

Nýsköpun & neytendur
Innovation & Consumers

Vinnsla, virðisaukning & eldi
Value Chain, Processing
& Aquaculture

Mælingar & miðlun
Analysis & Consulting

Líftækni & lífefni
Biotechnology & Biomolecules

Öryggi, umhverfi & erfðir
Food Safety, Environment
& Genetics



Fjölbreytileiki örvera á Íslandsmiðum

Eyjólfur Reynisson
Sveinn H. Magnússon
Eyjólfur Reynisson
Árni Rafn Rúnarsson
Kristinn Guðmundsson
Erla Björk Örnólfsdóttir
Viggó Þór Marteinnsson

Öryggi, umhverfi og erfðir

Skýrsla Matís 47-11
Desember 2011

ISSN 1670-7192

Report closed until 01.01.2014

Fjölbreytileiki örvera á Íslandsmiðum / Microbial diversity in the Icelandic fishing grounds

Verkefnasjóður Sjávarútvegsins

30. desember 2011

Höfundar:

Eyjólfur Reynisson¹
Sveinn Haukur Magnússon¹
Árni Rafn Rúnarsson¹
Kristinn Guðmundsson²
Erla Björk Örnólfsdóttir³
Viggó Þór Marteinsson¹

¹ Matís ohf

² Hafrannsóknarstofnunin

³ Vör, Sjávarrannsóknarsetrið við Breiðafjörð



HAFRANNSÓKNASTOFNUNIN



Titill / Title	Fjölbreytileiki örvera á Íslandsmiðum / Microbial diversity in the Icelandic fishing grounds		
Höfundar / Authors	Eyjólfur Reynisson, Sveinn Haukur Magnússon, Árni Rafn Rúnarsson, Kristinn Guðmundsson, Erla Björk Örnólfsdóttir, Viggó Þór Marteinsson		
Skýrsla / Report no.	47-11	Útgáfudagur / Date:	Desember 2011
Verknr. / project no.	6019 - 1987	Skýrsla lokuð til 01.01.2014	
Styrktaraðilar / funding:	Verkefnasjóður sjávarútvegsins		
Ágríp á íslensku:	<p>Fjölbreytileiki örvera í hafinu umhverfis Ísland er að mestu óþekktur en litlar sem engar rannsóknir hafa farið fram til þessa. Í þessari rannsókn var sjósýnum umhverfis landið safnað til greiningar á þéttni örvera með örverugreini (flow cytometry) og á fjölbreytileika þeirra með sameindalíffræðilegum aðferðum. Alls var 504 sjósýnum safnað; 483 sýnum úr vorralli Hafrannsóknarstofnunnar, 16 sýnum úr Breiðfirði og 5 sýnum var safnað norður af Vestfjörðum með sérútbúnum sýnatökubúnaði fyrir botnvörpu. Úr vorrallinu voru valin sýni rannsökuð frekar þau komu af Selvogsbanka, Siglunesi og Langanesi ásamt sitt hvoru sýninu vestan af Látrabjargi og af Hornbanka. Örveruþéttni var mest út af Selvogsbanka þar sem heildartalning var rétt um 1.6 milljón frumur/mL af sjó. Reiknað meðaltal allra sýna var hinsvegar 0.68 milljón frumur/mL. Tegundasamsetning örveruflórunnar var ákvörðuð með mögnun og raðgreiningu á 16S geni baktería. Alls voru 528 raðir raðgreindar sem sýndu 174 ólíkar 16S bakteríuraðir í sýnunum og reyndust 52% þeirra tilheyra áður óþekktum bakteríutegundum. Fjölbreytileiki örveruflórunnar var almennt mikill að undanskildu sýni úr hali togara. Átta fylkingar baktería greindust í sýnunum í mismiklum mæli. <i>Cyanobacteria</i> og <i>Cyanobacteria</i>-líkar raðir voru ríkjandi í öllum sýnum fyrir utan sýni 353-0m á Selvogsbanka þar sem hlutfall þeirra var einungis 4%. Þar voru Alpha og Gamma-proteobacteria ríkjandi. Af öðrum fylkingum greindust <i>Flavobacteria</i> reglulega ásamt öðrum hópum í minna hlutfalli.</p> <p>Munur á örverusamsetningu sjósýna var metinn með höfuðþáttgreiningu á fingrafari örverusamfélaga sem var fengin með t-RFLP tækni. Heilt yfir var meginmunur á sýnum úr hverri sýnalotu þ.e. úr vorralli, Breiðafirði og hali togara. Breytileikinn innan sýna úr vorrallinu hélst í hendur við sýnatökustað þar sem sýni af Selvogsbankanum sýndu meiri innbyrðis líkindi samanborið við sýnin norðan af Siglufirði og vestan af Íslandi sem voru ólíkari innbyrðis. Úr gögnum fingrafara örverusamfélaga í mismunandi sýnum mátti sjá fylgni á milli ákveðinna breyta í fingrafari samfélagana með umhverfisþáttum sem mældir voru við sýnaöflunina. Hitastig hafði þar mest að segja en einnig flúrljómun og selta. Skimað var fyrir <i>Vibrio</i>. <i>Paramaemolyticus</i> í sjósýnum úr hlýjum sjó sunnan af landinu þar sem yfirborðshit sjávar var milli 8-10°C. Enginn <i>V. parahaemolyticus</i> greindist í þessum sýnum.</p> <p>Niðurstöður þessara verkefnis má líta á sem mikilvægan grunn til frekari rannsókna á örverum á Íslandsmiðum. Áframhaldandi rannsóknir á þessu sviði geta haft mikla þýðingu til lengri tíma litið til að meta áhrif fyrirsjáanlegra umhverfisbreytinga vegna hlýnunar jarðar á lífríki sjávar og nytjastofna á Íslandsmiðum.</p>		

<i>Lykilorð á íslensku:</i>	<i>Sjávarörverur, fjölbreytileiki, Norður Atlantshaf, hlýnun sjávar</i>
<i>Summary in English:</i>	<p>The diversity of microorganisms in the ocean around Iceland is largely unknown and little or no research has been conducted to date. In this study, seawater samples around the country were gathered for analysis concentration and diversity of microorganisms using flow-cytometry and molecular methods. A total of 504 samples were collected. All samples were analysed with regards to microbial counts while samples from selected areas were investigated further, from Selvogsbanki, Siglunes and Langanes.</p> <p>Microbial concentrations were highest at Selvogsbanki, where the total counts were around 1.6 million cells/ml. Arithmetic mean of all samples was 0.68 million cells/ml. Species composition of microbial flora was determined by amplification and sequencing of the 16S bacterial gene. A total of 528 16S sequences were sequenced, and showed 174 different bacterial sequences. 52% of the sequences belonged to previously unknown bacterial species. Eight divisions of bacteria were detected in the samples. Cyanobacteria and cyanobacteria-like sequences were predominant in all samples except sample 353-0m in Selvogsbanki where the ratio was only 4% and alpha and gamma-proteobacteria were predominant. Of other ranks identified, Flavobacterium were regularly detected along with other less frequent groups.</p> <p>The difference in microbial composition in the sea samples was assessed by principal component analysis of the microbial community fingerprint obtained by t-RFLP technique. Variability within the samples was dependent upon sampling point, samples from Selvogsabanki showed more correlation with other samples from that area - than with samples from Siglunes or the west coast of Iceland that showed more intrinsic diversity. The community fingerprint and changes in the fingerprint shows correlation to changes in environmental factors measured at sampling. Temperature was the most important environmental factor, along with fluorescence and salinity. Samples from the warmer waters off the south coast were screened for <i>Vibrio parahaemolyticus</i>, but none was detected.</p> <p>The results of this project can be seen as an important basis for further studies of microorganisms in Icelandic waters. Continued research in this area can be of great importance for the evaluation environmental change and the effects of global warming on the marine environment and exploitable marine species in Icelandic waters.</p>
<i>English keywords:</i>	<i>Microorganisms, N. Atlantic ocean, diversity, global warming</i>

Efnisyfirlit

1.	Inngangur	1
1.1.	Kolefnishringur og örverur	1
1.2.	Sjávarörverurannsóknir við Ísland	3
1.3.	Nýjar rannsóknir	4
1.4.	Klónagreining – 16S rRNA.....	5
1.5.	Flæðisjá (<i>Flow Cytometry</i>)	6
2.	Efni og aðferðir	7
2.1.	Sýnatökur.....	7
2.2.	Sýnaundirbúningur og DNA einangrun.....	8
2.3.	Frumutalningar.....	9
2.4.	Skimun fyrir <i>V. parahaemolyticus</i>	9
2.5.	Fingrafar örverusamfélaga (t-RFLP).....	10
2.6.	Tölfræðigreining t-RFLP gagna	10
2.7.	Klónagreining.....	10
3.	Niðurstöður og umræður	11
3.1.	Frumutalningar.....	11
3.1.1	Íslandsmið.....	11
3.1.2	Breiðafjörður	15
3.2.	Skimun fyrir <i>V. paramaemolyticus</i>	17
3.3.	Fingrafar örverusamfélaga (t-RFLP).....	18
3.4.	Höfuðþáttagreining (PCA) til samanburðar á bakteríusamsetningu.....	20
3.4.1.	Öll sýni	20
3.4.2.	Íslandsmið.....	21
3.4.3.	Breiðafjörður	24
3.5.	Klónagreining.....	24
3.5.1.	Íslandsmið.....	27
3.5.2.	Breiðafjörður	32
3.5.3.	Hal.....	35
4.	Samantekt og ályktanir.....	35
4.1	Frumutalningar.....	36
4.2	Fingrafaragreining	36
4.3	Tegundagreining.....	37
4.4	Niðurlag	38
5.	Þakkir.....	39
6.	Heimildir	40
	Viðaukar	42

1. Inngangur

Til samans þekja höfin um 70% af yfirborði jarðar og er meðaldýpt þeirra um 3800 m en 62% af lífhvolfi jarðar er á meira en 1000 m dýpi (Jannasch og Taylor, 1984). Líffræðirannsóknir í þessu stærsta búsvæði lífvera á jörðinni hafa hingað til mest beinst að stærri lífverum en hinar smærri, eins og örverur, sem sjást ekki með berum augum, hafa fengið minni athygli. Á síðustu árum hefur þetta verið að breytast og vísindamenn gert sér betur grein fyrir mikilvægi örvera í höfunum. Heimshöfin eru í raun uppfull af örverum og lífmassi þeirra talinn vera meira en 98% af öllum lífmassa sjávarlífvera. Fjöldi þeirra á yfirborði sjávar hefur reynst vera meira en 1×10^5 frumur í einum millilítra af sjó (Porter & Feig, 1980; Hobbie et al. 1977). Ætla má að höfin innihaldi um 3.6×10^{29} örverur og að kolefnismassi þeirra geti verið um 3×10^{11} tonn (Whitman et al. 1998).

Þessar örsmáu efnaverksmiðjur sjá um 98% af allri frumframleiðslunni og hafa einnig lykilhutverk í hringrás efna í höfunum (Whitman et al. 1998; Atlas & Bartha 1993).

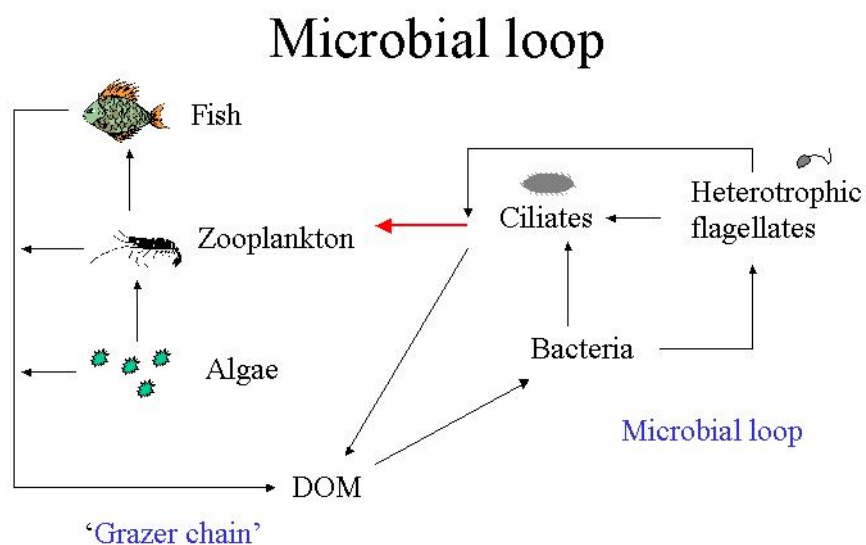
Vegna tæknilegra annmarka hefur vitneskja vísindamanna um lífverur á miklu dýpi verið tiltölulega lítil og enn minni um örverur. Til marks um þetta vissu menn ekki fyrir víst um tilvist djúpsjávarhvera fyrr enn seint á tuttugustu öldinni. Þar uppgötvuðust áður óþekkt vistkerfi örvera og dýra þar sem efnatillífandi örverur voru einu frumframleiðendurnir og þar með undirstaða vistkerfisins (Corliss et al. 1979). Við þessa uppgötvun jókst áhugi á djúpsjávarrannsóknum og hafa fjölmargir slíkir hverir fundist víða um höf og þá einkum við neðansjávarhryggi. Ísland er hluti af Atlantshafshryggnum en þar hafa ekki enn fundist neðansjávarhverir á mjög miklu dýpi. Tvö hverasvæði hafa verið rannsökuð, annað við Kolbeinsey á 100 m dýpi (Fricke et al. 1989) og hitt við Grímsey á 400 m dýpi (Hannington et al. 2001).

1.1. Kolefnishringur og örverur

Staðsetning örvera í sjó fer mikið eftir aðgengi þeirra að orku, kolefnisgjöfum og elektrónuþegum. Þær geta verið stakar og fljótandi um vatnsúlu sjávar, myndað þekju á ögnum eða myndað netju sem svífur um og verið á botni eða seti. Einnig geta þær lifað sem samlífisörverur í sjávardýrum. Upphaflega var talið að örverur væru í óverulegu magni í efstu lögum sjávar þar sem styrkur á uppleystu lífrænu efni væri of lítill til að ófrumbjarga örverur gætu þrífist. Örverur væri aðeins að finna á ögnum þar sem styrkur lífræns efnis væri hár.

Með nýjum tækjabúnaði og meiri rannsóknum hefur þessi mynd breyst verulega. Nýlegar rannsóknir hafa sýnt að meira er af örverum í vatnssúlu sjávar en áður var haldið (DeLong, 1997 og 2005). Á einstaka svæðum sem innihalda mikla næringu getur fjöldi örvera orðið yfir ein milljón á millilítra í yfirborðslögum við strendur en í næringarsnauðu úthafi er fjöldinn minni.

Hafið er talið einn stærsti langtíma hýsill lífræns kolefnis á jörðunni og stór hluti af CO₂ upptöku jarðarinnar fari fram í sjó. Áætlað er að 1/4 af því kolefni sem er fixerað með ljóstillífun í sjó losni frá frumum sem uppleyst lífrænt efni. Styrkur kolefnis í sjó virðist haldast stöðugur þrátt fyrir þessa aukningu. Þessi stöðugleiki hefur verið skýrður með kolefnisupptöku ófrumbjarga örvera, sérstaklega baktería, á uppleystum lífrænum efnum (Andrews og Williams 1971). Með betri sýnatökubúnaði hefur komið í ljós að fjöldi örvera hefur verið vanmetinn þar sem smæstu örverurnar s. s. bakteríusvif komust í gegnum síurnar sem áður voru notaðar (Hobbie og Williams 1984). Talið er líklegt að 90% af uppleystu lífrænu kolefni í vatnssúlu sjávar sé tekið upp af örverum sem eru minni en 1 µm (Sieburth 1982). Með því að breyta uppleystu lífrænu kolefni í frumumassa kemst kolefnið inn í fæðukeðjuna að nýju við það að vera fæða stærri lífvera eins og nano-svifdýra. Þannig viðhelst kolefnishringurinn fyrir tilstuðlan örvera, (Mynd 1) "the microbial loop" (Pomeroy 1974).



Mynd 1. "Örverulykkjan" Myndin sýnir á einfaldan hátt samband á milli sjávarörvera og annarra stærri lífvera ("the microbial loop") (mynd af vef: www.esf.edu/efb/schulz/Limnology/microbialloop.jpg).

Einkum eru það ófrumbjarga og ljóstillífaði örverur sem mynda stærstu örveruhópina í sjó. Ljóstillífaði *Cyanobacteria* finnast allstaðar í efri lögum sjávar og þá sérstaklega í næringarsnaudu (oligotrophic) umhverfi (Johnson og Seiburth 1979). Þessi hópur baktería er mikilvægt æti fyrir aðrar lífverur og getur náð frá 20 til 80% af þeim massa sem aðrar stærri lífverur nýta. Þeir ófrumbjarga örveruhópar sem þarna finnast eru loftháðir eða valloftháðir, Gram neikvæðar bakteríur sem tilheyra ættkvíslunum *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, og *Oceanospirillum*. Gram jákvæðar bakteríur eins og *Arthrobacter* eða grómyndandi bakteríur finnast einnig í litlum mæli. Veirur (Bratbak et al. 1996) og fornbakteríur eru þeir hópar örvera sem tiltölulega nýlega hafa uppgötvast í miklu magni í sjó. Talið er að allt að 1/3 af bakteríum minni en 2 μm tilheyri fornbakteríum (Olsen 1994) en ekki hefur enn tekist að rækta kaldsjávar fornbakteríur. Með sameindalíffræðilegum aðferðum hefur verið sýnt fram á mikinn fjölda fornbaktería í efri lögum sjávar og áður óþekktar bakteríur eins og t.d. SAR11 sem eru á yfirborði sjávar (Moriss et al 2002). Ekki hefur tekist að rækta þessar örverur en miðað við fjölda og dreifingu gegna þær veigamiklu hlutverki í vistkerfi sjávar. Fjöldi veira í sjó hefur einnig komið á óvart og getur náð allt að 10 milljónum veiruagna í millilíttra (Marie et al. 1999). Hlutverk þeirra í þessu vistkerfi er lítið þekkt en talið er að þær gegni mikilvægu hlutverki í hringrás efna í "örverulykkjunni" með því rjúfa örverur og auka uppleyst magn lífræns kolefnis.

1.2. Sjávarörverurannsóknir við Ísland

Hafrannsóknir á Íslandsmiðum hafa lengi verið stundaðar og miklu af upplýsingum safnað. Hér er einkum átt við hafræðirannsóknir og rannsóknir á ýmsum stærri dýrategundum, svífdýrum og svíförungum. Hinsvegar hafa nánast engar rannsóknir á hlutverki sjávarörvera í vistkerfinu farið fram. Helst má nefna óbirtar rannsóknir Ólafs S. Andréssonar o.fl. í tengslum við þorsklakleiðangra Hafrannsóknarstofnunar 1996-1997 og rannsóknir Guðna Á. Alfreðssonar. Einnig má nefna rannsókn þar sem erfðafjölbreytileiki óræktaðra örvera frá yfirborði til botns var kannaður. Viggó Þór Marteinson stýrði rannsókninni og tengdist sýnataka hennar sýnaleiðangri Biolce (Botndýr á Íslandsmiðum). Einungis örfáum sýnum var safnað en í ljós kom örveruflóra sem reyndist mjög fjölbreytileg. Stór hluti örveranna

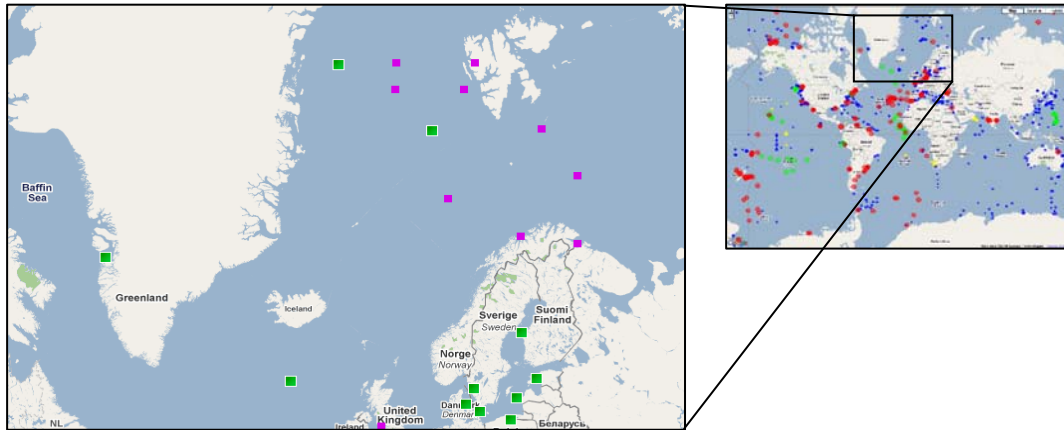
reyndist mjög fjarskyldur öðrum örverum og margar gátu talist nýjar ættkvíslir. Sérstaklega innihélt botnset mikinn fjölda óþekktra örvera. Niðurstöður sýndu að örveruflóran reyndist vera mjög breytileg á sama dýpi óháð sýnatökustað. Fjöldi baktería og veira var svipaður á 1-10 metra dýpi en fjöldi baktería lækkaði töluvert á 50 metra dýpi (Kjartan Á Maack, 2002).

1.3. Nýjar rannsóknir

Eins og komið hefur fram hafa rannsóknir á sjávarörverum og hlutverki þeirra í vistkerfi sjávar verið minna stundaðar en rannsóknir á öðrum sjávarlífverum. Á allra síðustu árum hefur orðið aukning á þessum rannsóknum og áhugi manna beinst meira að örverum sem einni af megin undirstöðum lífs í sjó og á landi. Nálgun á lífríki sjávarörvera með sameindalíffræðilegum aðferðum hefur opnað nýjar víddir í rannsóknum. Craig Venter sem áður stjórnaði raðgreiningum á erfðamengi mannsins, gerði út leiðangur um heimshöfin til að safna saman DNA úr örverum og raðgreina það tilviljunarkennt. Með þessu móti voru heilu örverugenamengin raðgreind úr lífmassa beint upp úr sjó án ræktunar en slík massa raðgreining hefur ekki áður þekkt. Tekin voru sjávarsýni á fjölda sýnatökustöðva á sömu sjóleiðum og Joseph Banks á HMS Endeavour og Charles Darwin á HMS Beagle fóru á seinni hluta 18. og fyrri hluta 19. aldar. Leiðirnar eru um 25.000 mílna langar og eru sunnarlega á hnettinum. Raðgreindir voru um 6.3 milljarðar basapara úr sjávarsýnum sem innihéldu fjöldann allan af örverutegundum. Með þessu fengust mikilvægar upplýsingar um örveruvistkerfið á þessum slóðum (Venter et al., 2004).

Nýlegar rannsóknir á fjölbreytileika sjávarörvera með nýrri raðgreiningartækni sýna enn betur þann gífurlega fjölbreytileika sem er til staðar í hafinu (Sogin et al., 2006) og ný óþekkt litarefni í ljóstillífun uppgötvast (Béja et al., 2000 og Yutin et al., 2007). Þessi nýja tækni mun í framtíðinni gera vísindamönnum kleyft að mæla fjölbreytileika örvera í sjó án ræktunar en með margfalt betri greiningu og með mun ódýrari hætti en áður. Með þessari nýju tækni verður auðveldara að fylgjast með breytingum á örverusamfélögum og rannsaka hlutverk þeirra í vistkerfi sjávar. Sérstaklega verður brýnt að fylgjast með framvindu vistkerfa í sjónum til að meta áhrif hlýnunar sjávar á lífríkið og hvernig CO₂ upptaka örvera breytist. Einnig leiðir þekking okkar á hlutverki örvera sem undirstöðu í fæðukeðjunni betri skilning á ástandi stofna sjávardýra.

