στη μικροβιολογία για την παρακολούθηση της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού των μικροβίων στο χρόνο, η οποία παρέχει έναν απλό, αξιόπιστο και συνήθη τρόπο για την κατανόηση διαφόρων πτυχών των μικροβίων.

Επιπλέον, οι συσκευές ανάγνωσης μικροπλακών με πλάκες 96 ή 384 φρεατίων έχουν γίνει όλο και πιο χρήσιμες για την παρακολούθηση της ανάπτυξης μικροβίων και τη διερεύνηση της αντιμικροβιακής δράσης και του μηχανισμού διαφόρων φαρμάκων και ουσιών.

Αρχικά, γίνεται εμβολιασμός (inoculation) μικρής ποσότητας από μια καλλιέργεια της προηγούμενης μέρας σε υγρό θρεπτικό LB την χρονική στιγμή  $t_0$  και από εκεί και έπειτα παρακολουθείται η οπτική απορρόφηση (OD) της καλλιέργειας σε μήκος κύματος  $\lambda=600\text{nm}$ .

## Βακτηριακή καμπύλη ανάπτυξης



Εικόνα 19: Πρότυπη καμπύλη του πολλαπλασιασμού των βακτηρίων στην πορεία του χρόνου. Απεικονίζονται όλα τα στάδια της βακτηριακής ανάπτυξης: φάση προσαρμογής (lag phase) – εκθετική φάση (log phase) – στατική φάση (stationary phase) – φάση ύφεσης (death phase) (Komorniczak, 2009).

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας συσχετίζεται η οπτική απορρόφηση με τη συγκέντρωση των βακτηρίων μέσω γραμμικής παλινδρόμησης αλλά και περιγράφεται η ανάπτυξη των βακτηρίων στη διάρκεια του χρόνου μέσω απεικόνισης σε γράφημα X-Y από το οποίο προκύπτει το πρότυπο (μοντέλο) ανάπτυξης. Ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων γίνεται κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης (exponential phase) η οποία χαρακτηρίζεται από την έντονη κλίση που παρουσιάζει στο γράφημα X-Y (Madigan et al., 2010).

Οι καμπύλες ανάπτυξης του *V. alginolyticus* V1 προσδιορίστηκαν με τη χρήση του συστήματος TECAN INFINITE PRO 300 που έχει την δυνατότητα να μετράει φωτομετρικά αυτόματα απορρόφηση και φθορισμό.

Για την δημιουργία καμπυλών ανάπτυξης του *V. alginolyticus* V1 στις συνθήκες που προαναφέρθηκαν χρησιμοποιήθηκε υγρή καλλιέργεια στην αρχή της εκθετικής της φάσης ( $OD_{600\text{nm}}$  0.15-0.2). Χρησιμοποιήθηκαν 96-well plates για cell culture (non-treated). Στην κάθε κυψελίδα τοποθετήθηκε υγρό θρεπτικό LB και μολύνθηκε με την καλλιέργεια του βακτηρίου. Έγιναν έξι τεχνικές επαναλήψεις για την κάθε συνθήκη. Το plate ήταν υπό συνεχή ανάδευση στις 450 rpm και κάθε μία ώρα γινόταν αυτόματα μετρήσεις για την οπτική απορρόφηση των δειγμάτων στα 600nm για 24 ώρες. Η ελάχιστη θερμοκρασία που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των βακτηρίων ήταν οι 23°C, ενώ η μέγιστη θερμοκρασία που χρησιμοποιήθηκε ήταν οι 32°C. Το ελάχιστο pH που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη βακτηρίων ήταν 6,5, ενώ το μέγιστο που χρησιμοποιήθηκε ήταν 8,3.

## Πολυφασική καμπύλη ανάπτυξης και προσδιορισμός βιολογικών χαρακτηριστικών βακτηριοφάγων στις διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης

Για τον προσδιορισμό βιολογικών χαρακτηριστικών του κάθε βακτηριοφάγου στις διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης, όπως ο χρόνος απορρόφησης (adsorption time), ο χρόνος έκλειψης (latency time) και το μέγεθος έκρηξης (burst size) προσδιορίστηκε σύμφωνα με Bolger-Munro, et al., 2013 (Bolger-Munro et al., 2013). Δημιουργήθηκε καμπύλη ανάπτυξης για κάθε ιό παρουσία ξενιστή με τον εξής τρόπο:

- 1) Υγρή καλλιέργεια του βακτηρίου-ξενιστή V1 επωάστηκε υπό συνεχή ανάδευση στις 150 rpm στην εκάστοτε συνθήκη έτσι ώστε τα βακτήρια να είναι στην αρχή της εκθετικής φάσης ανάπτυξης ( $OD_{600nm}$  0,15-0,2).
- 2) Η καλλιέργεια επιμολύνθηκε με ποσότητα του εκάστοτε βακτηριοφάγου έτσι ώστε η αναλογία φάγου/βακτηρίου να είναι 1 προς 100 ( $MOI=0,01$ ). Η στιγμής προσθήκης του φάγου θεωρείται ως η χρονική στιγμή 0,  $t=0$ .
- 3) Τις χρονικές στιγμές 6', 12', 15', 20', 30', 40', 55', 70', 85', 100', 120' πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για τον έλεγχο του τίτλου του βακτηριοφάγου.
- 4) Σε κάθε μέτρηση, μεταφέραμε δείγμα 300μL σε erpendorf με 30μL χλωροφόρμιο και πραγματοποιήσαμε φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 30 sec.
- 5) Ακολούθησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις του εναιωρήματος ( $10^{-2}$  και  $10^{-3}$ ). 100 μL από τις αραιώσεις μαζί με 100 μL υγρής καλλιέργειας V1 και 3 mL LB top agar επιστρώθηκαν σε τριβλύα με στερεό θρεπτικό.
- 6) Τα τριβλύα τα αφήσαμε για επώαση overnight στους 25°C και την επόμενη μέρα καταμετρήθηκαν οι λυτικές πλάκες και υπολογίστηκε ο τίτλος του φάγου κάθε χρονική στιγμή καθώς και το ποσοστό της προσρόφησης του βακτηριοφάγου.

Υπολογίζοντας τον τίτλο των ιών σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές μπορούμε να εξάγουμε συμπεράσματα για τον χρόνο που χρειάζονται τα ισωματίδια για να προσροφηθούν στο κύτταρο ξενιστή, πόση ώρα χρειάζονται για να λύσουν το κύτταρο, αλλά και το μέγεθος έκρηξης, δηλαδή τον αριθμό των ισωματιδίων που απελευθερώνονται μετά την λύση.

Για κάθε καμπύλη πραγματοποιήθηκαν 3 βιολογικές επαναλήψεις.

### Απομόνωση ολικού RNA από υγρή συγκαλλιέργεια βακτηριοφάγου-βακτηρίου

Πολλά ερωτήματα μοριακής βιολογίας βασίζονται στην εξέταση της έκφρασης των γονιδίων σε επίπεδο RNA. Ως εκ τούτου, σε αυτές τις περιπτώσεις, είναι απαραίτητη η χρήση RNA ως προτύπου σε πειράματα ενίσχυσης. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της ποσοτικής PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-qPCR), η οποία χρησιμοποιεί RNA ως πρότυπο αντί για DNA. Στην τεχνική αυτή, το RNA μεταγράφεται πρώτα αντίστροφα με τη χρήση ενός ειδικού ενζύμου που ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφάση, με αποτέλεσμα το σχηματισμό συμπληρωματικού DNA (cDNA), το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται ως πρότυπο σε μια qPCR για ενίσχυση και ανάλυση. Η RT-qPCR μπορεί να πραγματοποιηθεί σε δύο στάδια (που ονομάζεται επίσης αντίδραση σύνθεσης cDNA ταχείας αλυσίδας), κατά την οποία το RNA μεταγράφεται πρώτα αντίστροφα σε cDNA και στη συνέχεια χρησιμοποιείται ως μήτρα σε μια qPCR, ή σε ένα στάδιο, όπου η αντίστροφη μεταγραφή και η ενίσχυση του cDNA πραγματοποιούνται στον ίδιο σωλήνα.

1. Μόλυνση υγρού θρεπτικού LB με την βακτηριακή καλλιέργεια και επώαση στην εκάστοτε συνθήκη μέχρι την εκθετική φάσης ανάπτυξης ( $OD_{600nm}$  0,15-0,2).
2. Επιμόλυνση της υγρής με τον εκάστοτε βακτηριοφάγου έτσι ώστε η αναλογία φάγου/βακτηρίου να είναι 1 προς 100 ( $MOI=0,01$ ). Η στιγμή προσθήκης του φάγου θεωρείται ως η χρονική στιγμή 0,  $t=0$ .
3. Τις χρονικές στιγμές 1', 15', και 30' πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες για την απομόνωση RNA.
  - 3.1. Δειγματοληψία 3 mL από την αρχική συγκαλλιέργεια βακτηρίου-βακτηριοφάγου.
  - 3.2. Φυγοκέντρηση στους 4°C στις 13.000 rpm για 30'' και απομάκρυνση υπερκείμενου.
  - 3.3. Επαναδιάλυση ιζήματος σε 0,2 mL NaCl 150 mM.
  - 3.4. Φυγοκέντρηση στους 4°C στις 13.000 rpm για 30' και απομάκρυνση υπερκείμενου.
  - 3.5. Προσθήκη 500  $\mu$ L NucleoZOL και διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης χρησιμοποιώντας έμβολο.
  - 3.6. Spindown στις 12.000 rpm και έντονη ανάδευση στο Vortex.
  - 3.7. Προσθήκη 200  $\mu$ L RNase-free ddH<sub>2</sub>O, ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10'.
  - 3.8. Φυγοκέντρηση στους 4°C στις 12.000 g για 15'.
  - 3.9. Μεταφορά 500  $\mu$ L υπερκείμενου σε νέο erpendorf και προσθήκη 500  $\mu$ L ισοπροπανόλης.
  - 3.10. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10' και έπειτα φυγοκέντρηση στους 4°C στις 12.000 g για 10'.
  - 3.11. Απομάκρυνση υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος με 300  $\mu$ L αιθανόλη 100%.
  - 3.12. Φυγοκέντρηση στους 4°C στις 8.000 rpm για 3' και απομάκρυνση υπερκείμενου.
  - 3.13. Επαναδιάλυση του ιζήματος με 300  $\mu$ L αιθανόλη 75%.
  - 3.14. Φυγοκέντρηση στους 4°C στις 8.000 rpm για 3' και απομάκρυνση υπερκείμενου.
  - 3.15. Επανάληψη των δύο τελευταίων βημάτων.
  - 3.16. Απομάκρυνση της αιθανόλης, τα δείγματα αφήνονται να στεγνώσουν.
  - 3.17. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε RNase-free ddH<sub>2</sub>O.

Τα δείγματα αφού μετρήθηκαν για την καθαρότητα και τον όγκο των ριβονουκλεϊκών οξέων, σε φασματοφωτόμετρο Thermo Scientific™ NanoDrop™, αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

#### Απομάκρυνση DNA από δείγματα RNA

Κατά την απομόνωση ολικού RNA ενδέχεται να περιέχεται στο δείγμα και γονιδιωματικό DNA. Για να αποφευχθεί η λήψη λανθασμένων αποτελεσμάτων, κατά την μελέτη των επιπέδων έκφρασης γονιδίων, απαιτείται ο καθαρισμός του RNA από το γονιδιωματικό DNA. Αυτό επιτυγχάνεται με την χρήση του ενζύμου DNase. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:



1) Σε erpendorf προετοιμάζεται το παρακάτω μίγμα:

Δείγμα ολικού RNA (200 μg/μL)	20 μL
Turbo DNase	0.5 μL
Turbo DNase buffer 10x	5 μL
ddH <sub>2</sub> O	24.5 μL

- 2) Το μίγμα επωάζεται στους 37°C για 45'.
- 3) Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστίθενται στο δείγμα 100 μL ddH<sub>2</sub>O και 150 μL μίγματος φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη 25:24:1 PIC pH 8.3.
- 4) Ακολουθεί ανάδευση για 10'' και το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 5' σε θερμοκρασία δωματίου.
- 5) Η υδάτινη φάση μεταφέρεται σε νέο erpendorf και προστίθενται στο δείγμα 150 μL PIC.
- 6) Ακολουθεί ανάδευση για 10'' και το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 5' σε θερμοκρασία δωματίου και η υδάτινη φάση μεταφέρεται σε νέο erpendorf.
- 7) Στην υδάτινη φάση προστίθενται 1/10 όγκου 3M NaAc pH 5.2 και 2,5x όγκου αιθανόλη 100%.
- 8) Τα δείγματα επωάζονται στους -80 °C για 24 ώρες.
- 9) Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 30' στους 4 °C.
- 10) Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα ξεπλένεται με αιθανόλη 75% και φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 15' στους 4 °C.
- 11) Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει.
- 12) Το ίζημα επαναδιαλύεται σε ddH<sub>2</sub>O.
- 13) Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του δείγματος προσδιορίζονται φωτομετρικά σε φασματοφωτόμετρο Thermo Scientific™ NanoDrop™, ενώ η ακεραιότητα του RNA διαπιστώνεται με ανάλυση του δείγματος σε πηκτή αγαρόζης.
- 14) Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης πραγματοποιείται αντίδραση PCR στο καθαρό πλέον RNA και η μη παρουσία ενισχυμένου προϊόντος επιβεβαιώνει την επιτυχία της απομάκρυνσης του DNA.

#### *Φωτομετρικός προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων*

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων σε υδατικό διάλυμα γίνεται με τη χρήση του σπεκτροφωτομέτρου NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA). Για την ποσοτικοποίηση δείγματος νουκλεϊνικών οξέων απαιτείται μόλις 1 μL από το δείγμα που τοποθετείται στην συσκευή και πραγματοποιείται η μέτρηση. Η καθαρότητα ενός δείγματος υπολογίζεται από τους λόγους OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> και OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub>, όταν οι τιμές των λόγων είναι μεταξύ 1,8 και 2,2 τότε το δείγμα θεωρείται ικανοποιητικής καθαρότητας.

#### *Δημιουργία cDNA*

Η σύνθεση cDNA είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική που περιλαμβάνει τη μετατροπή του RNA σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) με τη χρήση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης. Η τεχνική αυτή επιτρέπει τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης και την ανάλυση μορίων RNA που μπορεί να υπάρχουν σε περιορισμένες ποσότητες. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για τη σύνθεση cDNA, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης εκκινητών oligo(dT) ή τυχαίων εξαμερών για την έναρξη της διαδικασίας της αντίστροφης μεταγραφής.

1. Σε αποστειρωμένο PCR eppendorf προστίθενται τα παρακάτω:

Μήτρα RNA (1 µg)	x µL
Εκκινητής random hexamers (2 µM)	5 µL
Μίγμα dNTPs (10 mM)	1 µL
DEPC treated H <sub>2</sub> O	γ µL
Τελικός όγκος	10 µL

2. Το RNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 65°C για 5', ώστε να γίνει ο υβριδισμός εκκινητών-RNA.
3. Το δείγμα μεταφέρεται σε πάγο για τουλάχιστον 1' για να διατηρηθεί σε μονόκλωνη κατάσταση.
4. Ακολουθεί παρασκευή του Master Mix 2x reaction mix σε αποστειρωμένο eppendorf:

10x RT buffer	2 µL
MgCL <sub>2</sub> (25 mM)	4 µL
0,1 M DTT	2 µL
RNase OUT (40 units/µL)	1 µL
Τελικός όγκος	9 µL

5. Σε κάθε PCR eppendorf προστίθεται 9 µL 2x reaction mix και ακολουθεί ήπια ανακίνηση.
6. Το δείγμα θερμαίνεται στους 25°C για 2'.
7. Προστίθεται 0.7 µL SuperScript II RT (200 units/µL) και γίνεται επώαση στους 25°C για 10' και έπειτα στους 42 °C για 50'.
8. Η αντίδραση σταματά με θέρμανση του δείγματος στους 70°C για 15'.

### Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR-qrt PCR)

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου είναι μία γρήγορη, ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της προόδου μιας αντίδρασης PCR σε πραγματικό χρόνο. Είναι δυνατή η ποσοτικοποίηση η οποιαδήποτε ποσότητα προϊόντος PCR (DNA, cDNA, RNA) με πολύ μεγάλη ακρίβεια.

Βασίζεται στην ανίχνευση του φθορισμού, που εκπέμπεται όταν κάποιο μόριο αναφοράς προσδεθεί στην δίκλωνη έλικα ενός μορίου DNA. Τα προϊόντα της αντίδρασης συσσωρεύονται μετά από κάθε κύκλο ενίσχυσης των ακολουθιών, γι' αυτό με την πρόοδο της αντίδρασης ο φθορισμός που παράγεται από το μόριο αυξάνει. Με αυτόν τον τρόπο διευκολύνεται η παρακολούθηση της αντίδρασης ενώ αυτή βρίσκεται σε εξέλιξη.

Η qrt-PCR πραγματικού χρόνου μετράει τα προϊόντα PCR καθώς συσσωρεύονται ή μετράει σε πραγματικό χρόνο το ποσό των PCR προϊόντων σε σημείο όπου η αντίδραση βρίσκεται ακόμη στην εκθετική φάση χρησιμοποιώντας την τεχνολογία των φθοριζουσών χρωστικών.

Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, ένα κατώφλι-σήμα φθορίζουσας χρωστικής καθορίζει σε πιο σημείο όλα τα δείγματα μπορούν να συγκριθούν. Αυτό το κατώφλι υπολογίζεται ως συνάρτηση του ποσού του υπόβαθρου της φθορίζουσας χρωστικής και τελικά ο κλασματικός αριθμός των κύκλων PCR που απαιτούνται για να παράγουν αρκετό σήμα φθορίζουσας χρωστικής που θα φτάσει σε αυτό το κατώφλι χαρακτηρίζεται ως κατώφλι κύκλου (cycle threshold,  $C_t$ ). Οι τιμές  $C_t$  εξαρτώνται απόλυτα από το αρχικό ποσό του δείγματος και είναι η βάση για τον υπολογισμό των DNA αντιγράφων ή των επιπέδων έκφρασης του mRNA.

Με τη qrt-PCR πραγματικού χρόνου, εκτός από την ποσοτική ανάλυση του προϊόντος της PCR, γίνεται και ποιοτική ανάλυση με βάση τη μελέτη της καμπύλης τήξης του προϊόντος (melting curve analysis), κατά την οποία οι μεγεθυμένες αλληλουχίες μπορούν να χαρακτηριστούν με βάση το σημείο τήξης τους ( $T_m$ ), το οποίο είναι συνάρτηση του μήκους και της σύνθεσης των βάσεων του προϊόντος. Το σημείο τήξης είναι μοναδικό και χαρακτηριστικό για κάθε αλληλουχία.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκε iTaq SYBR Green Supermix με ROX (Applied Biosystems, Austin, TX, USA). Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκε ο θερμοκυκλοποιητής Step One Plus (Applied Biosystems, Austin, TX, USA). Για μια τυπική αντίδραση τελικού όγκου 10  $\mu$ L αναμειγνύονται:

Μήτρα DNA	1 $\mu$ L
SYBR Select Master Mix	5 $\mu$ L
Εκκινητής F (0,5 $\mu$ M)	2 $\mu$ L
Εκκινητής R (0,5 $\mu$ M)	2 $\mu$ L

Οι συνθήκες πραγματοποίησης της qrt-PCR πραγματικού χρόνου είναι:

- Αρχική αποδιάταξη με ενεργοποίηση της πολυμεράσης στους 95°C για 10'.
- Αποδιάταξη στους 95°C για 45'' (40 κύκλοι).
- Υβριδισμός εκκινητών στους 60°C για 1'.
- Επιμήκυνση στους 60°C για 1'.

Στο τέλος κάθε κύκλου λαμβάνονται οι τιμές απορρόφησης για τις χρωστικές SYBR Green και ROX. Όταν ολοκληρώνονται οι 40 κύκλοι τα ενισχυμένα τμήματα αποδιατάσσονται σταδιακά με αύξηση της θερμοκρασίας ανά 30'' κατά 0,5°C από τους 60°C έως τους 95°C και λαμβάνεται η καμπύλη τήξης του καθενός προκειμένου να ελεγχθεί η εξειδίκευση των εκκινητών, όταν ενισχύεται ένα μόνο προϊόν η καμπύλη έχει μία μόνο κορυφή. Με αυτή τη διαδικασία μπορέσαμε να ποσοτικοποιήσουμε σχετικά τους πληθυσμούς των βακτηρίων και των βακτηριοφάγων.

Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με την χρήση εξειδικευμένου λογισμικού Geneious (Kearse et al., 2012) και το μέγεθος της ενισχυόμενης περιοχής είναι 20 ζεύγη βάσεων. Αναλυτικά φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 4: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR-qrt PCR).

Γονιδιακός τύπος που υβριδίζει ο εκκινητής	Αλληλουχία	Μήκος (bps)	Προσανατολισμός	Οργανισμός
dnaK	TCCTACACGTGT CTGCGAAA	20	Ευθύγραμμος	<i>V. alginolyticus</i>
dnaK	CCGCCAGAAGCT TGGATAGT	20	Ανάστροφος	<i>V. alginolyticus</i>
gyrA	CGGTACTIONGAGCA AGATCCAG	20	Ευθύγραμμος	<i>V. alginolyticus</i>
gyrA	ACCAGAAGCACC GTTAACCA	20	Ανάστροφος	<i>V. alginolyticus</i>
Rec	AAGTTTGC GGAG TTCATGGC	20	Ευθύγραμμος	Βακτηριοφάγος Athena1
Rec	AGTCTGCAGGCT TTCCTTGT	20	Ανάστροφος	Βακτηριοφάγος Athena1
MCP	CGCGCTGGTTCT TGAAACTT	20	Ευθύγραμμος	Βακτηριοφάγος Athena1
MCP	GGCTGTGTACAT CTCTAGCGT	20	Ανάστροφος	Βακτηριοφάγος Athena1
Gp40	CGTAACTCTCCG CCGAATTG	20	Ευθύγραμμος	Βακτηριοφάγος Athena1
Gp40	GCTTGCTTGCTC ACCGATAA	20	Ανάστροφος	Βακτηριοφάγος Athena1
Rec	TGGGTTGACAGT ACTAGCGG	20	Ευθύγραμμος	Βακτηριοφάγος φSt2
Rec	AGCAGCTACGCC AACTAGAC	20	Ανάστροφος	Βακτηριοφάγος φSt2
pvh	TGTGCTGACGAG CCGTATAT	20	Ευθύγραμμος	Βακτηριοφάγος φSt2

pvh	GCATCTTCAACT GGTTCGCA	20	Ανάστροφος	Βακτηριοφάγος φSt2
MCP	CGACCAATACGC AGTGAACG	20	Ευθύγραμμος	Βακτηριοφάγος φSt2
MCP	CACACCTGCGTC CATTTTCAG	20	Ανάστροφος	Βακτηριοφάγος φSt2
pnuC	GACGCTTTCACG ACAGTAGC	20	Ευθύγραμμος	Βακτηριοφάγος φSt2
pnuC	ACCATGCTTCGA CTTTACGC	20	Ανάστροφος	Βακτηριοφάγος φSt2
NAMPT	TGCGATTTCGTGA ACTGCAAG	20	Ευθύγραμμος	Βακτηριοφάγος φSt2
NAMPT	TTTGAGAGAGCC ACGCAAGA	20	Ανάστροφος	Βακτηριοφάγος φSt2

Για τη σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων χρησιμοποιείται μια τροποποιημένη μορφή της μεθόδου σύγκρισης των κύκλων όπου εμφανίζεται το κατώφλι (threshold) της αντίδρασης PCR. Τα σχετικά επίπεδα των μεταγράφων των υπό μελέτη γονιδίων (X) υπολογίζονται ως ένα ποσοστό των μεταγράφων του γονιδίου αναφοράς (dnaK, gyrA), και συγκεκριμένα, ως  $(E)^{-\Delta Ct}$ , όπου το  $\Delta Ct$  ισούται με  $Ct^X - Ct^{dnaK}$  και  $Ct^X - Ct^{gyrA}$  και E είναι η αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR (PCR efficiency).

Το γονίδιο *MCP* (major capsid protein gene) κωδικοποιεί την κύρια καψιδιακή πρωτεΐνη, η οποία είναι μια δομική πρωτεΐνη που συνθέτει την κεφαλή, την ουρά και τις ίνες της ουράς του ιού και από άλλες μελέτες η έκφρασή της αναμένεται να κορυφωθεί στο τέλος του κύκλου αντιγραφής του φάγου (Luke et al., 2002).

Το γονίδιο *Rec* (Recombination protein gene) απαιτείται για τη δημιουργία γενετικής ποικιλομορφίας και την επιδιόρθωση του δίκλωνου DNA και τα γονίδια *Gp40* (portal protein gene) και *pvh* (portal vertex of the head gene) ρυθμίζουν τη συναρμολόγηση του προκαψιδίου και δρουν ως αισθητήρες DNA που διευκολύνουν τόσο τη συσκευασία όσο και την απελευθέρωση του γονιδιώματος.

### Στατιστική ανάλυση

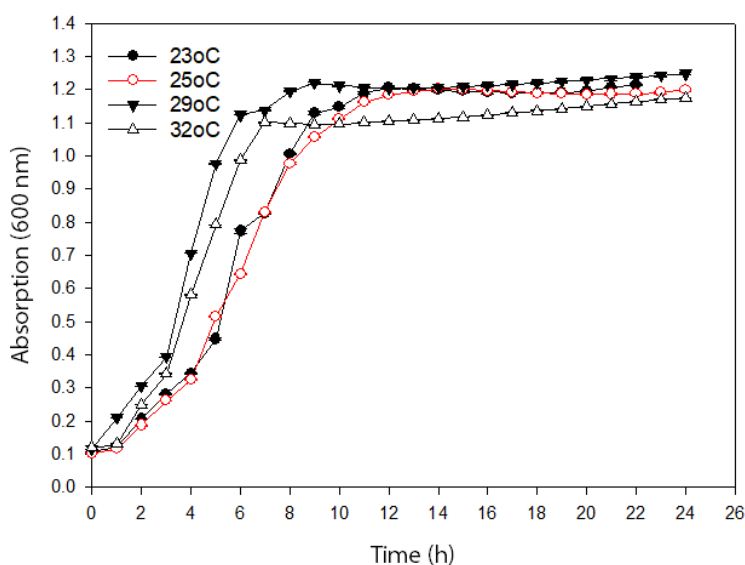
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε εφαρμόζοντας t-test ανά ζεύγος. Όταν τα δείγματα δεν παρουσίαζαν κανονικότητα, εφαρμόζονταν Mann-Whitney Rank Sum test. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη χρήση του προγράμματος SigmaStat 11.0.

## Αποτελέσματα

Επίδραση της θερμοκρασίας, της διαθεσιμότητας άνθρακα και του pH στον υπό μελέτη βακτηριακό ξενιστή *Vibrio alginolyticus*

Επίδραση της θερμοκρασίας στον ρυθμό ανάπτυξης του ξενιστή

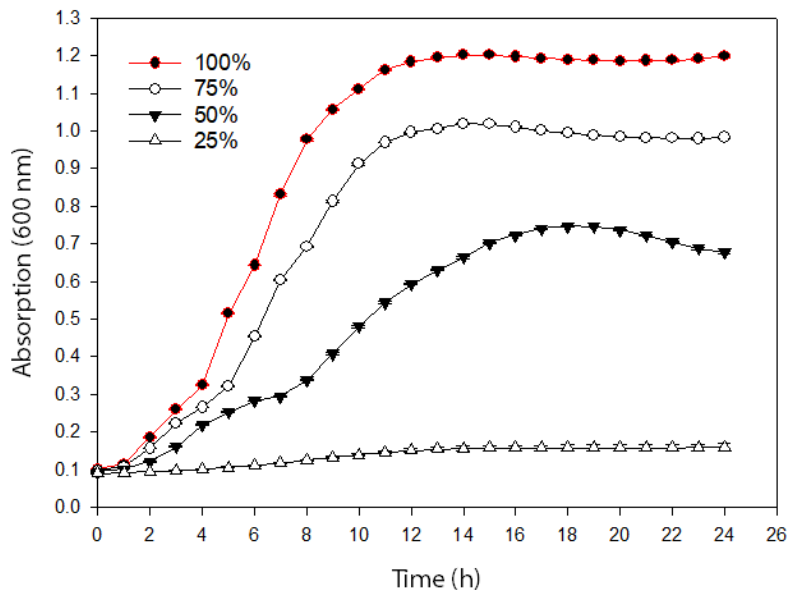
Η διαθεσιμότητα των θρεπτικών ήταν στο 100% και το pH στο 7, όσο δηλαδή οι βέλτιστες εργαστηριακές συνθήκες. Οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι 23°C, 25°C, 29°C και 32°C. Παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία τόσο πιο γρήγορα εισέρχεται το βακτήριο στην εκθετική φάση. Ωστόσο, στους 29°C παρατηρείται η πιο μικρή φάση υστέρησης και το βακτήριο να εισέρχεται πιο γρήγορα στην εκθετική φάση από όλες τις θερμοκρασίες. Δεν παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των θερμοκρασιών 23°C και 25°C.



Εικόνα 20: Καμπύλες ανάπτυξης του *V. alginolyticus* σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας.

Επίδραση της διαθεσιμότητας του άνθρακα στον ρυθμό ανάπτυξης του ξενιστή

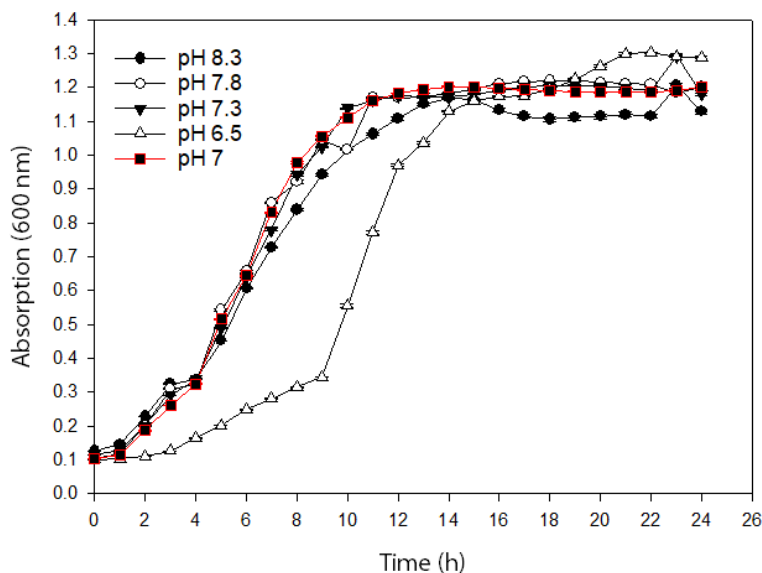
Το pH ήταν στο 7 και η θερμοκρασία ανάπτυξης στους 25°C, όσο δηλαδή οι βέλτιστες εργαστηριακές συνθήκες. Γενικά παρατηρείται ότι όσο μειώνονται τα θρεπτικά τόσο μειώνεται και ανάπτυξη του βακτηρίου. Στο 25% διαθεσιμότητας θρεπτικών δεν παρατηρείται ανάπτυξη του βακτηρίου σε καμία θερμοκρασία μετά από επώαση 24 ωρών.



Εικόνα 21: Καμπύλες ανάπτυξης του *V. alginolyticus* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις θρεπτικών ουσιών.

#### Επίδραση του pH στον ρυθμό ανάπτυξης του ξενιστή

Η διαθεσιμότητα θρεπτικών στο 100% και η θερμοκρασία ανάπτυξης στους 25°C, όσο δηλαδή οι βέλτιστες εργαστηριακές συνθήκες. Στα pH 7,3 και 7,8, σε αυτά δηλαδή που είναι πιο κοντά στο pH 7 (control) αλλά και στο pH 8,3 δεν παρατηρούνται μεγάλες αλλαγές στις καμπύλες ανάπτυξης. Στο pH 6,5 παρατηρείται μετατόπιση της εκθετικής φάσης προς τα δεξιά και διπλασιασμός του χρόνου προσαρμογής του βακτηρίου (από 4 στις 8 ώρες).

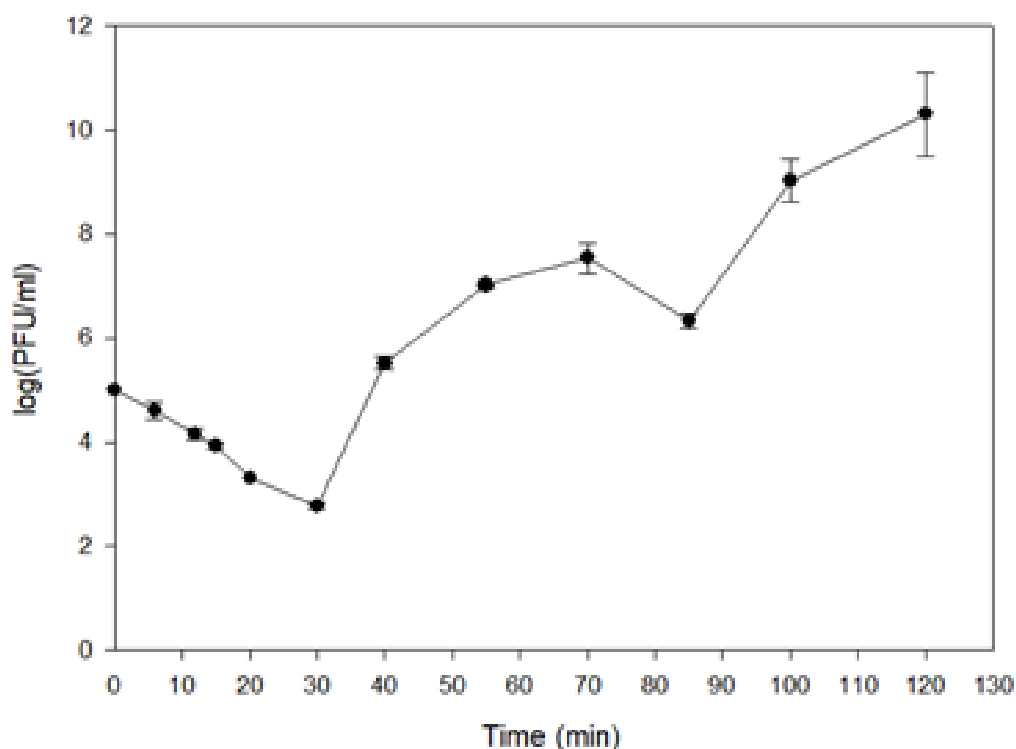


Εικόνα 22: Καμπύλες ανάπτυξης του *V. alginolyticus* σε διαφορετικά επίπεδα pH.

### Πολυφασικές καμπύλες ανάπτυξης των βακτηριοφάγων Athena1 και φSt2 υπό εργαστηριακές συνθήκες

Μετά από διαδοχικές μετρήσεις του τίτλου σε διάρκεια δύο ωρών δημιουργήσαμε την πολυφασική καμπύλη ανάπτυξης των βακτηριοφάγων. Από την καμπύλη ανάπτυξης προσδιορίζονται και τα βασικά χαρακτηριστικά του κύκλου ζωής του βακτηριοφάγου.

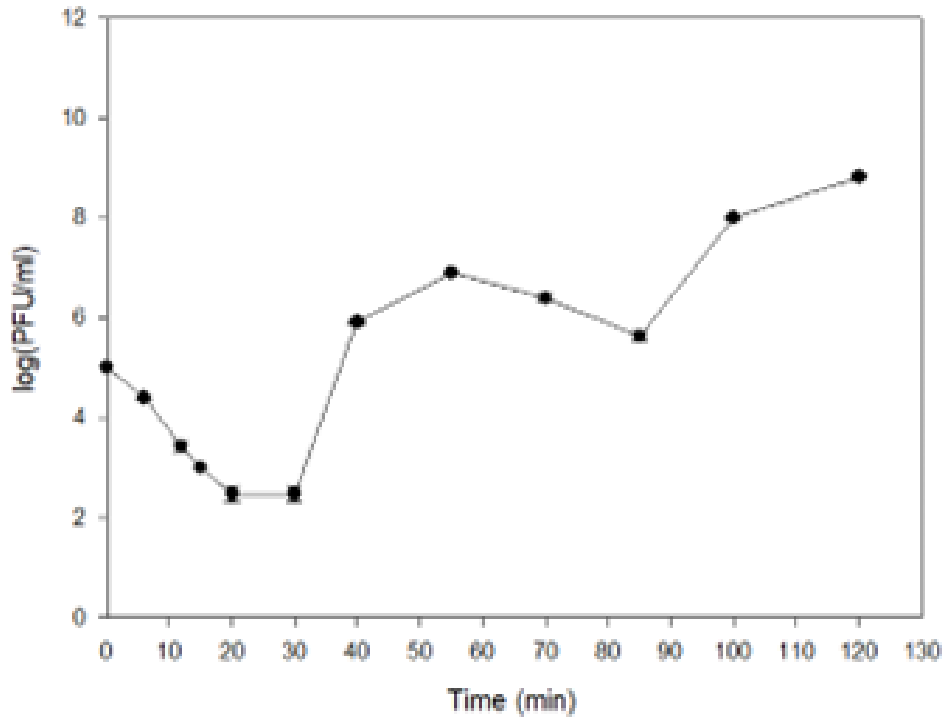
Σύμφωνα με την καμπύλη ανάπτυξης δύο σταδίων του βακτηριοφάγου Athena1 στις βέλτιστες εργαστηριακές συνθήκες (Εικόνα 23), η λανθάνουσα περίοδος (latend period) ήταν 30 λεπτά και από το μέγεθος έκρηξης (burst size) απελευθερώνονται περίπου ~54 σωματίδια φάγου από κάθε μολυσμένο κύτταρο.



Εικόνα 23: Πολυφασική καμπύλη ανάπτυξης του φάγου Athena1 σε εργαστηριακές συνθήκες (25°C, pH 7, 100% συγκέντρωση θρεπτικών).

Σύμφωνα με την καμπύλη ανάπτυξης δύο σταδίων του βακτηριοφάγου φSt2 στις βέλτιστες εργαστηριακές συνθήκες (Εικόνα 24), η λανθάνουσα περίοδος ήταν 30 λεπτά και από το μέγεθος έκρηξης απελευθερώνονται περίπου ~51 σωματίδια φάγου από κάθε μολυσμένο κύτταρο.

