

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

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Χωρικές και χρονικές αλλαγές βακτηριακής ποικιλότητας σε
γεωτρήσεις πόσιμου νερού»**

Παπαδάκη Σταυρούλα

ΒΟΛΟΣ 2023

«Spatial and temporal variability of bacterial diversity drinking water wells»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1. Κωνσταντίνος Αρ. Κορμάς**, Καθηγητής, Μικροβιακή Οικολογία Υδάτινου Περιβάλλοντος, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας,
Επιβλέπων

- 2. Αλεξάνδρα Μεζίτη**, Επίκουρη Καθηγήτρια, Θαλάσσια Βιολογία με έμφαση στη Μικροβιολογία με χρήση Μοριακών Μεθόδων, Τμήμα Ωκεανογραφίας και Θαλάσσιων Βιοεπιστημών, Σχολή Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Αιγαίου,
Μέλος

- 3. Σάββας Μ. Γενίτσαρης**, Επίκουρος Καθηγητής, Δομή και Λειτουργία Κοινοτήτων Υδατικών Οικοσυστημάτων, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, *Μέλος*

Στη γιαγιά μου Σταυρούλα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της εργασίας αυτής, κ. Κωνσταντίνο Κορμά, για την πολύτιμη καθοδήγηση, τη διαρκή παροχή γνώσεων και τις εξαιρετικά στοχευμένες υποδείξεις και σχόλια που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της, αλλά πάνω απ' όλα τον ευχαριστώ για την υποστήριξη και την υπομονή του ώστε να επιτύχω το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα. Φυσικά δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις θερμές μου ευχαριστίες προς την κ. Αλεξάνδρα Μεζίτη με την οποία ξεκινήσαμε και ολοκληρώσαμε όλο το εργαστηριακό κομμάτι της διπλωματικής εργασίας, δίνοντας μου σημαντικά εφόδια και άμεση βοήθεια σε πάρα πολλά στάδια διεκπεραίωσης της.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για όλες εκείνες τις στιγμές συμπαράστασης, υποστήριξης και ενθάρρυνσης που συνέβαλαν στην επιτυχή ολοκλήρωση της εργασίας αυτής και των σπουδών μου γενικότερα.

Παπαδάκη Σταυρούλα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη των βακτηριακών κοινοτήτων τριών υπόγειων πηγών πόσιμου νερού από τη περιοχή της Βόρειο-Δυτικής Ρουμανίας. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε από τον Ιούλιο του 2016 μέχρι τον Ιούλιο του 2020. Σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη των χώρο-χρονικών αλλαγών στη σύνθεση των βακτηριακών κοινοτήτων των δειγμάτων από τις υπό μελέτη πηγές πόσιμου νερού. Αρχικά τα δείγματα μελετήθηκαν εργαστηριακά μέσω μοριακών μεθόδων και ύστερα ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση όπου οι προκαρυωτικοί οργανισμοί ομαδοποιήθηκαν σε λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (Operational Taxonomic Units, OTU's) με την μεγαλύτερη έμφαση να δίνεται στις πιο άφθονους. Οι δείκτες ποικιλότητας εμφάνισαν υψηλές τιμές σε όλες τις πηγές ενώ κάποια βακτηριακά γένη και φύλα όπως τα *Leptospirillum*, *Omnitrophica*, *Flavobacterium* και *Nomurabacteria* φάνηκαν να ξεχωρίζουν λόγω της συχνότητας εμφάνισης και της σχετικής αφθονίας τους. Επίσης, έντονη ήταν και η παρουσία περαιτέρω σιδηροοξειδωτικών και ολιγότροφων βακτηρίων που δεν σχετίζονται με κάποιας μορφής ρύπανση, υποδηλώνοντας καλή ποιότητα νερού. Εν' συνεχεία, εφαρμόστηκαν μη παραμετρικές στατιστικές δοκιμασίες για τη σύγκριση των μικροβιακών κοινοτήτων των πηγών εμφανίζοντας διαφορετικές ομοιότητες ανάμεσά τους. Αντίστοιχες συγκρίσεις σε χώρο-χρονικές αλλαγές πραγματοποιήθηκαν και μεταξύ των ίδιων των πηγών ανά τα έτη δειγματοληψιών όπως επίσης και μεταξύ των ετών στις τρεις πηγές ξεχωριστά. Οι πιο ισχυροί λόγοι γύρω από το παραπάνω εύρημα αποδόθηκαν στις υδρολογικές παραμέτρους στηριζόμενοι σε υποθέσεις προϋπάρχουσας βιβλιογραφίας, καθώς δεν ήταν δυνατή η απόκτηση φυσικοχημικών δεδομένων από τις υπό μελέτη πηγές. Εν' κατακλείδι, η συνύπαρξη των παρόντων μικροοργανισμών δεν ήταν τυχαία, διότι φαίνεται πως είχαν σχηματιστεί καλά οργανωμένες, μικροβιακές κοινότητες ικανές να εξυπηρετήσουν βασικούς οικολογικούς ρόλους. Ωστόσο, παραμένει άγνωστο αν οι σχέσεις μεταξύ τους πρόκεινται για συμβιωτικές, παρασιτικές ή συνδυασμός των παραπάνω .

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: υπόγειες πηγές, πόσιμο νερό, χώρο-χρονική μελέτη, μικροβιακές κοινότητες, μικροβιακή ποικιλότητα, σίδηρο-οξειδωτικά βακτήρια

ABSTRACT

In this thesis, a study of the bacterial communities of three underground drinking water wells from the region of North-West Romania was carried out and the sampling period lasted from July 2016 to July 2020. The purpose of this thesis was to study the spatio-temporal changes in the composition of bacterial communities of the samples from the drinking water wells. First of all, the samples were studied in the laboratory through molecular methods and then bioinformatic analysis followed where the prokaryotic microorganisms were grouped into Operational Taxonomic Units (OTU's) with the greatest emphasis being placed on the most abundant ones. Within this time period and with the help of the diversity indices applied it was found that all three water wells share an extensive species richness with some bacterial genera and phyla such as *Leptospirillum*, *Omnitrophica*, *Flavobacterium* and *Nomurabacteria* standing out due to their frequency of occurrence and their relative abundance. Moreover, the presence of further iron-oxidizing and oligotrophic bacteria that are not related to any form of pollution was also pronounced, indicating good water quality. Subsequently, non-parametric statistical tests were applied to compare the microbial communities of the sources showing different similarities between them. Corresponding comparisons in spatio-temporal changes were made between the water wells themselves by the years of sampling as well as between the years in the three water wells separately. The strongest reasons surrounding the above finding were attributed to the hydrological parameters based on pre-existing literature assumptions, as it was not possible to obtain physicochemical data from the studied water wells. In conclusion, the coexistence of the present microorganisms was not accidental, since it seems that they had formed well-organized, microbial communities capable of serving basic ecological roles had formed. However, it remains unclear whether the relationships between them are symbiotic, parasitic or a combination of the them.

KEY WORDS: underground water wells, drinking water, spatio-temporal study, microbial communities, microbial diversity, iron-oxidizing bacteria

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Σημασία υπόγειων πηγών και υδάτων	9
1.2 Βακτηριακή ποικιλότητα στο πόσιμο νερό.....	11
1.3 Σημασία των μικροοργανισμών στο πόσιμο νερό	14
1.4 Σκοπός εργασίας.....	15
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	16
2.1 Δειγματοληψία–Προετοιμασία πριν την εργαστηριακή ανάλυση.....	16
2.2 Εκχύλιση του DNA και αλληλούχιση.....	17
2.3 Βιο-πληροφορική ανάλυση.....	17
2.4 Στατιστική ανάλυση-Δείκτες ποικιλότητας	18
2.5 Μη παραμετρικές μέθοδοι	19
2.6 Άφθονα γένη βακτηρίων.....	19
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	20
3.1 Δείκτες ποικιλότητας	21
3.2 Άφθονα γένη βακτηρίων.....	23
3.3 Μη παραμετρικές μέθοδοι	27
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	33
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	43

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η εκμετάλλευση και η χρησιμότητα του υπόγειου νερού αρχίζουν να γίνονται αντιληπτές από τις πρώτες ανθρώπινες κοινωνίες και αυτό αντικατοπτρίζεται από το γεγονός ότι οι πρώτοι άνθρωποι οικισμοί χτίστηκαν σε κοντινές αποστάσεις με πηγές, λίμνες και ποτάμια, οπουδήποτε δηλαδή υπήρχε εύκολη πρόσβαση στο υδάτινο στοιχείο. Ωστόσο, το ανθρώπινο είδος γνώριζε σχετικά με την ύπαρξη του υπόγειου νερού τουλάχιστον από το 8000 π.Χ. Κάποια χρόνια αργότερα, στα μέσα του 19ου αιώνα, ο Hassall (1850) πραγματοποίησε μικροσκοπικές έρευνες σε δείγματα υπόγειων υδάτων από έργα στο Λονδίνο και ο Cohn (1853) εντόπισε τα πρώτα βακτήρια που οξειδώνουν σίδηρο και μαγγάνιο σε πηγάδια υπόγειων υδάτων. Σε μικρό χρονικό διάστημα μετά τις πρώτες μικροσκοπικές έρευνες διεξήχθη και η πρώτη συστηματική ταξινόμηση βακτηρίων από έναν ρηχό υδροφόρο ορίζοντα στη Γερμανία στην οποία παρουσιάστηκε μια ξεχωριστή γηγενής μικροβιακή κοινότητα σε σύγκριση με εκείνες των επιφανειακών υδάτων (Wolters et al., 1956). Βέβαια, το γεγονός που οδήγησε στην ανάγκη για εντατικοποίηση της μικροβιολογικής έρευνας στα υπόγεια περιβάλλοντα ήταν το 1970 με την εξόρυξη πετρελαίου και πόσιμου νερού από το υπέδαφος καθώς απασχόλησε ιδιαίτερα η διάβρωση και η απόφραξη σωλήνων και φρεατίων (Ehrlich et al., 1983).

1.1 Σημασία υπόγειων πηγών και υδάτων

Οι πηγές τροφοδοτούνται με νερό χάρις την κατείσδυση ή τη διήθηση των κατακρημνισμάτων έχοντας ως αποτέλεσμα την ανύψωση της στάθμης του. Σε παγκόσμιο επίπεδο, περίπου το 95% του υγρού γλυκού νερού αποτελείται από χερσαία υπόγεια ύδατα ενώ, έχει υπολογιστεί πως μόλις το ένα τρίτο του παγκόσμιου πληθυσμού εξαρτάται από τα υπόγεια ύδατα ως κύρια πηγή πόσιμου νερού (Falkenmark et al., 2005). Γενικά ως πόσιμο νερό ορίζεται εκείνο που έχει υποστεί επεξεργασία ώστε να καθίσταται πόσιμο ή περιλαμβάνει νερό το οποίο προέρχεται από προστατευμένη πηγή (Hull et al., 2019). Παρόλα αυτά απέχει πολύ από την έννοια του αποστειρωμένου διότι, μπορεί να περιέχει εξαιρετικά διαφορετικές και λειτουργικά πολύπλοκες μικροβιακές κοινότητες (Wang et al., 2013). Επιπροσθέτως, τα υπόγεια ύδατα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον υδρολογικό κύκλο ενώ, παράλληλα