Nýlega var settur upp gagnabanki (International Census of Marine Microbes (ICoMM)) sem sýnir örverufjölbreytileika á mismunandi sýnatökustöðum í heiminum. Þessi gagnabanki MICROBIS er aðgengilegur á netinu (<http://icomm.mbl.edu/index.html>) og inniheldur mikilvægar upplýsingar um örverur ásamt upplýsingar um DNA (16S rRNA gen) þeirra.



Mynd 2. MICROBIS. Myndin sýnir kort úr gagnabanka MICROBIS. Minni myndin sýnir yfirlit yfir sýnatöku sýnatökustaði víðsvegar í heiminum ein sú stærra sýnatökur við Ísland.

1.4. Klónagreining – 16S rRNA

Klónagreining með hlutraðgreiningu 16S rRNA gensins er ein algengasta leiðin til að tegundagreina bakteríur. Genið skráir fyrir hluta 30S einingar ríbósóms baktería og er 16S rRNA genið til staðar í öllum bakteríum. Genið er vel varðveitt en inniheldur einnig breytileg svæði sem gerir það að verkum að hægt er að bera saman og ákvarða skyldleika bæði fjarskyldar og skyldra bakteríutegunda. Genið er hins vegar það vel varðveitt að oft er ekki mögulegt að greina á milli tveggja náskyldra tegunda (Tringe and Hugenholtz 2008). Raðgreining á 16S rRNA geninu hefur verið beitt með tvennum hætti, annarsvegar til að raðgreina genið úr stofnum og er það nú staðlað verklag við lýsingu nýrra bakteríutegunda og flokkunar á ræktanlegum tegundum. Aðferðinni hefur einnig verið beitt eins og hér er gert, til þess að skoða samsetningu bakteríusamfélaga. Í því skyni er erfðaeefni einangrað úr umhverfissýnum, erfðaeefnið sem einangrast er blanda af erfðaeefni þeirra tegunda sem til staðar voru í sýninu. Hluti gensins er magnaður upp úr erfðaefninu með PCR tækni og prímerum altækum fyrir ýmsa bakteríu flokka. PCR afurðin er klónuð inn í genaferju sem komið er fyrir í *E. coli* frumum eða notuð sambærileg aðferðafræði. Hver *E. coli* klón inniheldur 16S rRNA gen úr einni bakteríu í örverusamfélaginu. Með raðgreiningu nægjanlegs

magns af klónum má þannig fá upplýsingar um örveruflokka og jafnvel tegundir í því umhverfi sem sýnið var tekið. Með þessu móti má greina jafnt ræktanlegar sem óræktanlegar bakteríur sem ekki er mögulegt að greina nema með sameindalíffræðilegum aðferðum. Til að ákvarða hvaða bakteríum raðgreindir genahlutar tilheyra eru raðirnar bornar saman við NCBI genbank gagnabankann á netinu sem geymir m.a. 16S rRNA raðir og flokkunarfræðilegar upplýsingar fyrir hverja röð (Tringe and Hugenholtz 2008) eða 16S ribosomal database gagnabankann. Í dag er að finna á 16S ribosomal database gagnabankanum 1,483,016 raðir (<http://rdp.cme.msu.edu/>, desember 2010) og er hann í stöðugum vexti.

1.5. Flæðisjá (*Flow Cytometry*)

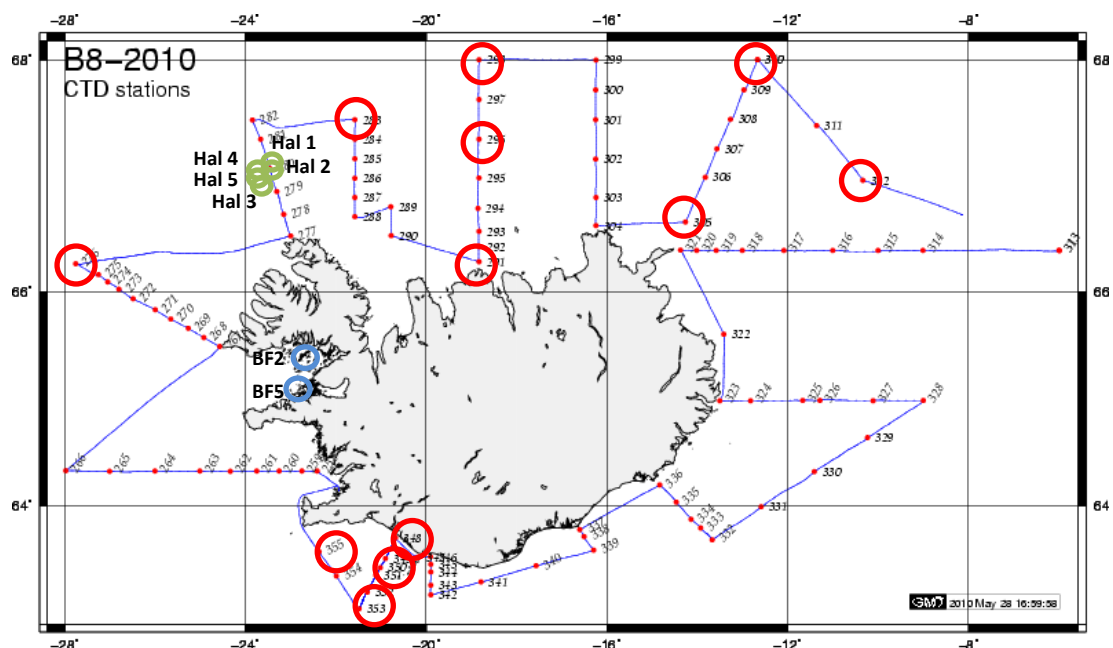
Eins og áður segir eru bakteríur mikilvægur hluti af svifi í fæðukeðjunni og virkni þeirra er talinn hafa mikil áhrif á vistkerfi almennt. Þetta á m.a. við um jafnvægi milli öndunar og frumframleiðslu og færslu kolefnis í kolefniskeðju jarðar. Magn baktería og lífmassi gegna því lykilhlutverki í sjávarvistkerfum. Til að skoða magn örvera í sjó er erfitt að nýta hefðbundnar aðferðir líkt og talningar með heildartalningum á agaræti, þar sem stóran hluta örveran er ekki hægt að rækta (DeLong 2005). Flow cytometry, eða flæðisjár-mæling er tækni sem hægt er að nýta til að telja, skoða eða flokka frumur með vökvaflæði. Flow cytometry (FCM) er mjög næm aðferð, þar sem ræktun eða auðgun á sýnum er ekki þörf og gefur bæði möguleika á að greina og telja örverur í sýnum. Tæknin er byggð á ljósörvun, ljósgleypni og útgeislun flúrljómandi sameinda. Aðallega hefur tæknin verið notuð í sambandi við ónæmisfræði en hefur nú á síðustu árum einnig nýst við umhverfissrannsóknir og þá sérstaklega í sjávarlíffræði (Marie, Partensky et al. 1997). Aðferðin er hraðvirk og gefur upplýsingar sem erfitt og tímafrekt er að ná með hefðbundnari aðferðum. Fyrir utan að vera þægileg tækni til að telja frumur er hægt að fá upplýsingar um stærð og náttúrulega flúrljómun. Að auki bíður tæknin upp á flokkun ákveðinna hópa og greina nánar, rækta eða raðgreina (Bergquist, Hardiman et al. 2009).

2. Efni og aðferðir

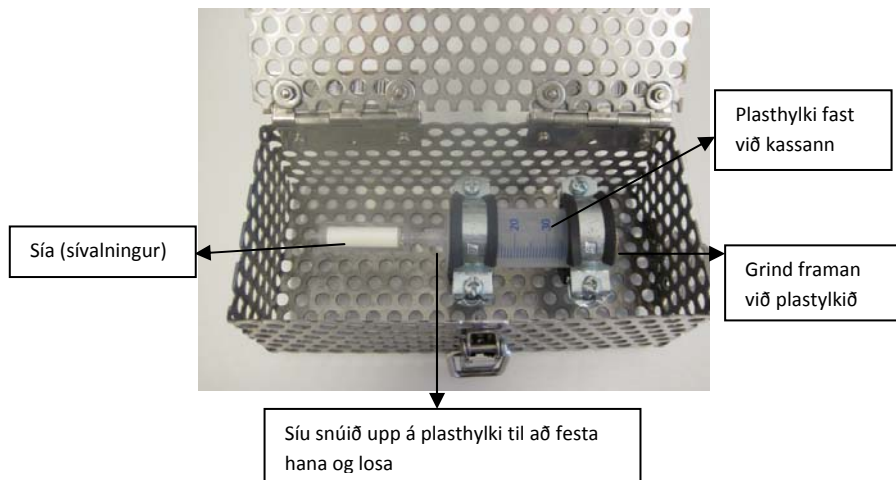
2.1. Sýnatökur

Í rannsókninni var sýna aflað á þrjá mismunandi vegu. Í fyrsta lagi var 483 sýnum safnað í samstarfi við árlegt rall Hafrannsóknarstofnunar. Í öðru lagi var 16 sýnum safnað úr Breiðafirðinum og í þriðja lagi var 5 sýnum safnað með sérútbúnum sýnatökubúnaði sem festur var við höfuðlínu trolls sem gerði það kleyft að safna örverusýnum við hal togarans. Að auki hafa verið tekin sýni úr Breiðafirði yfir vetrarmánuðina.

Úr vorralli Hafró voru tekin sýni af 96 mismunandi stöðvum og yfirleitt af fimm mismunandi dýpum á hverri stöð (0,10,20,30,50 metrar). Hafrannsóknarstofnun safnaði hefðbundnum gögnum s.s. hitastigi, seltu, súrefni og yfirborðsflúrjómun en aðferðalýsing þessara mælinga er ekki greint frá hér. Ljóst var frá upphafi að ekki myndi reynast ráðrúm til að vinna úr öllum þessum sýnum innan tímarammans fyrir þessa skýrslu. Öll sýnin voru hinsvegar síuð til að einangra örverumassan og einangra erfðaeftni örveranna sem síðan var frystur við -80°C (bæði örverumassi og DNA). Sýni sem valin voru til rannsóknarinnar hér komu af 12 stöðvum á Selvogsbanka, Langanesi, Siglunes og vestan af landi (Mynd 3). Sýnatökustöðvarnar sem um ræðir eru númer 276, 283, 291, 296, 298, 305, 310, 312, 348, 351, 353 og 355 og sýni tekin af dýptum 0m, 20m, 50m ásamt stöðvum 353 (800m dýpi) og 355 (250m dýpi), alls 38 sýni.



Mynd 3. Yfirlitsmynd yfir allar sýnatökustöðvar úr rannsókninni. Sýni úr vorralli Hafrannsóknarstofnunar eru merktar með rauðum hring, sýni úr Breiðafirði með bláum og hal sýni frá togaranum Klakki SH510 merkt með grænu. Myndin sýnir einnig allar aðrar sýnatökustöðvar í reglubundnum rannsóknarleiðingum Hafrannsóknarstofnunar.



Mynd 4. Örverugildran sem komið var á höfuðlínu trollsins. Örverugildran samanstendur af litlum kassa úr málmgrind, með loki en inn í kassanum er sía (lítill sívalningur) sem tengist (hægt að losa síuna með því að snúa henni rangsælis) plasthylki sem er fast við kassann. Plasthylkið er með grind til að taka óhreinindi frá.

Úr Breiðafirðinum var sýnum safnað í samstarfi við Sjávarrannsóknarsetrið Vör. Sýnum var safnað af tveimur sýnatökustöðum út frá Stykkishólmi af stöðvum BFS2 og BFS5 af 1m og 20m dýpi. Sýni voru tekin með viku millibili á tímabilinu 13. Júlí til 9. Ágúst 2010. Að auki hafa verið tekin sýni yfir vetrarmánuðina sem verið er að vinna úr.

Í samstarfi við togarann Klakk SH 510 var sýnatökubúnaði (sterivex filter) komið fyrir inn í stálbúri og fest á veiðibúnað. Sýnum úr hali var aflað með því að koma sérútbúinni örverugildru við höfuðlínu á trolli. Örverur voru síaðar úr sjónum við tog á trolli og ný sía sett í boxið fyrir hvert tog. Fimm sýnum var safnað af norðvestur miðum (Mynd 3). Lista yfir öll sýni sem tekin voru í rannsókninni má finna í viðauka 1.

2.2. Sýnaundirbúningur og DNA einangrun

Á hverjum sýnatökustað voru tvenns konar sýni tekin, annars vegar fyrir DNA einangrun og rannsóknir á fjölbreytileika en hins vegar fyrir frumutalningar með flæðisjá (*flow cytometry*). Fyrir frumutalningar í flæðisjá var 5 ml af sjó safnað og örverurnar fixeraðar með því að bæta glutaraldehyde í sýni með 0,1 % lokastyrkleika. Fyrir DNA einangrunina voru gerðar nokkuð ítarlegar fortíraunir til að finna bestu lausnirnar í þessum málum og sem hefur verið birt (Matís skýrsla 36-10).

Í flestum tilfellum var 1 L sýni síað í gegn um 0,47 µm filter (Millipore). Eftir súnina var filterpappírnum komið fyrir á petri skál og voru örverurnar losaðar af með því að skola 4 mL

af með samsettum sjó (*artificial seawater*), endurtekið yfir pappírinn og með því að skrapa þær af með pípettuoddi. Að því loknu var rúmmálinu skipt upp í 2x2 mL í og örverurnar þéttar í sýnaglassi með spuna við 8000 x g í 10 mín við 4°C. Flotinu var þvínæst fleygt og örverurnar geymdar við -80°C þar til DNA einangrun fór fram.

Einangrun á DNA var gerð með hálfsjálfvirkum King Fisher DNA einangrunarbúnaði (Thermo inc, MA, USA) með viðbættum 2,5µl af próteasa K (20mg/ml). Próteinasu var bætt í sýnin og þau lútin vera við 55°C vatnsbað í 1 klst. Þá var King Fisher lysisbuffer bætt út í og hefðbundið King Fisher einangrunar ferli notað. DNA magn allra sýna var mælt með NanoDrop (Nanodrop Technologies, DE, USA)

2.3. Frumutalningar

Talningar á örverum og einfrumu svifþörungum voru framkvæmdar með flæðisjá, FACSaria II cell sorter (BD Biosystems). Sýnin voru þýdd upp og lútin standa við stofuhita í um eina klst. Sýnin höfðu áður verið fixeruð með glutaraldehyde (lokastyrkur 0,1%). Sýni voru svo og lituð með SybrGreen (Invitrogen) í 1:10000 lokastyrk miðað við upphaflegan styrk á lausn frá framleiðanda og lútin standa í myrkri í um 20 mín. eða þar til þau voru skoðuð í flæðisjá. Áður en sýni voru keyrð á flæðisjá, var flæði mælt endurtekið og þannig ákvarðað hversu mikið magn vökvasýnis fór í gegnum flæðiklefan (*flow cell*) á sek. Öll sýnin voru svo keyrð í 120 sek. og niðurstöður notaðar til að telja og reikna yfir í magn frumna í mL af sjó.

2.4. Skimun fyrir *V. parahaemolyticus*

Skimun var gerð fyrir bakteríu sýklinum *Vibrio parahaemolyticus* í sýnum teknum úr hlýjum sjó sunnan af landinu; sýnatökustöðvum 341-355. Notuð var real time PCR greiningartækni sem byggir á sérvirkum *V. parahaemolyticus* primerum og flúrmerktum þreifara sem magna upp toxR gen bakteríunnar. Greiningahvörf voru gerð í MX300p real time PCR tæki og Brilliant II qPCR hvarfefnablöndu, hvort tveggja frá Agilent (Agilent, La Jolla, CA, US). Hvarfrúmmál var 25 µL, 1mM MgCl₂, 300nm fremri vísis (forward primer), 100nm aftari vísis (reverse primer) og 300nm þreifara (Taq Man probe). Hitaprófíll greiningarhvarfsins var 95°C í 10 mínútur og í kjölfarið 40 hringir af 95°C í 15 sekúndur og 60°C í 1 mínútu.

2.5. Fingrafar örverusamfélaga (t-RFLP)

Með þessari aðferð er að hægt er að fylgjast með breytingum á örverflórinni og bera saman fjölbreytileika mismunandi sýna á fljótvirkan hátt (Braker, Ayala-del-Rio et al. 2001). Aðferðin byggist á því að notaðir eru flúrmerktir alhliða vísar (universal primers) til að magna upp 16S rRNA geni raunbaktería. Vísarnir sem notaðir voru í þessu tilviki eru F9 merktur með FAM (FAM-5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') og 805R (5'-GACTACCCGGGTATCTAATCC-3'). Hvarfrúmmál var 40 µL og innihélt 0.05 U/µL *Teg* polymerasa, 200nM vísa, dNTP (200nM, 1x dúi(buffer) með 1,5 mM Mg₂Cl og 2-5 µL af DNA sýni. Hitaprógramið var 5 mín við 95°C, 35 hringir 50 sek við 95°C, 50 sek 52°C, 90 sek 72°C og lokaskref við 72°C í 5 mín. PCR afurðirnar voru þá rafdrengnar í 1% agarósa geli, klipptar úr gelinu og hreinsaðar með GFX aðferð (framleiðandi). Eftir það var hreinsaða PCR afurðin klippt með *HaeIII* skerðiensími (Fermentas) skv. leiðbeiningum framleiðanda. Að lokum var sýnið þynnt 1:20 í vatni, blandað við innri stærðarstaðal og keyrt á ABI 3730 raðgreiningartæki.

2.6. Tölfræðigreining t-RFLP gagna

Fyrir tölfræðilega úrvinnslu á t-RFLP gögnum var útbúið fylki þar sem toppum var raðað upp þvert á öll sýni. Hlutfallslegt flatarmál hvers topps af heildarflatarmáli allra toppa úr hverju sýni var reiknað. Þessi gögn voru svo notuð fyrir höfuðþáttagreiningu eða „principal component analysis“ (PCA) sem gerir mögulegt að bera saman t-RFLP fingraför sýna og kanna innbyrðis líkindi örverusamsetningu frá mismunandi hafsvæðum.

Til að kanna fylgni milli umhverfispáttu (dýpi, hitastig, selta, súrefni, flúrljómun) á móti t-RFLP gögnunum og þann breytileika sem þau innihalda var beitt Principal Component Regression (PCR). t-RFLP gögnin voru viktuð til að minnka áhrif stærstu toppana úr t-RFLP gagnasafninu. PCA og PCR greiningin var gerð með forritinu Unscrambler (CAMO Software AS, Oslo, Norway).

2.7. Klónagreining

Hér var einnig fyrsta skrefið mögnun með sömu PCR vísam, f9 og 805R, og áður en ómerktum en að öðru leyti voru PCR aðstæður þær sömu. Hér voru PCR afurðirnar klónaðar í *E.coli* frumur eins og áður hefur verið lýst (Marteinsson, Hauksdottir et al. 2001) og 30-50 raðir raðgreindar úr hverju sýni. Röðum var samraðað miðað við ≥98% skyldleika og flokkar

raða og stakar raðir bornar saman við þekktar raðir í NCBI Genbank gagnabankann með BLAST forriti. Með þessum hætti má ákvarða nánasta ættingja hveirrar raðar og skyldleikaprósentu við nánasta þekkta ættingja og fá að auki yfirlit yfir fjölbreytileika örveruflórunnar í hverju sýni. **Simpson's** fjölbreytileikastuðull var reiknaður fyrir sýnin en hann metur líkurnar á því að tvær raðir valdar úr sýninu af handahófi tilheyri ólíkum tegundum og er gefinn upp á bilinu 0-1 þar sem 0 væri minnstur mögulegi fjölbreytileiki þ.e. allar bakteríur úr sýni tilheyri sömu tegund og 1 væri allar greindar bakteríur úr sýni væru af mismunandi tegundum.

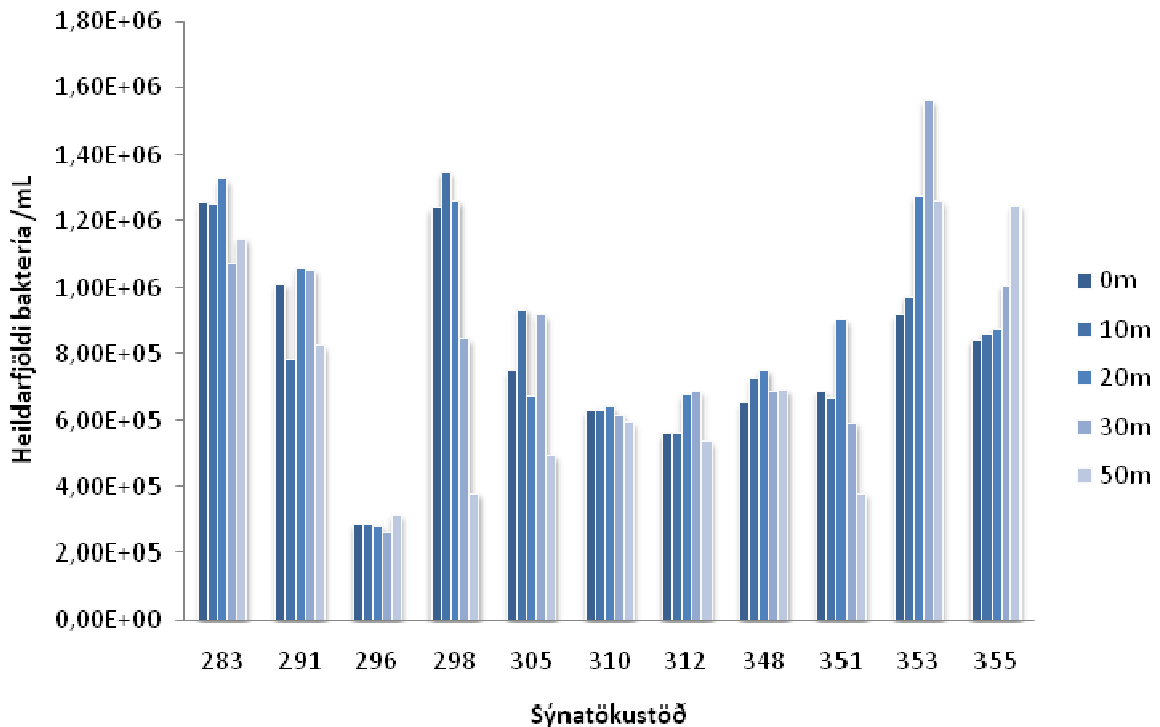
3. Niðurstöður og umræður

3.1. Frumutalningar

3.1.1 Íslandsmið

Aðeins lítill hluti örvera úr sjó er þekktur og ræktanlegur og því hafa talningar á örverum í sjó með hefðbundnum aðferðum með heildartalningum á agaræti ekki nýst sem skyldi. Til þess að fá áætlað magn þeirra í sýnunum var notuð flæðisjá en þannig er hægt að greina stærð og lögun fruma að hluta sem og flúrljómun. Bæði er hægt að nema náttúrulega flúrljómun en að auki hægt að flúrmerkja frumur með mismunandi hætti til að nema þær með flæðisjánni. Hér var notaður DNA litur, SybrGreen sem litar allt tvíþátta erfðaefni sem gerir allar frumur sjáanlegar á ákveðinni bylgjulengd ljóss. Talningar voru gerðar á heildarfjölda á örverum út frá filter sem nemur SybrGreen litaðar agnir og að auki voru taldar sérstaklega þær agnir sem að öllum líkindum voru einfrumu svifþörungur, þ.e. voru stærri samkvæmt dreifingu agna á FSC (*forward scatter*) og SSC (*side scatter*) og höfðu að auki náttúrulega flúrljómun.