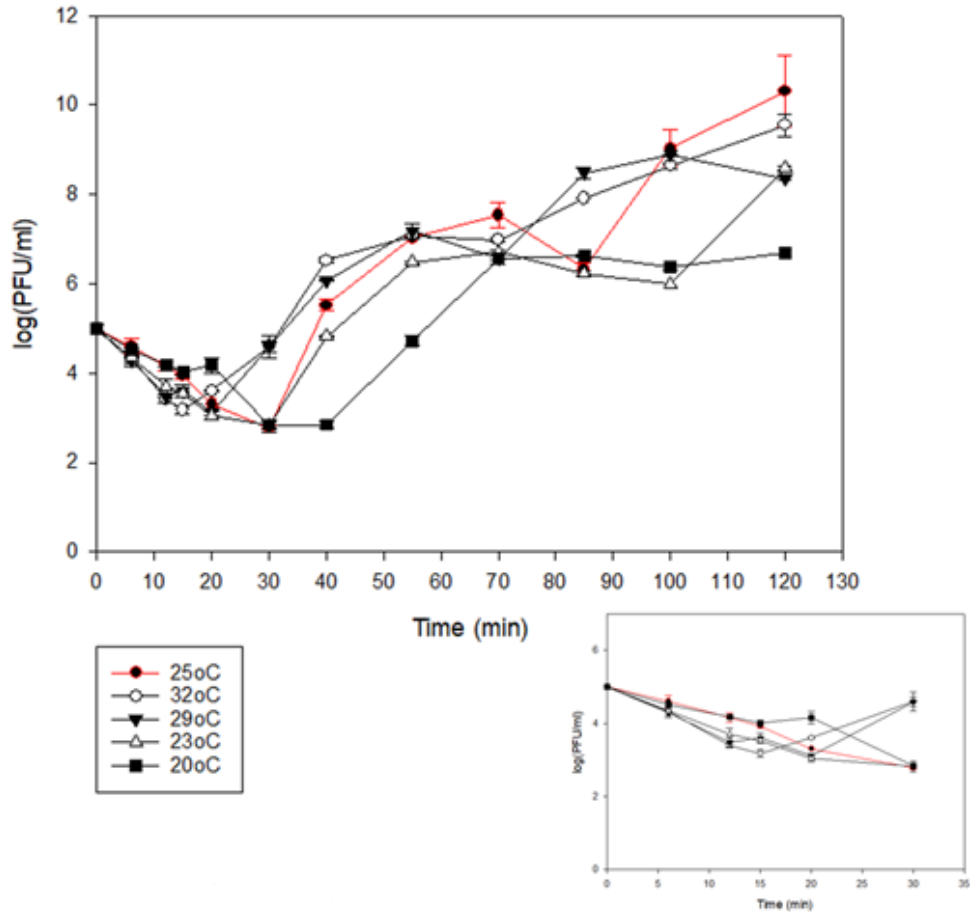




Εικόνα 2412: Πολυφασική καμπύλη ανάπτυξης του φάγου φSt2 σε εργαστηριακές συνθήκες (25°C, pH 7, 100% συγκέντρωση θρεπτικών

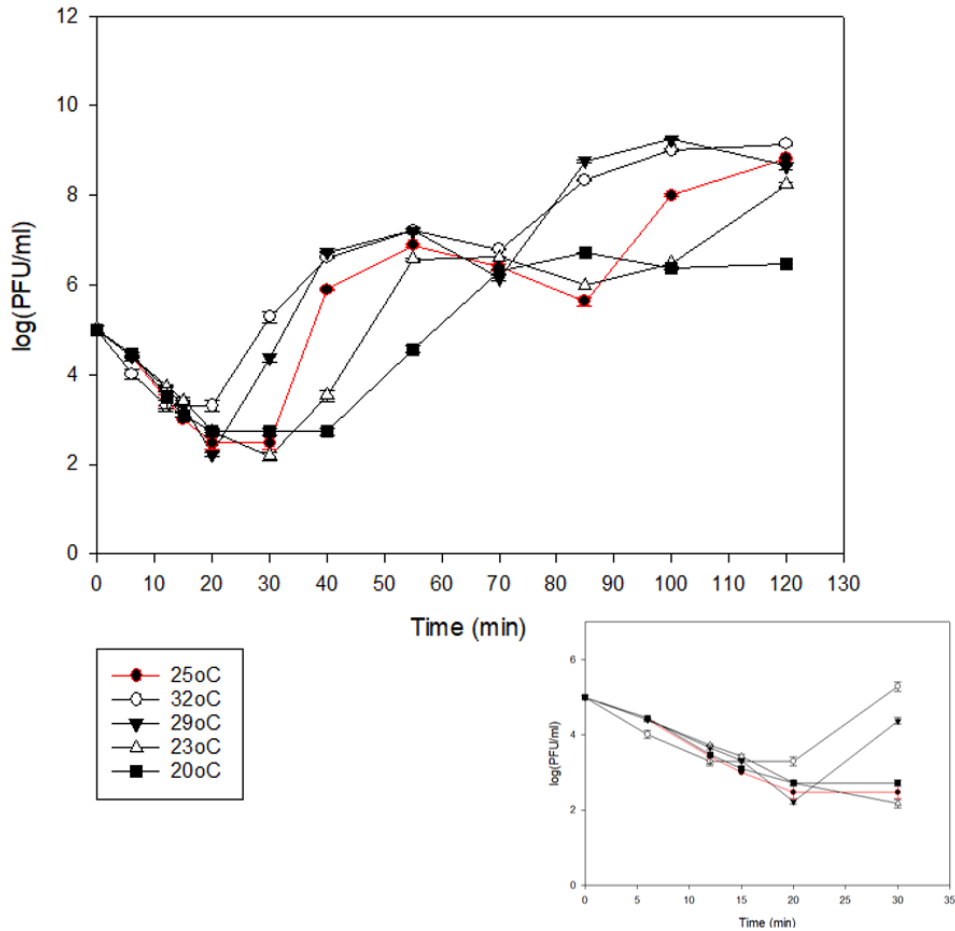
Πολυφασικές καμπύλες ανάπτυξης των φάγων Athena1 και φSt2 υπό διαφορετικές θερμοκρασίες

Σύμφωνα με την καμπύλη ανάπτυξης δύο σταδίων του βακτηριοφάγου Athena1 στις διαφορετικές θερμοκρασίες (20°C, 23°C, 25°C, 29°C, 32°C) (Εικόνα 25) παρατηρείται ότι η λανθάνουσα περίοδος αλλά και το μέγεθος της έκρηξης μεταβάλλονται (Πίνακας 5). Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία παρατηρείται μείωση της λανθάνουσας περιόδου (Πίνακας 5). Από 30 λεπτά που είναι στις θερμοκρασίες 20°C, 23°C και 25°C, παρατηρείται πτώση στα 20 λεπτά στους 29°C και στα 15 λεπτά στους 32°C (Πίνακας 5).



Εικόνα 25: Πολυφασικές καμπύλες ανάπτυξης του φάγου Athena1 στις διαφορετικές θερμοκρασίες (πάνω αριστερά) και η λανθάνουσα περίοδος του φάγου στις διαφορετικές θερμοκρασίες (κάτω δεξιά).

Σύμφωνα με την καμπύλη ανάπτυξης δύο σταδίων του βακτηριοφάγου φSt2 στις διαφορετικές θερμοκρασίες (20°C, 23°C, 25°C, 29°C, 32°C) (Εικόνα 26) παρατηρείται ότι η λανθάνουσα περίοδος αλλά και το μέγεθος της έκρηξης αλλάζουν (Πίνακας 6). Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία παρατηρείται μείωση της λανθάνουσας περιόδου (Πίνακας 6). Από 30 λεπτά που είναι στις θερμοκρασίες 23°C και 25°C, παρατηρείται πτώση στα 20 λεπτά στους 20°C 29°C και στα 12 λεπτά στους 32°C (Πίνακας 6). Επίσης, παρατηρείται αύξηση του μεγέθους έκρηξης όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, ενώ παρατηρείται διπλασιασμός των ισωματιδίων στις θερμοκρασίες 29°C και 32°C σε σχέση με τους 25°C (Πίνακας 6).

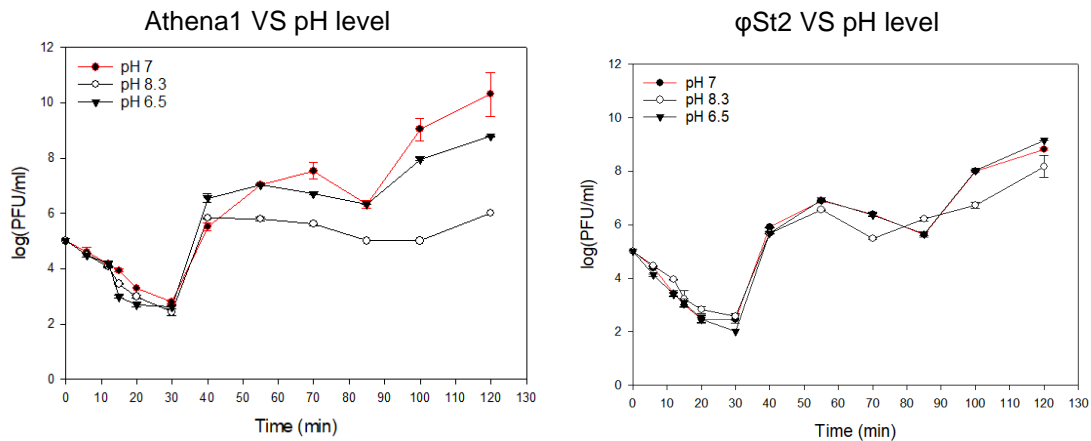


Εικόνα 26: Πολυφασικές καμπύλες ανάπτυξης του φάγου φSt2 στις διαφορετικές θερμοκρασίες (πάνω αριστερά) και η λανθάνουσα περίοδος του φάγου στις διαφορετικές θερμοκρασίες (κάτω δεξιά).

Πολυφασικές καμπύλες ανάπτυξης των φάγων Athena1 και φSt2 υπό διαφορετικά επίπεδα pH

Για τον βακτηριοφάγο Athena1, στον πρώτο κύκλο πολλαπλασιασμού δεν παρατηρούνται διαφορές όσον αφορά την λανθάνουσα περίοδο. Ωστόσο το μέγεθος της έκρηξης μειώνεται όσο αυξάνεται το pH (Πίνακας 5).

Για τον βακτηριοφάγο φSt2, στον πρώτο κύκλο πολλαπλασιασμού δεν παρατηρούνται διαφορές όσον αφορά την λανθάνουσα περίοδο. Το μέγεθος της έκρηξης μειώνεται όσο αυξάνεται το pH (Πίνακας 6). Ωστόσο παρατηρείται ότι στο pH 8,3 μπαίνει πιο γρήγορα στον δεύτερο κύκλο πολλαπλασιασμού (στα 70 λεπτά αντί για τα 85) και καταφέρνει να φτάσει στα επίπεδα ανάπτυξης των άλλων δύο pH στο τέλος του.

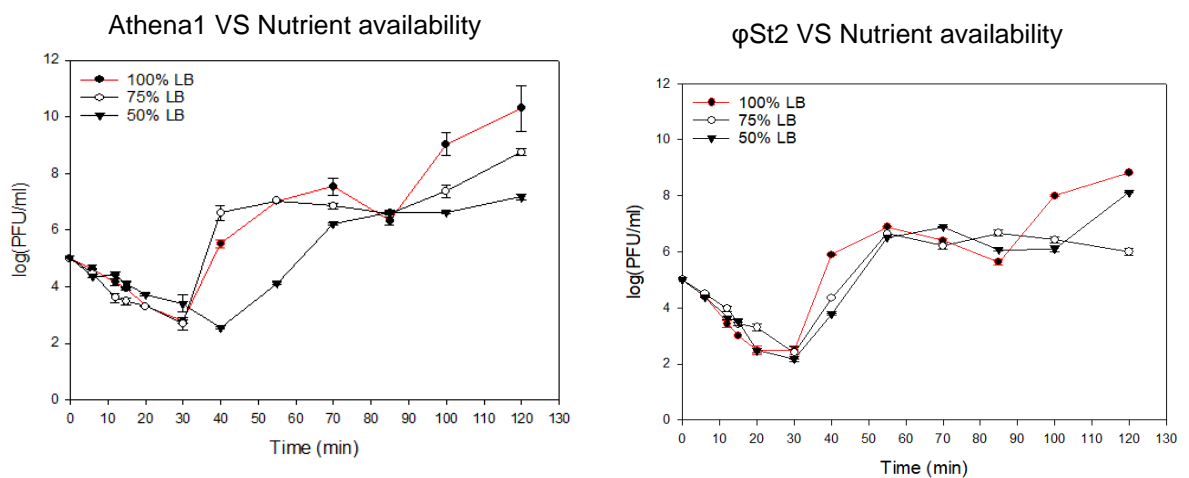


Εικόνα 27: Πολυφασικές καμπύλες ανάπτυξης των φάγων Athena1 και φSt2 στα διαφορετικά επίπεδα pH.

Πολυφασικές καμπύλες ανάπτυξης των φάγων Athena1 και φSt2 υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις θρεπτικών ουσιών

Για τον βακτηριοφάγο Athena1, παρατηρείται αύξηση της λανθάνουσας περιόδου όταν το βακτήριο μεγαλώνει σε 50% θρεπτικό (από 30 λεπτά σε 40) και μείωση του μέγεθους της έκρηξης (Πίνακας 5).

Για τον βακτηριοφάγο φSt2, στον πρώτο κύκλο πολλαπλασιασμού δεν παρατηρούνται διαφορές όσον αφορά την λανθάνουσα περίοδο. Το μέγεθος της έκρηξης μειώνεται όταν το βακτήριο μεγαλώνει σε 50% θρεπτικό (Πίνακας 6).



Εικόνα 28: Πολυφασικές καμπύλες ανάπτυξης των φάγων Athena1 και φSt2 στις διαφορετικές συγκεντρώσεις θρεπτικών ουσιών.

Από τις καμπύλες αυτές προκύπτουν οι τιμές για τα βασικότερα χαρακτηριστικά του κύκλου ζωής των φάγων (Πίνακες 5&6), η λανθάνουσα περίοδος (latency period), το μέγεθος έκρηξης (burst size) και ο χρόνος απορρόφησης 95% του βακτηριοφάγου (adsorption time).

Πίνακας 5: Βιολογικά χαρακτηριστικά (λανθάνουσα περίοδος ανάπτυξης και μέγεθος έκρηξης) του κύκλου ζωής του βακτηριοφάγου Athena1 και χρόνος προσρόφησης του 95% των ισωματιδίων στον ξενιστήο *V. alginolyticus* στις διαφορετικές συνθήκες που δοκιμάστηκαν. Οι αστερίσκοι συμβολίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους 25°C και τις λοιπές θερμοκρασίες, στο pH 7 και τις λοιπές τιμές και στο 100% LB και τις λοιπές τιμές (t-test,  $p < 0.05$ ).

Βακτηριοφάγος Athena1		Μέγεθος έκρηξης	Λανθάνουσα περίοδος (min)	Χρόνος απορρόφησης (min)
	20°C	17*	30	30
	23°C	17*	30	30
	25°C	54	30	30
	29°C	32*	20	20
	32°C	16*	15	20
	pH 8.3	32 <sup>+</sup>	30	30
	pH 7	54	30	30
	pH 6.5	52	30	30
	100% LB	54	30	30
	75% LB	55	30	30
50% LB	8 <sup>+</sup>	40	40	

Πίνακας 6: Βιολογικά χαρακτηριστικά (λανθάνουσα περίοδος ανάπτυξης και μέγεθος έκρηξης) του κύκλου ζωής του βακτηριοφάγου φSt2 και χρόνος προσρόφησης του 95% των ισωματιδίων στον ξενιστή *V. alginolyticus* στις διαφορετικές συνθήκες που δοκιμάστηκαν. Οι αστερίσκοι συμβολίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους 25°C και τις λοιπές θερμοκρασίες, στο pH 7 και τις λοιπές τιμές και στο 100% LB και τις λοιπές τιμές (t-test,  $p < 0.05$ ).

Βακτηριοφάγος φSt2		Μέγεθος έκρηξης	Λανθάνουσα περίοδος (min)	Χρόνος απορρόφησης (min)
	20°C	10*	40	20
	23°C	18*	30	30
	25°C	51	30	30
	29°C	100*	20	20
	32°C	100*	12	20
	pH 8.3	19 <sup>+</sup>	30	30
	pH 7	51	30	30
	pH 6.5	30	30	30
	100% LB	51	30	30
	75% LB	41	30	30
50% LB	15 <sup>+</sup>	30	30	

### Μελέτη των επιπέδων σχετικής έκφρασης βακτηριοφαγικών γονιδίων κατά την διάρκεια της μόλυνσης

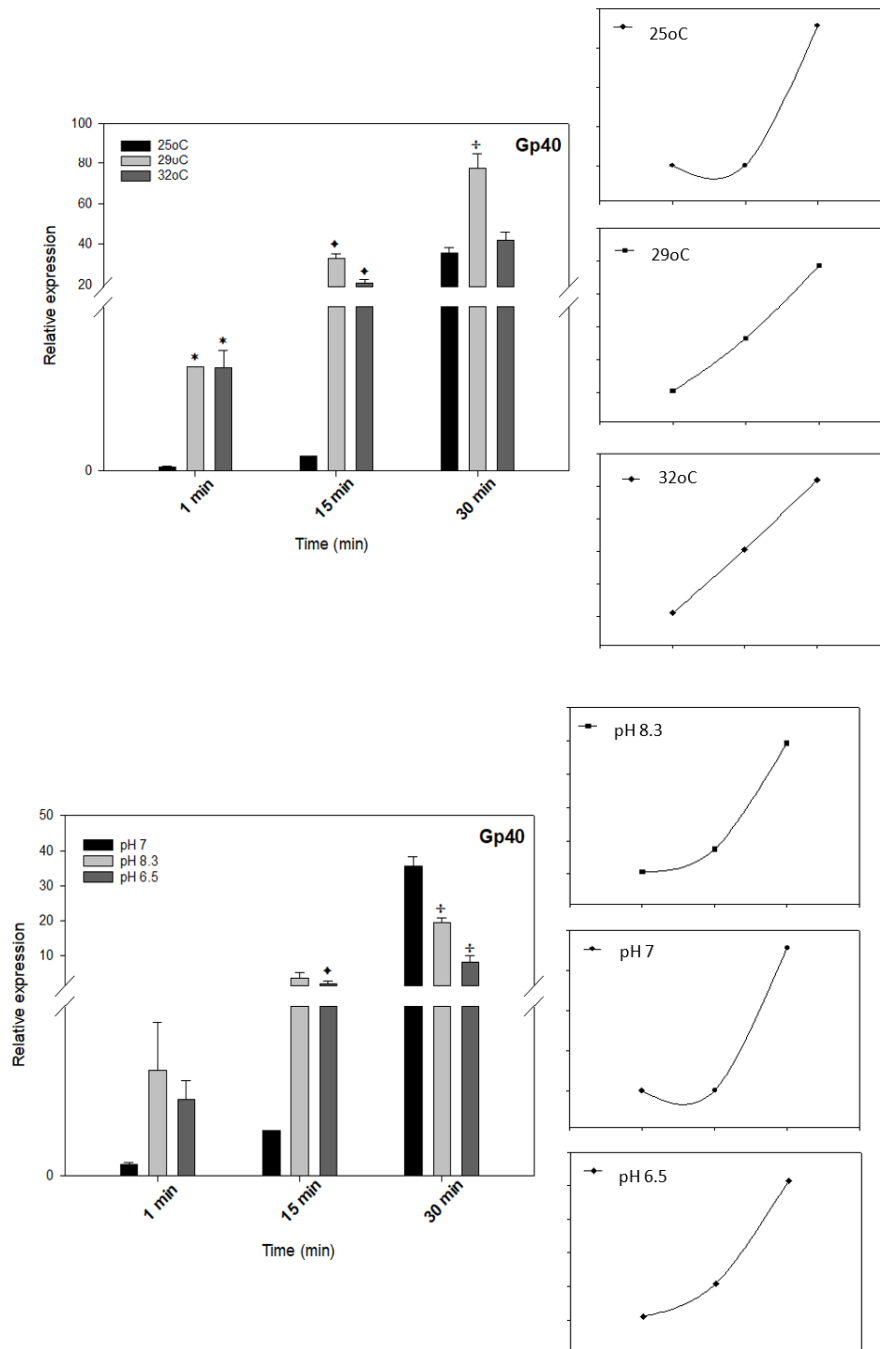
Για να εξακριβωθεί ο «γονιδιακός προγραμματισμός» των ενδιαφερόντων γονιδίων πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου (RT-PCR) στα γονίδια των φάγων και του βακτηρίου την ώρα της μόλυνσης σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές. Όπως αναμενόταν τα μεταγραφήματα των ικών γονιδίων υπερίσχυσαν αυτών των βακτηριακών (Chevallereau et al., 2016). Πιο συγκεκριμένα, συλλέχθηκαν κύτταρα και έγινε απομόνωση RNA στις χρονικές στιγμές 1 λεπτό, 15 λεπτά και 30 λεπτά, όσο διαρκεί δηλαδή η λανθάνουσα περίοδος των βακτηριοφάγων Athena1 και φSt2.

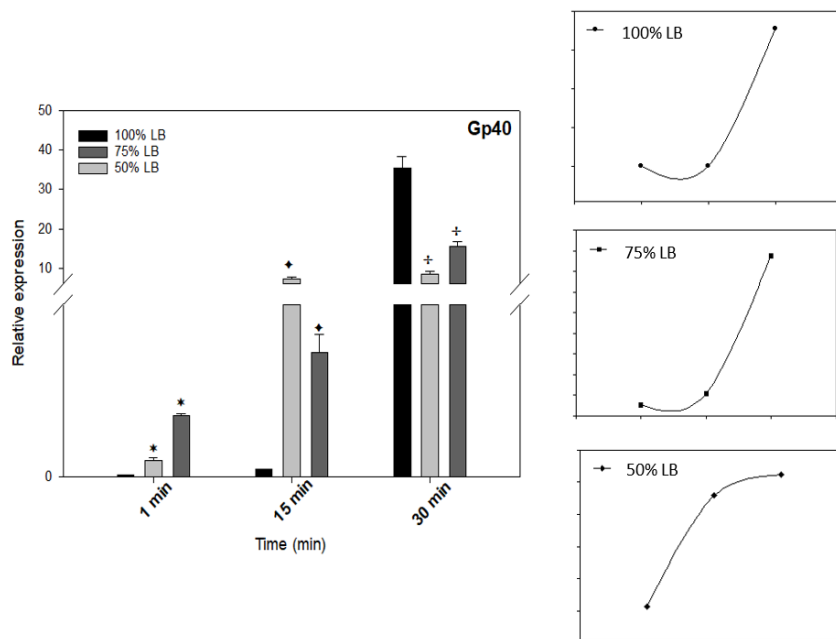
Μελετήθηκε η έκφραση φαγικών γονιδίων με γνωστό πρότυπο έκφρασης κατά τον Luke et al., 2002 για τον βακτηριοφάγο T4 κατά τη διάρκεια της μόλυνσης και πιο συγκεκριμένα τα γονίδια *MCP*, *Gr40*, *Rec* για τον φάγο Athena1 και *MCP*, *pnh*, *Rec* για τον φάγο φSt2.