καθίστανται ως ρυθμιστικός παράγοντας για τη διατήρηση υγροτόπων και ποταμών εξασφαλίζοντας μόνιμη ροή καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Ιδιαίτερα κατά την ζώνη μετάβασης μεταξύ των επιφανειακών τρεχούμενων υδάτων και των υπόγειων, δηλαδή η υπορροϊκή ζώνη, παίζει κομβικό ρόλο στο βιογεωχημικό κύκλο και στη βιοποικιλότητα των δύο οικοσυστημάτων (Gibert et al., 2009). Οι περιβαλλοντικές συνθήκες συστημάτων όπως του υπό μελέτη, μπορεί να είναι εξαιρετικά σταθερές και χαρακτηρίζονται από έλλειψη φωτός, χαμηλή διαθεσιμότητα οργανικού άνθρακα και θρεπτικών ουσιών με σταθερά χαμηλές θερμοκρασίες. Για τους παραπάνω λόγους το συγκεκριμένο ενδιαίτημα έχει θεωρηθεί ως «ακραίο» (Danielopol et al., 2000). Από την άλλη, λόγω της συνεχούς αύξησης του πληθυσμού και της κλιματικής αλλαγής ως συνεπακόλουθο της ανθρωπογενούς δραστηριότητας, τα οικοσυστήματα που φιλοξενούν τα υπόγεια ύδατα αναμένεται να επηρεαστούν αρνητικά ως προς την διαθεσιμότητα και την ποιότητα τους. Πιο συγκεκριμένα, οι ανθρωπογενείς μικροβιακές και χημικές προσμείξεις στα υπόγεια ύδατα μπορούν να αποτελέσουν άμεσο κίνδυνο όχι μόνο για την ανθρώπινη υγεία αλλά και για την περιβαλλοντική, διαταράσσοντας την ακεραιότητα και τη λειτουργία των υπόγειων υδάτινων οικοσυστημάτων (Griebler et al., 2014). Επιπλέον, τα υπόγεια ύδατα αποτελούν σημαντικό οικονομικό παράγοντα γι' αυτό άλλωστε και οι περισσότερες έρευνες υδροφορέων έχουν επικεντρωθεί σε μολυσμένες τοποθεσίες (Zarda et al., 1998). Η είσοδος ρύπων στα oligότροφα οικοσυστήματα των υπόγειων υδάτων πιθανώς να αλλάζει την δομή και τον μεταβολισμό της μικροβιακής κοινότητας (Yavari-Bafghi et al., 2023), καθώς οι κοινότητες μπορεί να παρουσιάζουν αρκετά περιορισμένες ικανότητες αντίστασης και ανθεκτικότητας σε διαταραχές. Εξίσου σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί των υπόγειων υδάτων είναι δυνατό να προκαλέσουν άμεσες αλλά και έμμεσες επιδράσεις σε άλλα είδη εφόσον μοιράζονται πολύπλοκες οικολογικές αλληλεπιδράσεις με αυτά (Goldscheider et al., 2006).

Ωστόσο, παρά την παγκόσμια βαρύτητα για ασφαλές πόσιμο νερό, το μικροβίωμα του παραμένει ανεπαρκώς μελετημένο σε σχέση με άλλα περιβαλλοντικά μικροβιώματα (Hull et al., 2019) και δεν έχει αποδοθεί η απαιτούμενη προσοχή παρόλο που η πλειονότητα της προκαρυωτικής ζωής βρίσκεται στη βαθιά υπόγεια βιόσφαιρα, αντιπροσωπεύοντας το ~ 15% της παγκόσμιας βιομάζας (Bar-On et al., 2018). Η μελέτη και η έρευνα στις παρθένες και ενεργειακά περιορισμένες μικροβιακές κοινότητες του υπό μελέτη οικοσυστήματος καθώς και οι σχετικές βιογεωχημικές διεργασίες παραμελούνται (Griebler et al., 2002) και αυτό φαίνεται από την απουσία τους σε τρέχοντα προγράμματα παρακολούθησης και από τις σχετικές πολιτικές. Ωστόσο, η μελέτη τόσο της μικροβιακής όσο και της ζωικής οικολογίας καθίσταται πολύτιμη για την κατανόηση της βιοποικιλότητας των υπόγειων υδάτων και της λειτουργίας του οικοσυστήματος (Gibert and Deharveng, 2002) ενώ παράλληλα με την προστασία των υδροφορέων επιφέρεται η διατήρηση της παγκόσμιας βιοποικιλότητας (Danielopol and Pospisil et al., 2001). Μολονότι, τα υπόγεια ύδατα συνιστούν ένα δυσπρόσιτο περιβάλλον, χάρις τις βελτιωμένες τεχνικές έρευνας και τεχνολογίας η μελέτη της οικολογίας τους γίνεται όλο και πιο δυνατή. Ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια οι μοριακές μέθοδοι έχουν αποκαλύψει μια υπερμεγέθη ποικιλομορφία μικροβιακών

κοινοτήτων στα υπόγεια ύδατα (Madsen et al., 2000). Τεχνικές από τη μοριακή βιολογία όπως η σύγκριση και η ταυτοποίηση επιλεγμένων αλληλουχιών γονιδίων χρησιμοποιούνται ολοένα περισσότερο στον τομέα της μικροβιακής οικολογίας. Το γονίδιο 16S rRNA (ριβοσωμικό ριβονουκλεϊκό οξύ) για παράδειγμα είναι κατάλληλο για αυτόν τον σκοπό, διότι υπάρχει σε όλους τους οργανισμούς και αλλάζει αργά κατά τη διάρκεια της βιολογικής εξέλιξης (Goldscheider et al., 2006). Τέτοιου είδους προσεγγίσεις μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώριση βακτηριακών ειδών από δείγματα υπόγειων υδάτων, συγκρίνοντας την αλληλουχία των γονιδίων τους με πληροφορίες που δίνονται από μια βάση δεδομένων γνωστών ειδών (Casamayor et al., 2002). Επιπλέον, αν συνυπολογιστεί πως τα περισσότερα βακτήρια των υπόγειων υδάτων είναι βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα, οι παραπάνω μέθοδοι πιθανόν να είναι και η μοναδική λύση για την απόκτηση πληροφοριών ολόκληρης της κοινότητας όπως ο αριθμός των μικροοργανισμών, η αναγνώριση ειδών και ο χαρακτηρισμός της μικροβιακής ποικιλότητας, αποτελέσματα τα οποία είτε δεν παρέχονται από τεχνικές καλλιέργειας είτε είναι ελλιπή (Goldscheider et al., 2006). Μάλιστα, με την εμφάνιση της αλληλούχισης ολόκληρου του γονιδιώματος έχει γίνει πλέον δυνατή η ταχεία αξιολόγηση της μικροβιακής κοινότητας για να βοηθηθεί η λήψη αποφάσεων σχετικά με την ασφάλεια του πόσιμου νερού (Tan et al., 2015).

1.2 Βακτηριακή ποικιλότητα στα υπόγεια ύδατα

Οι μικροβιολόγοι για μεγάλο χρονικό διάστημα στηρίζονταν στην «υπόθεση» του Baas-Becking «τα πάντα είναι παντού, αλλά το περιβάλλον επιλέγει» (Baas-Becking, 1934), αν και πλέον υπάρχουν ενδείξεις ότι τελικά κάτι τέτοιο δεν ισχύει. Για την ακρίβεια έχει προταθεί η μη τυχαιότητα στη κατανομή των μικροοργανισμών ακόμη και για τους καλά συνδεδεμένους επιφανειακούς οικοτόπους. Οι μικροοργανισμοί λοιπόν, λόγω του ότι χαρακτηρίζονται από μεγάλη αφθονία και μικρό σωματικό μέγεθος, παρουσιάζουν, υψηλή ικανότητα παθητικής διασποράς. Τα παραπάνω έχουν ως συνέπεια να επιδεικνύουν διάφορα πρότυπα ως προς την διασπορά τους στα υδάτινα οικοσυστήματα (Zhang et al., 2014). Τα παρθένα υπόγεια ύδατα από την άλλη όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, αποτελούν ένα σχετικά σταθερό περιβάλλον με χαμηλά επίπεδα ενέργειας και παραγωγικότητας σε σκοτεινές και ψυχρές συνθήκες (Griebler χαμηλής ενέργειας, περιέχουν μια αναπάντεχα μεγάλη ποικιλία μορφών ζωής που εμφανίζουν διακριτά προσαρμοστικά χαρακτηριστικά (Griebler et al., 2014). Επακολούθως, οι μικροβιακές κοινότητες των υπόγειων υδάτων εξαρτώνται από

χημικούς ενεργειακούς πόρους, οι οποίοι μάλιστα είναι σπάνιοι σε μη μολυσμένα υπόγεια ύδατα. Για τον παραπάνω λόγο οι μικροοργανισμοί που διαβιούν σε oligότροφες συνθήκες έχουν αναπτύξει συγκεκριμένες στρατηγικές επιβίωσης όπως τα μικρά μεγέθη κυττάρων, χαμηλή πυκνότητα πληθυσμού και μειωμένη δραστηριότητα (Goldscheider et al., 2006). Επομένως, οι μικροβιακές κοινότητες των υπόγειων υδροφορέων αναμένεται να αποτελούνται σε μεγάλο βαθμό από ετερότροφους, καλά προσαρμοσμένους μικροοργανισμούς στο φτωχό σε θρεπτικά συστατικά oligότροφο περιβάλλον των υπόγειων υδάτων (Ghiorse and Wilson, 1988). Γενικά οι μικροοργανισμοί που φαίνεται να κυριαρχούν στις υπόγειες πηγές είναι τα βακτήρια και τα αρχαία έναντι των ευκαρυωτών παρόλο που οι τελευταίοι είναι παρόντες και ενεργοί στο συγκεκριμένο ενδιαίτημα (Lopez-Fernandez et al., 2018), ενώ οι περισσότεροι από αυτούς συναντώνται σε μικρό-αποικίες ή λεπτά βιοϋμένια προσκολλημένα σε σωματίδια ιζήματος, επιφάνειες πετρωμάτων και σε νεκρό σωματιδιακό οργανικό υλικό (Griebler and Lueders et al., 2009). Για παράδειγμα, οι διαφορετικές συνθήκες οξειδοαναγωγής που επικρατούν στα βιοϋμένια έχουν ως συνέπεια τη διαφοροποίηση της συγκεκριμένης μικροβιακής κοινότητας σε σχέση με εκείνες που μπορεί να βρίσκονται ελεύθερες στα υπόγεια ύδατα (Marshall et al., 2006) καθώς, οι μικροοργανισμοί που συνδέονται με το ίζημα του υδροφόρου ορίζοντα είναι πολύ πιθανό να έχουν καλύτερη πρόσβαση στα θρεπτικά συστατικά απ' ό,τι τα αιωρούμενα κύτταρα (Hazen et al., 1991). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα και τις διαφορετικές συνθέσεις των κοινοτήτων. Μάλιστα, μερικά αποτελέσματα ερευνών έδειξαν ότι οι κύριοι μεταβολικώς ενεργοί μικροοργανισμοί σε περιβάλλοντα διακύμανσης υπόγειων υδάτων ήταν οι νιτροποιητές και οι οξειδωτές Fe (Shen et al.,

Σε κάποιες εργασίες έχει συνοψιστεί πως οι μικροβιακές κοινότητες που βρίσκονται σε παρθένους oligότροφους υδροφορείς χαρακτηρίζονται από σταθερή σύνθεση και χαμηλή ποικιλομορφία παρόλο που δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως εάν η μικροβιακή βιοποικιλότητα σε μη διαταραγμένους υδροφορείς είναι γενικά χαμηλή ή οι χαμηλές εκτιμήσεις οφείλονται σε αστοχία των μεθόδων που έχουν χρησιμοποιηθεί (Griebler and Lueders, 2009). Βέβαια, υπάρχουν πολυάριθμες βιοτικές και αβιοτικές παράμετροι που μπορούν να καθορίσουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τη μικροβιακή ποικιλότητα στα υπόγεια υδάτινα οικοσυστήματα. Οι παραπάνω παράμετροι αφορούν εξελικτικές παραμέτρους (λόγω της γενετικής ευελιξίας των προκαρυωτών), την βιογεωγραφία, το μέγεθος του οικοτόπου, την χωρική ετερογένεια, την χρονική μεταβλητότητα και τις πιθανές διαταραχές του ενδιαιτήματος όπως η ρύπανση (Griebler and Lueders, 2009). Όσον αφορά την χρονική μεταβλητότητα στα υπόγεια οικοσυστήματα αυτή μπορεί να περιλαμβάνει υδραυλικά γεγονότα όπως η βροχόπτωση, το λιώσιμο των πάγων και τις πλημμύρες, όμως μπορεί να περιλαμβάνει και διακυμάνσεις όπως της θερμοκρασίας ή του ρυπαντικού φορτίου που οφείλονται στην ανθρωπογενή δραστηριότητα. Μάλιστα, έχει βρεθεί πως η βακτηριακή ποικιλομορφία μπορεί να επηρεαστεί άμεσα από γεγονότα επαναφόρτισης, μεταφέροντας επιφανειακά βακτήρια στα υπόγεια ύδατα. Η προαναφερθείσα είσοδος των βακτηρίων πιστεύεται πως είναι η κύρια πηγή του μικροβιώματος των υπόγειων υδάτων, καθώς μόνο το 12% των πελαγικών γενών των υπόγειων υδάτων έχει βρεθεί