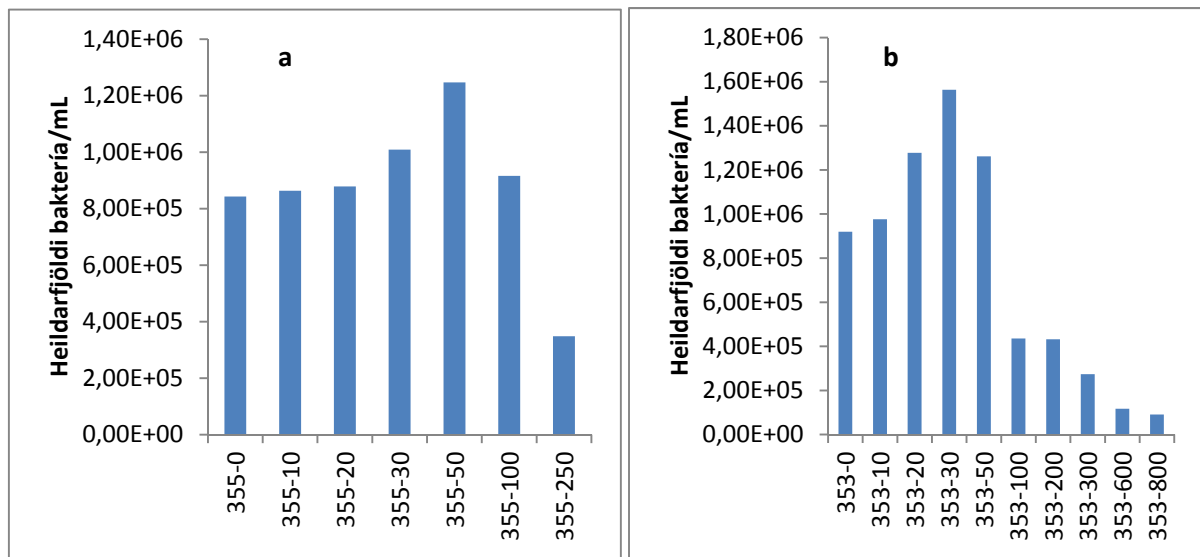
Niðurstöðurnar sýndu að fjöldi örvera var nokkuð breytilegur, bæði eftir dýpi og staðsetningu (mynd 5). Örverumagn var mest út af Selvogsbanka í sýni 353 á 30m dýpi og var heildartalning rétt um $1,6 \times 10^6$ /ml af sjó. Reiknað meðaltal allra sýna var um $6,8 \times 10^5$ /mL. Algengast var að hæsta talning væri í sýnum á 20 og 30 metra dýpi, en þó aðeins misjafnt eftir sýnum og í sýni 355 við Selvogsbanka má sjá að aukning er á fjölda alveg niður að 50m dýpi (Mynd 5). Heldur lægri talning fékkst í sýnum sem tekin voru á stöð 296, út af Siglunesi, en þegar sýni frá stöð 296 eru skoðuð í samanburði við sýnatökustöðvar sitthvoru megin, þ.e. 291 alveg uppvið land og 298 í sama sniði lengra frá landi, er fjöldi örvera á þeim stöðum umtalsvert meiri eða þrisvar og fjórum sinnum meira að meðaltali.



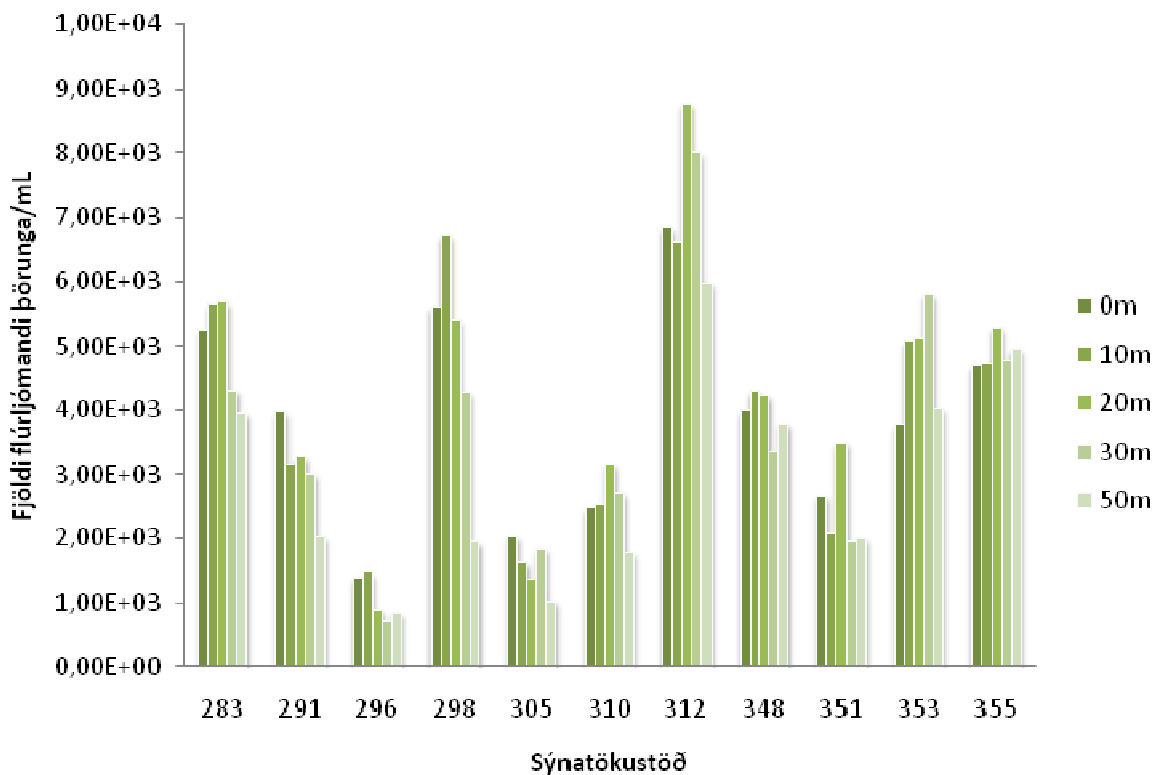
Mynd 5. Á grafinu má sjá heildartalningar í sýnum tekin á nokkrum stöðum á hafsvæðinum í kringum Ísland. Á myndinni má sjá graf fyrir talningar á örverum á 0, 10, 20, 30 og 50 metra dýpi á hverri sýnatökustöð.

Auk þeirra sýna sem tekin voru á 0-50m dýpi á hverri stöð voru tekin sýni á meira dýpi á sýnatökustöð 353 og 355 við Selvogsbanka. Á sýnatökustað 353 voru tekin sýni niður á 800 metra dýpi með um 100 metra millibili og á stöð 353 voru sýni tekin við 100 metra og 250 metra. Á grafinu má sjá að í sýni 353 við 100 metra dýpi er fjöldi örvera um 3 sinnum minni en við 50 metra og við 800 metra er fjöldi orðinn um 9×10^4 eða um 15 sinnum minna magn en við 30 metra dýpi á sömu stöð þar sem mest var (Mynd 6). Þetta er í ágætu samræmi við það sem áður hefur verið sýnt fram á. Almennt er talið að fjöldi örvera á næringaríkum hafsvæðum sé á bilinu 10^5 - 10^6 á millilíttra.

Einfrumu þörungar voru skoðaðir sérstaklega og taldir með flæðisjá, fjöldi var nokkuð mismunandi eftir dýpi en meira áberandi munur var á milli sýnatökustaða (Mynd 7). Mesta magn þörunga var á 10-30 metra dýpi en minna við yfirborð og 50 metra. Ekki var alger samsvörun milli heildarfjölda örvera og fjölda einfrumu þörunga í sýnum en þó nokkuð gott samræmi þar á milli. Talning sýndi að magn þörunga í sjó var á bilinu $1,0 \times 10^3$ til $9,0 \times 10^3$ eða um nífaldir munur þar sem mest var. Það er áhugavert að í sýni 312, langt út af Langanesi fékkst hæsta talning svifþörunga, en við stöð 312 á 20 metra dýpi var magn einfrumu þörunga um $8,8 \times 10^3$ /mL af sjó (Mynd 7). Þetta helst í hendur við aukna flúrljómun á þessu svæði (Viðauki 2).



Mynd 6. Á gröfunum hér að ofan má sjá heildartalningar gerðar með flæðisjá á sýnum 353 og 355 tekin við Selvogsgrunn. Á myndinni má sjá talningar á örverum á stöð 355 frá 0 niður á 250 metra dýpi metra dýpi (a) og stöð 353 frá 0 niður á 800 metra dýpi (b).

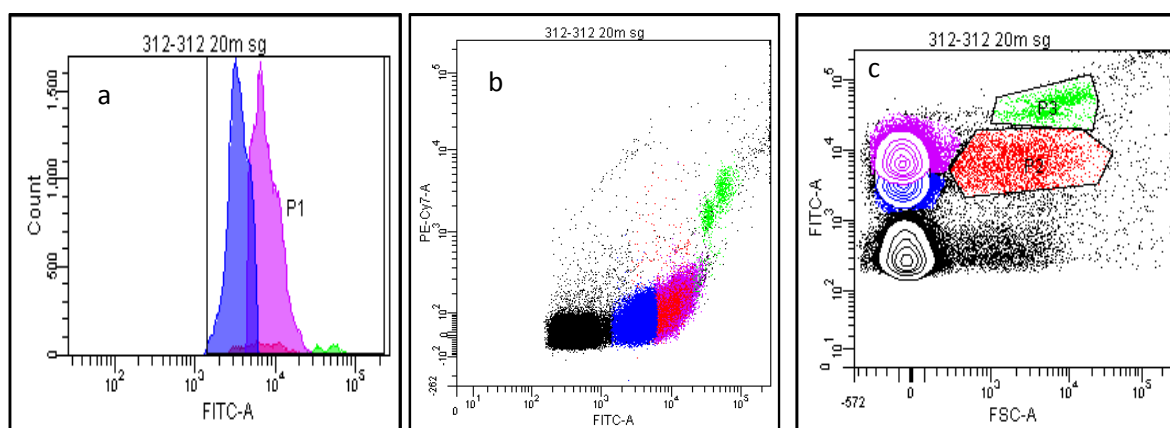


Mynd 7. Talningar svifþöruna með náttúrulega flúrljómun gerðar með flæðisjá. Grafið sýnir fjölda fruma á mL af sjó í sýnum sem tekin voru á nokkrum stöðum á hafsvæðinu í kringum Ísland. Á myndinni má sjá graf fyrir talningar á 0, 10, 20, 30 og 50 metra dýpi á hverri sýnatökustöð.

Fyrir utan að gefa ágætar upplýsingar um fjölda baktería og stærri hópa eins og svifþörunga með náttúrulega flúrljómun má einnig aðgreina bakteríur sérstaklega á grundvelli mismunandi magns af DNA og þar af leiðandi á mismundi flúrljómun með DNA litun (m.a. SybrGreen).

Mynd 8 sýnir dæmi um hrágögn úr flæðisjargreiningu fyrir sýni 312 á 20m dýpi. Þar má sjá þrjár myndir úr sömu greiningunni þar sem mismunandi mæligildi eru teiknuð upp. Mynd 3a sýnir taldar frumur á móti flúrljómun í FITC nemanum (SYBRgreen litað erfðaefni) þar sem bersýnilega má sjá í það minnsta tvo aðskilda hópa. Mynd 3b sýnir náttúrulega flúrljómun við 760 nm (PE-Cy7 nemi) á móti FITC og þar má sjá frekari hópaskiptingu örvera í sýninu. Efst til hægri eru einfruma þörungar, merktir með grænu. Mynd 3c sýnir loks FITCH mæligildi á móti „forward scatter“ (FSC) en sú mæling aðgreinir frumur eftir stærð. Þar má sjá tvo þetta bakteríuhópa (blár og fjólublár) sem sýna töluverða DNA flúrljómun en mælast með lágt gildi fyrir FSC vegna smæðar þeirra. Grænir og rauðir hópar eru svo að öllum líkindum einfruma þörungar með mismikla flúrljómun en svipaða frumustærð. Svörtu punktarnir eru þá veirur og önnur korn sem taka upp litla DNA litun.

Það sem tæknin býður einnig upp á og stefnt er á að beita í svipuðum rannsóknum, er möguleikinn á að einangra örverur með ákveðin flúrljómunarmynstur úr sýni. T.a.m. mætti einangra P2 og P3 hliðin í mynd 3c og safna þeim í tilraunaglas fyrir frekari rannsóknir og tegundagreiningar.



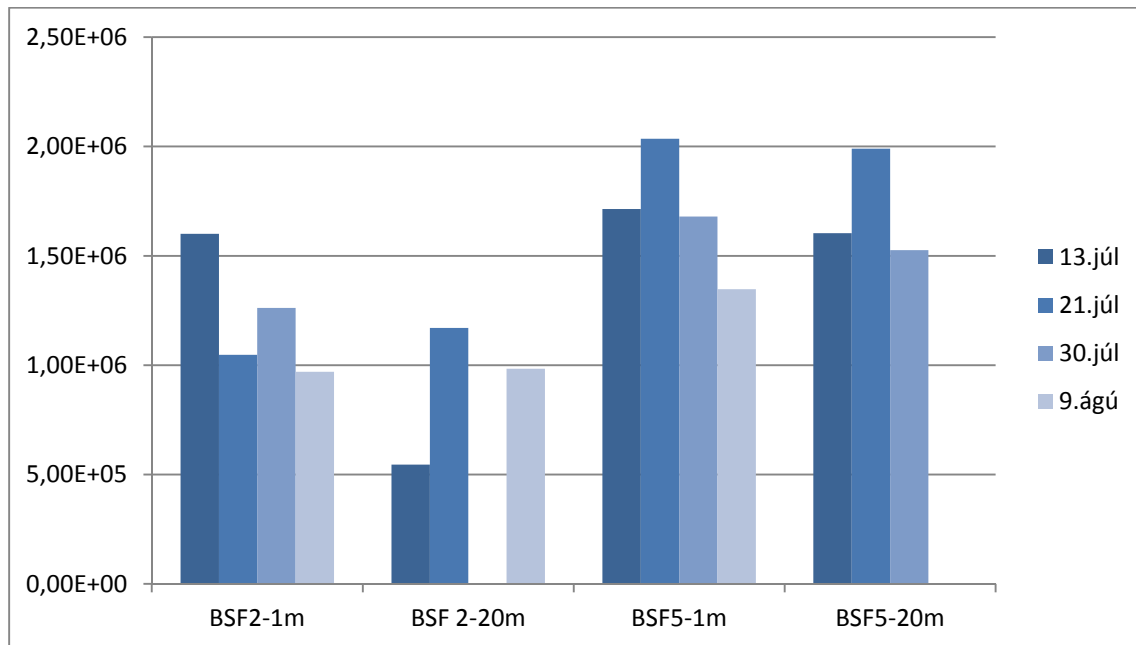
Mynd 8. Á myndunum má sjá dæmi um tvívíð flæðisjargröf sem sýna fjölda fruma, mismunandi stærð og flúrljómun þeirra. Á öðrum ásnum á myndum FITC skali en sýnin voru lituð með SybrGreen flúrljómandi efni, en sami filter er fyrir ljósgleypni þess og FITC. Y- ás á mynd a sýni hlutfallslegan fjölda agna á tímaeiningu(sek) en Y-ásinn á mynd á b sýnir náttúrulega flúrljómun. Á mynd c er svo forward scatter á x-ás sem segir til um stærðir frumna.

3.1.2. Breiðafjörður

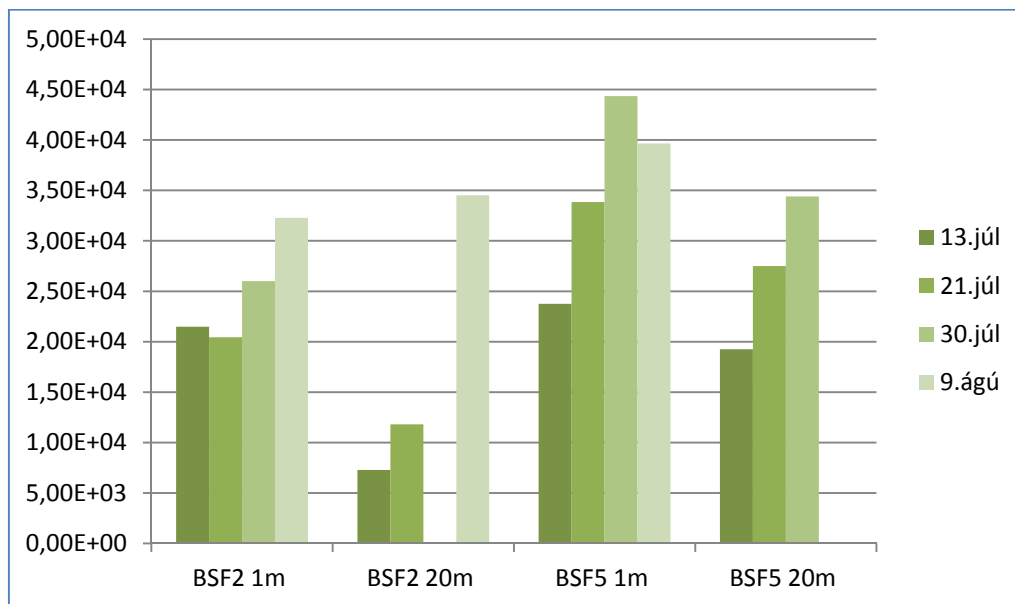
Í samstarfi við sjávarranssóknasetrið Vör við Breiðafjörð voru tekin sjávar sýni vikulega yfir fjögurra vikna tímabil frá 13. Júlí til 9. ágúst síðastliðinn (2010). Sýnin voru tekin á tveimur sýnatökustöðum, auðkenndir BSF-2 og BSF-5 og á bæði 1 metra og 20 metra dýpi. Auk þessara sýna hafa verið tekin sýni yfir vetrarmánuðina sem verið er að vinna úr en er ekki lokið á þessu stigi. Talningar á heildarfjölda örvera voru nokkuð svipaðar yfir allt tímabilið með einhverjum breytileika milli vikna og sýnatökustaða og heldur hærri talningar fengust á sýnatökustöð BSF 5. Minnst var í sýni BSF 2 á 20m dýpi þann 13. Júlí (0,55 milljón frumur/mL) en hæsta talningin var í sýni BSF 5 á 1m dýpi 21. Júlí (2,04 milljón frumur/mL). Á þremur af fjórum sýnatökustöðum var heildarfjöldi mestur 21. júlí en minnstur 9. ágúst en breytingar á fjölda voru almennt ekki miklar á milli vikna (myndir 9 og 10).

Út frá talningum á svifþörungum má sjá að almennt er aukning milli vikna á fjölda svifþörungum yfir tímabilið. Taka skal fram að tvö sýni misfórust í meðhöndlun, BSF 2-20m-21 júlí og BSF 5 20m 9 ágúst og því eru ekki til gögn fyrir þau sýni. Á gröfunum má sjá að ágæt samsvörun er á milli heildarfjölda örvera og fjölda svifþörungum eftir sýnatökustað. Aftur á móti má sjá að ef tölur fyrir heildarfjölda örvera annars vegar og svo svifþörungum hins vegar eru bornar saman virðist sem heildarfjöldi örvera minnki lítillega yfir tímabilið á meðan fjöldi svifþörungum aukast (Myndir 9 og 10). Það verður þó að hafa í huga að þó gögnin gefi ákveðnar vísbendingar var aðeins um eina staka sýnatöku í hvert skipti. Hugsanlega þarf að taka fleiri endurtekin sýni í hvert skipti til að auka á styrk gagnanna og yfir lengra tímabil til að sjá hvort að magn þörungum og örvera er að fara yfir ákveðinn topp á þessu tímabili eða hvort að um tilviljanakenndar breytingar sé að ræða.

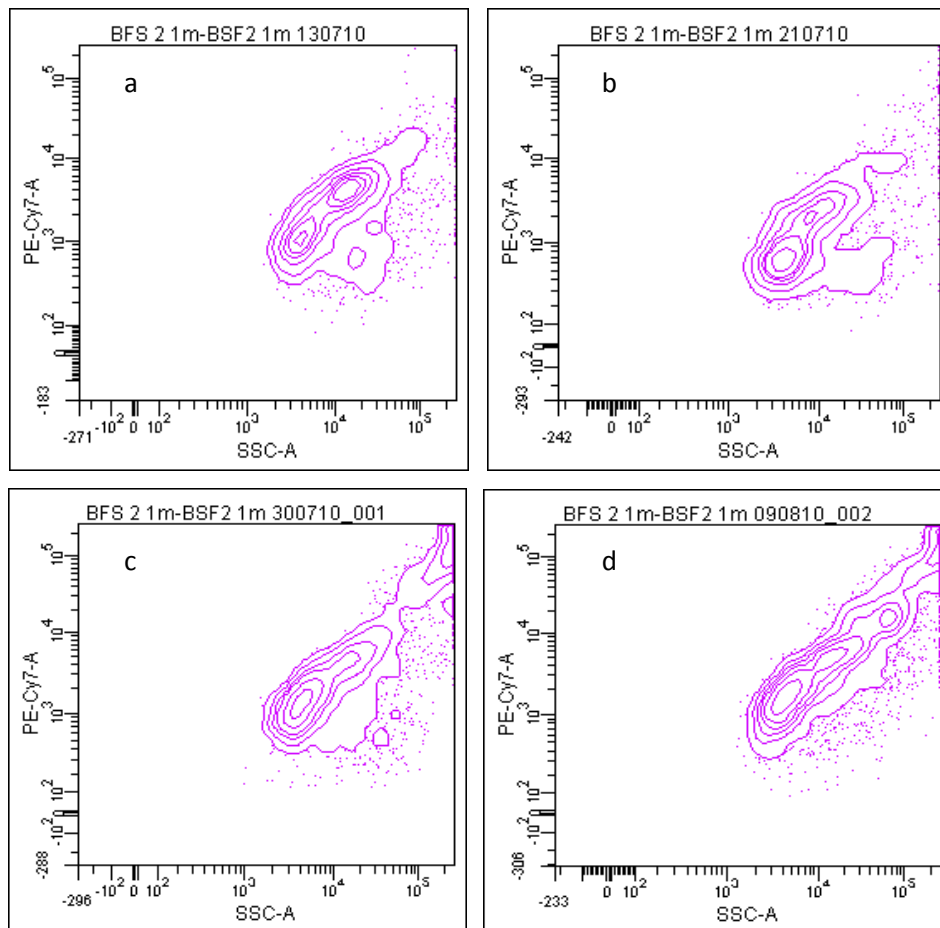
Þegar sýni úr Breiðafirði eru skoðuð m.t.t. tíma sýnatöku er ekki mjög greinanleg munur og þá sérstaklega á heildarfjölda örvera. Aftur á móti sjást ákveðnar breytingar á ákveðnum hópum þegar þeir eru skoðaðir sérstaklega. Á mynd 11 eru sýnd gröf úr örverugreininum af sýnum tekin á sama stað með viku millibili sem sýna líklega breytingar á einfrumu svifþörungum á svæðinu. Þetta eru hópar sem hafa hlutfallslega stórar frumur og eru með náttúrulega flúrljómun. Á myndunum virðast vera nokkrir mismunandi hópar til staðar þar sem sumir þeirra eru til staðar yfir allt tímabilið eru aðrir að hverfa eða myndast. Mögulegt væri að skoða þetta nánar með því að einangra þessa hópa í örverugreininum og skoða nánar með öðrum aðferðum.