### Τα Μοτίβα Έκφρασης των Γονιδίων του φαγού Athena1

Στις συνθήκες μάρτυρα (25°C, pH 7 & 100% LB) παρατηρείται αύξηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης κατά 4-φορές στα 15 λεπτά και κατά 1000-φορές στα 30 λεπτά του γονιδίου *Gr40* με την πάροδο του χρόνου, με μέγιστη σχετική έκφραση στα 30 λεπτά. Αυτή η τάση σχετικής έκφρασης επαναλαμβάνεται στις διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας, pH και περιεκτικότητας σε θρεπτικά συστατικά. Παρά τις φαινομενικές ομοιότητες στα μεταγραφικά μοτίβα σε όλες τις συνθήκες, οι στατιστικές αναλύσεις αποκαλύπτουν σημαντικές διαφορές.

Αυτό υποδηλώνει ότι, παρά το κοινό μεταγραφικό μοτίβο, υπάρχουν διακριτά στατιστικά χαρακτηριστικά που διαφοροποιούν τις συνθήκες μεταξύ τους.

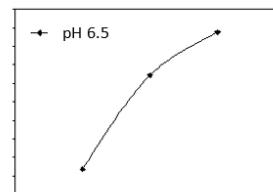
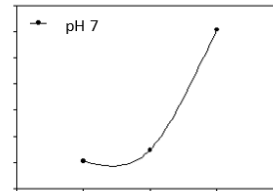
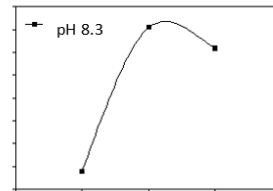
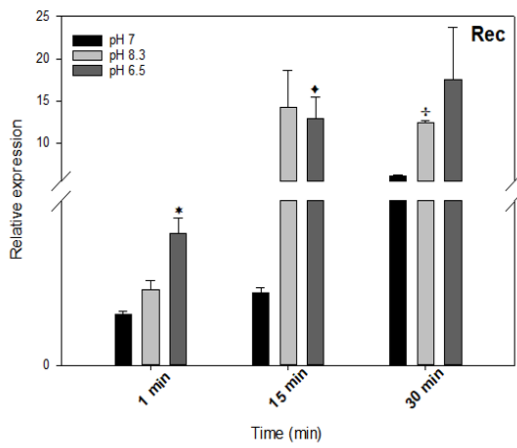
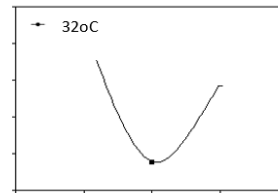
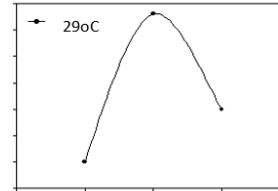
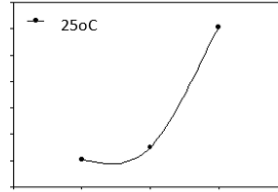
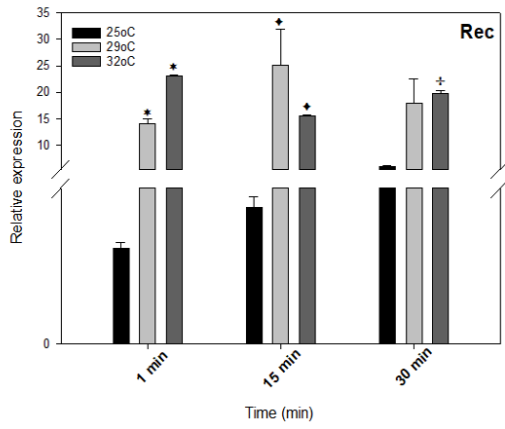


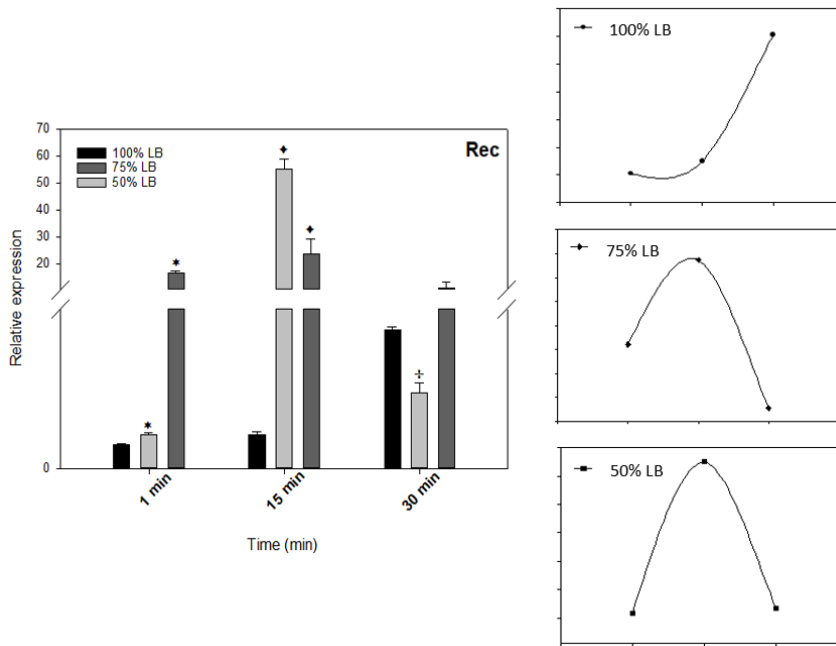


Εικόνα 29: Σχετικά επίπεδα έκφρασης και μεταγραφικά μοτίβα του γονιδίου *Grp40* ( $\pm$ SE) για τον φάγο *Athena1* στους 25°C, 29°C και 32°C, στα pH 6,5, 7 και 8,3 και σε 100%, 75% και 50% LB. Οι αστερίσκοι συμβολίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους 25°C και τις λοιπές θερμοκρασίες, στο pH 7 και τις λοιπές τιμές και στο 100% LB και τις λοιπές τιμές (t-test,  $p < 0.05$ ).

Στις συνθήκες μάρτυρα (25°C, pH 7 & 100% LB) παρατηρείται αύξηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης κατά 6-φορές στα 30 λεπτά του γονιδίου *Rec* με την πάροδο του χρόνου, με μέγιστη έκφραση στα 30 λεπτά. Στο pH 6,5 ενώ τα μεταγραφικά μοτίβα φαίνονται παρόμοια με το control pH 7, η στατιστική ανάλυση παρουσιάζει σημαντικές διαφορές. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται αύξηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης κατά 14-φορές στο 1<sup>ο</sup> λεπτό, κατά 6-φορές στα 15 λεπτά και κατά 1,5-φορές στα 30 λεπτά σε σχέση με τις συνθήκες μάρτυρα του γονιδίου *Grp40* με την πάροδο του χρόνου. Στη θερμοκρασία 29°C, στο pH 8,3 και στην περιεκτικότητα του θρεπτικού 75% και 50% παρατηρείται μια κορυφή στην σχετική έκφραση των γονιδίων στα 15 λεπτά ακολουθούμενη από μια μείωση των σχετικών επιπέδων έκφρασης. Στη θερμοκρασία των 32°C παρατηρείται αρχικά αυξημένη έκφραση του γονιδίου κατά την έναρξη της μόλυνσης (στο 1ο λεπτό), ακολουθούμενη από μείωση της έκφρασης και, στη συνέχεια, αύξηση προς τα 30 λεπτά. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται αύξηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης κατά 23-φορές στο 1<sup>ο</sup> λεπτό, κατά 15-φορές στα 15 λεπτά και κατά 3-φορές στα 30 λεπτά σε σχέση με τις συνθήκες μάρτυρα.

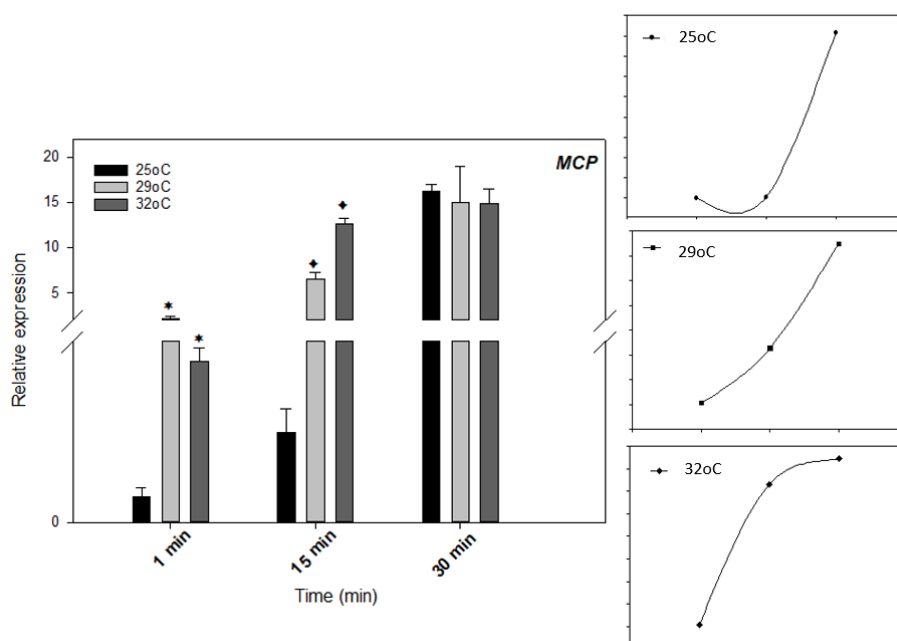


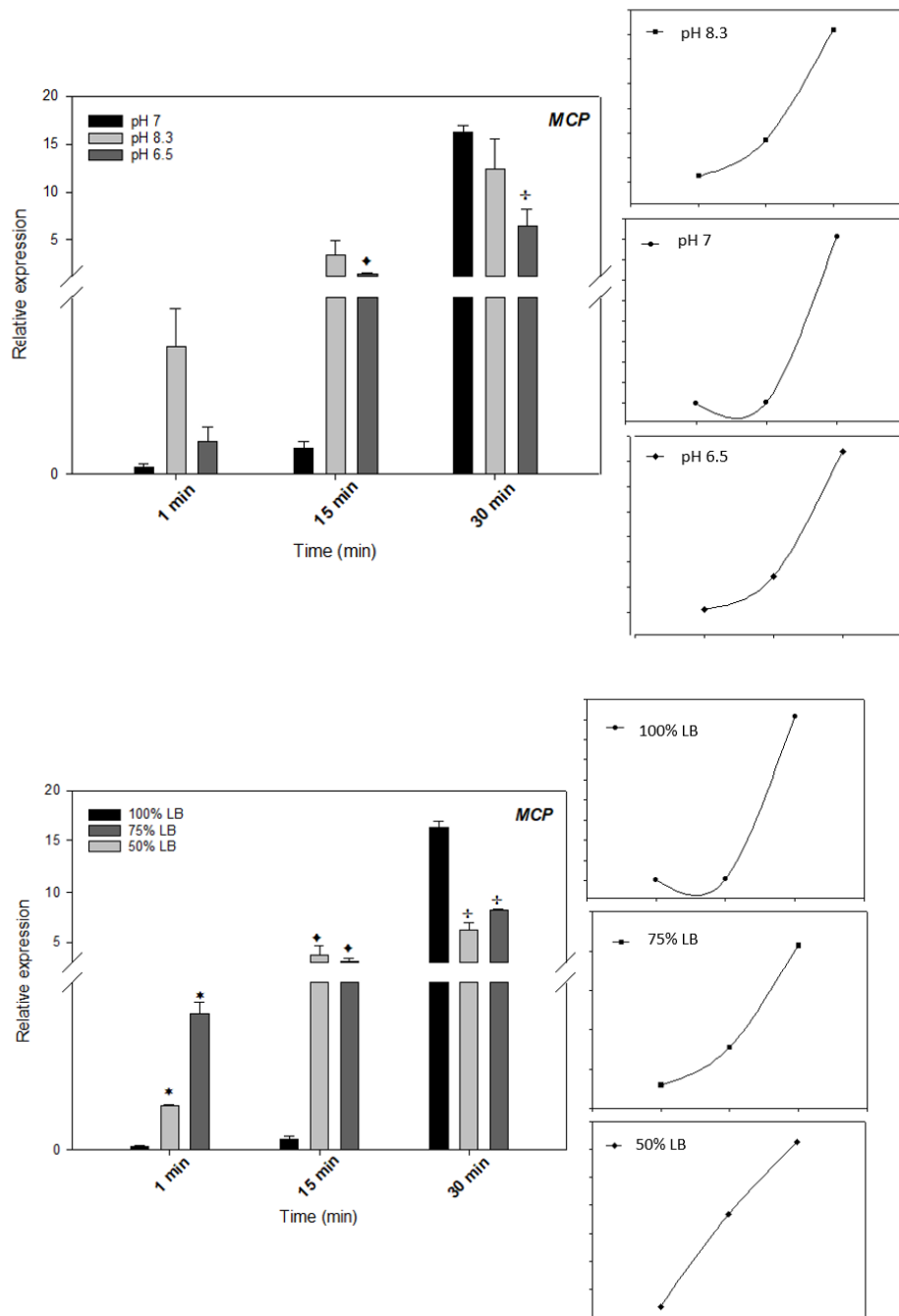




Εικόνα 30: Σχετικά επίπεδα έκφρασης και μεταγραφικά μοτίβα του γονιδίου *Rec* ( $\pm$ SE) για τον φάγο *Athena1* στους 25°C, 29°C και 32°C, στα pH 6,5, 7 και 8,3 και σε 100%, 75% και 50% LB. Οι αστερίσκοι συμβολίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους 25°C και τις λοιπές θερμοκρασίες, στο pH 7 και τις λοιπές τιμές και στο 100% LB και τις λοιπές τιμές (*t*-test,  $p < 0.05$ )

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα σχετικά επίπεδα έκφρασης της κύριας καψιδιακής πρωτεΐνης του βακτηριοφάγου (*MCP*) έχουν μέγιστα σχετικά επίπεδα έκφρασης στο τέλος της λανθάνουσας περιόδου, γεγονός αναμενόμενο αφού τότε γίνεται και πακεταρίσμο των νέων γονιδιωμάτων στα καψίδια. Ωστόσο, παρά τις παρατηρούμενες ομοιότητες στα μεταγραφικά μοτίβα στις διαφορετικές συνθήκες, οι στατιστικές αναλύσεις αποκαλύπτουν σημαντικές διαφορές. Ενώ τα μεταγραφικά μοτίβα παραμένουν σταθερά, είναι αξιοσημείωτο ότι η σχετική έκφραση του γονιδίου παρουσιάζει μια διακριτή αύξηση σε σύγκριση με τις συνθήκες μάρτυρα.



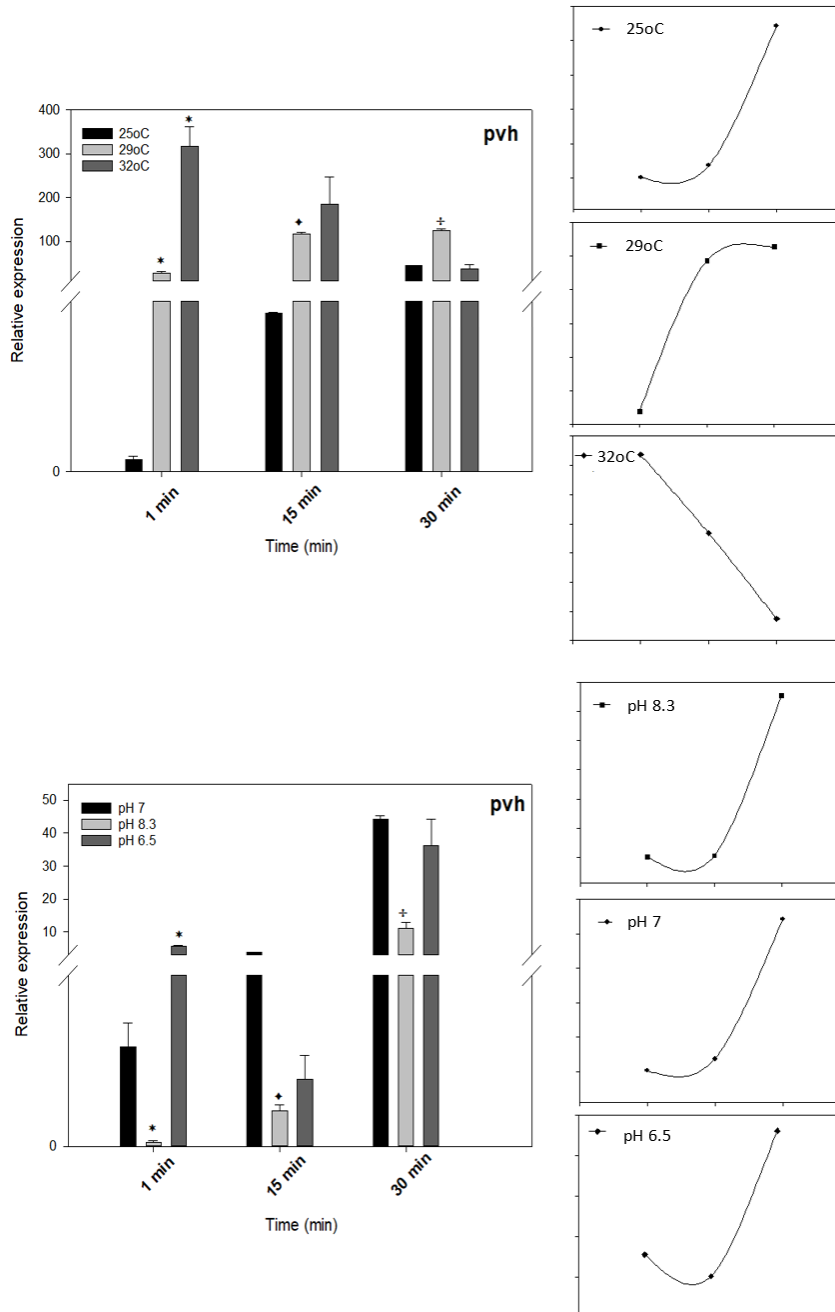


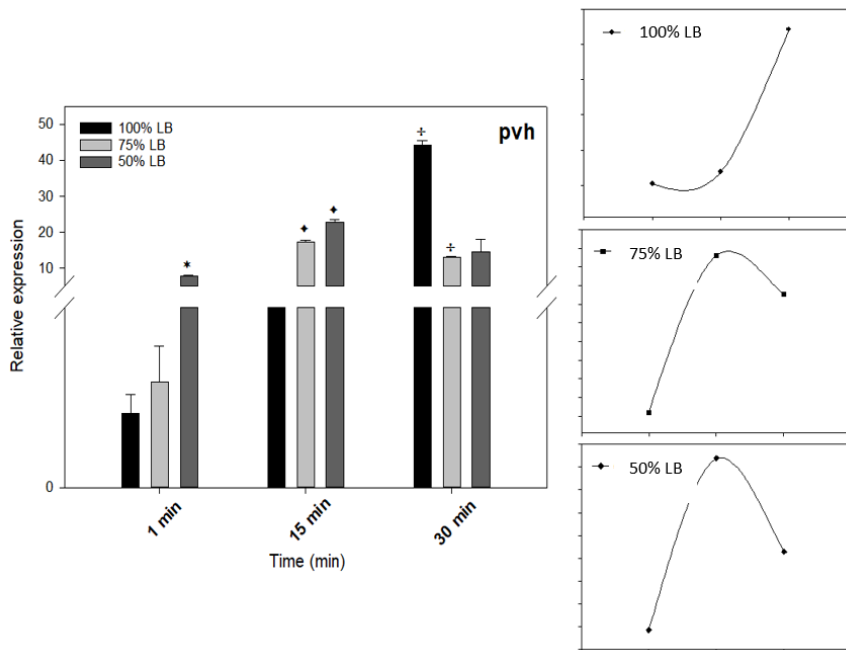
Εικόνα 31: Σχετικά επίπεδα έκφρασης και μεταγραφικά μοτίβα του γονιδίου MCP ( $\pm$ SE) για τον φάγο Athena1 στους 25oC, 29oC και 32oC, στα pH 6.5, 7 και 8,3 και σε 100%, 75% και 50% LB. Οι αστερίσκοι συμβολίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους 25oC και τις λοιπές θερμοκρασίες, στο pH 7 και τις λοιπές τιμές και στο 100% LB και τις λοιπές τιμές (t-test,  $p < 0.05$ )