στο μητρικό πέτρωμα των βράχων σε διάφορες περιοχές μελέτης (Lazar et al., 2019). Στη περίπτωση των οργανικών ρύπων όταν αυτοί εισήχθησαν σε oligότροφους υδροφορείς μετατόπισαν ή αύξησαν την τοπική μικροβιακή ποικιλότητα (Cho and Kim, 2000) μια κατάσταση που μπορεί να αποδοθεί στις υψηλές συγκεντρώσεις μικροβίων που εισάγονται με τη ρύπανση. Ωστόσο, σε περιπτώσεις που ο υπόγειος υδροφορέας έχει υποστεί ρύπανση από βαρέα μέταλλα ακολούθησε, έντονη μείωση της βιοποικιλότητας. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι η ανθρωπογενής διαταραχή δεν προκαλεί απαραίτητα απώλεια μικροβιακής ποικιλότητας στα υπόγεια υδατικά οικοσυστήματα. Απεναντίας, μελέτες έχουν αναφερθεί σε έντονες αλλαγές στη σύνθεση της κοινότητας σε παρόμοια επίπεδα ποικιλομορφίας και πλούτου (Feris et al., 2004) Δεν είναι άλλωστε λίγες οι περιπτώσεις που τέτοιες αλλαγές εμφανίζονται ακόμη και με αυξημένη βιοποικιλότητα (Cho and Kim, 2000). Επίσης, οι αναφορές στις απώλειες που αφορούν τη μικροβιακή ποικιλότητα σε μολυσμένα εδάφη και θαλάσσια ιζήματα (Gans et al., 2005) δεν έχουν επιβεβαιωθεί για τα υπόγεια ύδατα. Συμπληρωματικά, σε μια εργασία αποδείχθηκε ότι ακόμη και τα βασικά στοιχεία για τη μικροβιακή ανάπτυξη, όπως Ca, Mg, K και Na δεν διαδραμάτισαν σημαντικό ρόλο στη σύνθεση της βακτηριακής κοινότητας (Yan et al., 2020). Γενικά, οι παράγοντες που καθορίζουν τη βακτηριακή ποικιλότητα σε ένα ενδιαίτημα όπως αυτό των υπόγειων υδάτων χρίζουν περεταίρω έρευνας.

Όσον αφορά τον παράγοντα της εποχικότητας στις υπόγειες πηγές και το κατά πόσο μπορεί να μεταβληθεί η σύνθεση των μικροβιακών και πιο συγκεκριμένα των βακτηριακών κοινοτήτων, τα αποτελέσματα διαφόρων ερευνών δίστανται. Ορισμένες έρευνες πεδίου αποκάλυψαν ότι η αναπλήρωση και οι εποχιακές διακυμάνσεις της στάθμης των υπόγειων υδάτων επηρέασαν αισθητά τη σύνθεση του μικροβιώματος στα υπόγεια ύδατα (Meng et al., 2021). Σύμφωνα με την μελέτη του (Lin et al., 2012) φάνηκε πως λόγω της εποχικής ανόδου ενός ποταμού που προκάλεσε εισβολή νερού σε έναν υδροφόρο ορίζοντα, προκάλεσε επίσης και αλλαγές στη σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας του συγκεκριμένου υδροφόρου ορίζοντα. Ομοίως, μια τρέχουσα μελέτη σε υπόγειους υδροφορείς στην Ισλανδία δείχνει ότι τα έντονα καιρικά φαινόμενα τα οποία οδηγούν και στην υψηλή επιφανειακή απορροή είχαν σημαντικό αντίκτυπο στη σύνθεση και την ποικιλομορφία των μικροβιακών κοινοτήτων του ενδιαίτηματος (Knobloch et al., 2021). Τέλος, οι (Zhou et al., 2012), που μελέτησαν μικροβιακές κοινότητες από έναν πορώδες αλπικό υδροφόρο ορίζοντα, κατέληξαν στο ίδιο συμπέρασμα με τους προηγούμενους, ότι δηλαδή λόγω της υψηλής απορροής του νερού τήξης, αλλάζει το αιωρούμενο μικροβίωμα των υπόγειων υδάτων ενώ μάλιστα στη συγκεκριμένη έρευνα μειώθηκε και η συνολική μικροβιακή ποικιλότητα. Τα παραπάνω αποτελέσματα θα μπορούσαν να βασιστούν στην υπόθεση πως οι μικροοργανισμοί πιθανώς έχουν τη δυνατότητα να αποσπαστούν ασυνεχώς και να εισέλθουν στη στήλη του νερού ανάλογα με τις εποχικές αλλαγές στη ροή του νερού ή τις διακυμάνσεις της στάθμης του (Knobloch et al., 2021). Στον αντίποδα, μια ακόμη έρευνα παρουσίασε ότι οι βακτηριακές κοινότητες από έναν υπόγειο υδροφόρο ορίζοντα παρέμειναν σταθερές και καλά συνδεδεμένες ενώ, ελάχιστα επηρεάστηκαν από τον εποχιακό υδρολογικό κύκλο (Zhou et al., 2012). Παρομοίως, οι (Farnleitner et al., 2005) αναφέρουν ότι η μικροβιακή κοινότητα δύο διαφορετικών τύπων υπόγειων

πηγών που είχε μελετήσει παρέμεινε χρονικά σταθερή. Πιθανώς οι λόγοι για τους οποίους προέκυψαν τόσα διαφορετικά αποτελέσματα σχετικά με την συσχέτιση της εποχικότητας και της σύνθεσης των μικροβιακών κοινοτήτων στις υπόγειες πηγές να είναι ποικίλοι, όμως υπάρχουν παραδείγματα που αποδεικνύουν πως οι μικροβιακές κοινότητες των υπορροϊκών οικοτόπων των υπόγειων υδάτων είναι πιο δυναμικές από αυτές των υδροφορέων, για τις οποίες δεν έχουν αναφερθεί εποχιακές διακυμάνσεις (Griebler and Lueders, 2009).

1.3 Σημασία των μικροοργανισμών στα υπόγεια ύδατα

Πολλοί μικροοργανισμοί, σε αντίθεση με τα περισσότερα ασπόνδυλα έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται ταχύτατα στις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες. Αυτό συμβαίνει λόγω της μεταβολικής ευελιξίας και της ικανότητάς τους να ανταλλάσσουν γενετικές πληροφορίες (Dröge et al., 1999). Επιπλέον, οι μικροοργανισμοί είναι ευαίσθητοι σε περιβαλλοντικές αλλαγές της θερμοκρασίας (Lai et al., 2021), του οξυγόνου (Meyerhof et al., 2016), της υγρασίας (Matulich and Martiny, 2015) και γενικότερα της χημικής σύνθεσης του ενδιαιτήματος όπου ζουν (Hu et al., 2016). Συνεπώς, η μελέτη τους είναι πολύ πιθανό να αντικατοπτρίζει και τις επικρατούσες συνθήκες μιας οποιαδήποτε περιοχής. Μια πολύ σημαντική διεργασία η οποία εκτελείται από τους μικροοργανισμούς και ιδίως εκείνους που διαβιούν στα υπόγεια ύδατα είναι η ανακύκλωση της ύλης μέσω βιογεωχημικών διεργασιών όπως ο κύκλος του άνθρακα (C), του αζώτου (N), του θείου (S) και του σιδήρου (Fe) καθώς επίσης και στον μετασχηματισμό οργανικών και ανόργανων ουσιών (Ehrlich et al., 2015). Εκτός των άλλων υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες που έχουν αποδείξει τη σημασία των μικροοργανισμών για ένα ευρύ φάσμα γεωχημικών διεργασιών καθώς συμβάλλουν ενεργά στη διάβρωση των ορυκτών, απελευθερώνοντας έτσι τα στοιχεία που είναι απαραίτητα για το μεταβολισμό τους (Rogers and Bennett, 2004). Μάλιστα, δεν πρέπει να παραληφθεί η φυσική τους ικανότητα στην εξασθένιση των ρύπων του υδροφόρου ορίζοντα (Goldscheider et al., 2006). Αν και δεν υπάρχουν πολλές αναφορές που αφορούν τη χρήση τους για την απομάκρυνση των μετάλλων, οι μικροοργανισμοί τείνουν να απομακρύνουν ή και να προσροφούν ιόντα μετάλλων σε χαμηλές συγκεντρώσεις και για μικρότερης διάρκειας περιόδους επαφής. Πιο συγκεκριμένα υπάρχουν δημοσιευμένες αναφορές όπου βακτηριακά είδη όπως ορισμένα *Pseudomonas* spp. που έχουν την ικανότητα να απομακρύνουν σημαντικές ποσότητες βαρέων μετάλλων με βιοαπορρόφηση (Vullo et al., 2008) και το γένος

Leptospirillum το οποίο επίσης απομακρύνει τον χαλκό και το κοβάλτιο από θειικά διαλύματα εκπλυμένων ορυκτών μεταλλευμάτων. Τα παραπάνω χημικά στοιχεία αλλά και ουσίες προσλαμβάνονται εύκολα από τους μικροοργανισμούς, οξειδώνονται με γρήγορους ρυθμούς και στις περισσότερες περιπτώσεις απομακρύνονται πλήρως μέσα στο έδαφος και την ακόρεστη ζώνη πριν φτάσουν στον κύριο υδροφόρο ορίζοντα (Goldscheider et al., 2006). Τέλος, μπορεί να συνοψιστεί πως μικροβιακές κοινότητες μπορούν να είναι ενδεικτικές της ποιότητας των υπόγειων υδάτων (Goldscheider et al., 2006) γεγονός που τονίζει εντονότερα την σημασία τους σε ενδιαιτήματα υπόγειων πηγών και αναπόφευκτα στο πόσιμο νερό.

1.4. Σκοπός εργασίας

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η ανάλυση, μέσω μοριακών μεθόδων, και ο χαρακτηρισμός της βακτηριακής ποικιλότητας τριών υπόγειων πηγών για τέσσερα συνεχόμενα χρόνια, ώστε να αποκτηθούν χώρο-χρονικά χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την βακτηριακή τους σύνθεση και κατανομή.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δειγματοληψία–Προετοιμασία πριν την εργαστηριακή ανάλυση

Τα δείγματα νερού (39 δείγματα στο σύνολο) συλλέχθηκαν από τρεις διαφορετικές αλλά γειτονικές πηγές στη περιοχή της Βόρειο-Δυτικής Ρουμανίας από τον Ιούλιο του 2016 μέχρι τον Ιούλιο του 2020 (Πίν. 1).

Πίνακας 1. Χρονικές περίοδοι δειγματοληψίας

ΜΗΝΕΣ	ΕΤΗ
ΙΟΥΛΙΟΣ	2016
ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ	2016
ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ	2016
ΜΑΡΤΙΟΣ	2017
ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ	2017
ΜΑΡΤΙΟΣ	2018
ΙΟΥΛΙΟΣ	2018
ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ	2018
ΜΑΡΤΙΟΣ	2019
ΙΟΥΛΙΟΣ	2019
ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ	2019
ΜΑΡΤΙΟΣ	2020
ΙΟΥΛΙΟΣ	2020

Η διήθηση νερού (20L) έγινε αμέσως μετά την συλλογή του στην Ρουμανία χρησιμοποιώντας χαμηλής πίεσης κενού (<160 mm Hg) και πολυανθρακικά φίλτρα μεμβράνης με μέγεθος πόρων 0,22 µm και διάμετρο 47 mm από την Sartorius (23007-47N). Την επόμενη ημέρα τα δείγματα μεταφέρθηκαν στις εργαστηριακές εγκαταστάσεις στην Ελλάδα σε κατάψυξη όπου και αποθηκεύτηκαν επίσης στη κατάψυξη στους -20°C.