Mynd 9. Á grafinu má sjá heildarfjölda örvera sem talið var með FACSaria II flæðisjá og reiknaður fjöldi á hvern ml/sjó. tekin voru sýni vikulega yfir tímabilið sem mælt var og sýni tekin á tveimur stöðum á 1m og 20m dýpi.



Mynd 10. Á grafinu má sjá heildarfjölda svifþörunga sem talið var með FACSaria II flæðisjá og reiknaður fjöldi á hvern ml/sjó. tekin voru sýni vikulega yfir tímabilið sem mælt var og sýni tekin á tveimur stöðum á 1m og 20m dýpi.



Mynd 11. Á myndum a, uppi til vinstri -d, niðri til hægri, má sjá tvívíð gröf af sýni sem tekin eru á sömu stöð við Breiðafjörð á fjögurra vikna tímabili. X-ásinn sýnir SSC (side scatter) sem gefur stærð og Y-ásinn er filter PE-CY7 sem nemur náttúrulega flúrljómun frumna í sýnunum.

Almennt gefur greining með flæðisjá mikilvægar upplýsingar á sjávarsýnum sem erfitt er að ná fram á annan hátt. Aðferðin býður upp á að fylgjast vel með breytingum á örverumassa með einföldum talningum með einfaldri flúrmerkingu en að auki er hægt að greina mismunandi hópa á grundvelli stærðar og náttúrulegrar flúrljómunar.

3.2. Skimun fyrir *V. parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus er algeng sjávarörvera í efri lögum sjávar og í strandsjó og skelfiski víða um heim, enkum í hljújum sjó (Rosec, Simon et al. 2009). Sumar gerðir *V. parahaemolyticus* getur valdið alvarlegum matvælasýkingum sýkingum í mönnum og haft áhrif á öryggi sjávarafurða. Breytingar hafa orðið á dreifingu *V. parahaemolyticus* udnanfarin ár og matareitranir sökum bakteríunnar eru vaxandi vandamál í Evrópu og N. Ameríku (McLaughlin, DePaola et al. 2005; Ward and Bej 2006). Ástæður þessa eru einkum raknar til

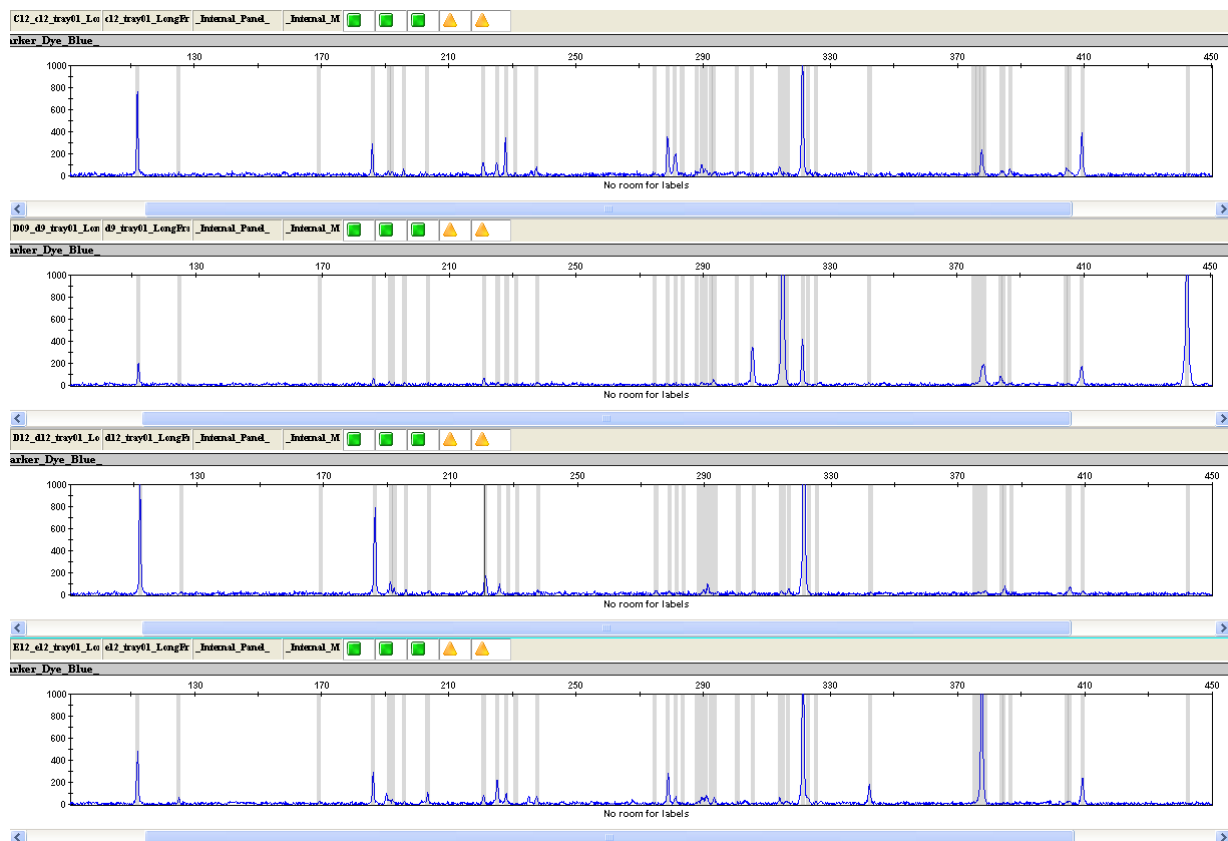
hlýnunar sjávar á norðurhveli. Með hlýnun sjávar kringum Ísland má telja líklegt að bakterían greinist í umhverfi og sjávarfangi við Íslandi innan tíðar. Skimað var fyrir *V. Paramaemolyticus* í sjósýnum úr hlýjum sjó sunnan af landinu úr í sýnum 336-355 þar sem yfirborðshit sjávar var milli 8-10°C. Enginn *V. parahaemolyticus* greindist í þessum sýnum.

3.3. Fingrafar örverusamfélaga (t-RFLP)

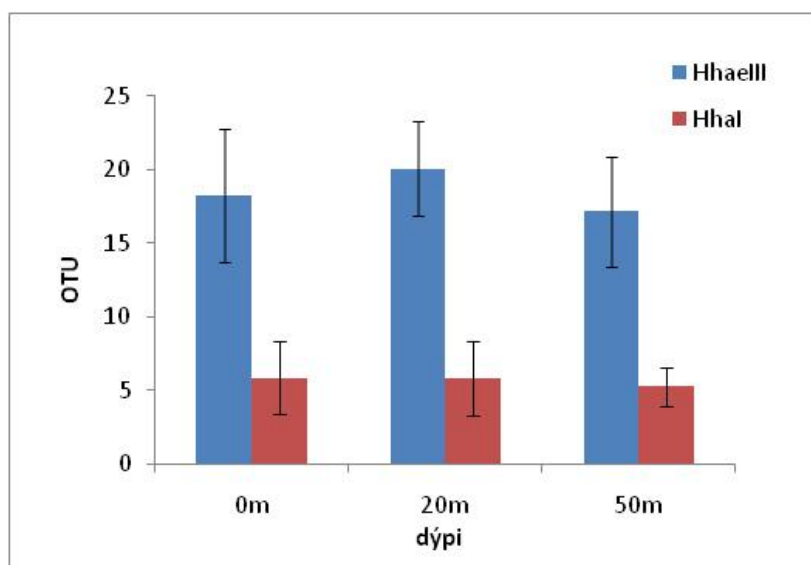
Fjölbreytileiki örveruflórunnar í hafinu umhverfis Ísland var kannaður á völdum sjósýnum með T-RFLP aðferð. Fingraför örverusamfélaga, svokölluð T-RFLP mynstur, má sjá á mynd 12 úr nokkrum völdum sýnum af 50m dýpi. Aðferðin er fljótleg og einföld leið til að fá hugmynd um fjölbreytileika örversamfélaga og var notuð til að bera saman fjölbreytileika í sýnunum og til að velja sýni til frekari greiningar. Með þessari aðferð má aðgreina mismunandi örveruhópa „operational taxonomic unit“ (OTU) og fá hugmynd um fjölbreytileika örverusamfélagsins. Aðferðin byggir á notkun skerðiensíms sem klippir alltaf á tiltekna basaröð erfðaefnisins. Í tilfelli skerðiensímsins *HaeIII* sem hér var notað er basaröðina GGCC. Hver örveruhópur, eða hópur skilda örvera hefur skerðiset á tilteknum stað og er sú staðsetning breytileg milli hópa. Mislangir DNA bútar myndast því við skerðingu eftir því hvaða örveruhópur á í hlut. Ólíka örveruhópa má því aðgreina með þessari aðferð og hver toppur á t-RFLP gröfunum táknar tiltekinn örveruhóp. PCR afurðin er flúrmerkt og myndar þannig mislanga DNA búta eftir því hvaða tegund á í hlut og eru þeir sýndir sem toppar á grafi. Fjöldi toppa á grafinu gefur því til kynna fjölda ólíkra örveruhópa, hæð toppa á grafinu gefur ákveðna hugmynd um hlutfallslegt magn hvers hóps fyrir sig. Hvern topp á gröfunum má líta á sem eitt OTU (Mynd 12).

Úr sýnunum 38 úr vorrallinu sem skoðuð voru greindust 42 örveruhópar eða OTU með *HaeIII* skerðingu og 16 OTU með *HhaI* skerðingu. Að meðaltali greindust 18.5 hópar úr sýnum teknum af 0-50m dýpi með *HaeIII*, en 5.6 með *HhaI*. Ekkert skerðibútamynstur fékkst úr einu sýnanna með *HhaI* (sýni 291x20m). Mynd 13 sýnir meðalfjölda skerðibúta eftir dýpi (0, 20 og 50m) með hvoru skerðiensímanna fyrir sig. Ekki er tölfræðilega marktækur munur á fjölda OTU af 0, 20 eða 50m dýpi. Miðað við þessar niðurstöður var því notast við fingraför fengin með *HaeIII* skerðingu þar sem um betri upplausn á örverusamfélögunum fékkst miðað við skerðingu með *HhaI*. Tvö stök sýni voru tekin af meira dýpi á tveimur af sýnatökustöðunum. Á sýnatökustöð 355 var sýni tekið á 250m dýpi og annað á 800m dýpi á stöð 353. Var fjöldi

OTU við 250m sambærilegur við sýni tekin af 0-50m dýpi en fjölbreytileiki á 800m dýpi reyndist mun minni með *HaeIII* skerðingu og tölfræðilega marktækur m.v. 99% öryggismörk. T-RFLP niðursöðurnar voru notaðar til að velja úr sýni til frekari greiningar með klónun og raðgreiningu. Í framhaldi af t-RFLP fingrafaragreiningunni voru sex sjósýni valin til klónagreiningar sem dekkuðu bróðurpartinn af þeim skerðibútum sem greindust í sýnatökunni og þar með örverufjölbreytileikann. Eftirfarandi sýni voru valin til klónunnar: 353-0m, 355-250m, 348-0m, 353-800m, 310-50m og 296-50m. Saman náðu þessi sex sýni yfir 46 af þeim 51 OTU (90% fjölbreytileikans) sem greindust með skerðibútagreiningunni með *HaeIII* og 12 af 18 OTU sem greindust með *HhaI*. Við val sýnanna var miðað við að hver OTU næði að lágmarki ~2% af heildarhlutfalli OTU í einhverju sýnanna. Með því móti ætti fræðilega að vera mögulegt að klófesta mestan fjölbreytileikanum með klónun (2% -> 2 klónar af hundrað) og 16S rRNA raðgreiningu.



Mynd 12. T-RFLP mynstur með *HaeIII* skerðingu úr sýnum teknum af 50m dýpi á fjórum sýnatökustöðum. Hvern topp má skilgreina sem eitt OTU (operational taxonomic unit) eða örveruhóp.



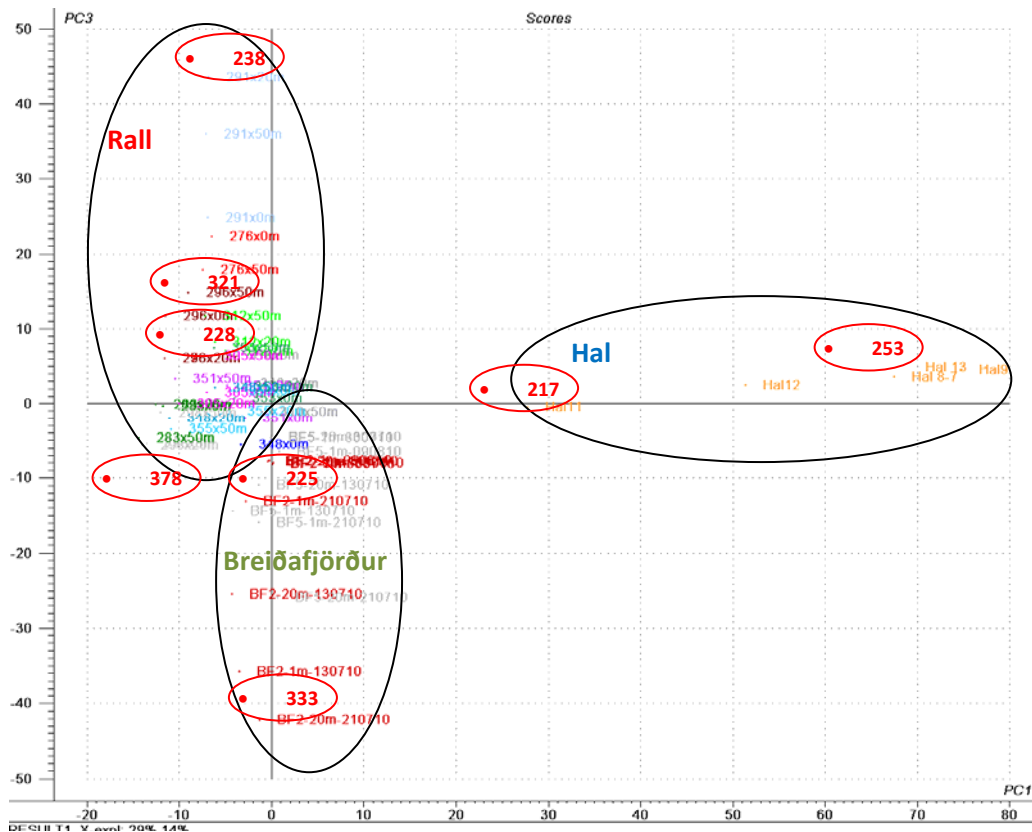
Mynd 13. Meðalfjöldi OTU eftir dýpi (0, 20 og 50m) með skerðiensímunum tveimur (*Hhaell* og *Hhal*).

3.4. Höfuðþáttgreining (PCA) til samanburðar á bakteríusamsetningu

3.4.1. Öll sýni

Til að skoða frávik á bakteríusamfélögum tekin af mismunandi svæði og dýpi var notast við höfuðþáttgreiningu á T-RFLP gögnunum.

Þegar öll sýni sem tekin voru í rannsókninni eru skoðuð saman þ.e. úr vorralli Hafrannsóknarstofnunar, úr Breiðafirði og úr hali togara má bersýnilega sjá mun á milli sýnatöku lota (mynd 14). Þar má sjá að höfuðþáttur 1 (PC1) aðgreinir togara sýnin frá öðrum sýnum lárétt í gegn um grafið en PC3 aðgreinir svo á milli rall sýna hafró og sýna úr Breiðafirðinum. Saman ná PC1 og PC3 að útskýra um 43% breytileikans í gögnunum. Þegar PC1 var skoðaður á móti PC2 greindust togarasýnin frá öðrum sýnum en Breiðafjarðar og rall sýnin blönduðust saman og því fengust meiri upplýsingar úr gögnunum með því að skoða PC1 á móti PC3. Það sem einkennir togara sýnin umfram önnur sýni er að toppar af stærð 217bp og 253 bp eru í háu hlutfalli en finnast ekki í neinum öðrum sýnum. Breiðafjarðarsýnin hafa mörg hver topp af stærð 333 bp í háu hlutfalli þó svo að sum sýnin þaðan hafi hann ekki. Sérstaða rallsýnanna liggur þá helst í toppum af stærð 238 bp, 321 bp og 228 bp.



Mynd 14. Samanburður á fingraförum (T-RFLP mynstra) bakteríusamfélaga með höfuðþáttagreiningu úr öllum sýnum rannsóknarinnar (Bi-plot). Hver sýnatökustaður er merktur í sama lit. Rauðir hringir innihalda toppa úr T-RFLP mynstri sem eru ráðandi við dreifing sýna á grafið. Svartir hringir eru dregnir utan um sýni af mismunandi uppruna þ.e. vorrall, Breiðafjörður og hal sýni.

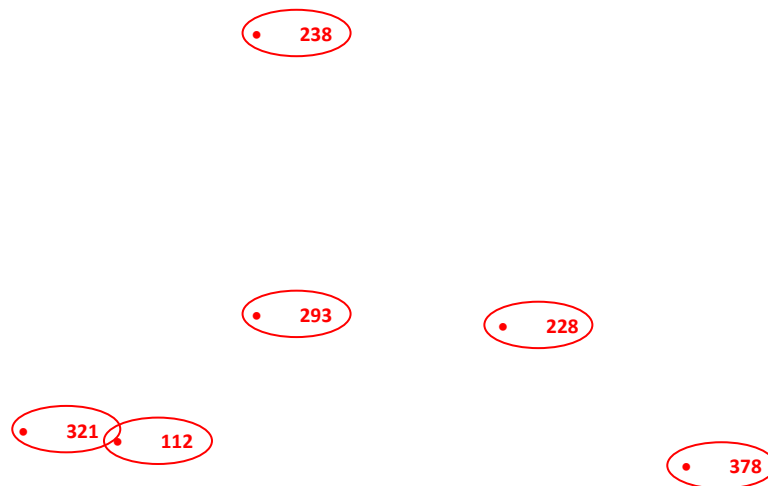
3.4.2. Íslandsmið

Mynd 15 sýnir hvernig sýnin 38 sem tekin voru úr ralli Hafrannsóknarstofnunar dreifast innbyrðis í tvívíðu plani greiningarinnar. Höfuðþættir 1 og 2 skýra samtals 54% breytileikans í gögnunum. Í grafinu má sjá að öll sýnin af Siglunesi skera sig mest úr skv. PC2 og orsakast það einna helst af toppi 238 sem er þar í hærra hlutfalli miðað við aðra staði. Einnig má sjá að sýni 291, 296 og 276 raðast öll ofan við PC1 línuna en þessi sýni eru norðan og vestan af landinu. Þá má sjá að öll sýni sem tekin eru af Selvogsbanka sunnan af landi raða sér þétt saman neðarlega til hægri í grafinu sem bendir til innbyrðis líkinda á örverusamfélögum. Dreifingin á þeim er einnig lítil sem helst í hendur við stutta fjarlægð milli sýnatökustaða miðað við sýni af öðrum svæðum. Innbyrðis líkindi sýna norðan og norðaustan af landinu er minni en sem helst í hendur við lengri fjarlægðir milli sýnatökustaða. Þrátt fyrir greinanlegan mun á örverumynstri sýna tekin af mismunandi svæðum er einnig þó nokkra skörun að finna. Áhugavert er að sjá að sýnin af Langanesi, norðaustan af landi (sýni 305,310 og 312) raðast

nálægt sýnunum af Selvogsbanka í PCA greiningunni, suðvestan af landinu þrátt fyrir að vera ólík að flestu öðru leyti s.s. hitastig sjávar, seltu, flúrljómun, langa vegalengd á milli svæða og ólík hafstraumakerfi milli svæðanna (Viðauki 1).

Gögnin sýna þá almennt að breytileiki bakteríusamfélaga er meiri á milli sýnatökusvæða en sýnatökudýpt.

Tvö sýni voru tekin af meira dýpi, af stöð 353 á 800 m dýpi og 355 á 250 metra dýpi. Á mynd 15 er ekki að sjá að þessi sýni séu frábrugðin en ef höfuðþáttur 3 skoðaður á mótí höfuðþætti 1 (í stað PC2) dregur sýni 353 sig út sem má helst rekja til topps af 195 bp stærð sem er þar í 65% hlutfallin en finnst í mjög litlu magni í öðrum sýnum. Sýni 355 af 250 m dýpi var að mörgu leyti svipað og önnur sýni af sömu slóðum þrátt fyrir meira dýpi.