### Τα Μοτίβα Έκφρασης των Γονιδίων του φαγού φSt2

Στις συνθήκες του μάρτυρα (25°C, pH 7 & 100% LB) παρατηρείται μέγιστη έκφραση του γονιδίου *pnh* με την πάροδο του χρόνου, με μέγιστη έκφραση στα 30 λεπτά. Το ίδιο παρατηρείται και στη θερμοκρασία 29°C και στα pH 8,3 και 6,5. Ωστόσο, παρά τις προφανείς ομοιότητες στα μεταγραφικά μοτίβα σε αυτές τις συνθήκες, οι στατιστικές αναλύσεις αποκαλύπτουν σημαντικές διαφορές. Στους 32°C, παρατηρείται μια αρχική αύξηση της γονιδιακής έκφρασης εντός του πρώτου λεπτού κατά 1000-φορές σε σχέση με τις συνθήκες μάρτυρα, η οποία ακολουθείται από μια επακόλουθη μείωση της έκφρασης με την πάροδο

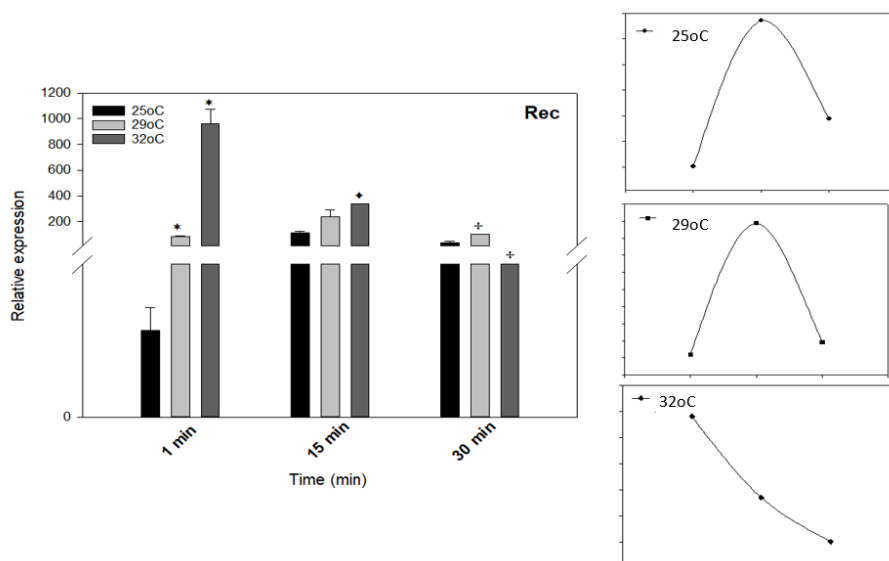
του χρόνου. Στην περιεκτικότητα του θρεπτικού 75% και 50% παρατηρείται μια έντονη κορύφωση της γονιδιακής έκφρασης στο 15λεπτο (αυξημένη κατά 5-φορές και 7-φορές αντίστοιχα σε σχέση με τις συνθήκες μάρτυρα), την οποία διαδέχεται μια επακόλουθη μείωση της έκφρασης (μειωμένη κατά 3-φορές σε σχέση με τις συνθήκες μάρτυρα).

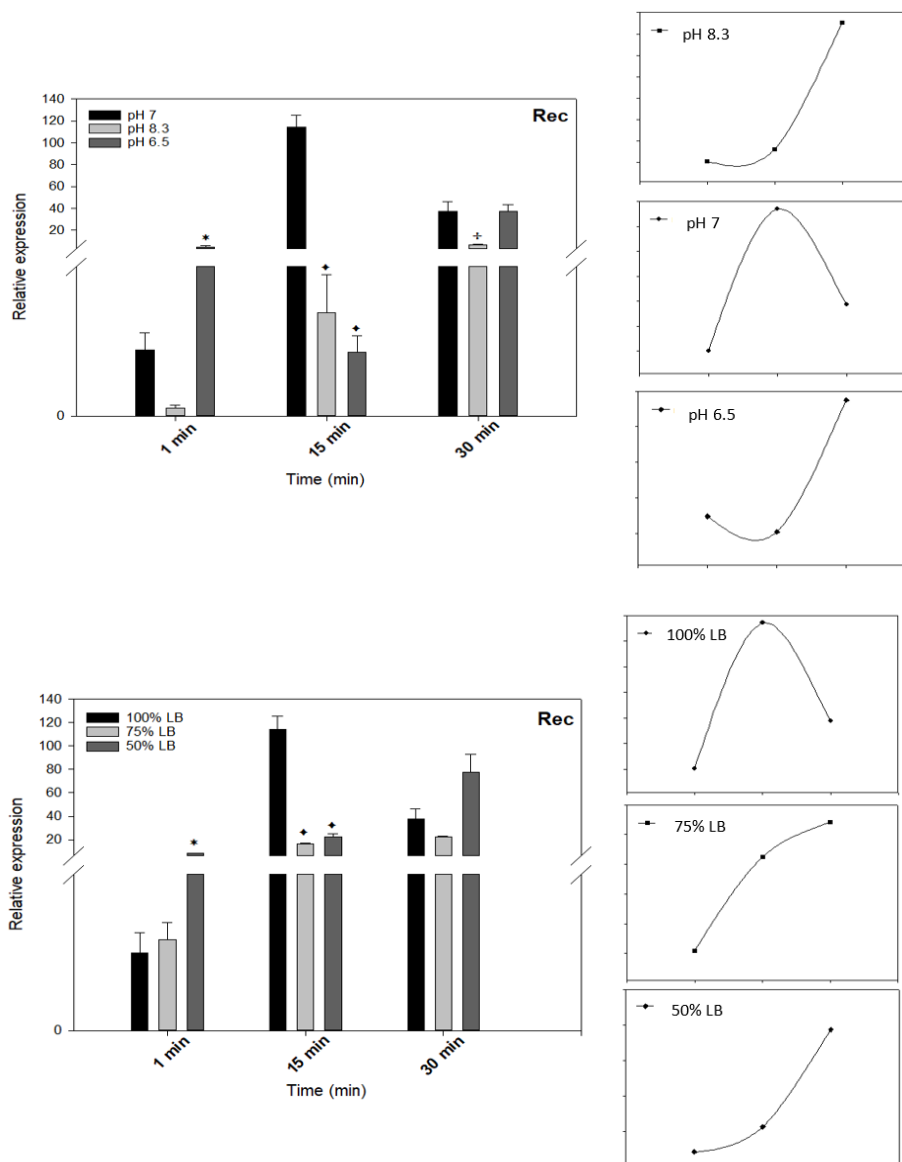




Εικόνα 32: Σχετικά επίπεδα έκφρασης και μεταγραφικά μοτίβα του γονιδίου *pvh* ( $\pm SE$ ) για τον φάγο *φSt2* στους 25°C, 29°C και 32°C, στα pH 6,5, 7 και 8,3 και σε 100%, 75% και 50% LB. Οι αστερίσκοι συμβολίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους 25°C και τις λοιπές θερμοκρασίες, στο pH 7 και τις λοιπές τιμές και στο 100% LB και τις λοιπές τιμές (*t*-test,  $p < 0.05$ )

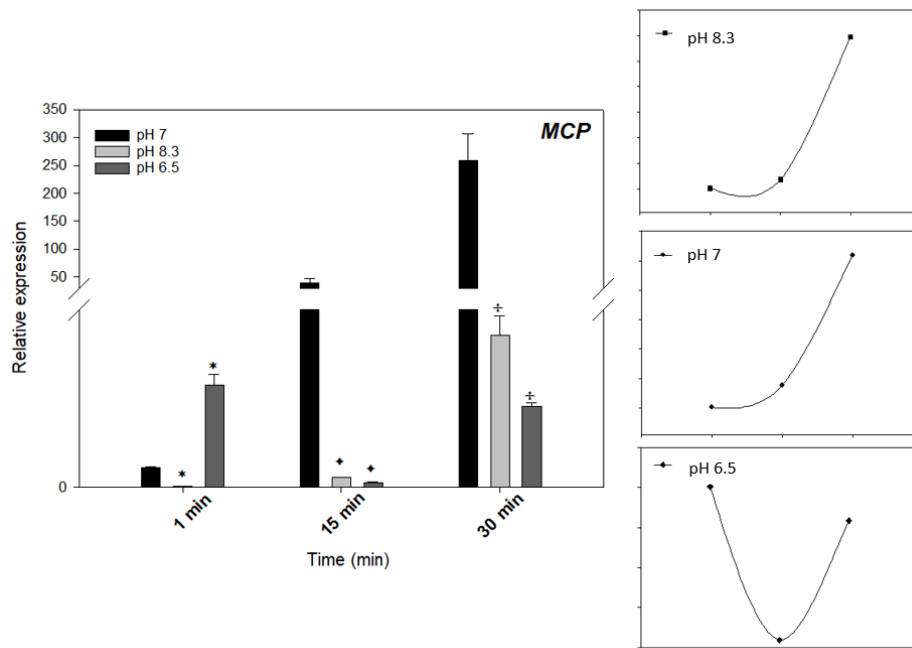
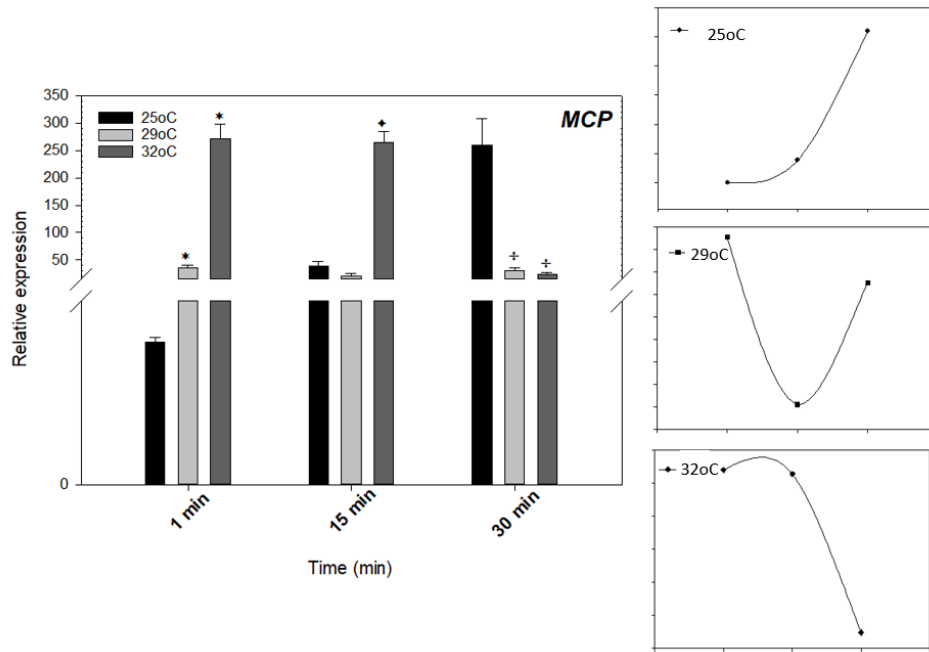
Στις control συνθήκες (25°C, pH 7 & 100% LB) παρατηρείται μέγιστη έκφραση του γονιδίου *Rec* στα 15 λεπτά. Το ίδιο παρατηρείται και στη θερμοκρασία 29°C. Παρά τις φαινομενικές ομοιότητες στα μεταγραφικά μοτίβα σε όλες τις συνθήκες, οι στατιστικές αναλύσεις αποκαλύπτουν σημαντικές διαφορές. Στην θερμοκρασία 32°C παρατηρείται μέγιστη έκφραση του γονιδίου στο 1 λεπτό (κατά 2000-φορές σε σχέση με τις συνθήκες μάρτυρα), ακολουθούμενη από μείωση της γονιδιακής έκφρασης με την πάροδο του χρόνου (κατά 10-φορές στα 30 λεπτά σε σχέση με τις συνθήκες μάρτυρα). Στα pH 8,3 και 6,5 καθώς και στην περιεκτικότητα του θρεπτικού 75% και 50% παρατηρείται αύξηση της έκφρασης του γονιδίου με την πάροδο του χρόνου, με μέγιστη έκφραση στα 30 λεπτά.

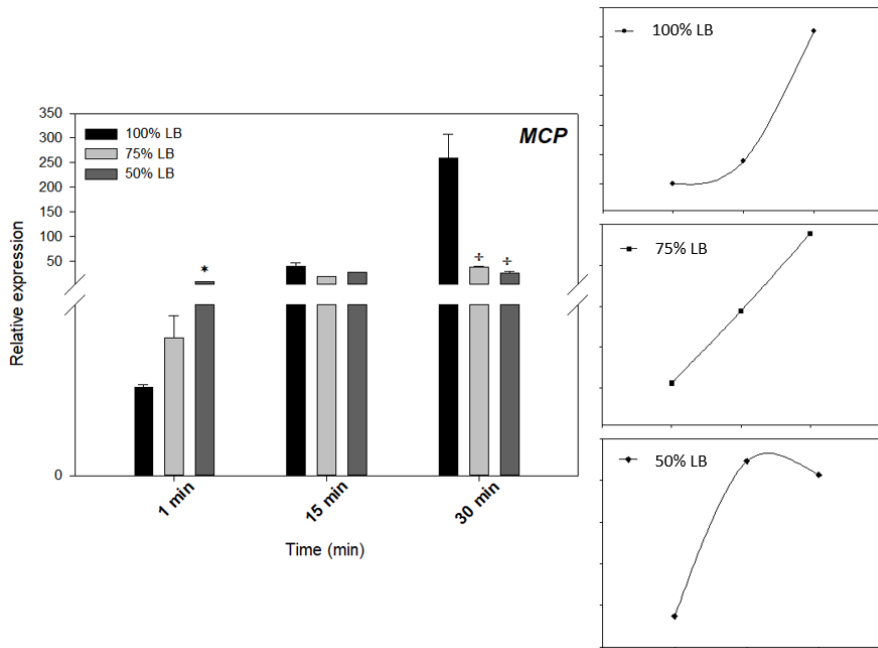




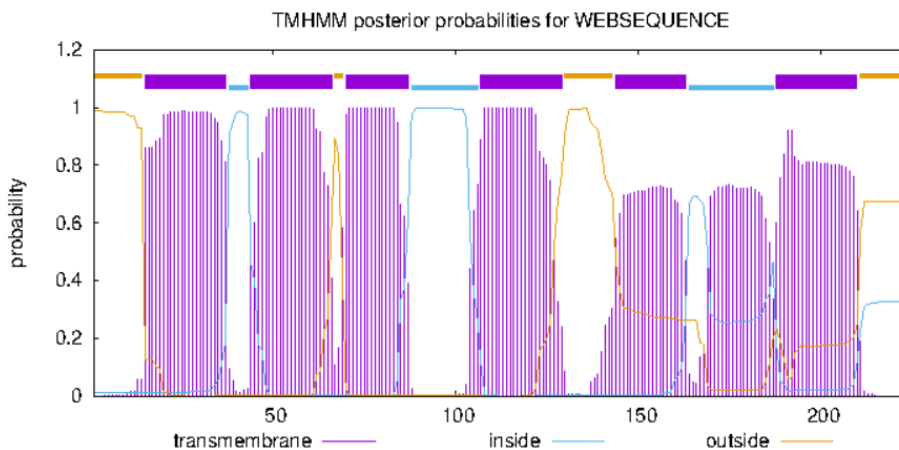
Εικόνα 33: Σχετικά επίπεδα έκφρασης και μεταγραφικά μοτίβα του γονιδίου *Rec* ( $\pm SE$ ) για τον φάγο  $\phi St2$  στους 25oC, 29oC και 32oC, στα pH 6.5, 7 και 8,3 και σε 100%, 75% και 50% LB. Οι αστερίσκοι συμβολίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους 25oC και τις λοιπές θερμοκρασίες, στο pH 7 και τις λοιπές τιμές και στο 100% LB και τις λοιπές τιμές (t-test,  $p < 0.05$ )

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα σχετικά επίπεδα έκφρασης της κύριας καψιδιακής πρωτεΐνης του βακτηριοφάγου (*MCP*) στις control συνθήκες (25°C, pH 7 & 100% LB) φτάνουν μέγιστο στο τέλος της λανθάνουσας περιόδου, γεγονός αναμενόμενο αφού τότε γίνεται και πακεταρίσμα των νέων γονιδιωμάτων στα καψίδια. Το ίδιο παρατηρείται και στο pH 8,3 και στην περιεκτικότητα του θρεπτικού στο 75%. Παρά τις φαινομενικές ομοιότητες στα μεταγραφικά μοτίβα σε όλες τις συνθήκες, οι στατιστικές αναλύσεις αποκαλύπτουν σημαντικές διαφορές. Στην θερμοκρασία 32°C και στην περιεκτικότητα του θρεπτικού 50% παρατηρείται μέγιστη έκφραση του γονιδίου στα 15 λεπτά (κατά 140-φορές στους 32°C και κατά 34-φορές στο 50% θρεπτικό) και έπειτα μείωση της έκφρασής του. Στην θερμοκρασία 29°C και στο pH 6,5 στο πρώτο λεπτό παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του γονιδίου, ενώ στα 15 λεπτά παρατηρήθηκε μείωση και στα 30 λεπτά παρατηρήθηκε εκ νέου αύξηση.





Εικόνα 34: Σχετικά επίπεδα έκφρασης και μεταγραφικά μοτίβα του γονιδίου MCP ( $\pm$ SE) για τον φάγο φSt2 στους 25οC, 29οC και 32οC, στα pH 6,5, 7 και 8,3 και σε 100%, 75% και 50% LB. Οι αστερίσκοι συμβολίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους 25οC και τις λοιπές θερμοκρασίες, στο pH 7 και τις λοιπές τιμές και στο 100% LB και τις λοιπές τιμές (t-test,  $p < 0.05$ )