2.2 Εκχύλιση του DNA και αλληλούχιση

Μετά τον τεμαχισμό των φίλτρων, ακολούθησε η εκχύλιση του DNA που πραγματοποιήθηκε σε λιγότερο από ένα 24ωρο από την παραλαβή των δειγμάτων, χρησιμοποιώντας το kit απομόνωσης DNA NucleoSpin Soil της εταιρίας Macherey-Nagel σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Οι εκκινητές S-DBact-0341-b-S-17 (CCTACGGGNGGCWG'CAG) και S-D-Bact-0785-a-A-24 (GACTACHVGGGTATCTAATCC) (Klindworth et al., 2012) επιλέχθηκαν για το γονίδιο 16S rRNA. Η ενίσχυση του DNA διεξήχθη χρησιμοποιώντας διαφορετικούς προσαρμογείς για κάθε δείγμα καθώς επίσης ακολούθησε η αλληλούχιση των δειγμάτων της τεχνολογίας Illumina με προσδιοριστή αλληλουχίας MiSeq PE300 ακολουθώντας τις συστάσεις των κατασκευαστών στις εγκαταστάσεις προσδιορισμού αλληλουχίας της MRDNA Ltd. (Shallowater, TX, ΗΠΑ). Αξίζει να σημειωθεί ότι η αλληλούχιση των δειγμάτων το 2016 έγινε με τη χρήση οργάνων και αντιδραστηρίων τιτανίου Roche454 FLX (454 pyrosequencing).

2.3 Βιο-πληροφορική ανάλυση

Ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση και επεξεργασία των αλληλουχιών με το λογισμικό MOTHUR (Schloss et al., 2009). Οι τελικές αλληλουχίες που προέκυψαν ήταν ~420bp. Στη συνέχεια οι προαναφερθείσες αλληλουχίες στοιχήθηκαν (alignment) με τη βάση δεδομένων SILVA 132 (Pruesse et al., 2007) και ομαδοποιήθηκαν σε λειτουργικές ταξινομικές ομάδες (Operational Taxonomic Units; OTU's) σε επίπεδο ομοιότητας $\geq 97\%$. Τέτοιοι όροι χρησιμοποιούνται συχνά για να περιγράψουν και να ταξινομήσουν τα βακτήρια στα υπόγεια ύδατα (Pickup et al. 2001; Rusterholtz and Mallory 1994). Ακολούθως, τα OTU's ταξινομήθηκαν χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων SILVA 132 σε επίπεδο γένους. Ωστόσο, επειδή τα δεδομένα είχαν προκύψει από διαφορετικές παρτίδες αλληλουχιών και στόχος ήταν η σύγκριση των συγκεκριμένων παρτίδων, ομαδοποιήθηκαν ξανά οι αλληλουχίες των OTU's που παρουσίασαν σχετική αφθονία $>1\%$ σε τουλάχιστον ένα δείγμα, σε επίπεδο ομοιότητας $\geq 97\%$ με την βοήθεια του λογισμικού cd-hit (Weizhong Li & Adam Godzik Bioinformatics, 2006). Συνολικά λοιπόν μετά την πρώτη ομαδοποίηση (ομοιότητα $\geq 97\%$) προέκυψαν 800-10.000 OTU's σε κάθε δείγμα όπου με την δεύτερη ομαδοποίηση (σχετική αφθονία $> 1\%$) μειώθηκαν στα 100. Συμπληρωματικά, μετά την πρώτη ομαδοποίηση των OTU's (με βάση την ομοιότητα) υπολογίστηκε η σχετική

τους αφθονία ώστε να πραγματοποιηθεί στη συνέχεια και η δεύτερη ομαδοποίηση κατά την οποία υποδηλώνεται ποια είναι εκείνα τα OTU's (δηλαδή τα γένη των βακτηρίων) που κυριαρχούν στις πηγές.

2.4 Στατιστική ανάλυση-Δείκτες ποικιλότητας

Προκειμένου να προσδιοριστεί η ποικιλότητα των τριών πηγών στις δεδομένες χρονικές περιόδους υπολογίστηκαν σε επίπεδο OTU οι δείκτες ποικιλότητας Shannon, Simpson και Chao-1. Ο δείκτης ποικιλότητας Shannon ($H' = -\sum_i^S P_i \ln P_i$) αξιολογεί τόσο τον πλούτο των ειδών όσο και την ανισοκατανομή όπως επίσης παρουσιάζει ευαισθησία στην αφθονία των σπάνιων ειδών (Shannon, 1948). Είναι ένας κλασσικός δείκτης ποικιλότητας και είναι βασισμένος στη θεωρία των πληροφοριών και όχι σε πρακτικές εφαρμογές οικολογίας (Krebs, 1999). Παίρνει τιμές από 0 – (+∞) και όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του τόσο μεγαλύτερη είναι και η ποικιλότητα. Από την άλλη, ο δείκτης ποικιλότητας Simpson ($D' = 1 / \sum_i^S P_i^2$) είναι ένας δείκτης ισοκατανομής που είναι ευαίσθητος στα άφθονα είδη και όχι στα σπάνια (Simpson 1949), εξαρτάται δηλαδή όχι μόνο από τον αριθμό των παρατηρούμενων ειδών αλλά και από τον βαθμό κυριαρχίας τους. Στην ουσία περιγράφει την πιθανότητα δυο άτομα που συλλέγονται τυχαία από ένα δείγμα μιας απείρως μεγάλης βιοκοινότητας να ανήκουν στο ίδιο είδος όπου p_i είναι η πιθανότητα ένα τυχαίο άτομο της βιοκοινότητας με S είδη να ανήκουν στο είδος i και S είναι ο αριθμός των ειδών. Οι τιμές του κυμαίνονται από 0 – 1 όπου τιμές κοντά στη μονάδα υποδηλώνουν ομοιομορφία στην κατανομή των ειδών. Όσον αφορά τον δείκτη Chao-1 ($S_{Chao1} = S_{obs} + \frac{F_1^2}{2F_2}$), είναι ένας μη παραμετρικός εκτιμητής του πλούτου των ειδών (υπολογίζει τα αναμενόμενα OTU's με βάση τα παρατηρούμενα OTU's), όπου S_{obs} είναι ο αριθμός των παρατηρούμενων OTU's, F_1 ο αριθμός των OTU's που έχουν μόνο μια αλληλουχία και F_2 ο αριθμός των OTU's που έχουν μόνο 2 αλληλουχίες (Chao 1987). Τέλος, προσδιορίστηκε ο βαθμός κάλυψης της ποικιλότητας (coverage) που προκύπτει από την διαίρεση του αριθμού των παρατηρούμενων OTU's προς τον αριθμό των αναμενόμενων OTU's του δείκτη Chao-1. Ο βαθμός κάλυψης της ποικιλότητας υποδεικνύει το κατά πόσο ακριβείς ήταν ο δείκτης Chao-1 σχετικά με τις προβλέψεις των αναμενόμενων OTU's.

2.5 Μη παραμετρικές μέθοδοι

Στη συνέχεια, κατασκευάστηκε μη παραμετρική πολυδιάστατη κλίμακα, Non-metric Dimensional Scaling (NMDS) με τον δείκτη ομοιότητας Bray-Curtis ώστε να απεικονιστεί γραφικά η διαχρονική μεταβλητότητα σχετικά με τις βακτηριακές κοινότητες κάθε πηγής ανά έτος. Η NMDS διάταξη εν' ολίγοις τοποθετεί τα δείγματα στον διδιάστατο χώρο και η απόσταση των κουκκίδων υποδηλώνουν πόσο όμοια ή ανόμοια είναι τα δείγματα όσον αφορά την βακτηριακή ποικιλότητα. Παράλληλα προκειμένου να συγκριθούν και οι τρεις πηγές κατασκευάστηκε ένα δενδρογράμμα κατά Morisita που περιλαμβάνει όλες τις χρονικές περιόδους δειγματοληψίας. Ο δείκτης ομοιότητας κατά Morisita χρησιμοποιεί τις σχετικές αφθονίες και παρουσιάζει την ομοιότητα μεταξύ δύο ή περισσότερων συνόλων δεδομένων. Τέλος, συγκρίθηκαν και οι τρεις πηγές ξεχωριστά φτιάχνοντας ακόμα τρία δενδρογράμματα κατά Morisita (ένα για κάθε πηγή) ώστε να εμφανιστούν ομοιότητες και διαφορές μεταξύ των δειγματοληψιών στις πηγές. Τα παραπάνω πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού Past (Paleontological statistics software package for education and data analysis) (Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. 2001).

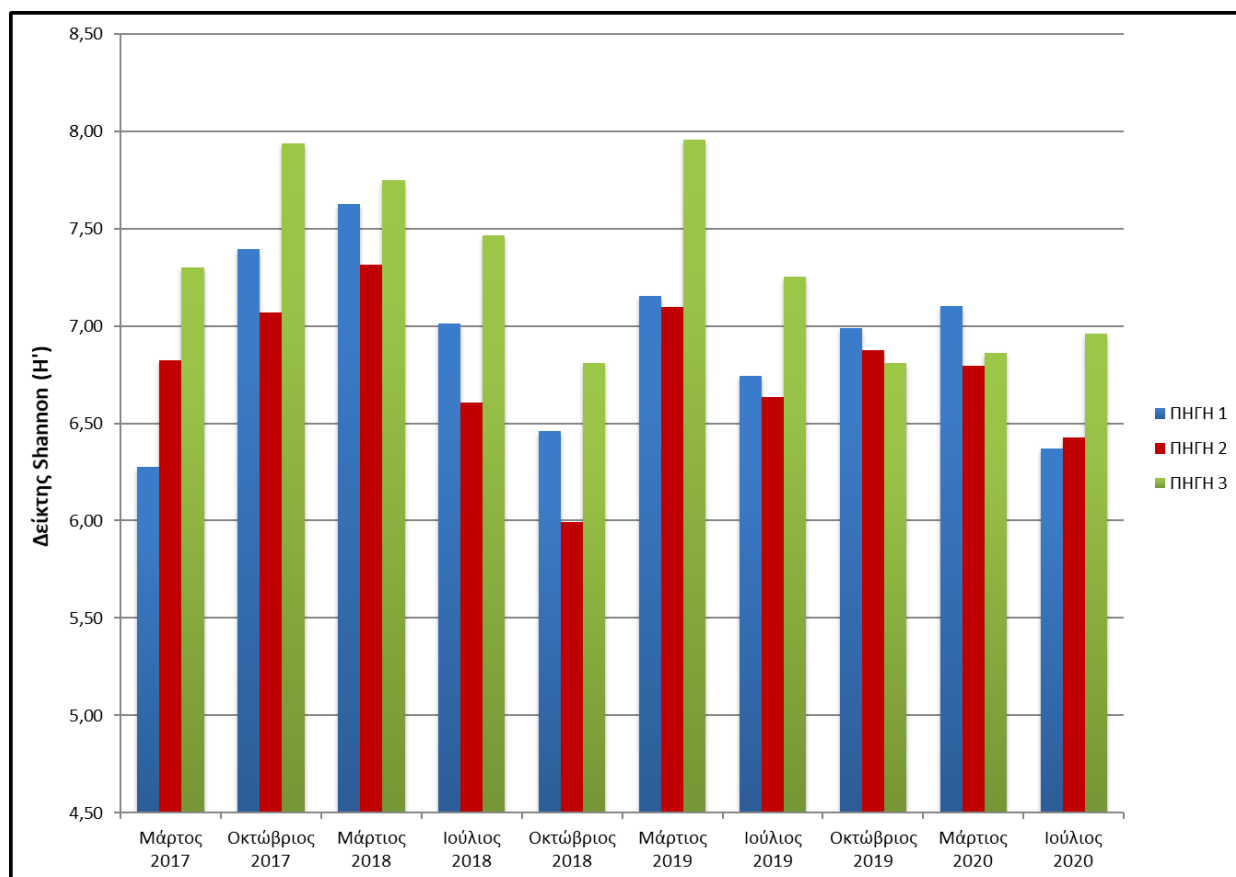
2.6 Άφθονα γένη βακτηρίων

Συμπληρωματικά, λαμβάνοντας υπόψη τις σχετικές αφθονίες εκείνων των OTU's που εμφάνισαν σχετική αφθονία πάνω από 1% έστω και μια φορά σε κάποια από τις περιόδους δειγματοληψίας, κατασκευάστηκαν τρία Stacked bars (ένα για κάθε πηγή) όπου απεικονίζεται η σχετική αφθονία για κάθε ένα από τα πιο άφθονα γένη βακτηρίων της συγκεκριμένης πηγής. Επίσης, θεωρήθηκε σκόπιμο να παρουσιαστεί η κατανομή του γένους *Leptospirillum* στις πηγές για κάθε δειγματοληψία μέσω ενός γραμμικού διαγράμματος. Τα stacked bars και το γραμμικό διάγραμμα κατασκευάστηκαν με το υπολογιστικό φύλο Excel.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