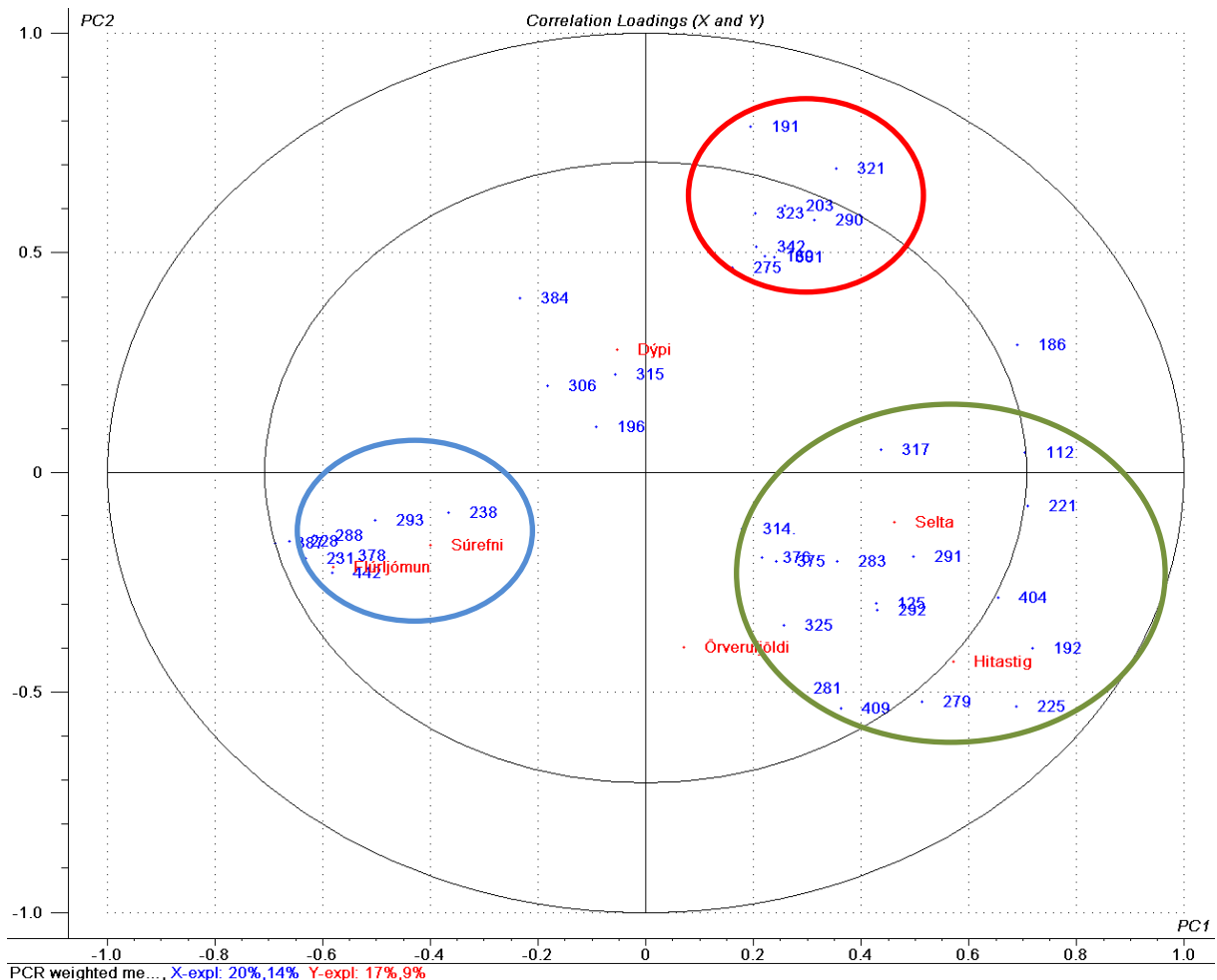


Mynd 15. Innbyrðis skyldleiki sýna úr vorralli Hafrannsóknarstofnunar greint með höfuðþáttgreiningu t-RFLP gagna. Sýni tekin af sömu sýnatökustöð eru merkt með sama lit. Tölur inn í rauðum hring er stærð toppa í basapörum sem hafa ráðandi áhrif á dreifingu sýna á grafinu.

Þar sem gögn um helstu umhverfisþætti liggja fyrir úr vorrallinu var gerð tilraun til þess að finna fylgni á milli umhverfisþátta og samsetningu örveruflórunnar með notkun „Principal Component Regression“. Á mynd 16 má sjá niðurstöður þessarar greiningar á „correlation loadings“ grafi. Myndin sýnir hvernig topparnir úr hverju sýni fyrir sig dreifast á þá umhverfisþætti sem mældir voru. Ytri hringurinn á myndinni táknar 100% útskýrðan

breytileika í gögnunum á meðan innri hringurinn táknar 50% útskýrðan breytileika. Því utar sem topparnir raða sér því meiri líkur eru á marktækri fylgni. Mestu fylgni toppa greindist með hitastigi sem er staðsett yst allra umhverfisþátta á grafinu. Þar má sjá að í þeim sýnum sem mældist hátt hitastig er líklegt að tilteknir bakteríuhópar (sem tilheyra toppum 225,279,192,404,281 o.fl.) fylgi í hærra hlutfalli en í sýnum með lægra hitastig (Mynd 16, afmarkað með grænum hring). Þau sýni sem mældist með hæsta hitastigið komu flest af Selvogsbankanum. Hærrí selta sýnir þá einnig nokkra fylgni með sömu toppum.

Einnig má sjá að ákveðnir örveruhópar fylgja hærra magni súrefnis og flúrljómunar (Mynd 16, blár hringur) á meðan enn aðrir hópar eru í öfugu hlutfalli við þessa umhverfisþætti (Mynd 16, rauður hringur). Á þessari greiningu er ekki að sjá að dýpi hafi minna að segja um samsetningu baktería í sýnunum en aðrir umhverfisþættir sem mældir voru.



Mynd 16. Fylgni á milli mældra umhverfisþátta (y-breytur, rautt letur) og toppa í t-RFLP (x breytur, blátt letur) með „Principal Component Regression“ (PCR) greiningu.

3.4.3. Breiðafjörður

Þegar sýnin úr Breiðafirðinum eru skoðuð ein og sér með höfuðþáttgreiningu má sjá að sýni sem tekin eru 30. júlí og 9. ágúst raða sér nokkuð þétt saman sem bendir til sambærilegrar örverusamfélags en önnur sýni dreifast víðar (Mynd 17). Nokkur sýni innihalda topp 333 bp í mismiklu hlutfalli sem PC1 greinir frá en á hinn bóginn virðist toppar að stærð 378 bp og 404 bp aðskilja sýnin eftir PC2.

Frekari rannsókna og fleiri sýna er þörf til að geta dregið ályktanir um breytingar á t-RFLP mynstrum með tíma og milli svæða. Unnið er að söfnun frekari sýna til þess.



Mynd 17. Innbyrðis skyldleiki sýna úr Breiðafirði. Sýni tekin á sömu dagsetningu eru merkt með sama lit. Tölur inn í rauðum hring er stærð toppa í basapörum og ráðandi áhrif á dreifingu sýna á grafinu.

3.5. Klónagreining

Klónagreining var framkvæmd á 576 16S rRNA klónum úr 7 sjósýnum (Tafla 1). Þrenn sjósýni voru greind úr Breiðafirði (BF2.20m, BF2.1m og BF5.20m), þrenn sjósýni úr vorralli Hafrannsóknarstofnunnar (348-0m, 353-0m, 355-250m) og eitt sýni (hal 11) var tekið var með botnvörpa togarans Klakks við veiðar útaf norðanverðum Vestfjörðum.

Örverusamsetning sjósýnanna var mjög fjölbreytileg - að undanskildu hal sýninu en sýnataka þess er annars eðlis en hinna sýnanna fimm (sjá neðan) og tekið var með botnvörpu við veiðar. Simpson's fjölbreytileikastuðull var reiknaður fyrir sýnin en hann metur líkurnar á því að tvær raðir valdar úr sýninu af handahófi tilheyri ólíkum tegundum. Simpson's fjölbreytileikastuðull hal-sýnisins var 0.434 en fjölbreytileikastuðull hinna sjósýnanna fimm á bilinu 0.820-0.969.

Tafla 1. Örverufjölbreytileiki samkvæmt Simpson's fjölbreytileikastuðli. Stuðullinn segir til um líkur þess að tvær raðir valdar af handahófi úr sýninu tilheyri tveimur ólíkum tegundum.

Sýnatökustaður	Sýni	Simpsons diversity index
Breiðafjörður	BF2.20m	0,834
Breiðafjörður	BF2.1m	0,776
Breiðafjörður	BF5.20m	0,969
Vorrall	355-0m	0,983
Vorrall	355-250m	0,994
Vorrall	348-0m	0,965
Hal	Hal 11	0,434

Samsvörun 16S rRNA raðanna var gerð við 16S rRNA gena raðir í NCBI gagnabankanum til að ákvarða mesta skyldleiki 16S raðanna í sýnunum við þekktar raðir. Með þeim samanburði má finna nánasta þekkta ættingja tegundarinnar sem finnst í sýninu, ræktaðan eða óræktaðan. Flokkun raða til tegunda var miðuð við 98% skyldleikamörkun við þekktar raðir í gagnabankanum. Í mörgum tilfellum var skyldleiki raðanna við þekktar raðir það lítill að ekki reyndist mögulegt að greina bakteríurnar nema til fylkingar eða flokks. Helmingur raðanna úr sýnunum sex (51%) sýndi 95-100% samsvörun við þekktar raðir í gagnabankanum, 30% sýnanna sýndu 90-95% skyldleika og 19% raðanna sýndu 80-90% skyldleika við þekkta röð. Af öllum 16S röðunum höfðu 30% meiri en 10% breytileika við þekktar raðir, og tilheyra óþekktum tegundum og í sumum tilfellum jafnvel nýjum ættkvíslum.

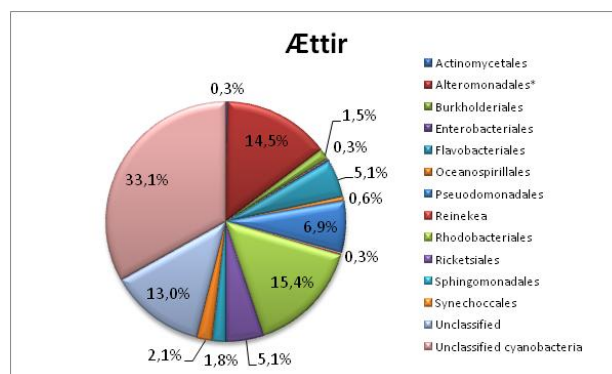
Átta flokkar (class) baktería greindust í sjósýnunum: Alpha-, Beta-, Gamma-, og Delta-proteobacteria, auk *Cyanobacteria*, *Flavobacteria*, *Firmicutes* og *Actinobacteria*. Hlutfall baktería eftir sýnum er listað upp eftir flokkum á myndum 18-24 (A) og eftir ættum á myndum 19-23 (B). Proteobacteria af flokki Alpha og Gamma-proteobacteria voru stór hluti bakteríusamfélagsins. Alpha-proteobacteria greindust úr öllum sjósýnanna í 14-57% hlutfalli.

Þetta helst í hendur við birtar rannsóknir á örverufjölbreytileika hafsins þar sem bakteríur af flokki Alpha-proteobacteria eru ríkjandi (Biers, Sun et al. 2009). Gamma-proteobacteria eru einnig algengar, í sýnum úr vorrallinu reyndust 17-38% 16S raðanna tilheyra Gamma-proteobakteríum. Bakteríur úr þeim flokki fundust hins vegar ekki í sýnum úr Breiðafirði. Beta-proteobacteria voru sjaldséðar en nokkrar slíkar bakteríur greindust þó úr sýnum 348-0m (1%) og 355-250m (4%). *Flavobacteria* greindust úr fernum sýnanna og voru í nokkuð háu hlutfalli í sýni 353-0m (9%) en annars skipuðu þær fremur lágt hlutfall (1-4%). Auk ofangreindra bakteríuflokka greindust bakteríur af flokki *Actinobacteria* í einu Breiðafjarðarsýnanna (3%).

Mjög hátt hlutfall *Cyanobacteria* eða *Cyanobacteria*-líkra 16SrRNA raða var að finna í sjósýnunum (348-0m, 355-250m, BF2.20m og BF5.20m), að undanskildu sýni 353-0m sem tekið var mun sunnar fjær landi. Hlutfall *Cyanobacteria* var á bilinu 39-68% í þessum fjórum sýnum en einungis 4% í sýni 353-0m. Auk óræktaðra *Cyanobacteria* greinast einnig *Synechococcus sp.* tegundir blágrænna baktería í sýnunum sem þar til nýlega voru einkum taldar einskorðast við lægri breiddargráður vegna sjávarhita (Cottrell and Kirchman 2009). Þetta háa hlutfall *Cyanobacteria* kemur nokkuð á óvart en samkvæmt fyrri rannsóknum er hlutfall blágrænna baktería í hafinu mun lægra (Pommier, Canback et al. 2007). Þó sýna rannsóknir Pommier og félaga (2007) einnig að hlutfall blágrænna þörunga er hlutfallslega hærra við norðlægri breiddargráður. Sú tilhneiging skýrir þó ekki fyllilega það háa hlutfall sem hér greinist. Sennileg skýring á þessu mikla magni blágrænna baktería á mörgum sýnatökustaðanna gæti falist í því að megnið af *Cyanobacteria*-líku röðunum höfðu einnig samsvörun við 16S raðir grænu-korna (chloroplast) kísilþörunga. Það er því mögulegt að ekki sé um eiginlegar *Cyanobacteria* að ræða heldur 16S mögnun úr grænu-kornum kísilþörunga sem eru ríkjandi í þörungaflóru hafsins umhverfis landið. Hafa ber það í huga þegar gögnin eru skoðuð, en sé það raunin eru framsetningin á hlutfallsdreifingu *Cyanobacteria* í örveruflórunni nokkuð ýkt.

Alls greindust 12 ættir (order) baktería í sýnunum og eru þær listaðir upp á mynd 18. Mishátt hlutfall klóna tókst að greina niður í ættir eftir sýnum. Úr eiginlegu sjósýnunum fimm tókst að greina 20-80% klónanna niður í ættir, en ekki reyndist unnt að greina raðirnar til ættkvísla og tegunda nema í mjög fáum tilfellum; einungis tókst að greina 19 raðir (~4%) til ættkvísla úr sjósýnunum fimm. Þetta stafar af því hve hátt hlutfall bakteríutebundanna í sýnunum eru áður óþekktar og tilheyra jafnvel í sumum tilfellum nýjum ættkvíslum.

Alla klóna úr hal-sýninu sem var mjög einsleitt tókst að greina niður til ættkvísla (genus). Hal-sýnið samanstóð að mestu leiti (94%) af *Pseudoalteromonas* sp. bakteríum af ættbálki *Alteromonadales* sem finnst í mjög litlu mæli í hinum sýnanna. Aðrar tegundir sem þar var að finna voru *Psychrobacter* sp. (4%) auk *Comomonas* sp. (2%). Þessar bakteríutegundir eru vel þekktar fiskibakteríur og hafa verið greindar bæði á roði lifandi fiska og við geymslu á heilum fiski og flökum (Wilson, Danilowicz et al. 2008; Reynisson, Lauzon et al. 2009; Reynisson, Lauzon et al. 2010). Þar sem sýnatökubúnaðurinn er í trollinu og mjög mikið af fiski safnast þar saman þarf ekki að koma á óvart að samsetning þessa sýnis sé ólík hinum sjósýnunum og samanstandi einkum af bakteríum sem vaxa í tengslum við fiska.



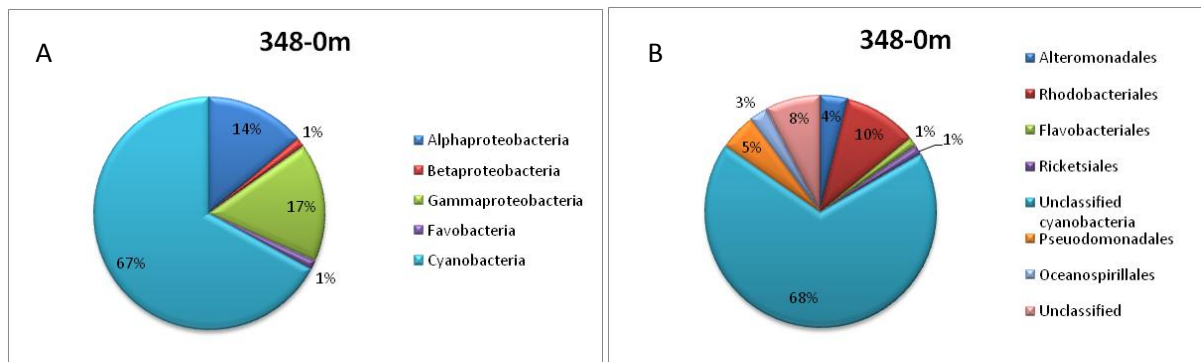
Mynd 18. Dreifing bakteríuhópa í sjósýnum eftir ættum skv. 16SrRNA hlutraðgreiningu.

Hér fyrir neðan verður farið nánar yfir tegundagreiningar fyrir hvert sýni fyrir sig. Töflur 2-8 sýna niðurstöður 16S tegundagreiningar á sýnunum og Myndir 19-23A og B sýna hlutfallslega dreifingu bakteríutegunda í sýnunum m.t.t. flokka (19-23A) og ætta (19-23B). Nýjar tegundir eru tilgreindar með bláum lit í skyldleika dálknum. GenBank númer er gefið upp í tölfum um tegundafjölbreytileika en með því má ýmsar upplýsingar um nánasta ættingjann í GenBank.

3.5.1. Íslandsmið

Sýni 348-0m var tekið á Selvogsbanka útifyrir Suðurlandi. Mikill tegundfjölbreytileiki greindist í þessu sýni og var Simpson's fjölbreytileikastuðullinn 0.965 sem merkir að 96.5% líkur séu á því að tvær raðir teknar af handahófi úr sýninu tilheyri tveimur ólíkum tegundum. *Cyanobacteria* og *Cyanobacteria*-líkar raðir voru ríkjandi í þessu sýni eða 67% tegundanna. Engin *Cyanobacteria* átti þó ræktaðan nánast ættingja og ekki reyndist mögulegt að flokka þær frekar niður til ættkvísla eða ætta. Margar *Cyanobacteria* raðanna áttu ennfremur mikinn skyldleika við grænuhorn ýmissra kísilþörunga eins og áður hefur verið nefnt og gætu

hafa tilheyrt þörungategundum sem ekki hafa síast frá eða brotnað upp við filtreringu sýnanna. Alpha-proteobakteriur af ætt *Rhodobacterales* (10%) voru algengar í sýninu og thilheyrdðu helmingur þeirra nýjum tegundum. Ein baktería af flokki Beta-proteobaktería og ein af flokki *Flavobacteria* greindust í sýninu, hvor um sig sýndi aðeins 88% skyldleika við nánasta ættingja og eru þær því afar fjarskildar öllu því sem fundist hefur áður (Mynd 19, Tafla 2).

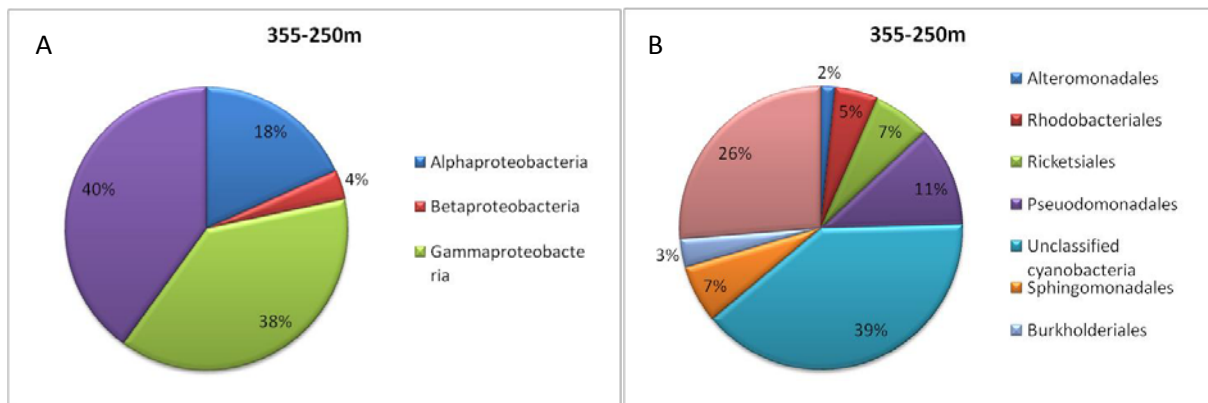


Mynd 19. Dreifing örveruhópa í sjósýni 348-0m skvt. 16SrRNA klónagreiningu. Mynd A sýnir dreifingu baktería eftir flokkum en mynd B dreifingu eftir ættum.

Tafla 2. Tegundafjölbreytileiki baktería í sýni 348-0m. 79 klónar, 36 tegundir. Nýjar tegundir eru tilgreindar með bláum lit í skyldleika dálknum.

Sýni-fjöldi ^{a)}	Nánasti ættingi í GenBank	Skyldl. ^{b)}	Fylking	GenBank locus ^{d)}
348-0-con24-2	Alpha proteobacterium IMCC10409 16S ribosomal RNA gene	97%	α-proteobacteria	FJ532487.1
348-0-P17-2	Alpha proteobacterium IMCC10434 16S ribosomal RNA gene	87%	α-proteobacteria	FJ532479.1
348-0-D5-1	Uncultured bacterium clone DP10.2.34 16S ribosomal RNA gene	93%	??	FJ612352.1
348-0-con3-10	Uncultured Cyanobacterium sp. clone CM01187X1B01 16S ribosomal	99%	Cyanobacteria	GU170675.1
348-0-B5-1	β- proteobacterium IMCC10439 16S ribosomal RNA gene	88%	β-proteobacteria	FJ532484.1
348-0-B3-1	Candidatus Pelagibacter ubique HTCC1062, complete genome	98%	α-proteobacteria	CP000084.1
348-0-B6-1	Uncultured Cyanobacterium sp. clone CM01187X1F10 16S ribosomal	93%	Cyanobacteria	GU170717.1
348-0-A11-1	Uncultured Cyanobacterium sp. clone CM01187X1F10 16S ribosomal	97%	Cyanobacteria	GU170717.1
348-0-con8-8	Uncultured Cyanobacterium sp. clone CM01187X1F10 16S ribosomal	97%	Cyanobacteria	GU170717.1
348-0-D3-1	Uncultured Cyanobacterium sp. clone CM01187X1F10 16S ribosomal	96%	Cyanobacteria	GU170717.1
348-0-C8-1	Uncultured Cyanobacterium sp. clone CM01187X1F10 16S ribosomal	96%	Cyanobacteria	GU170717.1
348-0-E7-1	Colwellia sp. B5s20151	95%	γ-proteobacteria	EU365514.1
348-0-con1-2	Coscinodiscus radiatus chloroplast 16S rRNA gene, strain p148	98%	Eukaryotic chloroplast	AJ536462.1
348-0-C1-1	Endosymbiont of Bathymodiolus aff. brevior	94%	γ-proteobacteria	DQ077891.1
348-0-con6-4	Uncultured cyanobacterium partial 16S rRNA gene, clone TAU-7-73	97%	Cyanobacteria	AM259750.1
348-0-con9-2	Glaciicola sp. B5s20135	88%	γ-proteobacteria	EU365479.1
348-0-D6-1	Uncultured cyanobacterium clone LC3-54 16S ribosomal RNA gene	91%	Cyanobacteria	DQ289913.1
348-0-D2-1	Marine γ- proteobacterium HTCC2151 16S	99%	γ-proteobacteria	AY386342.1
348-0-con26-2	Marinomonas sp. Y5 16S	92%	γ-proteobacteria	DQ279852.1
348-0-con19-2	Neptunomonas sp. NF4-29	90%	γ-proteobacteria	FJ889618.1
348-0-B1-1	Uncultured Cyanobacterium sp. clone CM01187X1F10 16S ribosomal	95%	Cyanobacteria	GU170717.1
348-0-B12-1	Uncultured cyanobacterium partial 16S rRNA gene, clone TAU-7-73	96%	Cyanobacteria	AM259750.1
348-0-B7-1	Polaribacter sp. W-2 16S	88%	Flavobacteria	DQ923436.1
348-0-con12-4	Pseudomonas sp. LC07	100%	γ-proteobacteria	EU595584.1
348-0-A12-1	Psychromonas sp. ANT9282b	97%	α-proteobacteria	AY167263.1
348-0-E10-1	Rhodobacter sp. CR07-8	86%	α-proteobacteria	EU979475.1
348-0-A7-1	Rhodobacteraceae bacterium 183	90%	α-proteobacteria	AJ810844.1
348-0-B2-1	Rhodobacterales bacterium CB1005	95%	α-proteobacteria	FJ869041.1
348-0-D12-1	Rhodobacterales bacterium CB1005	96%	α-proteobacteria	FJ869041.1
348-0-G6-1	Roseobacter sp. 3008	87%	α-proteobacteria	AM110967.1
348-0-D09-1	Roseobacter sp. ANT909	97%	α-proteobacteria	AY167254.1
348-0-con7-3	Uncultured bacterium clone A8W_156 16S ribosomal RNA gene	97%	??	HM057781.1
348-0-con13-4	Uncultured bacterium clone A8W_156 16S ribosomal RNA gene	98%	??	HM057781.1
348-0-H5-1	Uncultured cyanobacterium clone SIMO-838 16S ribosomal RNA gene	95%	Cyanobacteria	AY712375.1
348-0-con2-9	Uncultured bacterium clone PC-PA9-43 16S ribosomal RNA gene	89%	??	EF379769.1
348-0-E11-1	Uncultured bacterium clone SIMO-1019 16S ribosomal RNA gene	98%	??	AY712464.1

Sýni 355-250m var tekið á 250m dýpi á Selvogsbanka. Örverufjölbreytileikinn í því sýni var mikill; Simpson's fjölbreytileikastuðullinn var 0.994 með mjög háu hlutfalli áður óþekkra tegunda (47%) Óræktaðar *Cyanobacteria* voru ríkjandi í þessu sýni (40%) en líkt og í sýni 348-0m var ekki hægt að rekja þær til ætta. Gamma-proteobacteria voru einnig algengar (38%). Af Gamma-proteobacteria var hlutfall *Pseudomonas* tegunda hátt (14%) en einnig mikið um óþekktar Gamma- proteobacteria tegundir (25%) með litla samsvörun við nánasta ættingja í GenBank; allt niður í 88% og er þar jafnvel um nýja fjölskyldu Gamma-proteobacteria að ræða. Alpha-proteobacteria af ættum *Rickettsiales*, *Rhodobacteriales* og *Sphingomonadales* voru einnig algengar (17.8%), og margar þeirra áður óþekktar. Ein Beta-proteobacteria af ættkvísl *Delftia* sp. greindist í sýninu (Mynd 20, Tafla 3).