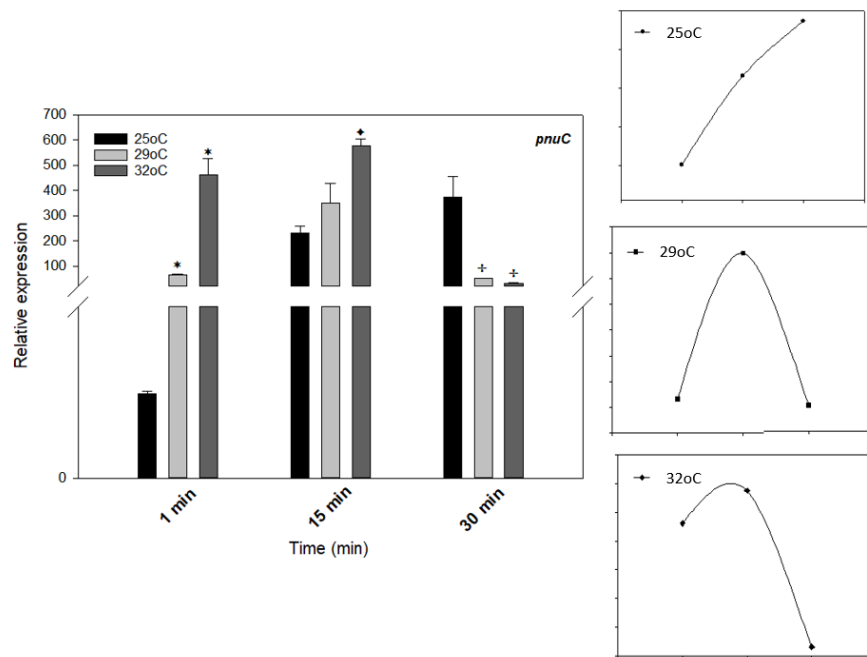


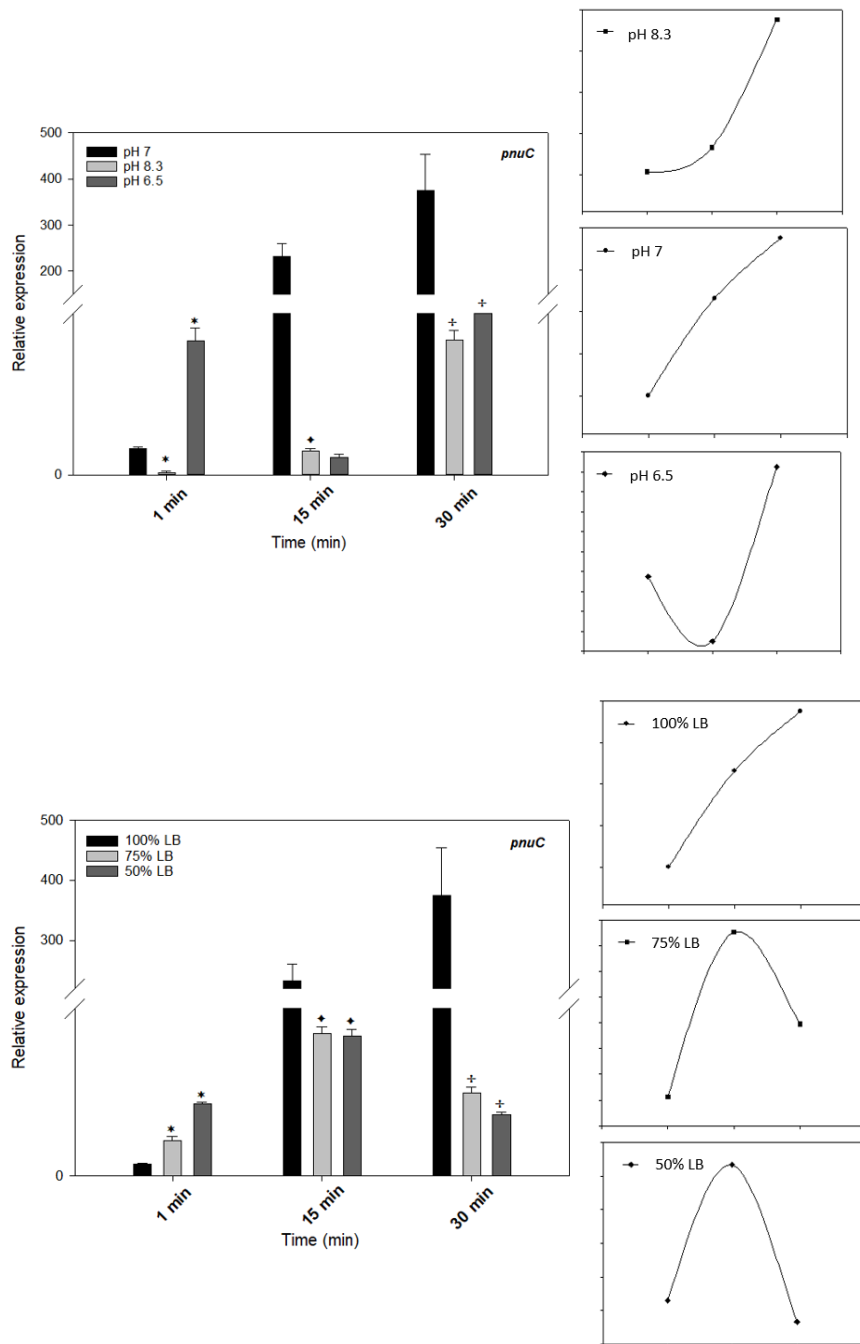
Εικόνα 35: Ίκός ρnuC μεταφορέας μονονουκλεοτιδίων νικοτιναμιδίου

Στις συνθήκες μάρτυρα (25°C, pH 7 & 100% LB) παρατηρείται αύξηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του μεταφορέα μονονουκλεοτιδίου του νικοτιναμιδίου (ρnuC) κατά 54-φορές στα 15 λεπτά και κατά 370-φορές στα 30 λεπτά με την πάροδο του χρόνου, με μέγιστη έκφραση στα 30 λεπτά. Στο pH 8,3 ενώ τα μεταγραφικά μοτίβα φαίνονται παρόμοια με το control pH 7, η στατιστική ανάλυση παρουσιάζει σημαντικές διαφορές. Αυτό υποδηλώνει ότι, παρά το κοινό μεταγραφικό μοτίβο, υπάρχουν διακριτά στατιστικά χαρακτηριστικά που τα διακρίνουν. Στις θερμοκρασίες 29°C και 32°C και στην περιεκτικότητα του θρεπτικού 75% και 50% παρατηρείται μέγιστη έκφραση του γονιδίου στα 15 λεπτά και έπειτα μείωση της έκφρασής του. Στο pH 6,5 η μέγιστη έκφραση του γονιδίου διακρίνεται στο χρονικό σημείο των 30 λεπτών. Ταυτόχρονα με αυτή τη μέγιστη έκφραση, παρατηρείται μείωση της έκφρασης του γονιδίου στο διάστημα των 15 λεπτών. Αυτό το διπλό χρονικό μοτίβο



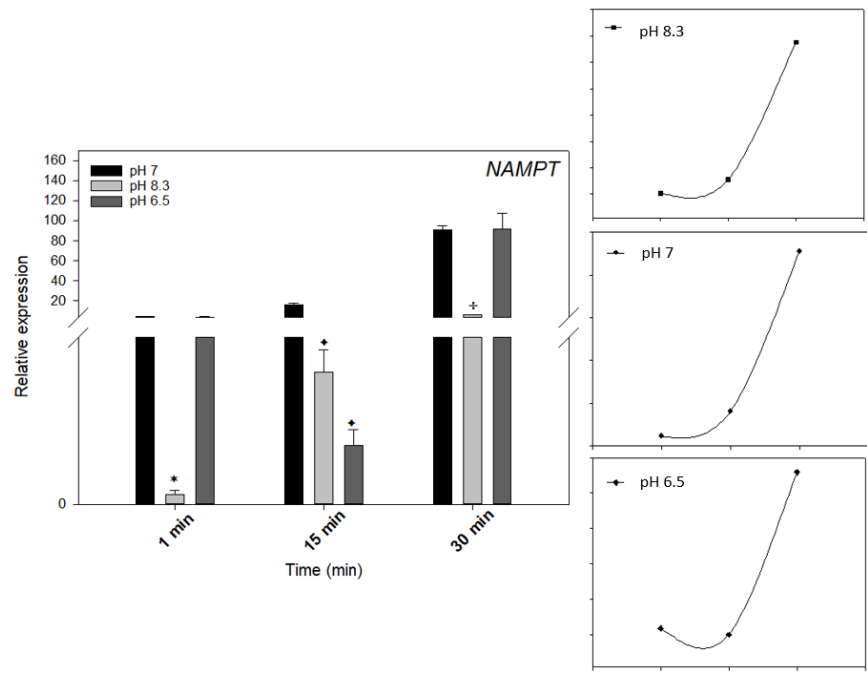
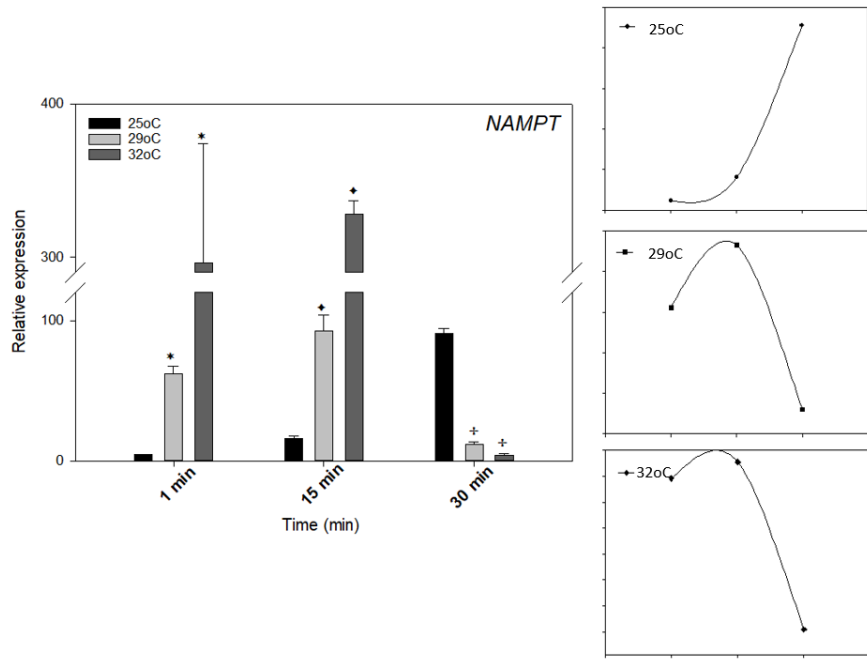
υποδηλώνει έναν δυναμικό και ενδεχομένως περίπλοκο ρυθμιστικό μηχανισμό που επηρεάζει τη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου σε όξινες συνθήκες.

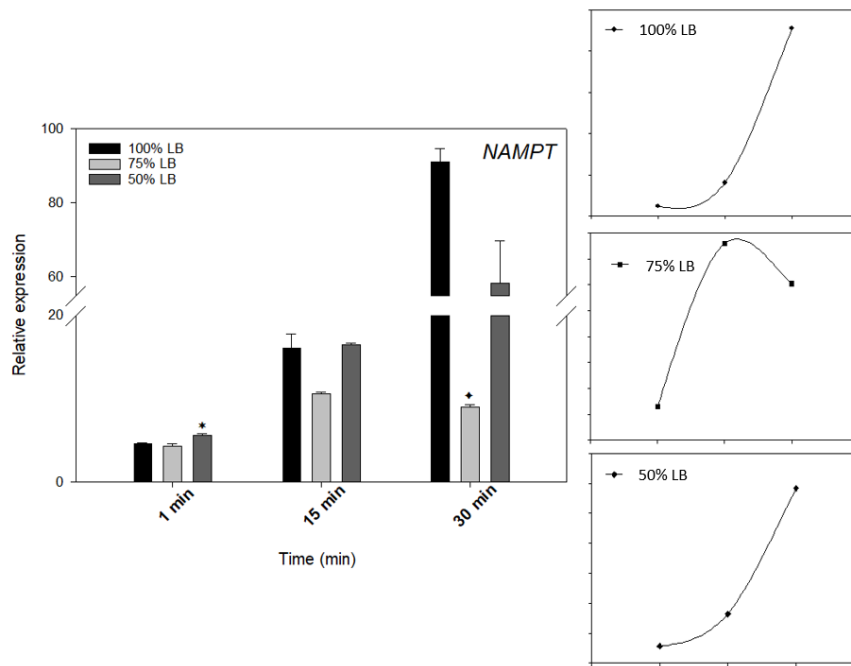




Εικόνα 36: Σχετικά επίπεδα έκφρασης και μεταγραφικά μοτίβα του γονιδίου *pnuC* ( $\pm$ SE) για τον φάγο  $\phi$ St2 στους 25 $^{\circ}$ C, 29 $^{\circ}$ C και 32 $^{\circ}$ C, στα pH 6.5, 7 και 8,3 και σε 100%, 75% και 50% LB. Οι αστερίσκοι συμβολίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους 25 $^{\circ}$ C και τις λοιπές θερμοκρασίες, στο pH 7 και τις λοιπές τιμές και στο 100% LB και τις λοιπές τιμές (t-test,  $p < 0.05$ )

Στις συνθήκες μάρτυρα (25 $^{\circ}$ C, pH 7 & 100% LB) παρατηρείται αύξηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης της φωσφορυβολμεταφοράσης του νικοταμιδίου (*NAMPT*) κατά 4-φορές στα 15 λεπτά και κατά 20-φορές στα 30 λεπτά με την πάροδο του χρόνου, με μέγιστη έκφραση στα 30 λεπτά. Στο pH 8,3 και 6,5 και στην περιεκτικότητα του θρεπτικού 50% τα μεταγραφικά μοτίβα φαίνονται παρόμοια με τις συνθήκες μάρτυρα. Στις θερμοκρασίες 29 $^{\circ}$ C και 32 $^{\circ}$ C και στην περιεκτικότητα του θρεπτικού 75% παρατηρείται μέγιστη έκφραση του γονιδίου στα 15 λεπτά και έπειτα μείωση της έκφρασής του.





Εικόνα 37: Σχετικά επίπεδα έκφρασης και μεταγραφικά μοτίβα του γονιδίου NAMPT ( $\pm$ SE) για τον φάγο  $\phi$ St2 στους 25 $^{\circ}$ C, 29 $^{\circ}$ C και 32 $^{\circ}$ C, στα pH 6.5, 7 και 8,3 και σε 100%, 75% και 50% LB. Οι αστερίσκοι συμβολίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους 25 $^{\circ}$ C και τις λοιπές θερμοκρασίες, στο pH 7 και τις λοιπές τιμές και στο 100% LB και τις λοιπές τιμές (t-test,  $p < 0.05$ )

## Συζήτηση

Είναι πλέον καλά εγκαθιδρυμένο ότι οι βακτηριοφάγοι αποτελούν μέρος του συνολικού μικροβιώματος σε ανώτερους πολυκύτταρους οργανισμούς, αλλά και σε φυσικά ενδιαιτήματα. Έχουν την ικανότητα να κατευθύνουν τους βακτηριακούς πληθυσμούς με φαινόμενα εξελικτικής πίεσης και συνεξέλιξης (Scanlan et al., 2009). Ο επαναπρογραμματισμός που εμφανίζεται λόγω της αλληλεπίδρασης φάγων και βακτηρίων έχει ήδη προταθεί σε θαλάσσια οικοσυστήματα (Hurwitz & U'Ren, 2016; Rosenwasser et al., 2016), ενώ ταυτόχρονα φαίνεται ότι αποτελούν και δυναμικό μέρος αυτών των οικοσυστημάτων (Middelboe & Brussaard, 2017). Γενικεύοντας αυτό το μοντέλο, φαίνεται ότι οι βακτηριοφάγοι αποτελούν «μοχλό» πίεσης ολόκληρων μεταβολικών διεργασιών των ξενιστών τους και μπορούν να κατευθύνουν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά σε μεγαλύτερη κλίμακα.

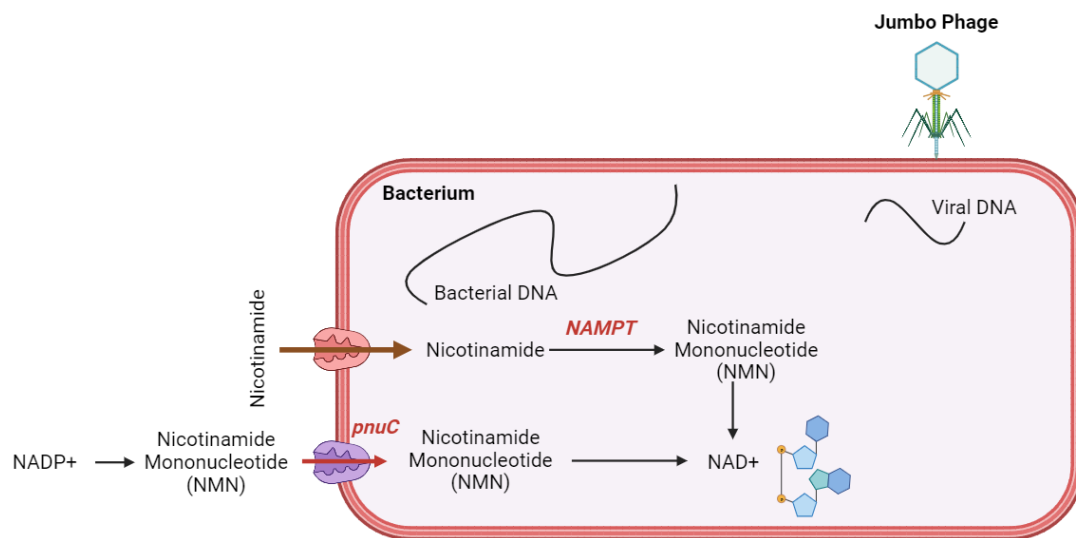
Η κλιματική αλλαγή έχει αναδειχθεί ως ένας κρίσιμος παράγοντας με σοβαρές επιπτώσεις στην περίπλοκη σχέση μεταξύ βακτηριοφάγων και βακτηρίων, τονίζοντας τη δυνατότητά της να ασκήσει σημαντικό αντίκτυπο στα οικολογικά συστήματα. Η αλληλεπίδραση μεταξύ βακτηριοφάγων και βακτηρίων αντιμετωπίζει σημαντικές μεταβολές λόγω των επιπτώσεων της κλιματικής αλλαγής. Αυτή η αλλαγή στις περιβαλλοντικές συνθήκες έχει τη δυνατότητα να αναδιαμορφώσει τα θεμελιώδη βιολογικά χαρακτηριστικά των λυτικών βακτηριοφάγων. Κατά συνέπεια, οι οικολογικές συνέπειες αυτών των αλλαγών θα μπορούσαν να διαπεράσουν τις μικροβιακές κοινότητες, επηρεάζοντας τη σύσταση και τη λειτουργία τους. Το περίπλοκο πλέγμα αλληλεπιδράσεων εντός αυτών των κοινοτήτων μπορεί να υποστεί διαταραχές, εισάγοντας ένα νέο επίπεδο πολυπλοκότητας στην κατανόηση της μικροβιακής οικολογίας στο πλαίσιο μιας ταχείας κλιματικής αλλαγής.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ βακτηριοφάγων και βακτηρίων επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το pH και η διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών. Αυτοί οι παράγοντες έχουν καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση της δυναμικής των αλληλεπιδράσεων φάγων-βακτηρίων στα μικροβιακά οικοσυστήματα. Οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας μπορούν να επηρεάσουν τον ρυθμό προσρόφησης του φάγου στους βακτηριακούς ξενιστές, τη λανθάνουσα περίοδο και το μέγεθος της έκρηξης, επηρεάζοντας έτσι τη συνολική αποτελεσματικότητα της μόλυνσης από τον φάγο. Τα επίπεδα pH, που αντικατοπτρίζουν την οξύτητα ή την αλκαλικότητα του περιβάλλοντος, μπορούν να επηρεάσουν τη σταθερότητα των φάγων και την ευαισθησία των βακτηριακών ξενιστών. Επιπλέον, η διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών επηρεάζει άμεσα τη μεταβολική κατάσταση των βακτηρίων, επηρεάζοντας κατά συνέπεια την ευαισθησία τους στη μόλυνση από τους φάγους και την επακόλουθη πορεία της αλληλεπίδρασης. Η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο αυτοί οι περιβαλλοντικοί παράγοντες διαμορφώνουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ φάγων και βακτηρίων είναι ζωτικής σημασίας για τη διαλεύκανση της πολυπλοκότητας των μικροβιακών οικοσυστημάτων.

Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση μεταξύ του *Vibrio alginolyticus*, ενός ευρέως διαδεδομένου βακτηριακού είδους στο θαλάσσιο περιβάλλον της Μεσογείου, και δύο λυτικών βακτηριοφάγων που ανήκουν στην κλάση Caudoviricetes. Και οι δύο βακτηριοφάγοι παρουσίαζαν ίδιο μορφότυπο, ωστόσο διέφεραν ως προς το μέγεθος του γονιδιώματος. Για να εξετάσουμε την προσαρμοστικότητά τους στις περιβαλλοντικές μεταβολές, υποβάλλαμε τους φάγους σε διαφορετικές θερμοκρασίες, επίπεδα pH και συνθήκες θρεπτικών συστατικών κατά τη διάρκεια μιας καμπύλης ανάπτυξης δύο σταδίων. Χρησιμοποιώντας αναλύσεις rt-qPCR, παρακολουθήσαμε στενά τα διαφορετικά πρότυπα

έκφρασης γονιδίων τόσο στο βακτήριο-ξενιστή όσο και στους φάγους. Τα ευρήματά μας εκτείνονται πέρα από το εργαστηριακό περιβάλλον, υποδηλώνοντας ένα πιθανό οικολογικό πλεονέκτημα για τους βακτηριοφάγους με μεγαλύτερα γονιδιώματα στα θαλάσσια ενδιαιτήματα. Καθώς η κλιματική αλλαγή συνεχίζει να διαμορφώνει τον πλανήτη μας, η προσαρμοστικότητα αυτών των φάγων θα μπορούσε να τους τοποθετήσει ευνοϊκά απέναντι στις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες. Η μελέτη αυτή προσφέρει έτσι πολύτιμες γνώσεις σχετικά με την περίπλοκη οικολογική δυναμική των θαλάσσιων βακτηριοφάγων, τονίζοντας ιδιαίτερα τον ρόλο των γονιδιωματικών χαρακτηριστικών στην ικανότητά τους να ευδοκίμουν εν μέσω μελλοντικών κλιματικών αλλαγών.