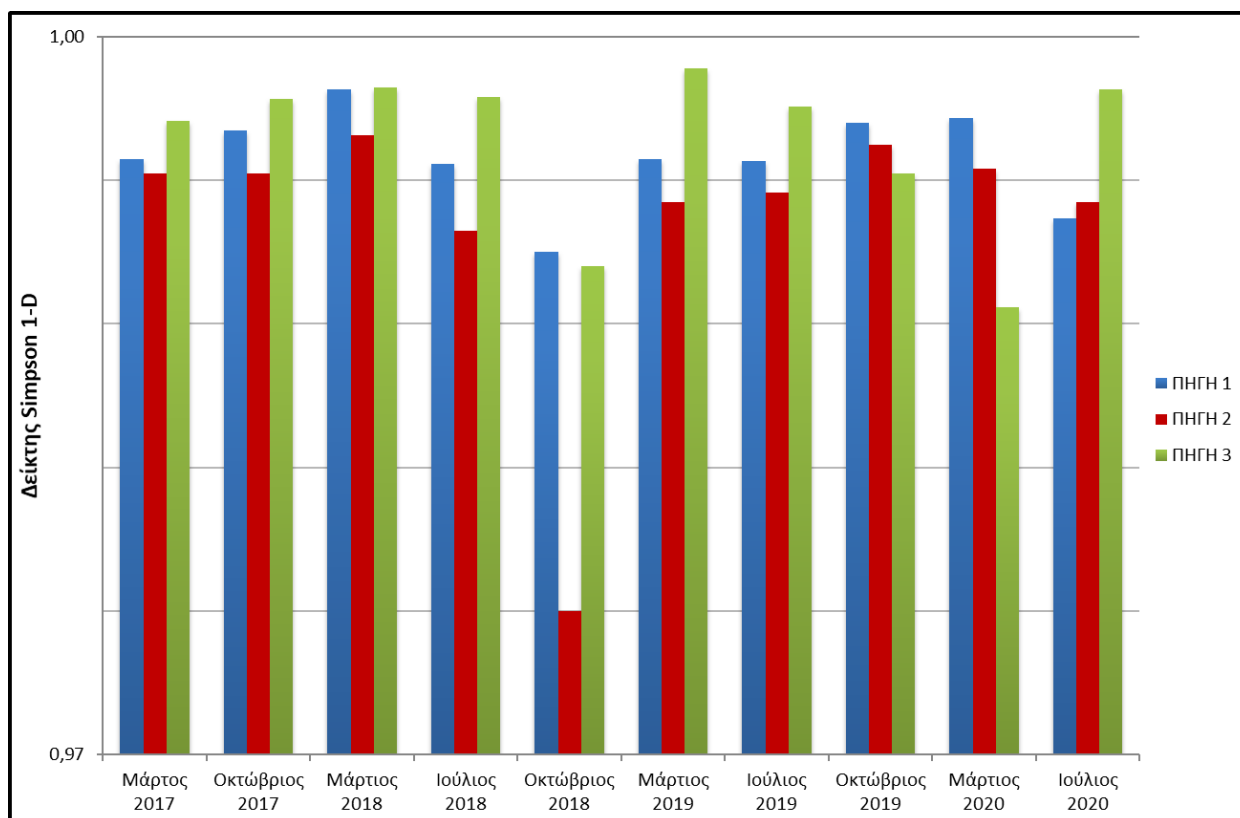
3.1 Δείκτες ποικιλότητας

Ο δείκτης Shannon (H') υπέδειξε υψηλές τιμές ποικιλότητας και στις τρεις πηγές σε όλες τις χρονικές περιόδους δειγματοληψίας καθώς $H' > 2$ (**Διάγραμμα 1**). Συγκριτικά, η μεγαλύτερη ποικιλότητα φαίνεται να επικρατεί στη πηγή 3 ενώ η μικρότερη στην πηγή 2. Μάλιστα, τον Οκτώβριο του 2018 στη πηγή 2 παρουσιάστηκε η μικρότερη τιμή ποικιλότητας (5,9) όλων των υπόλοιπων χρονικών περιόδων και πηγών ενώ τον Μάρτιο 2019 και Οκτώβριο 2017 στη πηγή 3 εμφανίστηκαν οι μεγαλύτερες με τιμές 7,95 και 7,93 αντίστοιχα.



Διάγραμμα 1. Εκτίμηση ποικιλότητας των τριών πηγών με τον δείκτη Shannon (H')

Στη συνέχεια, σύμφωνα με τον δείκτη Simpson (D) (**Διάγραμμα 2**) φαίνεται να υπάρχει ομοιομορφία στη κατανομή των ειδών στις πηγές καθώς οι τιμές πλησιάζουν την μονάδα και δεν πέφτουν κάτω από 0,97. Οι μικρότερες τιμές Simpson παρατηρούνται στη πηγή 2 με την μικρότερη να σημειώνεται τον Οκτώβριο του 2018 ενώ οι μεγαλύτερες στη πηγή 3.

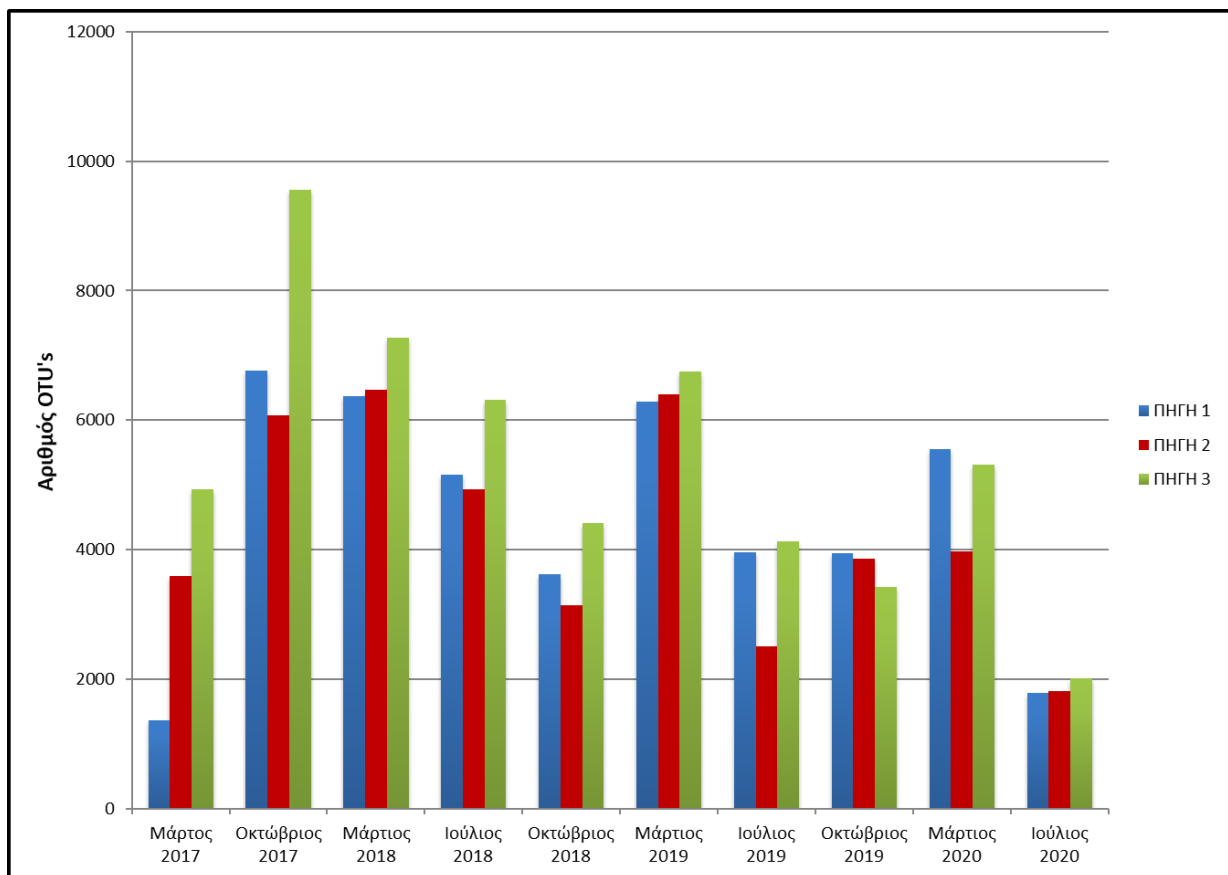


Διάγραμμα 2. Εκτίμηση ομοιομορφίας της κατανομής των γενών στις πηγές με τον δείκτη Simpson (D)

Τέλος, με την διαγραμματική απεικόνιση του αριθμού των παρατηρούμενων OTU's (**Διάγραμμα 3**) φάνηκε ότι δείκτης Chao-1 εκτίμησε με επιτυχία τον αριθμό των αναμενόμενων OTU's καθώς το ποσοστό κάλυψης (coverage) δεν έπεσε κάτω από το 63% (**Πίνακας 2**). Επιπλέον, φανερώνεται ότι η πηγή 3 έχει τον μεγαλύτερο αριθμό παρατηρούμενων OTU's, ενώ η πηγή 2 τον μικρότερο παρόλο που ο μικρότερος αριθμός παρατηρούμενων OTU's εμφανίστηκε στη πηγή 1 τον Μάρτιο 2017. Αισθητές διαφορές ως προς τα παρατηρούμενα OTU's μεταξύ των τριών πηγών παρατηρήθηκαν μόνο τον Οκτώβριο 2017.

Πίνακας 2. Εκτιμώμενα OTU's και ποσοστά κάλυψης των πηγών 1, 2 και 3 με τον δείκτη Chao-1