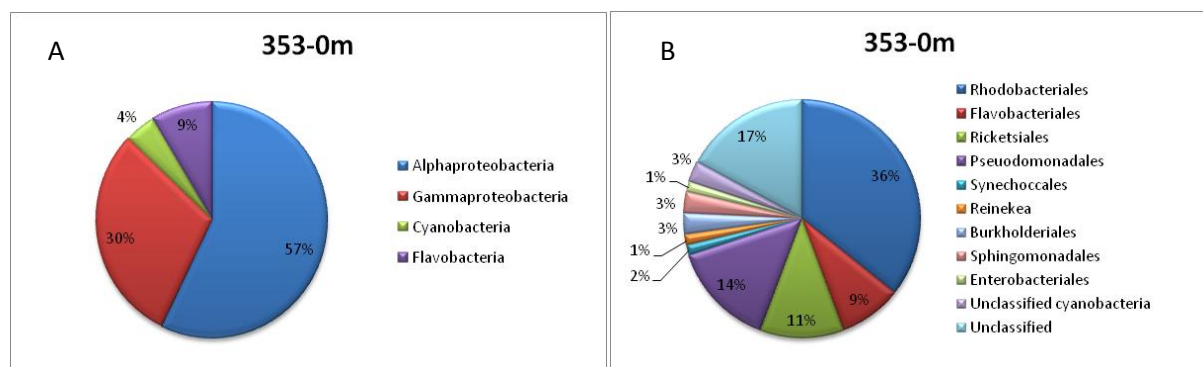


Mynd 20. Dreifing örveruhópa í sjósýni 355-250m skvt. 16SrRNA klónagreiningu. Mynd A sýnir dreifingu baktería eftir flokkum en mynd B dreifingu eftir ættum.

Sýni 353-0m var tekið á Selvogsbanka, úti fyrir Suðurlandi, fjær landi en hin sýnin tvö af Selvogsbanka. Ólíkt Selvogsbanka-sýnum 348-0m og 355-250m þar sem *Cyanobacteria* eða *Cyanobacteria*-líkar raðir voru ríkjandi eru *Cyanobacteria* hér einungis 4% tegundanna - allar áttu þær óræktaðan nánasta ættingja. Tegundfjölbreytileikinn í sýnin er mikill; Simpson's stuðullinn er 0.983 og gríðarlega mikið af nýjum tegundum. 76% tegundanna hafa $\leq 95\%$ samsvörun við nánasta ættingja og 18% raðanna hafa $\leq 90\%$ samsvörun við næsta þekhta ættingja og eru því mjög fjarskyldar og tilheyra sumar þeirra mögulega nýjum ættkvíslum. Alpha-proteobacteria er hér ríkjandi tegundir (57%) ásamt Gamma-proteobacteria (30%). Einkum Alpha-proteobacteria af ætt *Rhodobacteriales* (36%) ásamt Gamma-proteobacteria af ættkvísl *Pseudomonas*. *Flavobacteria* koma hér fyrir (9%) en þær er ekki að finna sem neinu nemur úr hinum tveimur sýnanna af Selvogsbanka (Mynd 21, Tafla 4).

Tafla 3. Tegundafjölbreytileiki baktería í sýni 355-250m. 64 klónar, 49 tegundir. Nýjar tegundir eru tilgreindar með bláum lit í skyldleika dálknum.

Sýni-fjöldi ^{a)}	Nánasti ættingi í GenBank	Skyldi. ^{b)}	Fylking	GenBank locus ^{d)}
355-250-D6-1	Uncultured Cyanobacterium sp. clone CM01187X1B01 16S ribosomal	95%	Cyanobacteria	GU170675.1
355-250-C4-1	Uncultured Cyanobacterium sp. clone CM01187X1B01 16S ribosomal	96%	Cyanobacteria	GU170675.1
355-250-E9-1	Uncultured Cyanobacterium sp. clone CM01187X1B01 16S ribosomal	96%	Cyanobacteria	GU170675.1
355-250-con2-7	Uncultured Cyanobacterium sp. clone CM01187X1B01 16S ribosomal	98%	Cyanobacteria	GU170675.1
355-250-con5-2	Uncultured Cyanobacterium sp. clone CM01187X1B01 16S ribosomal	97%	Cyanobacteria	GU170675.1
355-250-G6-1	Uncultured Cyanobacterium sp. clone CM01187X1B01 16S ribosomal	99%	Cyanobacteria	GU170675.1
355-250-E2-1	Candidatus Pelagibacter ubique	97%	α-proteobacteria	EU410957.1
355-250-B1-1	Candidatus Pelagibacter ubique	98%	α-proteobacteria	EU410957.1
355-250-H8-1	Candidatus Pelagibacter ubique	95%	α-proteobacteria	EU410957.1
355-250-E6-1	Uncultured Cyanobacterium sp. clone CM01187X1F10 16S ribosomal	96%	Cyanobacteria	GU170717.1
355-250-F2-1	Uncultured Cyanobacterium sp. clone CM01187X1F10 16S ribosomal	98%	Cyanobacteria	GU170717.1
355-250-F7-1	Uncultured cyanobacterium partial 16S rRNA gene, clone TAU-7-73	97%	Cyanobacteria	AM259750.1
355-250-con8-2	Delftia sp.	99%	β-proteobacteria	CP000884.1
355-250-B8-1	Uncultured cyanobacterium partial 16S rRNA gene, clone TAU-7-73	98%	Cyanobacteria	AM259750.1
355-250-E5-1	γ- proteobacterium HTCC2146	98%	γ-proteobacteria	EF182726.1
355-250-D3-1	Glaciecola sp.	97%	γ-proteobacteria	AY167271.1
355-250-A5-1	Marine γ- proteobacterium HTCC2290	97%	γ-proteobacteria	AY386338.1
355-250-C2-1	Uncultured bacterium clone A048_NCI 16S ribosomal RNA gene	99%	??	FJ456816.1
355-250-B4-1	Pseudomonas sp. a207	94%	γ-proteobacteria	EU434472.1
355-250-G11-1	Pseudomonas sp. GIT-1	98%	γ-proteobacteria	FJ426594.1
355-250-G10-1	Pseudomonas sp. Lc31-3	96%	γ-proteobacteria	GU733468.1
355-250-A4-1	Pseudomonas sp. LS197	96%	γ-proteobacteria	FJ937924.1
355-250-C1-1	Pseudomonas sp. phi9	94%	γ-proteobacteria	GU233953.1
355-250-H7-1	Pseudomonas sp. phi10	96%	γ-proteobacteria	GU233953.1
355-250-G8-1	Pseudomonas sp. phi11	98%	γ-proteobacteria	GU233953.1
355-250-H9-1	Reinekea sp. IMCC 4489	88%	γ-proteobacteria	GQ456131.1
355-250-E10-1	Rhodobacteraceae ACEMC 5-3	95%	α-proteobacteria	FM163081.1
355-250-A11-1	Rhodobacteraceae bacterium KS2	96%	α-proteobacteria	AB436779.1
355-250-B9-1	Rhodobacterales bacterium CB1040	84%	α-proteobacteria	FJ869045.1
355-250-A7-1	Sphingomonadaceae bacterium PHPY	88%	α-proteobacteria	EU179717.1
355-250-C9-1	Sphingomonadaceae bacterium PHPY	87%	α-proteobacteria	EU179717.1
355-250-B3-1	Sphingomonadaceae bacterium PHPY	87%	α-proteobacteria	EU179717.1
355-250-C12-1	Sphingomonadaceae bacterium PHPY	87%	α-proteobacteria	EU179717.1
355-250-A8-1	Streptococcus sp. 10aVMg3	89%	Firmicutes	EF151147.1
355-250-D11-1	Sulfur-oxidizing bacterium NDII1.1	91%	γ-proteobacteria	AF170424.1
355-250-G5-1	Sulfur-oxidizing bacterium NDII1.2	91%	γ-proteobacteria	AF170424.1
355-250-F5-1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone SG_58	98%	??	AM921380.1
355-250-D1-1	Uncultured bacterium clone t16 16S ribosomal RNA gene,	98%	??	GQ452891.1
355-250-B10-1	Uncultured bacterium clone PC-PA9-43 16S ribosomal RNA gene,	92%	α-proteobacteria?	EF379769.1
355-250-D5-1	Thiotrophic endosymbiont of Adipicola crypta	95%	γ-proteobacteria	EU683308.1
355-250-G7-1	Thiotrophic endosymbiont of Adipicola crypta	92%	γ-proteobacteria	EU683304.1
355-250-H6-1	Thiotrophic endosymbiont of Bathymodiolus puteoserpentis	93%	γ-proteobacteria	AM083985.1
355-250-B6-1	Thiotrophic endosymbiont of Idas sp.	91%	γ-proteobacteria	AM402957.1
355-250-con10-2	Thiotrophic endosymbiont of Idas sp.	94%	γ-proteobacteria	AM402957.1
355-250-A3-1	Thiotrophic endosymbiont of Idas sp.	90%	γ-proteobacteria	AM402957.1
355-250-B7-1	Thiotrophic endosymbiont of Idas sp.	92%	γ-proteobacteria	AM402957.1
355-250-G2-1	Thiotrophic endosymbiont of Idas sp.	94%	γ-proteobacteria	AM402957.1
355-250-H3-1	Thiotrophic endosymbiont of Idas sp.	94%	γ-proteobacteria	AM402957.1
355-250-H51	Alpha proteobacterium clone PRTBB8589		α-proteobacteria	HM799003.1



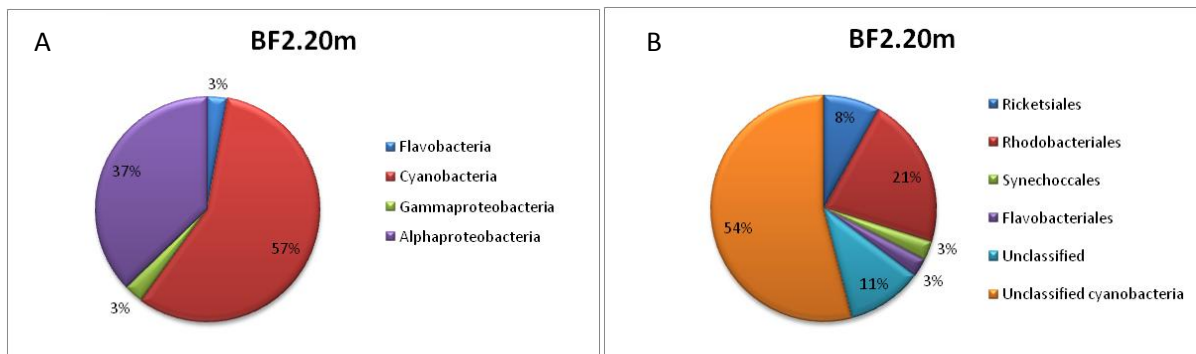
Mynd 21. Dreifing örveruhópa í sjósýni 353-0m skvt. 16SrRNA klónagreiningu. Mynd A sýnir dreifingu baktería eftir flokkum en mynd B dreifingu eftir ættum.

Tafla 4. Tegundafjölbreytileiki baktería í sýni 353-0m. 76 klónar, 50 tegundir. Nýjar tegundir eru tilgreindar með bláum lit í skyldleika dálknum.

Sýni-fjöldi ^{a)}	Nánasti ættingi í GenBank	Skyldi. ^{b)}	Fylking	GenBank locus ^{c)}
353-0-H11-1	Alpha proteobacterium TI_chim_Sur55-1	84%	α-proteobacteria	AB518773.1
353-0-con3-3	Bacterial endosymbiont of Idas sp.	96%	γ-proteobacteria	AM402959.1
353-0-E12-1	Bacteroidetes bacterium GMD15A07	87%	Bacteroidetes	AY162121.1
353-0-G7-1	β- proteobacterium IMCC10438	97%	β-proteobacteria	FJ532484.1
353-0-G10-1	Candidatus Pelagibacter ubique HTCC1062,	89%	α-proteobacteria	CP000084.1
353-0-F3-1	Candidatus Pelagibacter ubique HTCC1062,	96%	α-proteobacteria	CP000084.1
353-0-A6-1	Candidatus Pelagibacter ubique HTCC1062,	96%	α-proteobacteria	CP000084.1
353-0-con5-4	Candidatus Pelagibacter ubique HTCC1062,	97%	α-proteobacteria	CP000084.1
353-0-F6-1	Delftia sp.	96%	β-proteobacteria	CP000884.1
353-0-B10-1	Delftia sp. IHB B 4037	88%	β-proteobacteria	HM234001.1
353-0-G12-1	Uncultured cyanobacterium, clone TAU-7-49	98%	Cyanobacteria	AM259752.1
353-0-H2-1	Escherichia coli DH1,	93%	γ-proteobacteria	CP001637.1
353-0-B5-1	Flavobacteria bacterium Yb011	92%	Flavobacteria	AB496665.1
353-0-H6-1	Flavobacteriaceae bacterium 14III/A01/012	93%	Bacteroidetes	AY576695.1
353-0-H12-1	Flavobacteriaceae bacterium G11A1	87%	Flavobacteria	AY285940.1
353-0-con8-2	Flavobacteriaceae bacterium TJD809	88%	Flavobacteria	DQ993346.1
353-0-G3-1	Flavobacteriaceae bacterium TJD810	90%	Flavobacteria	DQ993346.1
353-0-B8-1	γ- proteobacterium HTCC231	93%	γ-proteobacteria	EF182722.1
353-0-G6-1	γ- proteobacterium HTCC234	80%	γ-proteobacteria	AY102028.1
353-0-B2-1	γ- proteobacterium NEP2	92%	γ-proteobacteria	AB212801.1
353-0-D2-1	Loktanelia sp. ZS6-12 1	97%	α-proteobacteria	FJ196061.1
353-0-G5-1	Octadecabacter sp. NF3-22	96%	α-proteobacteria	FJ196058.1
353-0-A9-1	Octadecabacter sp. ZS6-9 1	95%	α-proteobacteria	FJ196062.1
353-0-F4-1	Pelagibacter ubique strain HTCC1062	95%	α-proteobacteria	AF510191.1
353-0-C2-1	Phaeobacter sp. NH52F 1	95%	α-proteobacteria	FJ232451.1
353-0-D9-1	Polaribacter sp. NF3-11 1	94%	Flavobacteria	FJ196052.1
353-0-G11-1	Pseudomonas sp. 130	88%	γ-proteobacteria	AM409194.1
353-0-con14-2	Pseudomonas sp. DD1	96%	γ-proteobacteria	HQ113379.1
353-0-F12-1	Pseudomonas sp. phi9	92%	γ-proteobacteria	GU233953.1
353-0-con4-4	Pseudomonas sp. phi10	98%	γ-proteobacteria	GU233953.1
353-0-C7-1	Pseudomonas sp. Z49zhy	92%	γ-proteobacteria	AM411057.1
353-0-C8-1	Pseudomonas sp. Z49zhy	92%	γ-proteobacteria	AM411057.1
353-0-A2-1	Reinekea sp. IMCC 4489	87%	γ-proteobacteria	GQ456131.1
353-0-con15-2	Rhodobacteraceae bacterium DG1250	93%	α-proteobacteria	DQ486490.1
353-0-C11-1	Rhodobacteraceae bacterium DG1251	100%	α-proteobacteria	DQ486490.1
353-0-H1-1	Rhodobacteraceae bacterium KS2	95%	α-proteobacteria	AB436779.1
353-0-con2-4	Rhodobacteraceae bacterium KS3	94%	α-proteobacteria	AB436779.1
353-0-con9-4	Rhodobacteraceae bacterium psc7	94%	α-proteobacteria	EU930869.3
353-0-con1-3	Rhodobacterales bacterium CB1005	93%	α-proteobacteria	FJ869041.1
353-0-A8-1	Rhodobacterales bacterium CB1005	93%	α-proteobacteria	FJ869041.1
353-0-con11-4	Roseobacter sp. ANT909	97%	α-proteobacteria	AY167254.1
353-0-con18-2	Roseovarius sp. E4-1	92%	α-proteobacteria	FN377714.1
353-0-C10-1	Roseovarius sp. E4-2	93%	α-proteobacteria	FN377714.1
353-0-con17-2	Roseovarius sp. E4-3	94%	α-proteobacteria	FN377714.1
353-0-con13-2	Sphingomonas sp. M16	95%	α-proteobacteria	GU086440.1
353-0-H7-1	Synechococcus sp. CC9902	98%	Cyanobacteria	CP000097.1
353-0-D1-1	Thiotrophic bacterial endosymbiont of Bathymodiolus	91%	γ-proteobacteria	AM236328.1
353-0-F7-1	Thiotrophic endosymbiont of Adipicola cryptace	92%	γ-proteobacteria	EU683304.1
353-0-G4-1	Thiotrophic endosymbiont of Idas sp	91%	γ-proteobacteria	AM402957.1
353-0-con6-2	Uncultured cyanobacterium, clone TAU-7-26	96%	Cyanobacteria	AM259747.1

3.5.2. Breiðafjörður

Sýni BF2.20m er tekið á 20m dýpi Breiðafirði 30. Júlí 2010. Í þessu sýni eru óræktaðar *Cyanobacteria* eða *Cynaobacteria* líkar raðir enn sem fyrr ríkjandi (57%). Hér greinast einnig ræktaðar *Cyanobacteria* af ættkvísl *Synechococcus* sem finnast víða í yfirborðslögum sjávar. Ræktaðar *Cyanobacteria* hafa ekki fundist í sýnum af Selvogsbanka en finnast í báðum Breiðafjarðar sýnanna. Örverufjölbreytileikinn er hér minni en í fyrri sýnum; 0.882 en margar raðanna tilheyrðu hér sömu *Cyanobacteria*-líku tegundinni. Áður óþekktar tegundir eru 44%. Meginþorinn af öðrum tegundum tilheyrir Alpha-proteobacteria, einkum ætt *Rhodobacteriales* (Mynd 22, Tafla 5).

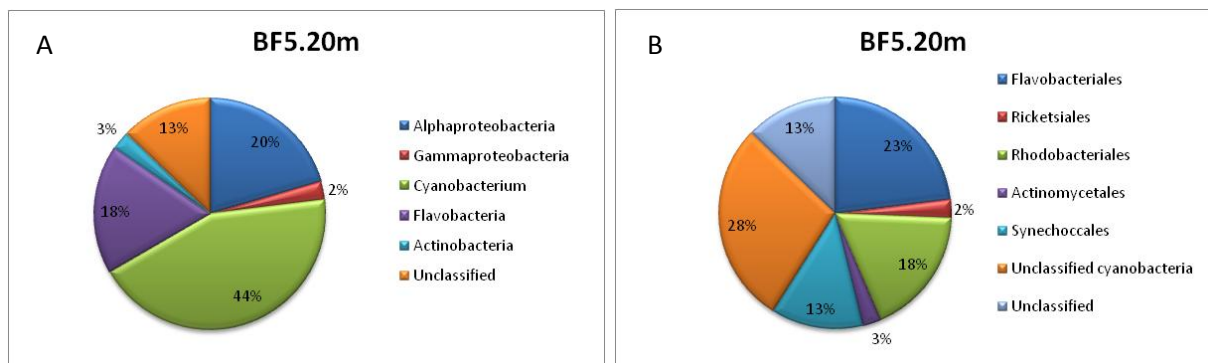


Mynd 22. Dreifing örveruhópa í sjósýni BF2.20m skvt. 16SrRNA klónagreiningu. Mynd A sýnir dreifingu baktería eftir flokkum en mynd B dreifingu eftir ættum.

Tafla 5. Tegundafjölbreytileiki baktería í sýni BF2.20m. 40 klónar, 16 tegundir. Nýjar tegundir eru tilgreindar með bláum lit í skyldleika dálknunum.