Οι μεγάλοι φάγοι έχουν επιδείξει αξιοσημείωτη προσαρμοστικότητα σε ένα φάσμα περιβαλλοντικών πεδίων, παρουσιάζοντας μια ευελιξία που τους κάνει να ξεχωρίζουν. Ο αντίκτυπος των αβιοτικών συνθηκών στον βακτηριακό μεταβολισμό εισάγει μια σημαντική διάσταση στην εξίσωση, καθώς οι συνθήκες αυτές έχουν την ικανότητα να επαναπρογραμματίζουν τις μεταβολικές οδούς των βακτηρίων, επηρεάζοντας κατά συνέπεια τις μεταγραφικές συνθήκες των φάγων. Στο πλαίσιο ισχυρών συνθηκών κλιματικής αλλαγής, υπάρχει αξιοσημείωτη πιθανότητα οι συνθήκες αυτές να ευνοήσουν την αυξημένη αφθονία των μεγάλων φάγων. Αυτό υποδηλώνει μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ περιβαλλοντικών παραγόντων, βακτηριακού μεταβολισμού και οικολογικής επικράτησης των μεγάλων φάγων, αναδεικνύοντας την ανάγκη συνολικής κατανόησης αυτών των δυναμικών ενόψει της αλλαγής του παγκόσμιου κλίματος.



Εικόνα 38: Σχηματική αναπαράσταση των βιοχημικών διεργασιών κατά τη διάρκεια της μόλυνσης του *V. alginolyticus* από τον βακτηριοφάγο φSt2.

Αυτή η μελέτη προωθεί το *Vibrio* sp. σαν μοντέλο μελέτης της αλληλεπίδρασης των Gram αρνητικών βακτηρίων με τους λυτικούς ιούς, ενώ ταυτόχρονα υπογραμμίζει και την ανάγκη περαιτέρω μελέτης των αλληλεπιδράσεων διαφορετικών βακτηριοφάγων (λυτικών/λυσιογονικών, ss/ds DNA/RNA, μικρών/μεγάλων) με αυτό σε αναμενόμενες περιβαλλοντικές αλλαγές. Τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσαν να συσχετιστούν σε ένα μεγαλύτερο πλαίσιο της βιολογία συστημάτων, αφού μελετώντας τις αλληλεπιδράσεις *in vitro* μπορούμε σιγά σιγά να κατανοήσουμε την οικολογία του συστήματος σε μεγάλη κλίμακα και πώς μπορούν οι βακτηριοφάγοι να κατευθύνουν μεταλλάξεις και μεταβολικούς

επαναπρογραμματισμούς στη φύση και επομένως τη διάθεση θρεπτικών σε οικοσυστήματα, ενδαιτήματα, αλλά και εντός πολυκύτταρων οργανισμών.

Τα τελευταία χρόνια η φαγική βιολογία βρίσκεται στο επίκεντρο της μικροβιακής βιοτεχνολογίας, λόγω της προσέγγισης που μπορούν να προσφέρουν οι βακτηριοφάγοι για τον βιολογικό έλεγχο παθογόνων βακτηρίων. Οι σύγχρονες ομικές προσεγγίσεις, έρχονται να συμπληρώσουν ερευνητικές εργασίες του παρελθόντος που αφορούν τη βασική έρευνα, γύρω από την βιολογία των βακτηριοφάγων, ενώ ταυτόχρονα ολοένα περισσότεροι βακτηριοφάγοι, απομονώνονται και χαρακτηρίζονται πλήρως ανά τον κόσμο, αυξάνοντας τις γνώσεις μας πάνω σε αυτούς.

Η αύξηση του ατμοσφαιρικού CO<sub>2</sub> προκαλεί αύξηση των θερμοκρασιών της ατμόσφαιρας και των ωκεανών, οι οποίες με τη σειρά τους οδηγούν στην άνοδο της στάθμης της θάλασσας, στην αύξηση της κατακόρυφης στρωμάτωσης, στην υποχώρηση των θαλάσσιων πάγων και στη μεταβολή των βροχοπτώσεων, της απορροής και των ανέμων. Η αύξηση της θερμοκρασίας και η μεταβαλλόμενη ροή των ωκεανών μειώνουν τις συγκεντρώσεις οξυγόνου στο υπέδαφος και η αύξηση του ατμοσφαιρικού CO<sub>2</sub> οδηγεί στην οξίνιση των ωκεανών. Οι μεταβολές του κλίματος και του CO<sub>2</sub> επηρεάζουν πολλά επίπεδα της βιολογικής οργάνωσης και λειτουργίας των ωκεανών (Abirami et al., 2021). Οι άμεσες θερμοκρασιακές και χημικές επιδράσεις μεταβάλλουν τη φυσιολογία και τη συμπεριφορά των οργανισμών, οδηγώντας σε επιπτώσεις σε επίπεδο πληθυσμών, όπως οι μετατοπίσεις των γεωγραφικών περιοχών προς τους πόλους, καθώς και οι αλλαγές στο μέγεθος του πληθυσμού, στους ρυθμούς αύξησης του πληθυσμού και στις εποχιακές διακυμάνσεις (Doney et al., 2012). Οι επιπτώσεις της κλιματικής αλλαγής σε επίπεδο κοινότητας προέρχονται από τη μεταβολή της φυσιολογίας που μεταφράζεται σε μεταβαλλόμενες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ειδών, όπως ο ανταγωνισμός, η βόσκηση, η θήρευση και οι ασθένειες. Οι διαδικασίες αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την αλλαγή της δομής και της ποικιλότητας της κοινότητας, συμπεριλαμβανομένης της εμφάνισης νέων οικοσυστημάτων. Η αύξηση του CO<sub>2</sub> και η κλιματική αλλαγή μπορεί να τροποποιήσουν τις συνολικές ιδιότητες των οικοσυστημάτων, όπως η τροφική δομή, η δυναμική των τροφικών πλεγμάτων και η συνολική λειτουργία, όπως οι ροές ενέργειας και υλικών και οι βιογεωχημικοί κύκλοι, επηρεάζοντας τελικά τις υπηρεσίες των οικοσυστημάτων από τις οποίες εξαρτώνται οι άνθρωποι και οι κοινωνίες (Doney et al., 2012; Fabry et al., 2008; Guinotte & Fabry, 2008; Pelejero et al., 2010).

Στο πεδίο της θαλάσσιας μικροβιακής οικολογίας, η μελέτη μας σχετικά με την αλληλεπίδραση μεταξύ του *Vibrio alginolyticus* και δύο διαφορετικών λυτικών βακτηριοφάγων, που χαρακτηρίζονται από διαφορετικά μεγέθη γονιδιώματος, αποκαλύπτει πολλά υποσχόμενους δρόμους για μελλοντική έρευνα. Η παρατηρούμενη προσαρμοστικότητα των βακτηριοφάγων με μεγαλύτερα γονιδιώματα όχι μόνο υποδηλώνει τη δυνητική οικολογική ανθεκτικότητά τους απέναντι στις κλιματικές αλλαγές, αλλά και ωθεί σε έρευνες για συγκεκριμένους μηχανισμούς που διέπουν την προσαρμοστικότητά τους (Breitbart et al., 2018; Hurwitz & U'Ren, 2016). Η διερεύνηση των ευρύτερων συνεπειών της προκαλούμενης από τους φαγούς βακτηριακής λύσης στη δυναμική των θαλάσσιων οικοσυστημάτων θα μπορούσε να αποφέρει πολύτιμες γνώσεις. Επιπλέον, η μελέτη ανοίγει την πόρτα σε πιθανές εφαρμογές στη θεραπεία με φάγους, καθώς η προσαρμοστικότητα αυτών των φάγων μπορεί να συμβάλει στην αποτελεσματικότητά τους υπό ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι μελλοντικές ερευνητικές προσπάθειες μπορεί να περιλαμβάνουν σε βάθος γονιδιωματικές αναλύσεις και λειτουργικές μελέτες για τον εντοπισμό βασικών γενετικών παραγόντων. Μελέτες διαχρονικού χαρακτήρα σε φυσικά

θαλάσσια περιβάλλοντα, ενσωματωμένες με μεταγονιδιαματικές προσεγγίσεις, θα εμπλουτίσουν περαιτέρω την κατανόηση των μικροβιακών αλληλεπιδράσεων με την πάροδο του χρόνου, προσφέροντας μια ολιστική προοπτική για τη δυναμική των θαλάσσιων οικοσυστημάτων στο πλαίσιο της κλιματικής αλλαγής.



## Βιβλιογραφία

- Abedon, S. T. (2011). Size does matter – distinguishing bacteriophages by genome length (and ‘breadth’). *Microbiology Australia*, 32(2), 95. <https://doi.org/10.1071/MA11095>
- Abirami, B., Radhakrishnan, M., Kumaran, S., & Wilson, A. (2021). Impacts of global warming on marine microbial communities. *The Science of the Total Environment*, 791, 147905. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147905>
- Ackermann, H. W. (2011). Bacteriophage taxonomy. *Microbiology Australia*, 32(2), 90. <https://doi.org/10.1071/MA11090>
- Adams, M. H. (1959). *Bacteriophages*.
- Almand, E. A., Moore, M. D., & Jaykus, L.-A. (2017). Virus-Bacteria Interactions: An Emerging Topic in Human Infection. *Viruses*, 9(3), 58. <https://doi.org/10.3390/v9030058>
- Alpert, P., Krichak, S. O., Shafir, H., Haim, D., & Osetinsky, I. (2008). Climatic trends to extremes employing regional modeling and statistical interpretation over the E. Mediterranean. *Global and Planetary Change*, 63(2–3), 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2008.03.003>
- Andersson, A., Meier, H. E. M., Ripszam, M., Rowe, O., Wikner, J., Haglund, P., Eilola, K., Legrand, C., Figueroa, D., Paczkowska, J., Lindehoff, E., Tysklind, M., & Elmgren, R. (2015). Projected future climate change and Baltic Sea ecosystem management. *AMBIO*, 44(S3), 345–356. <https://doi.org/10.1007/s13280-015-0654-8>
- Austin, B. (2010a). Vibrios as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology*, 140(3–4), 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.015>
- Austin, B. (2010b). Vibrios as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology*, 140(3–4), 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.015>
- Australian Academy of Science. (2021). *What is climate change?* Australian Academy of Science. <https://www.science.org.au/learning/general-audience/science-climate-change/1-what-is-climate-change>
- Baker-Austin, C., Trinanes, J., Gonzalez-Escalona, N., & Martinez-Urtaza, J. (2017). Non-Cholera Vibrios: The Microbial Barometer of Climate Change. *Trends in Microbiology*, 25(1), 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.008>
- Bertani, G. (2004). Lysogeny at Mid-Twentieth Century: P1, P2, and Other Experimental Systems. *Journal of Bacteriology*, 186(3), 595–600. <https://doi.org/10.1128/JB.186.3.595-600.2004>
- Béthoux, J. P., Morin, P., Chaumery, C., Connan, O., Gentili, B., & Ruiz-Pino, D. (1998). Nutrients in the Mediterranean Sea, mass balance and statistical analysis of concentrations with respect to environmental change. *Marine Chemistry*, 63(1–2), 155–169. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(98\)00059-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(98)00059-0)
- Bethoux, J. P., Morin, P., Madec, C., & Gentili, B. (1992). Phosphorus and nitrogen behaviour in the Mediterranean Sea. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 39(9), 1641–1654. [https://doi.org/10.1016/0198-0149\(92\)90053-V](https://doi.org/10.1016/0198-0149(92)90053-V)

- Bohannon, B. J. M., & Lenski, R. E. (2000). Linking genetic change to community evolution: insights from studies of bacteria and bacteriophage. *Ecol. Lett.*, *3*, 362–377.
- Bolger-Munro, M., Cheung, K., Fang, A., & Wang, L. (2013). T4 bacteriophage average burst size varies with *Escherichia coli* B23 cell culture age. *J Exp Microbiol Immunol*, *17*, 115–119.
- Bonnain, C., Breitbart, M., & Buck, K. N. (2016). The Ferrojan Horse Hypothesis: Iron-Virus Interactions in the Ocean. *Frontiers in Marine Science*, *3*.  
<https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00082>
- Brehm, T. T., Dupke, S., Hauk, G., Fickenscher, H., Rohde, H., & Berneking, L. (2021). Nicht-Cholera-Vibrionen – derzeit noch seltene, aber wachsende Infektionsgefahr in Nord- und Ostsee. *Der Internist*, *62*(8), 876–886. <https://doi.org/10.1007/s00108-021-01086-x>
- Breitbart, M., Bonnain, C., Malki, K., & Sawaya, N. A. (2018). Phage puppet masters of the marine microbial realm. *Nature Microbiology*, *3*(7), 754–766.  
<https://doi.org/10.1038/s41564-018-0166-y>
- Brian Austin, & Dawn A. Austin. (2016). *Bacterial Fish Pathogens*.
- Bricaud, A., Bosc, E., & Antoine, D. (2002). Algal biomass and sea surface temperature in the Mediterranean Basin. *Remote Sensing of Environment*, *81*(2–3), 163–178.  
[https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(01\)00335-2](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(01)00335-2)
- Brohan, P., Kennedy, J. J., Harris, I., Tett, S. F. B., & Jones, P. D. (2006). Uncertainty estimates in regional and global observed temperature changes: A new data set from 1850. *Journal of Geophysical Research*, *111*(D12), D12106.  
<https://doi.org/10.1029/2005JD006548>
- Brunetti, M., Buffoni, L., Mangianti, F., Maugeri, M., & Nanni, T. (2004). Temperature, precipitation and extreme events during the last century in Italy. *Global and Planetary Change*, *40*(1–2), 141–149. [https://doi.org/10.1016/S0921-8181\(03\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S0921-8181(03)00104-8)
- Burton, D. R., Stanfield, R. L., & Wilson, I. A. (2005). Antibody vs. HIV in a clash of evolutionary titans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(42), 14943–14948. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505126102>
- Byrne, M., & Przeslawski, R. (2013). Multistressor Impacts of Warming and Acidification of the Ocean on Marine Invertebrates' Life Histories. *Integrative and Comparative Biology*, *53*(4), 582–596. <https://doi.org/10.1093/icb/ict049>
- Campbell, A. (1988). Phage Evolution and Speciation. In *The Bacteriophages* (pp. 1–14). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5424-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5424-6_1)
- Camuffo, D., Bertolin, C., Barriendos, M., Dominguez-Castro, F., Cocheo, C., Enzi, S., Sghedoni, M., della Valle, A., Garnier, E., Alcoforado, M.-J., Xoplaki, E., Luterbacher, J., Diodato, N., Maugeri, M., Nunes, M. F., & Rodriguez, R. (2010). 500-year temperature reconstruction in the Mediterranean Basin by means of documentary data and instrumental observations. *Climatic Change*, *101*(1–2), 169–199.  
<https://doi.org/10.1007/s10584-010-9815-8>

- Castillo, D., D'Alvise, P., Kalatzis, P. G., Kokkari, C., Middelboe, M., Gram, L., Liu, S., & Katharios, P. (2015). Draft Genome Sequences of *Vibrio alginolyticus* Strains V1 and V2, Opportunistic Marine Pathogens. *Genome Announcements*, 3(4).  
<https://doi.org/10.1128/genomeA.00729-15>
- Cavicchioli, R., Ripple, W. J., Timmis, K. N., Azam, F., Bakken, L. R., Baylis, M., Behrenfeld, M. J., Boetius, A., Boyd, P. W., Classen, A. T., Crowther, T. W., Danovaro, R., Foreman, C. M., Huisman, J., Hutchins, D. A., Jansson, J. K., Karl, D. M., Koskella, B., Mark Welch, D. B., ... Webster, N. S. (2019). Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nature Reviews Microbiology*, 17(9), 569–586.  
<https://doi.org/10.1038/s41579-019-0222-5>
- Chevallereau, A., Blasdel, B. G., De Smet, J., Monot, M., Zimmermann, M., Kogadeeva, M., Sauer, U., Jorth, P., Whiteley, M., Debarbieux, L., & Lavigne, R. (2016). Next-Generation “-omics” Approaches Reveal a Massive Alteration of Host RNA Metabolism during Bacteriophage Infection of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS Genetics*, 12(7), e1006134.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006134>
- Chu, C., Do, Y., Kim, Y., Saito, Y., Lee, S.-D., Park, H., & Lee, J.-K. (2011). Mathematical Modeling of *Vibrio vulnificus* Infection in Korea and the Influence of Global Warming. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 2(1), 51–58.  
<https://doi.org/10.1016/j.phrp.2011.05.002>
- Civitaresse, G., Gačić, M., Lipizer, M., & Eusebi Borzelli, G. L. (2010). On the impact of the Bimodal Oscillating System (BiOS) on the biogeochemistry and biology of the Adriatic and Ionian Seas (Eastern Mediterranean). *Biogeosciences*, 7(12), 3987–3997.  
<https://doi.org/10.5194/bg-7-3987-2010>
- Clokie, M. R. J., Millard, A. D., Letarov, A. V., & Heaphy, S. (2011a). Phages in nature. *Bacteriophage*, 1(1), 31–45. <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14942>
- Clokie, M. R. J., Millard, A. D., Letarov, A. V., & Heaphy, S. (2011b). Phages in nature. *Bacteriophage*, 1(1), 31–45. <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14942>
- Collins, M., Knutti, R., Arblaster, J., Dufresne, J.-L., Fichet, T., Friedlingstein, P., Gao, X., Gutowski, W. J., Johns, T., Krinner, G., Shongwe, M., Tebaldi, C., Weaver, A. J., Wehner, M., Allen, M. R., Andrews, T., Beyerle, U., Bitz, C. M., Bony, S., ... Zickfeld, K. (2013). *Long-term climate change: Projections, commitments and irreversibility* (IPCC, Ed.). Cambridge University Press. <https://pure.iiasa.ac.at/id/eprint/10551/>
- Copernicus. (2023). *Sea surface temperature | Copernicus*.  
<https://climate.copernicus.eu/climate-indicators/sea-surface-temperature>
- Covazzi Harriague, A., Brino, M. Di, Zampini, M., Albertelli, G., Pruzzo, C., & Misic, C. (2008). Vibrios in association with sedimentary crustaceans in three beaches of the northern Adriatic Sea (Italy). *Marine Pollution Bulletin*, 56(3), 574–579.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.12.011>
- Cui, J., Schlub, T. E., & Holmes, E. C. (2014). An Allometric Relationship between the Genome Length and Virion Volume of Viruses. *Journal of Virology*, 88(11), 6403–6410.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.00362-14>

- Cunha, A., Almeida, A., Coelho, F. J. R. C., Gomes, N. C. M., Oliveira, V., & Santos, A. L. (2010). Bacterial Extracellular Enzymatic Activity in Globally Changing Aquatic Ecosystems. In *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* (Vol. 1).
- De Smet, J., Hendrix, H., Blasdel, B. G., Danis-Wlodarczyk, K., & Lavigne, R. (2017). *Pseudomonas* predators: understanding and exploiting phage–host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, *15*(9), 517–530. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.61>
- d’Herelle, F. (1917). An invisible microbe that is antagonistic to the dysentery bacillus. *CR Acad Sci*, *165*, 373-375.
- Doney, S. C., Ruckelshaus, M., Emmett Duffy, J., Barry, J. P., Chan, F., English, C. A., Galindo, H. M., Grebmeier, J. M., Hollowed, A. B., Knowlton, N., Polovina, J., Rabalais, N. N., Sydeman, W. J., & Talley, L. D. (2012). Climate Change Impacts on Marine Ecosystems. *Annual Review of Marine Science*, *4*(1), 11–37. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-041911-111611>
- Doss, J., Culbertson, K., Hahn, D., Camacho, J., & Berekzi, N. (2017). A Review of Phage Therapy against Bacterial Pathogens of Aquatic and Terrestrial Organisms. *Viruses*, *9*(3), 50. <https://doi.org/10.3390/v9030050>
- Edgar, R., Friedman, N., Molshanski-Mor, S., & Qimron, U. (2012). Reversing Bacterial Resistance to Antibiotics by Phage-Mediated Delivery of Dominant Sensitive Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(3), 744–751. <https://doi.org/10.1128/AEM.05741-11>
- Fabry, V. J., Seibel, B. A., Feely, R. A., & Orr, J. C. (2008). Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES Journal of Marine Science*, *65*(3), 414–432. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsn048>
- Favrin, S. J., Jassim, S. A., & Griffiths, M. W. (2001). Development and Optimization of a Novel Immunomagnetic Separation- Bacteriophage Assay for Detection of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis in Broth. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(1), 217–224. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.217-224.2001>
- Folland, C. K. (2002). Relative influences of the Interdecadal Pacific Oscillation and ENSO on the South Pacific Convergence Zone. *Geophysical Research Letters*, *29*(13), 1643. <https://doi.org/10.1029/2001GL014201>
- Grimes, D. J., Johnson, C. N., Dillon, K. S., Flowers, A. R., Noriega, N. F., & Berutti, T. (2009). What Genomic Sequence Information Has Revealed About *Vibrio* Ecology in the Ocean—A Review. *Microbial Ecology*, *58*(3), 447–460. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9578-9>
- Guinotte, J. M., & Fabry, V. J. (2008). Ocean Acidification and Its Potential Effects on Marine Ecosystems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1134*(1), 320–342. <https://doi.org/10.1196/annals.1439.013>
- Hampton, H. G., Watson, B. N. J., & Fineran, P. C. (2020). The arms race between bacteria and their phage foes. *Nature*, *577*(7790), 327–336. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1894-8>