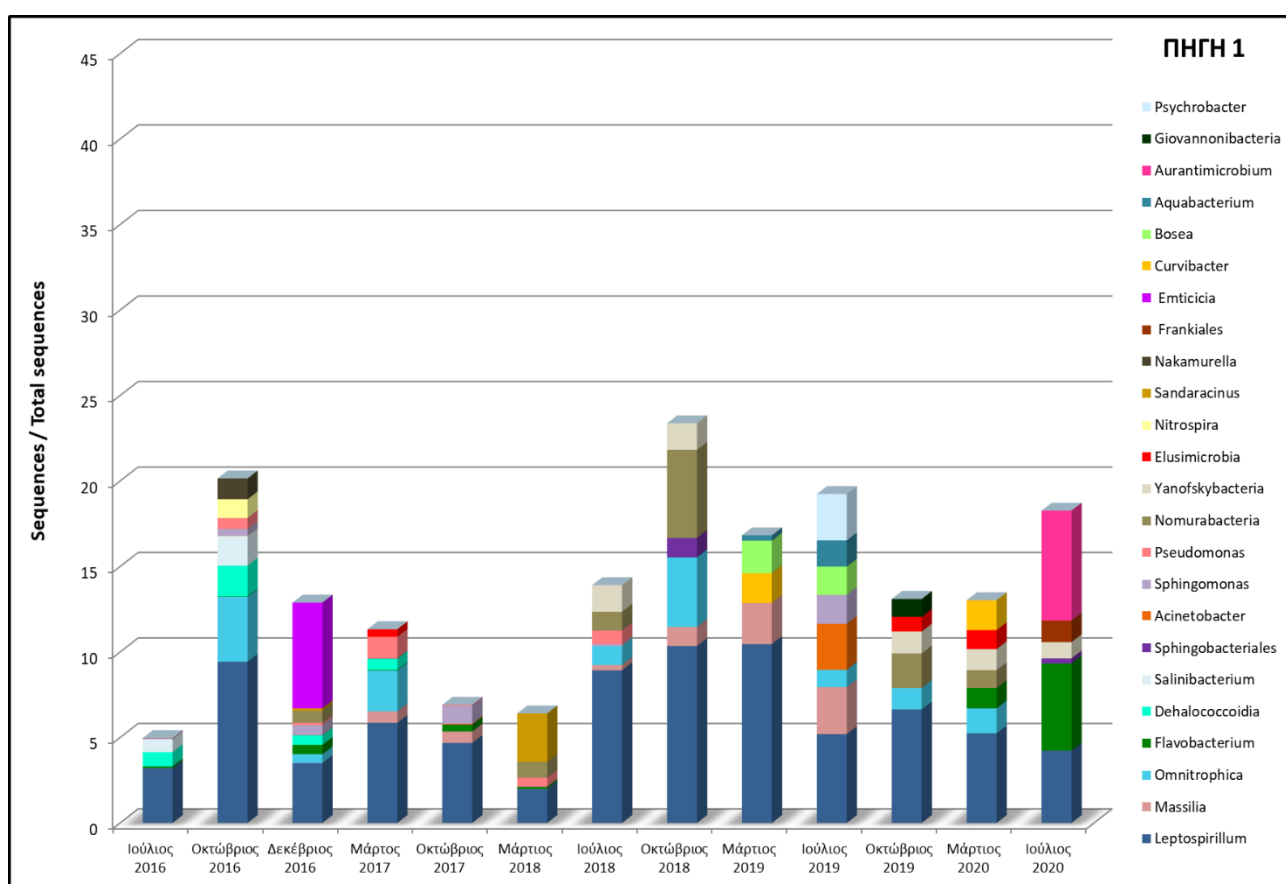
ΠΗΓΗ 1	Chao-1	Coverage	ΠΗΓΗ 2	Chao-1	Coverage	ΠΗΓΗ 3	Chao-1	Coverage
Μάρτος 2017	2190	63%	Μάρτος 2017	4037	89%	Μάρτος 2017	5087	97%
Οκτώβριος 2017	7632	89%	Οκτώβριος 2017	7082	86%	Οκτώβριος 2017	10140	94%
Μάρτιος 2018	7216	88%	Μάρτιος 2018	7441	87%	Μάρτιος 2018	8137	89%
Ιούλιος 2018	5597	92%	Ιούλιος 2018	5435	91%	Ιούλιος 2018	6648	95%
Οκτώβριος 2018	4135	88%	Οκτώβριος 2018	3431	92%	Οκτώβριος 2018	4641	95%
Μάρτιος 2019	6990	90%	Μάρτιος 2019	7183	89%	Μάρτιος 2019	7174	94%
Ιούλιος 2019	4293	92%	Ιούλιος 2019	3047	82%	Ιούλιος 2019	4503	92%
Οκτώβριος 2019	4379	90%	Οκτώβριος 2019	4241	91%	Οκτώβριος 2019	3869	88%
Μάρτιος 2020	6114	91%	Μάρτιος 2020	4812	83%	Μάρτιος 2020	5881	90%
Ιούλιος 2020	1965	91%	Ιούλιος 2020	2005	91%	Ιούλιος 2020	2159	93%



Διάγραμμα 3. Παρατηρούμενα ΟΤΥ's στις πηγές

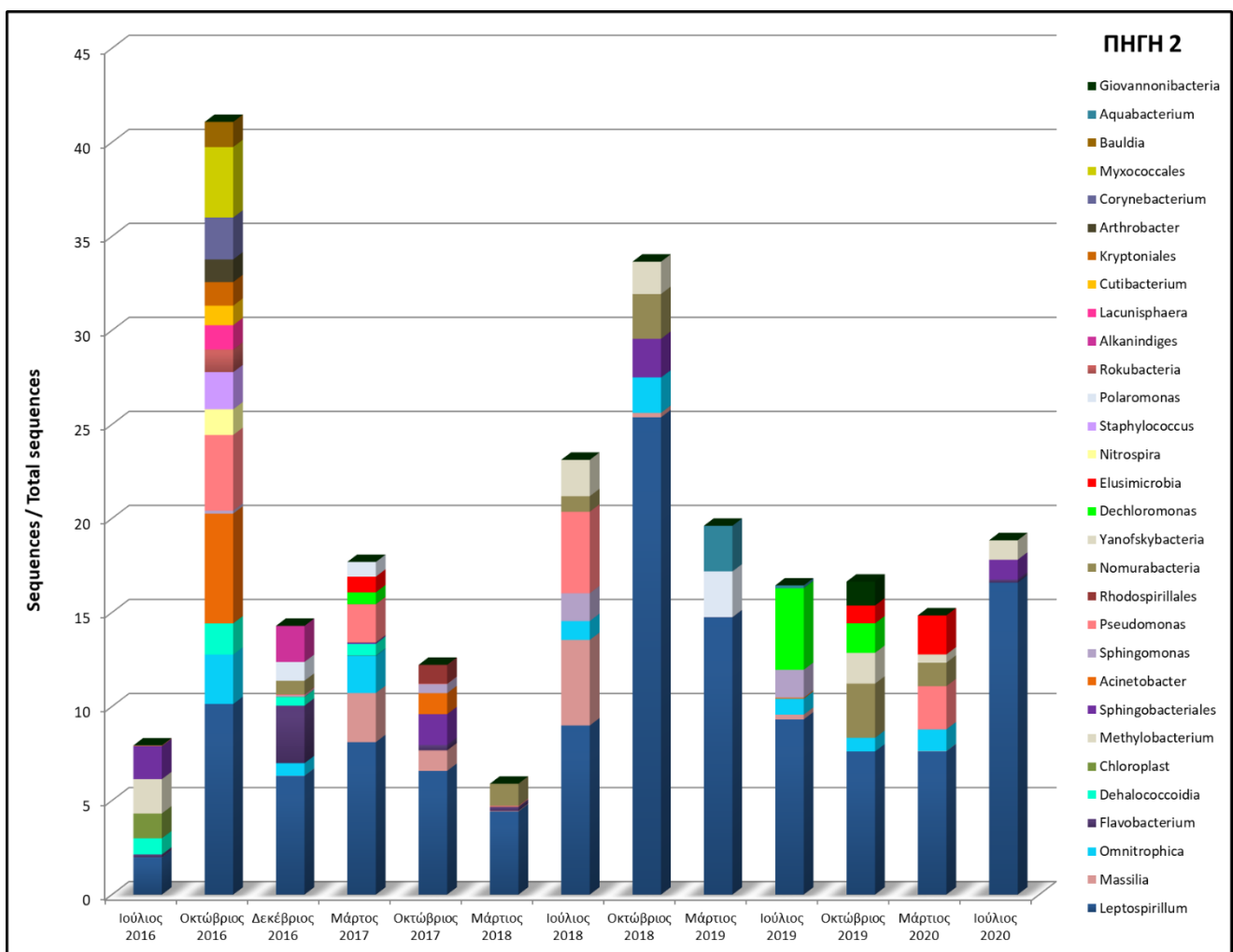
3.2 Άφθονα γένη βακτηρίων

Στη συνέχεια, σύμφωνα με τις σχετικές αφθονίες των γενών των βακτηρίων απεικονίστηκαν μέσω stacked bars τα πιο άφθονα γένη ανάλογα την πηγή στις διάφορες περιόδους δειγματοληψίας. Όσον αφορά την πηγή 1 (**Διάγραμμα 4**) φαίνεται πως αντιπροσωπεύεται από 24 άφθονα γένη με το γένος *Leptospirillum* να είναι παρών και στις 13 δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν. Μάλιστα σε αρκετές χρονικές περιόδους η σχετική του αφθονία ήταν μεγαλύτερη των υπόλοιπων γενών. Τον Οκτώβριο του 2018 το συγκεκριμένο γένος παρουσίασε την υψηλότερη σχετική αφθονία του φτάνοντας το 10%. Επιπρόσθετα, στην πηγή 1 τα πιο άφθονα γένη αποτελούν συσσωρευτικά το 23% του συνολικού πληθυσμού.



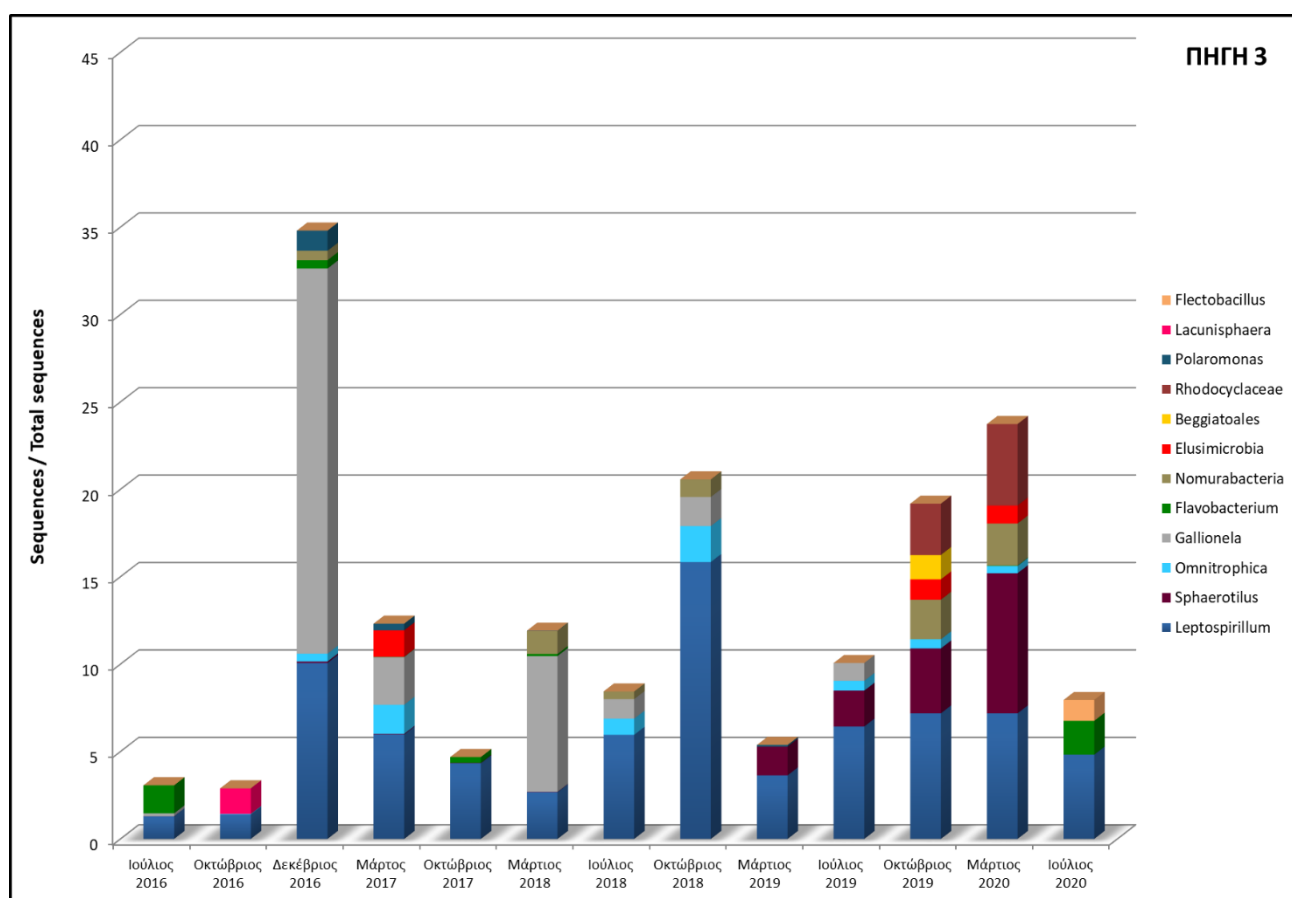
Διάγραμμα 4. Σχετικές αφθονίες των πιο άφθονων βακτηρίων της πηγής 1

Η πηγή 2 αποτελείται από 30 άφθονα γένη βακτηρίων (**Διάγραμμα 5**). Το γένος *Leptospirillum* εμφανίζεται και πάλι σε όλες τις περιόδους δειγματοληψίας και μάλιστα με μεγαλύτερες σχετικές αφθονίες σε σύγκριση με εκείνες της πηγής 1 ενώ, τα υπόλοιπα γένη παρουσιάζουν πολύ μικρότερες σχετικές αφθονίες που δεν ξεπερνούν το 5%. Τον Οκτώβριο του 2018 το γένος *Leptospirillum* εμφανίζει και σε αυτή την πηγή τη μεγαλύτερη σχετική αφθονία από όλες τις υπόλοιπες δειγματοληψίες καταλαμβάνοντας το 25% του πληθυσμού. Συσσωρευτικά η σχετική αφθονία των πιο άφθονων βακτηρίων είναι σαφώς μεγαλύτερη και φτάνει μέχρι το 41% του συνολικού πληθυσμού της πηγής 2. Μάλιστα, τον Οκτώβριο του 2016 εντοπίστηκαν τα μισά από τα συνολικά συλληφθέντα άφθονα γένη βακτηρίων της πηγής, πολλά εκ των οποίων δεν ξανά-εμφανίστηκαν στις επόμενες δειγματοληψίες.