Sýni-fjöldi ^{a)}	Nánasti ættingi í GenBank	Skyldi. ^{b)}	Fylking	GenBank locus ^{d)}
BF2-20-E9-1	Alpha proteobacterium IMCC10404 16S ribosomal RNA gene	91%	α-proteobacteria	FJ532499.1
BF2-20-D12-1	Alpha proteobacterium TI_chim_Sur55-1 gene for 16S ribosomal RNA	85%	α-proteobacteria	AB518773.1
BF2-20-con3-2	Uncultured cyanobacterium clone 926-C6 16S ribosomal RNA gene,	93%	Cyanobacteria	EU315557.1
BF2-20-con3-3	Candidatus Pelagibacter ubique HTCC1062, complete genome	98%	α-proteobacteria	CP000084.1
BF2-20-D7-1	Uncultured Cyanobacterium sp. clone CM01187X1F10 16S ribosomal	97%	Cyanobacteria	GU170717.1
BF2-20-con4-2	Uncultured cyanobacterium partial 16S rRNA gene, clone TAU-7-26	99%	Cyanobacteria	AM259747.1
BF2-20-E10-1	Endosymbiont of Ifremeria nautiliei gene for 16S rRNA,	87%	γ-proteobacteria	AB238958.1
BF2-20-H12-1	Flavobacteriaceae bacterium T15 16S ribosomal RNA gene,	87%	Flavobacteria	AY177723.1
BF2-20-con1-14	Uncultured cyanobacterium clone PI_4p4e 16S ribosomal RNA gene	97%	Cyanobacteria	AY580398.1
BF2-20-D11-1	Rhodobacteraceae bacterium IMCC1933 16S ribosomal RNA gene	95%	α-proteobacteria	GQ468664.1
BF2-20-G11-1	Rhodobacteraceae bacterium IMCC1933 16S ribosomal RNA gene	83%	α-proteobacteria	GQ468664.1
BF2-20-con10-3	Rhodobacteraceae bacterium IMCC1933 16S ribosomal RNA gene	98%	α-proteobacteria	GQ468664.1
BF2-20-F12-1	Rhodobacteraceae bacterium KS2 gene for 16S ribosomal RNA	98%	α-proteobacteria	AB436779.1
BF2-20-F10-1	Rhodobacteraceae bacterium KS2 gene for 16S ribosomal RNA	96%	α-proteobacteria	AB436779.1
BF2-20-E11-1	Sulfitobacter sp. ANT9115 16S ribosomal RNA gene	99%	α-proteobacteria	AY167322.1
BF2-20-con14-2	Synechococcus sp. CC9311, complete genome	98%	Cyanobacteria	CP000435.1

Sýni BF5.20m er tekið á 20m dýpi í Breiðafirði 30. Júlí 2010. Fjölbreytileikastuðullinn er 0.969 og 50% tegundanna í sýninu eru áður óþekktar ($\leq 95\%$). *Cyanobacteria* líkar raðir eru hér ríkjandi (44%) ásamt *Flavobacteria* (19%) og Alpha-proteobacteria (20%). *Flavobacteria* hafa ekki skipað svo hátt hlutfall fjölbreytileikans í öðrum sýnum. Fimm áður óþekktar tegundir *Flavobacteria* fundust í sýninu sem höfðu 90-94% líkindi við nánasta ættingja. *Synechococcus* tegundir *Cyanobacteria* finnast hér einnig líkt og í hinu Breiðafjarðar sýninu. Alpha-proteobacteria í sýninu voru allar af ætt *Rhodobacteriales*. Ein baktería af ætt *Actinobacteria* greindist í sýninu og var hún eini meðlimur síns ættledds í sjósýnunum (Mynd 23, Tafla 6).

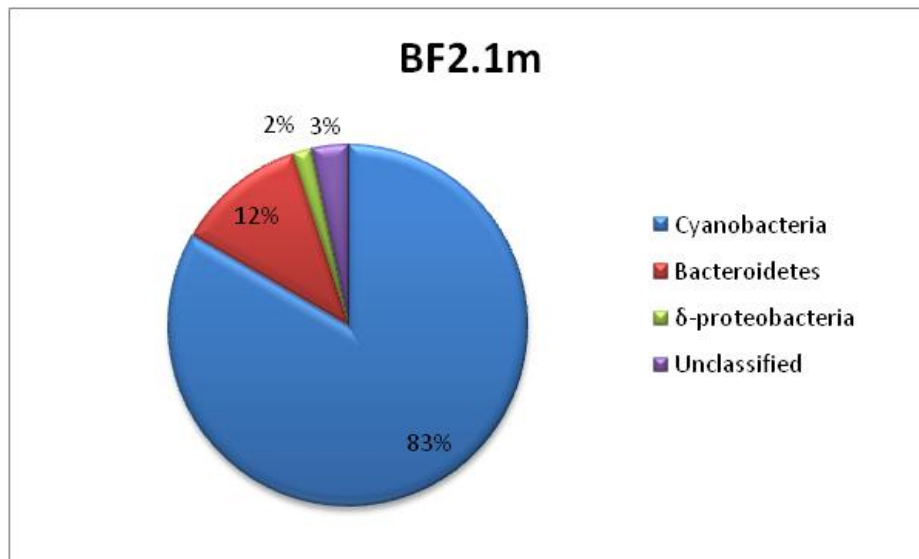


Mynd 23. Dreifing örveruhópa í sjósýni BF5.20m skvt. 16SrRNA klónagreiningu. Mynd A sýnir dreifingu baktería eftir flokkum en mynd B dreifingu eftir ættum.

Tafla 6. Tegundafjölbreytileika baktería í sýni BF5.20m. 40 klónar, 16 tegundir. Nýjar tegundir eru tilgreindar með bláum lit í skyldleika dálknum.

Sýni-fjöldi ^{a)}	Nánasti ættingi í GenBank	Skyldi. ^{b)}	Fylking	GenBank locus ^{d)}
BF5-20-C9-1	Alcanivorax sp. W340 16S ribosomal RNA gene	88%	γ-proteobacteria	GU826605.1
BF5-20-C12-1	Uncultured cyanobacterium clone SHBC388 16S ribosomal RNA gene	99%	Cyanobacteria	GQ350222.1
BF5-20-G8-1	Bacteroidetes bacterium MOLA 411 partial 16S rRNA gene	83%	Bacteroidetes	AM990678.1
BF5-20-B8-1	Bacteroidetes bacterium MOLA 411 partial 16S rRNA gene	87%	Bacteroidetes	AM990678.1
BF5-20-E10-1	Candidatus Aquiluna rubra partial 16S rRNA gene	98%	Actinobacteria	AM999977.1
BF5-20-E7-1	Uncultured cyanobacterium clone SHAB472 16S ribosomal RNA gene	98%	Cyanobacteria	GQ348584.1
BF5-20-A10-1	Uncultured cyanobacterium clone SGPW599 16S ribosomal RNA gene	97%	Cyanobacteria	GQ346786.1
BF5-20-B11-1	Uncultured marine bacterium clone A6-1-40 16S ribosomal RNA gene	93%	Cyanobacteria	FJ826248.1
BF5-20-D10-1	Uncultured cyanobacterium clone SGPW681 16S ribosomal RNA gene	99%	Cyanobacteria	GQ346803.1
BF5-20-F11-1	Extubocellulus cribriger isolate C111 16S ribosomal RNA gene	96%	Cyanobacteria	FJ002187.1
BF5-20-E8-1	Flavobacteria bacterium 7531 gene for 16S rRNA	95%	Flavobacteria	AB498901.1
BF5-20-con2-2	Flavobacteriaceae bacterium ACEMC 24-1 partial 16S rRNA gene	91%	Flavobacteria	FM162986.1
BF5-20-con3-4	Flavobacteriaceae bacterium TJD809 16S ribosomal RNA gene	94%	Flavobacteria	DQ993346.1
BF5-20-E11-1	Flavobacteriaceae bacterium TJD809 16S ribosomal RNA gene	90%	Flavobacteria	DQ993346.1
BF5-20-A7-1	Uncultured soil bacterium clone F4C76 16S ribosomal RNA gene	99%	??	AY794215.1
BF5-20-B9-1	Pelagibacter ubique strain HTCC1002 16S ribosomal RNA	98%	α-proteobacteria	AF510192.1
BF5-20-con4-2	Polaribacter sp. 7526 gene for 16S rRNA	88%	Bacteroidetes	AB498908.1
BF5-20-C7-1	Psychroserpens mesophilus strain KOPRI 13649 16S ribosomal RNA	90%	Flavobacteria	DQ001321.1
BF5-20-D11-1	Uncultured bacterium clone 1C227648 16S ribosomal RNA gene	90%	??	EU799970.1
BF5-20-con7-2	Uncultured cyanobacterium clone PI_4p4e 16S ribosomal RNA gene	96%	Cyanobacteria	AY580398.1
BF5-20-C10-1	Rhodobacteraceae bacterium B7 ZZ-2008 partial 16S rRNA gene	96%	α-proteobacteria	FM180521.1
BF5-20-con5-2	Rhodobacteraceae bacterium IMCC1933 16S ribosomal RNA gene	99%	α-proteobacteria	GQ468664.1
BF5-20-con9-2	Rhodobacteraceae bacterium KS2 gene for 16S ribosomal RNA	94%	α-proteobacteria	AB436779.1
BF5-20-D8-1	Roseobacter sp. 3008 partial 16S rRNA gene	99%	α-proteobacteria	AM110967.1
BF5-20-D9-1	Sulfitobacter sp. ANT9115 16S ribosomal RNA gene	98%	α-proteobacteria	AY167322.1
BF5-20-con10-2	Synechococcus sp. 1tu39s01 partial 16S rRNA gene, strain 1tu39s01	90%	Cyanobacteria	AM259222.1
BF5-20-con1-4	Synechococcus sp. Almo3 16S ribosomal RNA gene	99%	Cyanobacteria	AY172800.1
BF5-20-A8-1	Synechococcus sp. KORDI-42 16S ribosomal RNA gene	91%	Cyanobacteria	FJ497718.1

Sýni BF2.1m er tekið á Breiðfafirði á 1m dýpi 9.ágúst 2010. Um er að ræða sama sýnatökustað og fyrir sýni BF2.20m en sýnið er tekið tíu dögum síðar. *Cyanobacteria* og *Cyanobacteria* -líkar raðir eru í yfirgnæfandi meirihluta (83%). Tegundafjölbreytileikinn er ennfremur minni (0.776) en 29 raðanna tilheyrja sömu *Cyanobacteria* tegundinni (Mynd 24, Tafla 7).



Mynd 24. Dreifing örveruhópa í sjósýni BF2.1m svkt 16SrRNA klónagreiningu.

Tafla 7. Tegundafjölbreytileiki baktería í sýni BF2.1. 63 klónar, 24 tegundir. Nýjar tegundir eru tilgreindar með bláum lit í skyldleika dálknum.

Sýni-fjöldi ^{a)}	Nánasti ættingi í GenBank	Skyldi. ^{b)}	Fylking	GenBank locus ^{c)}
BF2-1-A7-1	Uncultured Flavobacteria bacterium 16S rRNA gene	99%	Flavobacterium	FN433442.1
BF2-1-A12-1	Uncultured bacterium clone SW-Apr-21 16S ribosomal RNA gene	97%	??	HQ203917.1
BF2-1-B8-1	Uncultured cyanobacterium clone SHAB472 16S ribosomal RNA gene	91%	Cyanobacteria	GQ348584.1
BF2-1-C9-1	Uncultured delta proteobacterium clone SHBC408	99%	δ-proteobacteria	GQ350238.1
BF2-con1-29	Uncultured cyanobacterium clone SIMO-2241 16S ribosomal RNA gene	96%	Cyanobacteria	AY711607.1
BF2-con2-8	Uncultured Cyanobacterium sp. clone CM01187X1F08	98%	Cyanobacteria	GU170715.1
BF2-con8-2	Uncultured Cyanobacterium sp. clone CM01188X1G03	96%	Cyanobacteria	GU170789.1
BF2-con17-2	Uncultured cyanobacterium clone SIMO-2403	98%	Cyanobacteria	AY711769.1
BF2-con18-2	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone FFP69	99%	Bacteroidetes	AY830008.1
BF2-1-D9-1	Uncultured bacterium clone SINP932	88%	??	HM127811.1
BF2-1-E9-1	Uncultured bacterium clone NH10_40	97%	??	DQ372851.1
BF2-1-F6-1	Cyanobacterium sp. MS-F-83	90%	Cyanobacteria	FJ460075.1
BF2-1-F9-1	Uncultured Flavobacteria bacterium 16S rRNA gene	91%	Flavobacterium	FN433360.1
BF2-1-F10-1	Uncultured Flavobacterium sp. partial 16S rRNA gene	92%	Flavobacterium	AM259869.1
BF2-1-F12-1	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone SHBC566	94%	Bacteroidetes	GQ350358.1
BF2-1G3-1	Uncultured Cyanobacterium partial 16S rRNA gene	94%	Cyanobacteria	AM501814.1
BF2-1-G5-1	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone SHZW728	99%	Flavobacterium	HQ163352.1
BF2-1-G6-1	Uncultured Flavobacteria bacterium clone MS024-2A	99%	Flavobacterium	EF202336.1
BF2-1-G11-1	Uncultured cyanobacterium clone SHAB462	95%	Cyanobacteria	GQ348575.1
BF2-1-H2-1	Uncultured cyanobacterium clone SIMO-838	98%	Cyanobacteria	AY712375.1
BF2-1-H4-1	Uncultured cyanobacterium clone SIMO-2403	94%	Cyanobacteria	AY711769.1
BF2-1-H8-1	Uncultured cyanobacterium clone SGPW716	94%	Cyanobacteria	GQ346809.1
BF2-1-H11-1	Uncultured cyanobacterium clone SIMO-2267	95%	Cyanobacteria	AY711633.1
BF2-1-H12-1	Uncultured Cyanobacterium sp. clone CM01188X1G03	98%	Cyanobacteria	GU170789.1

3.5.3. Hal

Sýni Hal11 var tekið með sérútbúnum sýnatökubúnaði er festur var við troll og sýni safnað við veiðar. Þetta sýni reyndist ólíkt hinum sjósýnunum m.t.t. fjölbreytileika og tegundasamsetningar. Sýnið var afar einsleitt, Simpson's stuðullinn aðeins 0.434 og samanstóð svotil eingöngu af *Pseudoalteromonas* og *Psychrobacter* tegundum af flokki Gamma-proteobacteria. Þessar tegundir eru vel þekktar fiskibakteríur og ríkjandi þáttur þessara baktería í sýninu stafar að öllum líkindum af mikilli nálægð og miklu magni fisks sem safnast í trollið. Sýnatakan gefur því í raun mynd af fjölbreytileika baktería í sjónum sem umleikur fiskitorfunna og samanstendur bakteríum sem áður hafa greinst í fiski (Tafla 8). Lágur fjölbreytileiki kemur þá á óvart sem gæti stafað af sýnatökuaðferðinni sem verður að kanna með frekari rannsóknum.

Tafla 8. Tegundafjölbreytileiki baktería í sýni Hal11. 47 klónar, 5 tegundir. Nýjar tegundir eru tilgreindar með bláum lit í skyldleika dálknum.

Sýni-fjöldi ^{a)}	Nánasti ættingi í GenBank	Skyldi. ^{b)}	Fylking	GenBank locus ^{c)}
Hal11-cont1-35	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. JS6 16S ribosomal RNA gene	99%	γ-proteobacteria	FJ205743.1
Hal11-cont9-2	<i>Psychrobacter</i> sp. a381 partial 16S rRNA gene, strain a381	99%	γ-proteobacteria	FN433004.1
Hal11-cont15-4	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. WH10-2-1 16S ribosomal RNA gene	99%	γ-proteobacteria	HM454193.1
Hal11-cont17-5	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 5AePink 16S ribosomal RNA gene	99%	γ-proteobacteria	HM771255.1
Hal11-F5-1	<i>Comamonas</i> sp. R-25060 16S rRNA gene, strain R-25060	99%	β-proteobacteria	AM084020.1

4. Samantekt og ályktanir

Í þessari rannsókn var sjósýnum úr hafinu víðsvegar umhverfis landið safnað til greiningar á örverufjölbreytileika á Íslandsmiðum. Fjölbreytileiki örveruflórunnar í hafinu umhverfis Ísland er að mestu óþekktur en litlar sem engar rannsóknir hafa farið fram til þessa. Alls var 504 sjósýnum safnað; 483 sýnum úr vorralli Hafrannsóknarstofnunar, 16 sýnum úr Breiðfirði og 5 sýnum var safnað norður af Vestfjörðum með sérútbúnum sýnatökubúnaði fyrir botnvörpur er hannaður var innan verkefnisins.

Erfðaefni var einangrað úr öllum sjósýnunum 504 og því komið í geymslu við -80°C. Auk þess eru til sýni sem hafa verið varðveitt með fixeringu og eru einnig geymd við -80°C. Ekki var ætlunin að greina öll sýnin sem safnað var innan þessa afmarkaða verkefnis. Efniviður úr öllum sýnunum er hins vegar aðgengilegur og ætlaður til frekari rannsókna í framtíðinni.

Valin voru 59 sýni til greiningar; 38 sjósýni úr vorralli Hafrannsóknarstofnunnar, 16 sýni úr Breiðafirði auk 5 sýna safnað var við togveiðar norður af Vestfjörðum. Þessi sýni voru einnig tekin til örverutalninga með flæðisjá (flow cytometry) auk þess sem örverufjölbreytileiki sýnanna var skoðaður með t-RFLP fingrafaragreiningu.

4.1 Frumutalningar

Fjöldi örvera í sýnunum var talinn með flæðisjá (FACSaria II cell sorter) og flúrljómandi litun á erfðaeefni örveranna. Einn meginþátturinn í því að hægt er að telja örverur í sjó má rekja til tækniframfara í sambandi við notkun flúrljómandi efnasambanda. Slík efni, líkt og SybrGreen sem binst tvíþátta erfðaeefni, er hægt að hengja við eða innlima í frumur og nýta svo til talninga á einstökum frumum með því að nema flúrljómun þeirra. Frumutalningar gáfu góða mynd af örverumassanum í efstu lögum sjávar í kringum ísland, fjölda baktería og einfrumu þörunga. Almennt var magn örvera á því bili sem menn hafa áætlað í næringarríkum sjó eða á milli 10^5 - 10^6 frumur í hverjum millilítra af sjó. Megnið af örverumassa hafsins er háður flæði á uppleystu kolefni frá dýra- og plöntusvifi sem einkum er að finna á því dýpi sem sólarljós nær til og frumframleiðsla fer fram og er stór áhrifþáttur í lóðréttri dreifingu baktería í vantsmassanum. Talningar á örveruflóru sýna er tekin voru á meira dýpi (353-800m, 355-250m) sýna berlega hve örverum fækkar með auknu dýpi.

Gögn úr Breiðafirði sýna nokkrar breytingar er virðast verða á samsetningu þörungaflórunnar yfir sýnatökutímabilið. Sýnatökum úr Breiðfirði hefur því verið haldið áfram yfir vetrarmánuðina en áhugavert er að skoða slík sýni yfir lengra tímabil og fylgjast með þróun, bæði í fjölda og samsetningu örveruflórunnar með tíma.

4.2 Fingrafaragreining

Greining á fjölbreytileika örverusamfélagsins var gerð með t-RFLP fingrafaragreiningu. Aðferðin er fljótleg og einföld leið til að fá hugmynd um fölbreytileika örversamfélaga. Niðurstöður fingrafaragreiningarinnar voru ennfremur notaðar sem forskoðun á örverufjölbreytileikanum og sem krítéria fyrir val á sýnum til tegundagreiningar með 16S hlutraðgreiningu.

Erfitt er að bera saman flókin t-RFLP mynstur margra sýna með berum augum svo vel sé. Því var notast við höfuðþáttgreiningu (principal component analysis) sem gerir mögulegt að

rannsaka líkindi milli sýna. Með viðbótarupplýsingum úr vorrallinu má enn frekar kanna fylgni milli ákveðinna breyta í t-RFLP gögnunum með þeim umhverfispáttum sem mældir voru. Þá er notast við „principal component regression“.

Með þessari aðferðafræði var sýnt fram á ólík bakteríusamfélög milli sýnatökustöðva. Heilt yfir var meginmunur á sýnum úr hverri sýnalotu þ.e. úr vorralli, Breiðafirði og hali togara. Breytileikinn innan sýna úr vorrallinu hélst nokkuð vel í hendur við sýnatökustað. Sýni tekinn af Selvogsbankanum sýndu meiri innbyrðis líkindi samanborið við sýnin norðan af Siglufirði og vestan af Íslandi sem voru ólíkari innbyrðis. Það skýrist hugsanlega af meiri fjarlægð milli sýnatökustaða en fyrir sunnan. Áhugavert var að sjá að öll sýnin af Langanesi, norðaustan af landinu flokkuðust með sýnum af Selvogsbankanum þrátt fyrir ólíkar umhverfisaðstæður.

Þegar kannað var sambandið milli umhverfispáttana annars vegar (selta, súrefni, hiti, flúrljómun, örverufjöldi, dýpi) og breyta í t-RFLP fjölbreytileika gögnum hinsvegar sást að fylgni var á milli ákveðinna toppa með umhverfispáttum. Hitastig hafði þar mest að segja en einnig flúrljómun og selta. Flúrljómun er hinsvegar afleiða örveranna á meðan hitastig og selta hafa mótandi áhrif á samsetningu örvera í hafinu. Sjálfsagt hefur staðsetning sýnatökunnar mest að segja um fylgni með ákveðnum örveruhópum en staðsetningin helst í hendur með umhverfispáttunum. T.a.m. var sjórinn sunnan af landi var heitastur og með ýfið hærri salt styrk en annars staðar.

4.3 Tegundagreining

Tegundasamsetning örveruflórunnar var ákvörðuð með mögnun og raðgreiningu á 16S geni baktería.

Tíu sýni voru valin út frá niðurstöðu fingrafaragreiningar; 3 af Selvogsbanka, 1 af Langanesi, 2 af Siglunesi, 3 úr Breiðafirði auk 1 hal-sýnis. Allar 16S raðirnar voru flokkaðar til tegunda miðað við 98% skyldleikamörk og bornar saman við raðir í Genbank til að ákvarða nánustu ættingja. Alls voru 528 raðir raðgreindar og af þeim náðist læsileg raðgreining af 441 röð. Alls greindust 174 ólíkar 16S bakteríuraðir í sýnunum og reyndust 52% þeirra tilheyra áður óþekktum bakteríutegundum. Fjölbreytileiki örveruflórunnar var mikill en hann var skvt. Simpson's fjölbreytlileikastuðli - sem áætla líkurnar á því að tvær raðir teknar af handahófi úr sýni tilheyri ólíkum tegundum - á milli 0.776-0.969 að undanskildu hal-11 sýninu sem var mjög einsleitt.

Átta fylkingar baktería greindust í sýnunum í mismiklum mæli. *Cyanobacteria* og *Cyanobacteria*-líkar raðir voru ríkjandi í öllum sýnum utan sýni 353-0m þar sem hlutfall þeirra var einungis 4%. Alpha og Gamma-proteobacteria voru ríkjandi í sýni 353-0m. Alpha-proteobacteria eru stór hluti örveruflórunnar í öllum sýnanna utan BF2.1m. Gamma-proteobacteria skipa á sama máta hátt hlutfall í sýnum teknum af Selvogsbanka en þær er aðeins að finna í litlum mæli í Breiðafirði. Af öðrum fylkingum greindust *Flavobacteria* reglulega og voru 8.6% og 17.9% hlutfalli í sýnum 353-0m og BF5.20m. Beta-protobacteria greindust í fjórum klónum en Delta-proteobacteria, *Actinobacteria* og *Firmicutes* greindust í einum klón hver.

Cyanobacteria eða *Cyanobacteria*-líkar raðir voru ríkjandi tegundir í öllum sjósýnunum nema 353-0m. Leiða má líkum að því hluti þessara *Cyanobacteria*-líku röðum gætu tilheyrt grænuhornum kísilþörungum sem eru ríkjandi þörungar í hafinu umhverfis landið. Grænuhorn þörungum hafa eigið erfðaefni og innihalda 16S gen en talið er að þörungar hafi innlimað *Cyanobacteria* í forneskju sem hafi þróast yfir í grænuhorn í umfrymi þörunganna. Líkur má leiða að því að hluti þeirra *Cyanobacteria*-líku raða sem greinast í sýnunum séu upprunin frá kísilþörungum sem ekki hafa skilist frá sýninu við síun. Hafa ber það í huga þegar niðurstöðurnar eru túlkaðar enda er hátt hlutfall *Cyanobacteria* í sýnunum eitthvað sem vekur umhugsun en hlutfall *Synechococcus* sp. tegunda fellur almennt er kemur í kaldari sjó á pólsvæðunum.