- Hansen, J., Sato, M., Ruedy, R., Lo, K., Lea, D. W., & Medina-Elizade, M. (2006). Global temperature change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(39), 14288–14293. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606291103>
- Hasan, N. A., Grim, C. J., Lipp, E. K., Rivera, I. N. G., Chun, J., Haley, B. J., Taviani, E., Choi, S. Y., Hoq, M., Munk, A. C., Brettin, T. S., Bruce, D., Challacombe, J. F., Detter, J. C., Han, C. S., Eisen, J. A., Huq, A., & Colwell, R. R. (2015). Deep-sea hydrothermal vent bacteria related to human pathogenic *Vibrio* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(21). <https://doi.org/10.1073/pnas.1503928112>
- Hatfull, G. F. (2008a). Bacteriophage genomics. *Current Opinion in Microbiology*, *11*(5), 447–453. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.004>
- Hatfull, G. F. (2008b). Bacteriophage genomics. *Current Opinion in Microbiology*, *11*(5), 447–453. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.004>
- Hatfull, G. F., & Hendrix, R. W. (2011). Bacteriophages and their genomes. *Current Opinion in Virology*, *1*(4), 298–303. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.06.009>
- Hertveldt, K., Lavigne, R., Pleteneva, E., Sernova, N., Kurochkina, L., Korchevskii, R., Robben, J., Mesyanzhinov, V., Krylov, V. N., & Volckaert, G. (2005). Genome Comparison of *Pseudomonas aeruginosa* Large Phages. *Journal of Molecular Biology*, *354*(3), 536–545. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.08.075>
- Hibma, A. (1997). Infection and removal of L-forms of *Listeria monocytogenes* with bred bacteriophage. *International Journal of Food Microbiology*, *34*(3), 197–207. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01190-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01190-7)
- Holt, R. D. (1977). Predation, apparent competition, and structure of prey communities. *Theor. Pop. Biol.*, *12*, 197–229.
- Holt, R. D. (1995). Community modules. In: *Multitrophic Interaction in Terrestrial Systems*. Oxford: Blackwell, 333–350.
- Holt, R. D., Grover, J., & Tilman, D. (1994). Simple rules for interspecific dominance in systems with exploitative and apparent competition. *Am. Nat.* .
- Hunter-Cevera, J., Karl, D., & Buckley, M. (2005). *Marine Microbial Diversity: The Key to Earth's Habitability: This report is based on a colloquium, sponsored by the American Academy of Microbiology, held April 8–10, 2005, in San Francisco, California*. American Society for Microbiology. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559439/>
- Hurwitz, B. L., & U'Ren, J. M. (2016). Viral metabolic reprogramming in marine ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, *31*, 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.04.002>
- IPCC. (2022). *IPCC — Intergovernmental Panel on Climate Change*. IPCC. <https://www.ipcc.ch/>
- Jassim, S. A. A., Abdulmir, A. S., & Abu Bakar, F. (2012). Novel phage-based bio-processing of pathogenic *Escherichia coli* and its biofilms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*(1), 47–60. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0791-6>

- Jassim, S. A. A., & Griffiths, M. W. (2007). Evaluation of a rapid microbial detection method via phage lytic amplification assay coupled with Live/Dead fluorochromic stains. *Letters in Applied Microbiology*, *44*(6), 673–678. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02115.x>
- Jassim, S. A. A., & Limoges, R. G. (2013). Impact of external forces on cyanophage–host interactions in aquatic ecosystems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *29*(10), 1751–1762. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1358-5>
- Jones, J. B., Jackson, L. E., Balogh, B., Obradovic, A., Iriarte, F. B., & Momol, M. T. (2007). Bacteriophages for Plant Disease Control. *Annual Review of Phytopathology*, *45*(1), 245–262. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094411>
- Jover, L. F., Effler, T. C., Buchan, A., Wilhelm, S. W., & Weitz, J. S. (2014). The elemental composition of virus particles: implications for marine biogeochemical cycles. *Nature Reviews Microbiology*, *12*(7), 519–528. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3289>
- Kalatzis, P. G., Bastías, R., Kokkari, C., & Katharios, P. (2016). Isolation and Characterization of Two Lytic Bacteriophages,  $\phi$ St2 and  $\phi$ Grn1; Phage Therapy Application for Biological Control of *Vibrio alginolyticus* in Aquaculture Live Feeds. *PLOS ONE*, *11*(3), e0151101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151101>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, *28*(12), 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Kim, J., & Chun, B. C. (2021). Effect of Seawater Temperature Increase on the Occurrence of Coastal *Vibrio vulnificus* Cases: Korean National Surveillance Data from 2003 to 2016. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(9), 4439. <https://doi.org/10.3390/ijerph18094439>
- Komorniczak, M. (2009). *Bacterial growth curve*.
- Koonin, E. V., Makarova, K. S., & Wolf, Y. I. (2017). Evolutionary Genomics of Defense Systems in Archaea and Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, *71*(1), 233–261. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093830>
- Kroeker, K. J., Kordas, R. L., Crim, R., Hendriks, I. E., Ramajo, L., Singh, G. S., Duarte, C. M., & Gattuso, J. (2013). Impacts of ocean acidification on marine organisms: quantifying sensitivities and interaction with warming. *Global Change Biology*, *19*(6), 1884–1896. <https://doi.org/10.1111/gcb.12179>
- Krupovic, M., Prangishvili, D., Hendrix, R. W., & Bamford, D. H. (2011). Genomics of Bacterial and Archaeal Viruses: Dynamics within the Prokaryotic Virosphere. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *75*(4), 610–635. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00011-11>
- Kustus, R. J., Kuehl, C. J., & Crosa, J. H. (2011). Power plays: iron transport and energy transduction in pathogenic vibrios. *BioMetals*, *24*(3), 559–566. <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9437-2>

- Lee, J.-K., Jung, D.-W., Eom, S.-Y., Oh, S.-W., Kim, Y., Kwak, H.-S., & Kim, Y.-H. (2008). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters from Korean retail outlets. *Food Control*, *19*(10), 990–994. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.10.006>
- Lee, K., Han, J. H., Park, Y., Colas des Francs-Small, C., Small, I., & Kang, H. (2017). The mitochondrial pentatricopeptide repeat protein <scp>PPR</scp> 19 is involved in the stabilization of *NADH dehydrogenase 1* transcripts and is crucial for mitochondrial function and *Arabidopsis thaliana* development. *New Phytologist*, *215*(1), 202–216. <https://doi.org/10.1111/nph.14528>
- Lefkowitz, E. J., Dempsey, D. M., Hendrickson, R. C., Orton, R. J., Siddell, S. G., & Smith, D. B. (2018). Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Research*, *46*(D1), D708–D717. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx932>
- Leibold, M. A. (1996). A graphical model of keystone predators in food webs: trophic regulation of abundance, incidence, and diversity patterns in communities. *Am. Nat.*, *147*, 784–812.
- Luke, K., Radek, A., Liu, X., Campbell, J., Uzan, M., Haselkorn, R., & Kogan, Y. (2002). Microarray Analysis of Gene Expression during Bacteriophage T4 Infection. *Virology*, *299*(2), 182–191. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1409>
- MacFadden, D. R., McGough, S. F., Fisman, D., Santillana, M., & Brownstein, J. S. (2018). Antibiotic resistance increases with local temperature. *Nature Climate Change*, *8*(6), 510–514. <https://doi.org/10.1038/s41558-018-0161-6>
- Madigan, M. T., Clark, D. P., Stahl, D., & Martinko, J. M. (2010). *Brock biology of microorganisms 13th edition*. Benjamin Cummings.
- Malanotte-Rizzoli, P., Manca, B. B., D'Alcalà, M. R., Theocharis, A., Bergamasco, A., Bregant, D., Budillon, G., Civitarese, G., Georgopoulos, D., Michelato, A., Sansone, E., Scarazzato, P., & Souvermezoglou, E. (1997). A synthesis of the Ionian Sea hydrography, circulation and water mass pathways during POEM-Phase I. *Progress in Oceanography*, *39*(3), 153–204. [https://doi.org/10.1016/S0079-6611\(97\)00013-X](https://doi.org/10.1016/S0079-6611(97)00013-X)
- Marras, S., Cucco, A., Antognarelli, F., Azzurro, E., Milazzo, M., Bariche, M., Butenschön, M., Kay, S., Di Bitetto, M., Quattrocchi, G., Sinerchia, M., & Domenici, P. (2015). Predicting future thermal habitat suitability of competing native and invasive fish species: from metabolic scope to oceanographic modelling. *Conservation Physiology*, *3*(1), cou059. <https://doi.org/10.1093/conphys/cou059>
- Middelboe, M., & Brussaard, C. (2017). Marine Viruses: Key Players in Marine Ecosystems. *Viruses*, *9*(10), 302. <https://doi.org/10.3390/v9100302>
- Miller, E. S., Heidelberg, J. F., Eisen, J. A., Nelson, W. C., Durkin, A. S., Ciecko, A., Feldblyum, T. V., White, O., Paulsen, I. T., Nierman, W. C., Lee, J., Szczypinski, B., & Fraser, C. M. (2003). Complete Genome Sequence of the Broad-Host-Range Vibriophage KVP40: Comparative Genomics of a T4-Related Bacteriophage. *Journal of Bacteriology*, *185*(17), 5220–5233. <https://doi.org/10.1128/JB.185.17.5220-5233.2003>
- Montánchez, I., & Kaberdin, V. R. (2020). *Vibrio harveyi*: A brief survey of general characteristics and recent epidemiological traits associated with climate change.

- Marine Environmental Research*, 154, 104850.  
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.104850>
- NASA. (2017). *What's the difference between climate change and global warming? – Climate Change: Vital Signs of the Planet*. <https://climate.nasa.gov/faq/12/whats-the-difference-between-climate-change-and-global-warming/>
- Newton, A. E., Garrett, N., Stroika, S. G., Halpin, J. L., Turnsek, M., Mody, R. K., & Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2014). Increase in *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with consumption of Atlantic Coast shellfish--2013. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 63(15), 335–336.
- Oliver, J. D. (2013). *Vibrio vulnificus*: Death on the Half Shell. A Personal Journey with the Pathogen and its Ecology. *Microbial Ecology*, 65(4), 793–799.  
<https://doi.org/10.1007/s00248-012-0140-9>
- Parmar, P., Shukla, A., Goswami, D., Gaur, S., Patel, B., & Saraf, M. (2020). Comprehensive depiction of novel heavy metal tolerant and EPS producing bioluminescent *Vibrio alginolyticus* PBR1 and *V. rotiferianus* PBL1 confined from marine organisms. *Microbiological Research*, 238, 126526. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126526>
- Pelejero, C., Calvo, E., & Hoegh-Guldberg, O. (2010). Paleo-perspectives on ocean acidification. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6), 332–344.  
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.02.002>
- Polz, M. F., Hunt, D. E., Preheim, S. P., & Weinreich, D. M. (2006). Patterns and mechanisms of genetic and phenotypic differentiation in marine microbes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1475), 2009–2021.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1928>
- Powley, H. R., Krom, M. D., & Van Cappellen, P. (2017). Understanding the unique biogeochemistry of the Mediterranean Sea: Insights from a coupled phosphorus and nitrogen model. *Global Biogeochemical Cycles*, 31(6), 1010–1031.  
<https://doi.org/10.1002/2017GB005648>
- Pradeep Ram, A. S., & Sime-Ngando, T. (2010). Resources drive trade-off between viral lifestyles in the plankton: evidence from freshwater microbial microcosms. *Environmental Microbiology*, 12(2), 467–479. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02088.x>
- Pruzzo, C., Huq, A., Colwell, R. R., & Donelli, G. (n.d.). Pathogenic *Vibrio* Species in the Marine and Estuarine Environment. In *Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment* (pp. 217–252). Springer US. [https://doi.org/10.1007/0-387-23709-7\\_9](https://doi.org/10.1007/0-387-23709-7_9)
- Repapis, C. C., & Philandras, C. M. (1988). A note on the air temperature trends of the last 100 years as evidenced in the eastern Mediterranean time series. *Theoretical and Applied Climatology*, 39(2), 93–97. <https://doi.org/10.1007/BF00866394>
- Rosenwasser, S., Ziv, C., Creveld, S. G. van, & Vardi, A. (2016). Virocell Metabolism: Metabolic Innovations During Host–Virus Interactions in the Ocean. *Trends in Microbiology*, 24(10), 821–832. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.006>



- Sabine, C. L., Feely, R. A., Gruber, N., Key, R. M., Lee, K., Bullister, J. L., Wanninkhof, R., Wong, C. S., Wallace, D. W. R., Tilbrook, B., Millero, F. J., Peng, T.-H., Kozyr, A., Ono, T., & Rios, A. F. (2004). The Oceanic Sink for Anthropogenic CO<sub>2</sub>. *Science*, *305*(5682), 367–371. <https://doi.org/10.1126/science.1097403>
- Samsygina, G. A., & Boni, E. G. (1984). Bakteriofagi i fagoterapiia v pediatricheskoj praktike [Bacteriophages and phage therapy in pediatric practice]. *Pediatrriia*.
- Sawabe, T., Kita-Tsukamoto, K., & Thompson, F. L. (2007). Inferring the Evolutionary History of Vibrios by Means of Multilocus Sequence Analysis. *Journal of Bacteriology*, *189*(21), 7932–7936. <https://doi.org/10.1128/JB.00693-07>
- Sawabe, T., Ogura, Y., Matsumura, Y., Feng, G., Amin, A. R., Mino, S., Nakagawa, S., Sawabe, T., Kumar, R., Fukui, Y., Satomi, M., Matsushima, R., Thompson, F. L., Gomez-Gil, B., Christen, R., Maruyama, F., Kurokawa, K., & Hayashi, T. (2013). Updating the Vibrio clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. *Frontiers in Microbiology*, *4*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00414>
- Scanlan, D. J., Ostrowski, M., Mazard, S., Dufresne, A., Garczarek, L., Hess, W. R., Post, A. F., Hagemann, M., Paulsen, I., & Partensky, F. (2009). Ecological Genomics of Marine Picocyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *73*(2), 249–299. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00035-08>
- Scott, M. (2021). *LAST CHANCE VIRAL PHAGE THERAPY : the natural alternative to antibiotics*. Books On Demand.
- Sime-Ngando, T. (2014). Environmental bacteriophages: viruses of microbes in aquatic ecosystems. *Frontiers in Microbiology*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00355>
- Siokou-Frangou, I., Christaki, U., Mazzocchi, M. G., Montresor, M., Ribera d'Alcalá, M., Vaqué, D., & Zingone, A. (2010). Plankton in the open Mediterranean Sea: a review. *Biogeosciences*, *7*(5), 1543–1586. <https://doi.org/10.5194/bg-7-1543-2010>
- Skliros, D., Kalatzis, P. G., Katharios, P., & Flemetakis, E. (2016). Comparative Functional Genomic Analysis of Two Vibrio Phages Reveals Complex Metabolic Interactions with the Host Cell. *Frontiers in Microbiology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01807>
- Skliros, D., Karpouzis, E., Kalloniati, C., Katharios, P., & Flemetakis, E. (2022). Comparative genomic analysis of dwarf Vibrio myoviruses defines a conserved gene cluster for successful phage infection. *Archives of Virology*, *167*(2), 501–516. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05340-3>
- Stewart, Jassim, Denyer, Newby, Linley, & Dhir. (1998). The specific and sensitive detection of bacterial pathogens within 4 h using bacteriophage amplification. *Journal of Applied Microbiology*, *84*(5), 777–783. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00408.x>
- Stewart, P. L., Ghosh, S., Bamford, D. H., & Burnett, R. M. (1993). Crystallization of the Major Coat Protein of PRD1, a Bacteriophage with an Internal Membrane. *Journal of Molecular Biology*, *230*(1), 349–352. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1148>
- Summers, W. C. (1999). *The hope of phage therapy. Felix d'Herelle and the Origins of Molecular Biology*.

- Takemura, A. F., Chien, D. M., & Polz, M. F. (2014). Associations and dynamics of Vibrionaceae in the environment, from the genus to the population level. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00038>
- Thompson, F. L., Iida, T., & Swings, J. (2004). Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), 403–431. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.403-431.2004>
- Touratier, F., & Goyet, C. (2009). Decadal evolution of anthropogenic CO<sub>2</sub> in the northwestern Mediterranean Sea from the mid-1990s to the mid-2000s. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 56(10), 1708–1716. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2009.05.015>
- Turley, C. M. (1999). The changing Mediterranean Sea — a sensitive ecosystem? *Progress in Oceanography*, 44(1–3), 387–400. [https://doi.org/10.1016/S0079-6611\(99\)00033-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6611(99)00033-6)
- Turner, J. W., Good, B., Cole, D., & Lipp, E. K. (2009). Plankton composition and environmental factors contribute to Vibrio seasonality. *The ISME Journal*, 3(9), 1082–1092. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.50>
- Twort, F. W. (1915). *An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses*.
- Ulitzur, S. (1975). The mechanism of swarming of *Vibrio alginolyticus*. *Archives of Microbiology*, 104(1), 67–71. <https://doi.org/10.1007/BF00447301>
- van Helvoort, T. (1992). Bacteriological and physiological research styles in the early controversy on the nature of the bacteriophage phenomenon. *Medical History*, 36(3), 243–270. <https://doi.org/10.1017/S0025727300055265>
- Verheust, C., Pauwels, K., Mahillon, J., Helinski, D. R., & Herman, P. (2010). Contained use of Bacteriophages: Risk Assessment and Biosafety Recommendations. *Applied Biosafety*, 15(1), 32–44. <https://doi.org/10.1177/153567601001500106>
- W. M. Hassan, S., Abd-ElNaby, H., M. Abou-Elala, G., E. Abouelwafa, A., & A. El-Sersy, N. (2020). Bacteriophages: Ecological role in the marine environment and potential applications. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 24(7), 93–117. <https://doi.org/10.21608/ejabf.2020.119131>
- Wang, J., Ding, Q., Yang, Q., Fan, H., Yu, G., Liu, F., Bello, B. K., Zhang, X., Zhang, T., Dong, J., Liu, G., & Zhao, P. (2021). *Vibrio alginolyticus* Triggers Inflammatory Response in Mouse Peritoneal Macrophages via Activation of NLRP3 Inflammasome. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.769777>
- Wommack, K. E., & Colwell, R. R. (2000). Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 69–114. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.1.69-114.2000>
- Yin, W.-L., Zhang, N., Xu, H., Gong, X.-X., Long, H., Ren, W., Zhang, X., Cai, X.-N., Huang, A.-Y., & Xie, Z.-Y. (2021). Stress adaptation and virulence in *Vibrio alginolyticus* is mediated by two (p)ppGpp synthetase genes, *relA* and *spoT*. *Microbiological Research*, 253, 126883. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126883>
- Yuan, Y., & Gao, M. (2017). Jumbo Bacteriophages: An Overview. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00403>

- Zaccone, R., Azzaro, M., Azzaro, F., Caruso, G., Caroppo, C., Decembrini, F., Diociaiuti, T., Fonda Umani, S., Leonardi, M., Maimone, G., Monticelli, L. S., Paranhos, R., Placenti, F., Cuttitta, A., Patti, B., & La Ferla, R. (2018). Trophic structure and microbial activity in a spawning area of *Engraulis encrasicolus*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *207*, 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2018.04.008>
- Zaccone, R., & Caruso, G. (2019). Microbial enzymes in the Mediterranean Sea: relationship with climate changes. *AIMS Microbiology*, *5*(3), 251–272. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2019.3.251>
- Zhang, N., Zhang, S., Ren, W., Gong, X., Long, H., Zhang, X., Cai, X., Huang, A., & Xie, Z. (2021). Roles of rpoN in biofilm formation of *Vibrio alginolyticus* HN08155 at different cell densities. *Microbiological Research*, *247*, 126728. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126728>
- Zhu, Y., Shang, J., Peng, C., & Sun, Y. (2022). Phage family classification under Caudoviricetes: a review of current tools using the latest ICTV classification framework. *ArXiv:2209.01942 [q-Bio]*. <https://arxiv.org/abs/2209.01942>