Διάγραμμα 5. Σχετικές αφθονίες των πιο άφθονων βακτηρίων της πηγής 2

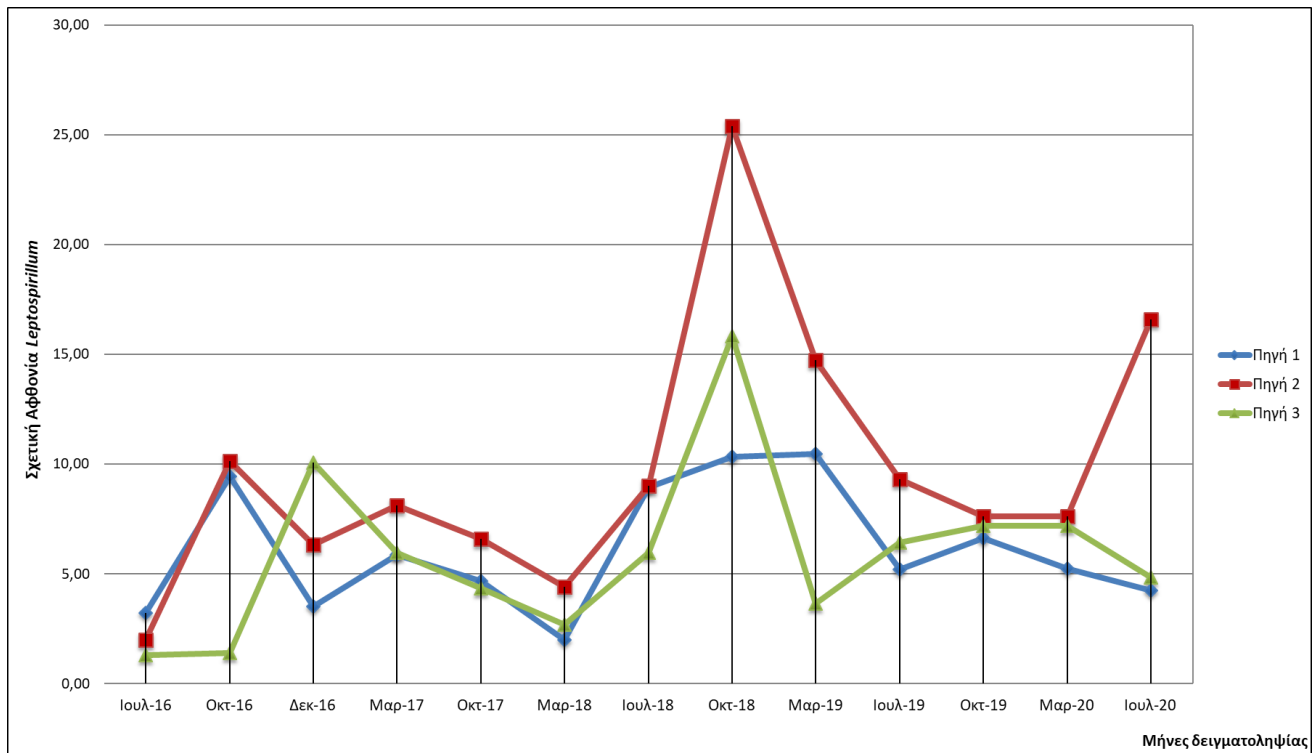
Αναφορικά, στην τρίτη και τελευταία πηγή τα πιο άφθονα γένη βακτηρίων ήταν 12 (λιγότερα από εκείνα της πηγής 1 και της πηγής 2) (**Διάγραμμα 6**). Το γένος *Leptospirillum* εμφανίζεται και σε αυτή την πηγή σε όλες τις δειγματοληψίες με την μέγιστη σχετική αφθονία του να παρατηρείται ξανά τον Οκτώβριο του 2018 φτάνοντας το 15%. Ωστόσο, συσσωρευτικά η μεγαλύτερη σχετική αφθονία παρατηρήθηκε τον Δεκέμβριο του 2016 αντιπροσωπεύοντας το 34% του συνολικού πληθυσμού της πηγής. Από την ίδια χρονική στιγμή και μετά εμφανίστηκε και το γένος *Gallionella* στις μισές σχεδόν από τις δειγματοληψίες με υψηλή σχετική αφθονία που έφτασε ως και το 22% του συνόλου. Ένα ακόμα άφθονο βακτηριακό γένος που εμφανίστηκε μόνο στη συγκεκριμένη πηγή είναι το γένος *Sphaerotilus* του οποίου η σχετική αφθονία σχεδόν πενταπλασιάστηκε από τον Μάρτιο 2019 μέχρι τον Μάρτιο του 2020



Διάγραμμα 6. Σχετικές αφθονίες των πιο άφθονων βακτηρίων της πηγής 3

Τα γένη- φύλα βακτηρίων που εμφανίστηκαν σε αφθονία (>1%) και είναι κοινά στις 3 πηγές ήταν τα *Leptospirillum*, *Omnitrphica*, *Flavobacterium* και *Nomurabacteria*, όμως το *Leptospirillum* εμφανίστηκε σε όλες τις περιόδους δειγματοληψιών.

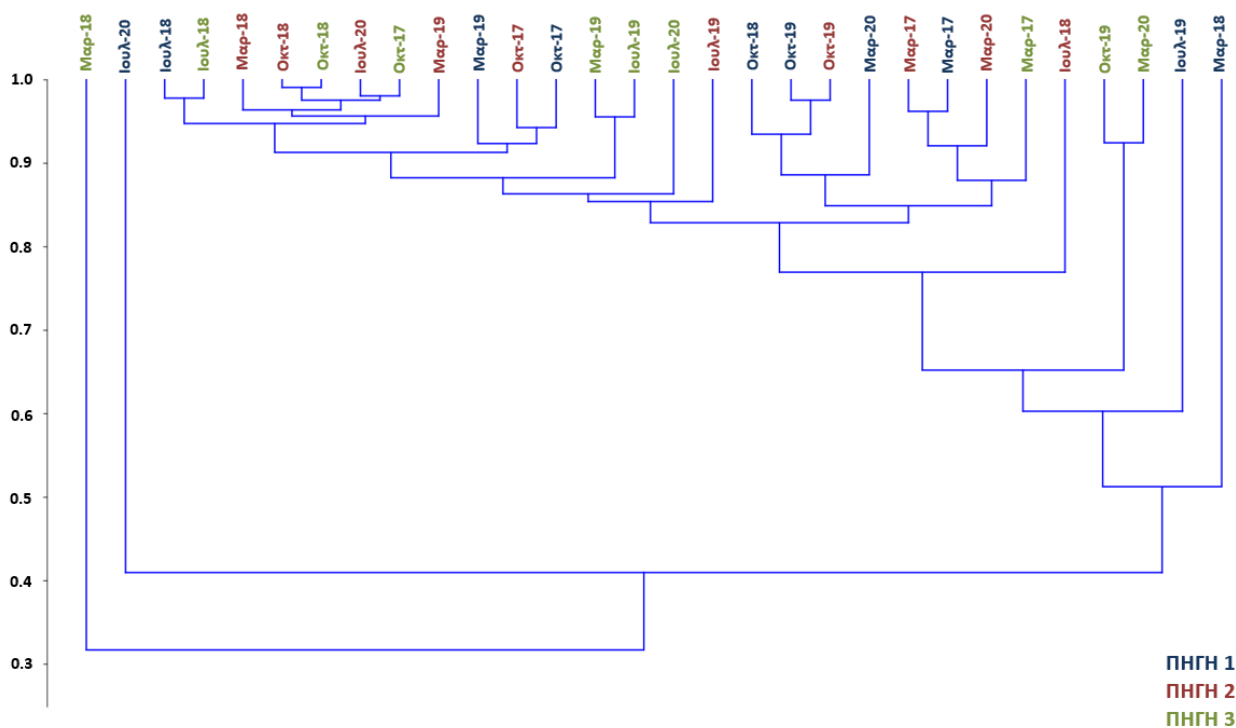
Στη συνέχεια, θεωρήθηκε σκόπιμο να απεικονιστεί η πορεία του γένους *Leptospirillum* στις περιόδους δειγματοληψίας των τριών πηγών (**Διάγραμμα 7**) καθώς, ήταν το μοναδικό άφθονο βακτήριο που εμφανίστηκε σε όλα τα έτη δειγματοληψίας ανεξαρτήτου εποχής και στις τρεις από τις πηγές. Σύμφωνα με το διάγραμμα γίνεται αντιληπτό ότι οι υψηλότερες σχετικές αφθονίες του γένους (με ελάχιστες εξαιρέσεις) συναντώνται στην πηγή 2 ενώ, οι χαμηλότερες στη πηγή 1. Επιπλέον, ένα κοινό χαρακτηριστικό των τριών πηγών σε σχέση με την κατανομή του *Leptospirillum* είναι ότι τον Οκτώβριο του 2018 παρουσιάζονται οι υψηλότερες σχετικές αφθονίες του.



Διάγραμμα 7. Κατανομή του γένους *Leptospirillum* σύμφωνα με την σχετική αφθονία του στις τρεις πηγές

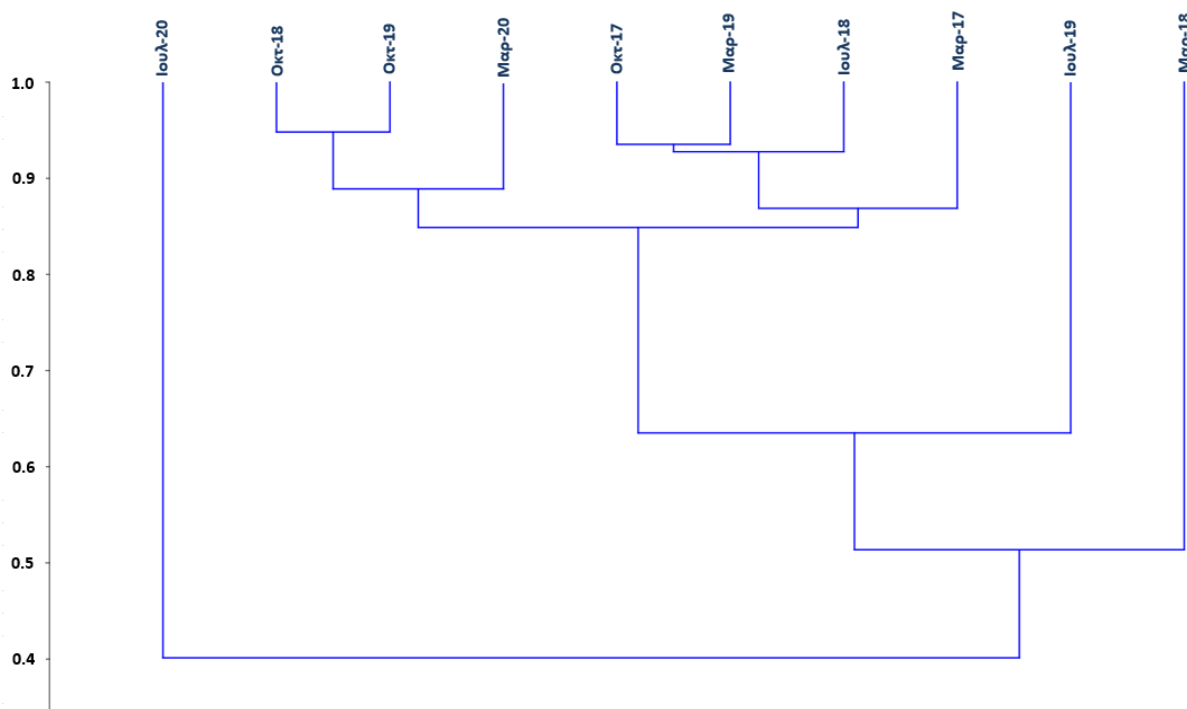
3.3 Μη παραμετρικές μέθοδοι

Παρακάτω, προκειμένου να συγκριθούν οι τρεις πηγές μεταξύ τους ως προς την ομοιότητα και την κατανομή της βακτηριακής ποικιλότητας κατασκευάστηκε ένα δενδρόγραμμα με ομοιότητα κατά Morisita το οποίο περιλαμβάνει τις σχετικές αφθονίες των πιο άφθονων βακτηρίων σε όλες τις περιόδους δειγματοληψίας εκτός του 2016 (**Διάγραμμα 8**). Ιδιαίτερα αισθητές ομοιότητες παρουσιάστηκαν τον Οκτώβριο 2018 μεταξύ των πηγών 2 και 3 όπως επίσης και τον Ιούλιο 2018 μεταξύ των πηγών 1 και 2 με ομοιότητες μεγαλύτερες από 97%. Επίσης, μεγάλες διαφορές στη βακτηριακή ποικιλότητα παρατηρήθηκαν τον Μάρτιο 2018 στη πηγή 1 και 3 και τον Ιούλιο 2020 στη πηγή 1 σε σχέση με τις υπόλοιπες δειγματοληψίες οι οποίες είχαν πάνω από 50% ομοιότητα μεταξύ τους.