Sýnatökustaður 353 er úthafssýni tekið langt suður af landinu meðan önnur sýni voru tekin á grunni. Flúrljómun á þessum sýnatökustað sem segir til um frumfamleiðni og magn ljóstillífanði örvera var þó síst lægri á þessu svæði en á sýnatökustöðum 348-0, og 355-250m teknum á grunni útaf Suðurlandi. Einnig vekur athygli hve mikið af *Cyanobacteria*-líkum röðum finnast á 250m dýpi á sýnatökustöð 355, en niður á það dýpi nær einungis 1% af sólarjosi og er það svæði því afar illa til fallið til ljóstillífunnar og engin blaðgrænu-drifin ljóstillífun getur átt sér stað.

4.4 Niðurlag

Þegar allt er tekið saman má segja að þessar fyrstu niðurstöður gefi aðeins litla mynd af örverumassa og fjölbreytileika í sjónum við Ísland. Víst má telja að með 16S klónagreiningu sé aðeins litlu broti örverufjölbreytileikans í hafinu gerð skil, en áætlað hefur verið að undir

1% örveruflóru hafsins sé skilgreind og ræktanleg – 99% allra bakteríurtegunda hafsins eru því enn óþekktar. Hingað til hefur örverum í kringum landið verið sýnd fremur lítil athygli og hugsanleg áhrif þeirra hærra upp í fæðukeðjuna lítið verið rannsakaðar. Í stærra samhengi hefur verið sýnt fram á að í heild séu um 3×10^{11} tonn kolefnis í hafinu bundið í slíkum örverumassa (Sogin, Morrison et al. 2006). Að auki eru örverur mikilvægur hlekkur í öllum efnaferlum í lífríki sjávar, bæði við niðurbrot og uppbyggingu efna (Sogin, Morrison et al. 2006). Eingöngu lítill hluti þeirra örvera sem er að finna í sjó hefur verið tegundagreindur nákvæmlega og endurspeglar niðurstöður okkar úr klónun og raðgreiningu á 16S það, þar sem mikið var um óþekktar og óræktanlegar tegundir. Slík tegundagreining hefur kannski ekki mikið að segja þegar lítið er um gögn til samanburðar en segir þó mikið til um hversu fjölbreytt samfélagið er í heild sinni. Út frá þeim niðurstöðum einum og sér og hefur m.a. verið horft til þess að fjölbreytileiki samfélagsins sé mikilvægur þáttur í að viðhalda stöðugleika í vistkerfinu (Loreau, Naeem et al. 2001). Slík vitneskja, ásamt því að afla gagna um þann örverumassa sem er í hafinu við Ísland gefa okkur mikilvæga vitneskju en aftur á móti vantar samanburð til að sjá hvernig breytingar verða í tíma og rúmi. Því má líta á þessi gögn sem ákveðinn grunnflöt sem hægt er að byggja á.

Til lengri tíma lítið er mikilvægt að hafa í huga þær breytingar sem eru að verða á hafinu við Ísland vegna hlýnunar jarðar og hugsanleg áhrif á lífríki sjávar. Almenn er vitað að hitastig er einn af ráðandi umhverfispáttum sem hafa áhrif á örverur og örveruvöxt en að auki getur hitastig haft áhrif á leysni efna sem aftur hefur áhrif lífríkið. Það er því mikilvægt að fylgjast vel með þeim breytingum á magni, tegundasamsetningu og fjölbreytileika örvera hér við land.

5. Þakkir

Skýrsluhöfundar vilja þakka Verkefnasjóði sjávarútvegsins fyrir framlag til rannsóknarinnar. Gylfa Guðjónssyni hjá Fisk Seafood og Snorra Snorrasynti á Klakk SH 510 er ennfremur þakkað fyrir sýnaöflun.

6. Heimildir

- Andrews, P. and Williams P. J. LeB. 1971. Heterotrophic utilization of dissolved organic compound in the sea. III. Measurements of the oxidation rates and concentrations of glucose and amino acids in sea water. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 51: 111-125.
- Atlas, R. M. & Bartha, R. 1993 *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications* (Benjamin/Cummings, Redwood City, CA).
- Bergquist, P. L., E. M. Hardiman, et al. (2009). "Applications of flow cytometry in environmental microbiology and biotechnology." *Extremophiles* 13(3): 389-401.
- Béja, O. et al. (2000). Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea *Science* 289, 1902-1906
- Biers, E. J., S. Sun, et al. (2009). "Prokaryotic genomes and diversity in surface ocean waters: interrogating the global ocean sampling metagenome." *Appl Environ Microbiol* 75(7): 2221-9.
- Braker, G., H. L. Ayala-del-Rio, et al. (2001). "Community structure of denitrifiers, bacteria, and archaea along redox gradients in Pacific Northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (*nirS*) and 16S rRNA genes." *Appl Environ Microbiol* 67(4): 1893-901.
- Bratbak, G., Heide, M., Thingstad, T. F. and Toumi, P. 1996. Dynamics of virus abundance in coastal seawater. *FEMS Microb. Ecol.* 19:263-69.
- Corliss, J. B., J. Dymond, L. I. Gordon, J. M. Edmond, R. P. Von Herzen, R. D. Ballard, K. Green, D. Williams, A. Bainbridge, K. Crane, & T. H. Van Andel. 1979. Submarine thermal springs on the Galapagos Rift. *Science*. 203:1073-1083.
- Cottrell, M. T. and D. L. Kirchman (2009). "Photoheterotrophic microbes in the Arctic Ocean in summer and winter." *Appl Environ Microbiol* 75(15): 4958-66.
- DeLong, E. F. 1997. Marine microbial diversity: The tip of the iceberg. *Tibtech* 15:203-207.
- DeLong, E. F. (2005). "Microbial community genomics in the ocean." *Nat Rev Microbiol* 3(6): 459-69.
- Fricke, H., O. Giere, K.O. Stetter, G.A. Alfredsson, and J.K. Kristjansson. 1989. Hydrothermal vent communities at the shallow subpolar Mid-Atlantic ridge. *Marine Biology* 50:425-9
- Hobbie, J. E. and Williams P. J. LeB (eds.). 1984. *Heterotrophic activity in the sea*. Plenum. N. Y. 569pp.
- Kjartan Á Maack, 2002. Fjölbreytileiki óræktaðra sjávarörvera frá Íslandsmiðum, febrúar 2002, Marie, D., Brussaard, C. Thyraug, R. Bratbak, G. & Vaulot, D. 1999. Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:45-52
- Hannington, M, P. Herzig, P. Stoffers, J. Scholtens, R. Botz, D. Garbe-Schönberg, I.R. Hobbie, J. E, Daley, R. J. & Jasper, S, 1977, *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 1225-1228.
- Jannasch, H. W., and Taylor, C. D. 1984. Deep-sea microbiology. *Ann Rev. Microbiol*
- Johnson, P. W., and Sieburth J. M. 1979. Chroococoid *Cyanobacteria* in the sea: A ubiquitous and diverse phototropic mass. *Limn. Oceanog.* 24:928-935.
- Jonasson, W. Roesta, Shipboard Scientific Party From Prokaria Ltd. (J.K.Kristjánsson, V.T. Marteinson, S.K.Petursdottir.) 2001. First observations of high-temperature submarine hydrothermal vents and massive anhydrite deposits off the north coast of Iceland. *Marine Geology.* 177:199-220.
- Loreau, M., S. Naeem, et al. (2001). "Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges." *Science* 294(5543): 804-8.
- Marie, D., F. Partensky, et al. (1997). "Enumeration and Cell Cycle Analysis of Natural Populations of Marine Picoplankton by Flow Cytometry Using the Nucleic Acid Stain SYBR Green I." *Appl Environ Microbiol* 63(1): 186-193.
- Marteinson, V. T., S. Hauksdottir, et al. (2001). "Phylogenetic diversity analysis of subterranean hot springs in Iceland." *Applied and Environmental Microbiology* 67(9): 4242-8.
- McLaughlin, J. B., A. DePaola, et al. (2005). "Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters." *N Engl J Med* 353(14): 1463-70.
- Olsen, G. J. 1994. Archaea, archaea, everywhere. *Nature* 371: 657

- Pomeroy, L. R. 1974. The ocean's food web, a changing paradigm. *Bioscience* 24:499-504.
- Morris et al. (2002). "SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities". *Nature* 420: 806–810
- Pommier, T., B. Canback, et al. (2007). "Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton." *Mol Ecol* 16(4): 867-80.
- Porter, K.G. & Feig, Y. S. 1980 *Limnol. Oceanogr.* 25, 943-948
- Reynisson, E., H. L. Lauzon, et al. (2009). "Bacterial Composition and Succession during Storage of North-Atlantic Cod (*Gadus morhua*) at Superchilled Temperatures." *BMC Microbiol* 9(1): 250.
- Reynisson, E., H. L. Lauzon, et al. (2010). "Effects of different cooling techniques on bacterial succession and other spoilage indicators during storage of whole, gutted haddock (*Melogrammus aeglefinus*)." *European Food Research and Technology* 231(2): 237-246.
- Rosec, J. P., M. Simon, et al. (2009). "Detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish: comparison of PCR protocols using pR72H or toxR targets with a culture method." *Int J Food Microbiol* 129(2): 136-45.
- Sieburth, J. M.. 1982. The role of heterotrophic nano-plankton in the grazing and nurturing of planktonic bacteria in the Sargasso & Caribbean Seas. *Ann. Inst. Ocean. suppl. Tome 58 pp.* 285-296.
- Sogin, M. L., H. G. Morrison, et al. (2006). "Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere"." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(32): 12115-20.
- Sogin, M. L., Morrison H. G., Huber J. A., Welch D.M., Huse S. M., Neal P. R., Arrieta J. M., and Herndi G. J. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere" *PNAS*, 103, 32, 12115-12120
- Tringe, S. G. and P. Hugenholtz (2008). "A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene." *Curr Opin Microbiol* 11(5): 442-6.
- Venter J.C., Remington K., Heidelberg J. F., Halpern A. L., Rusch D., Eisen J.A. Wu D., Paulsen I., Nelson K.E. Nelson W., et al 2004. *Science* 304, 66-74
- Ward, L. N. and A. K. Bej (2006). "Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by use of multiplexed real-time PCR with TaqMan fluorescent probes." *Appl Environ Microbiol* 72(3): 2031-42.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C. & Wiebe, W. J. 1998 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6578-6583
- Wilson, B., B. S. Danilowicz, et al. (2008). "The diversity of bacterial communities associated with Atlantic cod *Gadus morhua*." *Microbial Ecology* 55(3): 425-34.
- Yutin, N. et al. Assessing diversity and biogeography of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in surface waters of the Atlantic and Pacific Oceans using the Global Ocean Sampling expeditions metagenomes. *Environ. Microbiol* 9. 1464-1475 2007

Viðaukar

Viðauki 1 Sýnatökustaðir

Vorrall Hafrannsóknarstofnunar 2010

Sýnatökustöð, dýpi

276	0,20,50 metrar
283	0,20,50 metrar
291	0,20,50 metrar
296	0,20,50 metrar
298	0,20,50 metrar
305	0,20,50 metrar
310	0,20,50 metrar
312	0,20,50 metrar
348	0,20,50 metrar
351	0,20,50 metrar
353	0,20,50 metrar
355	0,20,50, 250 metrar
353	800 metrar

36 Sýni

Breiðafjörður:

Staður, dýpi, dagsetning:

BF2-20m-130710

BF2-20m-210710

BF2-20m-300710

BF2-20m-090810

BF5-20m-130710

BF5-20m-210710

BF5-20m-300710

BF2-1m-130710

BF2-1m-210710

BF2-1m-300710

BF2-1m-090810

BF5-1m-130710

BF5-1m-210710

BF5-1m-300710

BF5-1m-090810

15 Sýni

Hal úr trolli Klakks:

20-10-10 No 1 – Hol 8 67'09 N 23'38 W 140 fm NA 5 m/s botnhiti -0,4°C

20-10-10 No 2 – Hol 9 67'03 N 23'32 W 128 fm hiti 2,0°C kl 14:25

21-10-10 No 3 – Hol 11 66'57 N 23'40 W 117 fm NA 10 m/s hiti 2,0°C

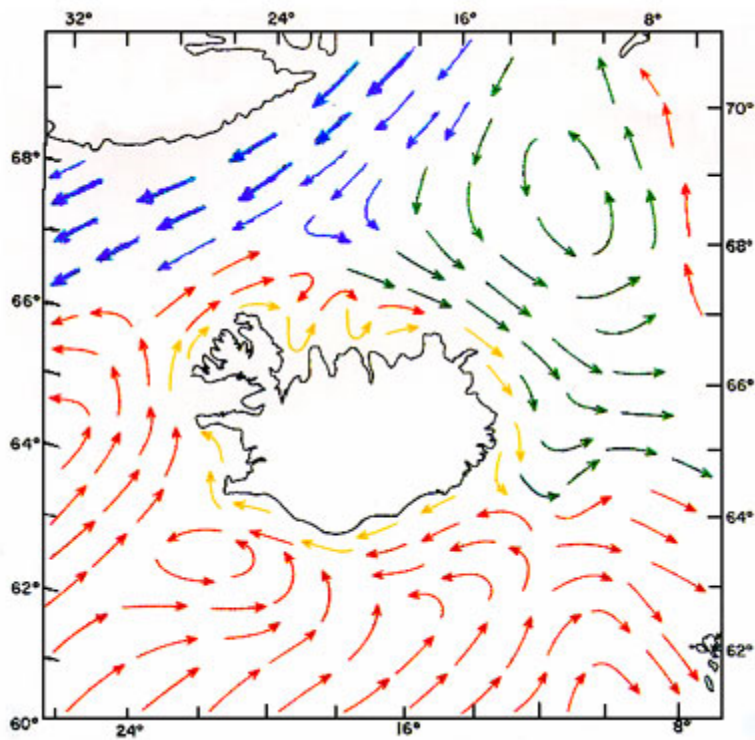
21-10-10 No 4 – Hol 12 67'01 N 23'44 W 125 fm NA 10 m/s botnhiti 0,8°C

21-10-10 No 5 – Hol 13 67'00 N 23'43 W 130 fm NA 5 m/s botnhiti -0,3°C

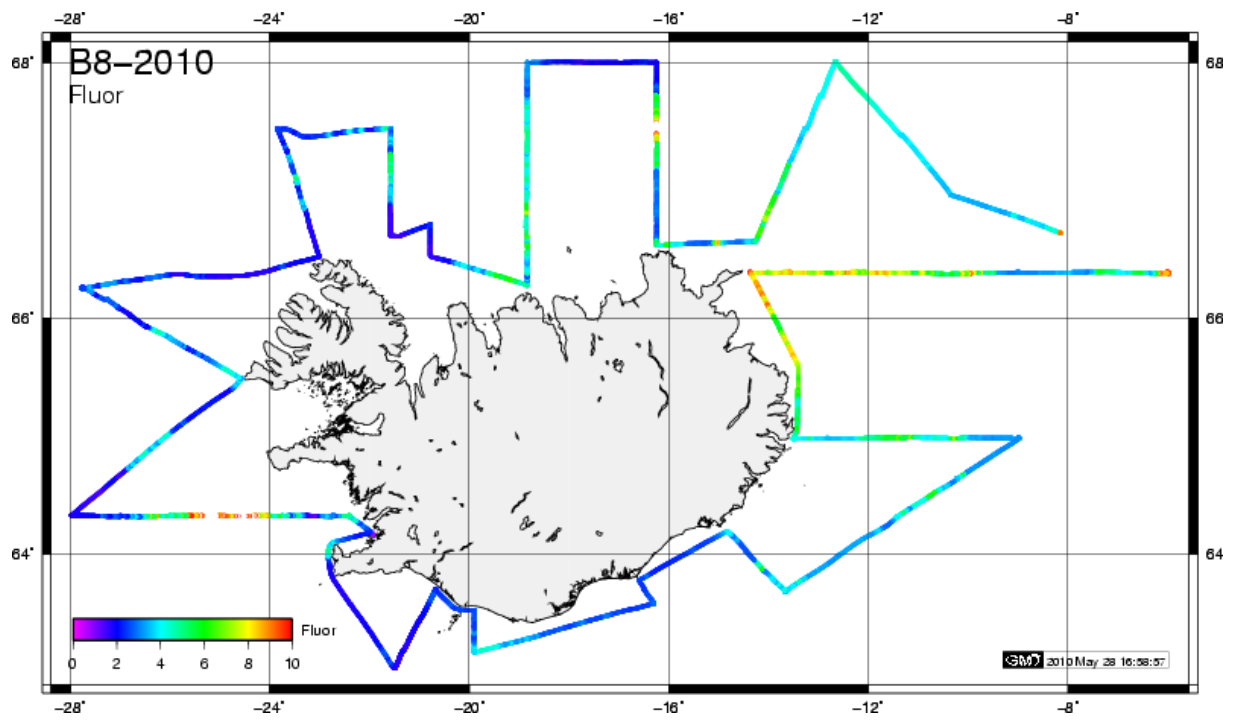
5 Sýni

Samtals 56 sýni

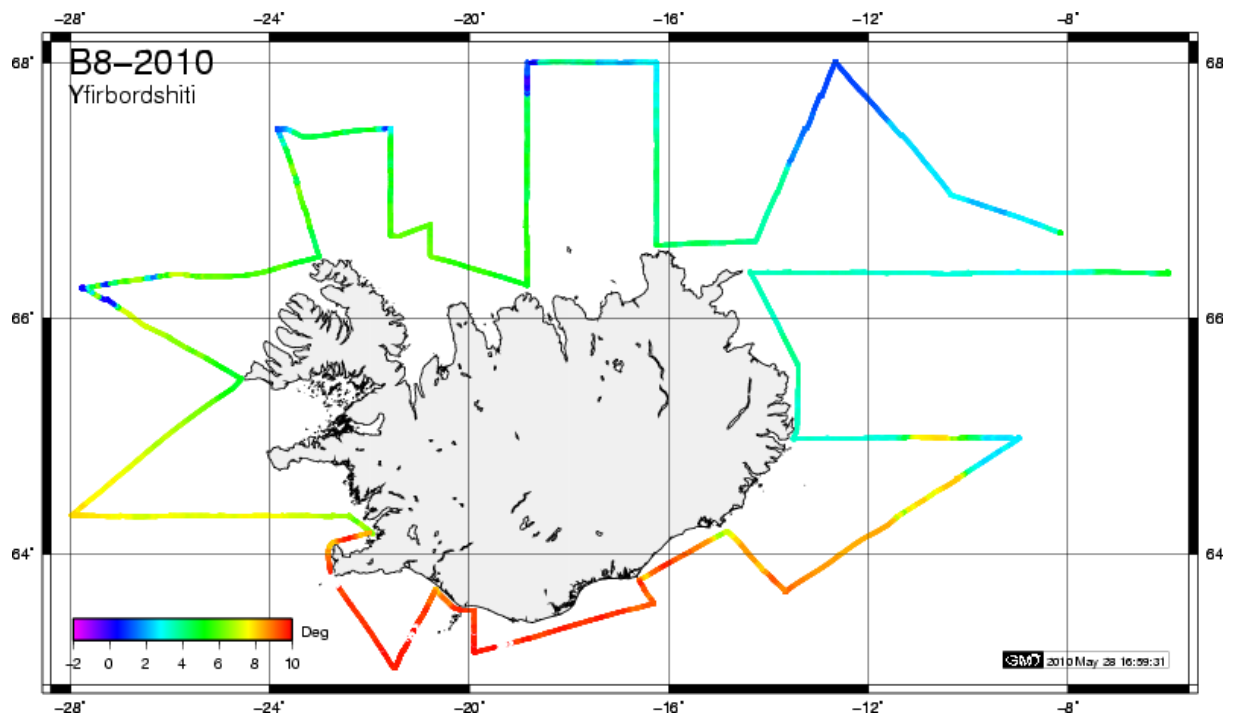
Viðauki 2



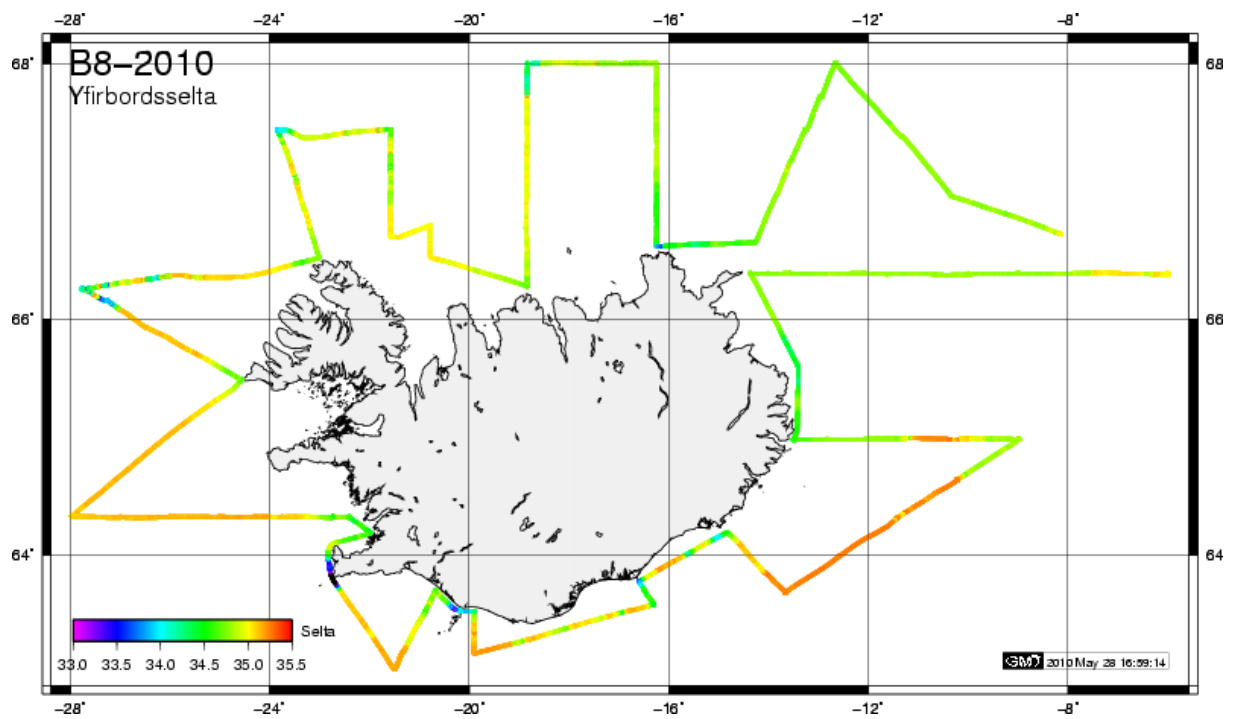
Hafstraumlíkan umhverfis Ísland (af vísindavef Háskóla Íslands).



Yfirborðs flúr mælingar í vorralli Hafrannsóknarstofnunar 2010.



Yfirborðshitamælingar í vorralli Hafrannsóknarstofnunar 2010.



Yfirborðsseltumælingar í vorralli Hafrannsóknarstofnunar 2010.