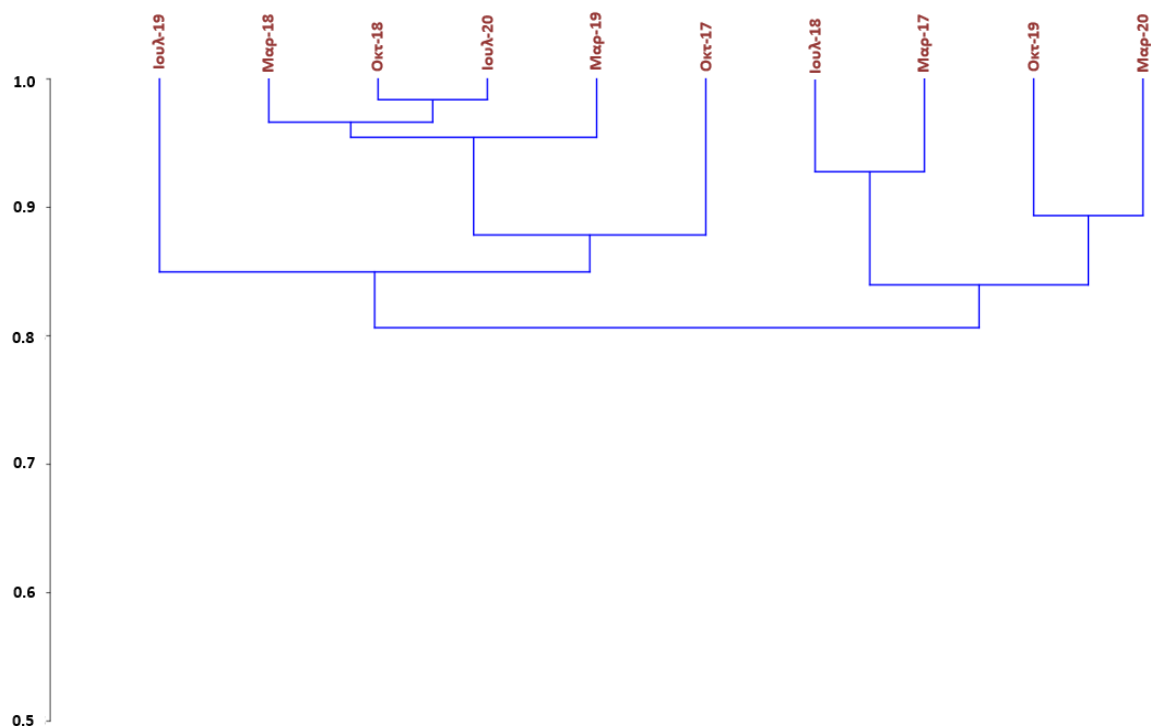
Διάγραμμα 8. Σύγκριση των δειγματοληψιών των τριών πηγών με βάση τις σχετικές αφθονίες των βακτηρίων με τον δείκτη Morisita

Αντιστοίχως, δημιουργήθηκαν ακόμα τρία δενδρογράμματα με ομοιότητα κατά Morisita για κάθε μια από τις πηγές ώστε να προκύψουν οι διαφορές και οι ομοιότητες μεταξύ των δειγματοληψιών σε κάθε πηγή ξεχωριστά. Υψηλά ποσοστά ομοιότητας (μεγαλύτερα από 95%) παρουσιάζονται στη πηγή 1 (**Διάγραμμα 9**) μεταξύ των δειγματοληψιών του Οκτωβρίου 2018 – Οκτωβρίου 2019 και Οκτωβρίου 2017 – Μαρτίου 2019 ενώ, οι μήνες Ιούλιος 2020 και Μάρτιος 2018 φαίνεται να αποτελούν τους πιο ανόμοιους αναλογιζόμενοι τις σχετικές αφθονίες και την βακτηριακή ποικιλότητα της πηγής.



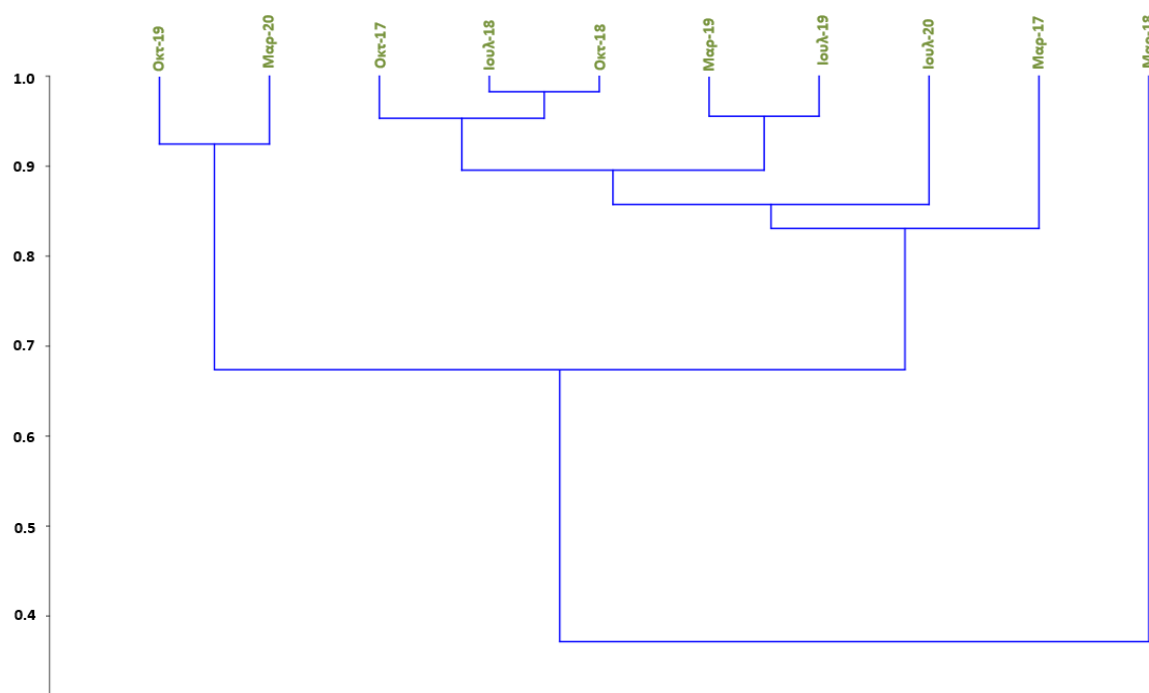
Διάγραμμα 9. Σύγκριση των δειγματοληψιών της πηγής 1 με βάση τις σχετικές αφθονίες των βακτηρίων με τον δείκτη Morisita

Στη πηγή 2 πάραυτα, υποδεικνύεται υψηλή συσχέτιση μεταξύ των δειγματοληψιών Οκτωβρίου 2018 – Ιουλίου 2020 αλλά και του Μαρτίου 2018 με τις προηγούμενες δύο σε αντίθεση με την δειγματοληψία του Ιουλίου 2019 η οποία αποτελεί την πιο ανόμοια στη συγκεκριμένη πηγή (**Διάγραμμα 10**). Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι οι συσχετίσεις μεταξύ των δειγματοληψιών της πηγής 2 είναι γενικότερα πολύ υψηλές καθώς τα ποσοστά ομοιότητας δεν πέφτουν κάτω από το 80%.



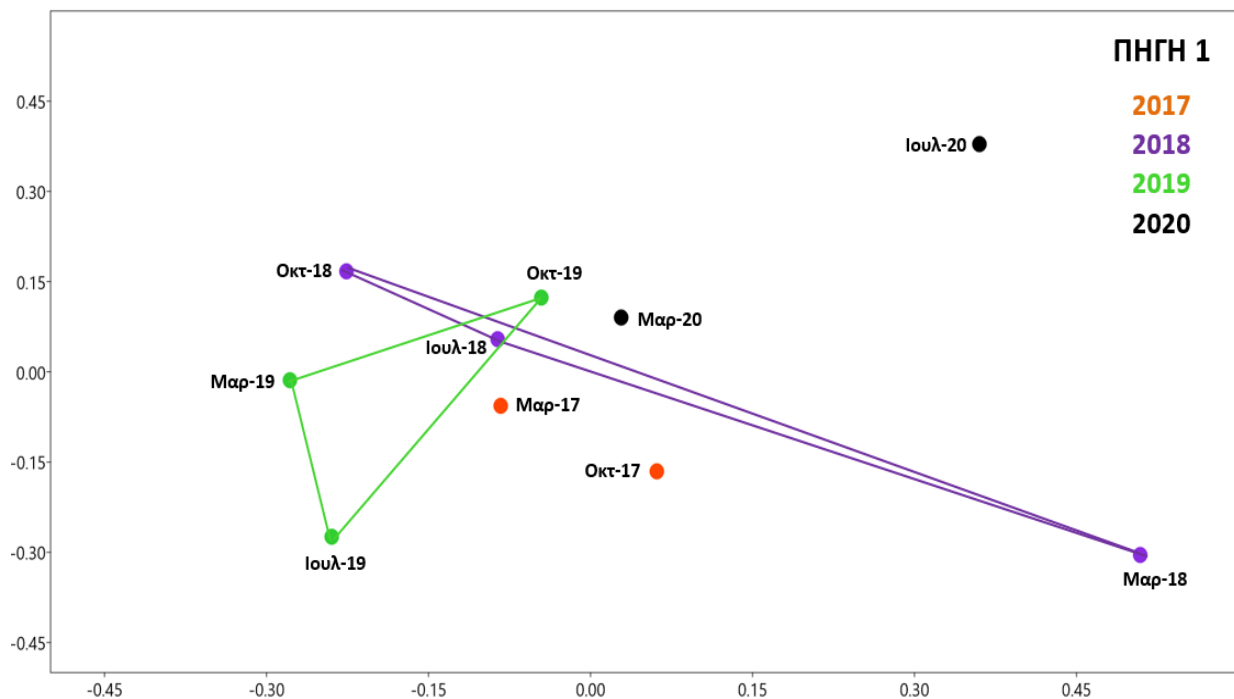
Διάγραμμα 10. Σύγκριση των δειγματοληψιών της πηγής 2 με βάση τις σχετικές αφθονίες των βακτηρίων με τον δείκτη Morisita

Τέλος, στη πηγή 3 οι δειγματοληψίες με τις πιο ισχυρές συσχετίσεις ήταν εκείνες του Ιουλίου 2018 – Οκτωβρίου 2018 και του Μαρτίου 2019 – Ιουλίου 2019. Ωστόσο, ο Μάρτιος 2018 είναι ιδιαίτερα διαφοροποιημένος (όπως και στη πηγή 1) από τις υπόλοιπες δειγματοληψίες καθώς η ομοιότητα του δεν ξεπερνάει το 0.4%



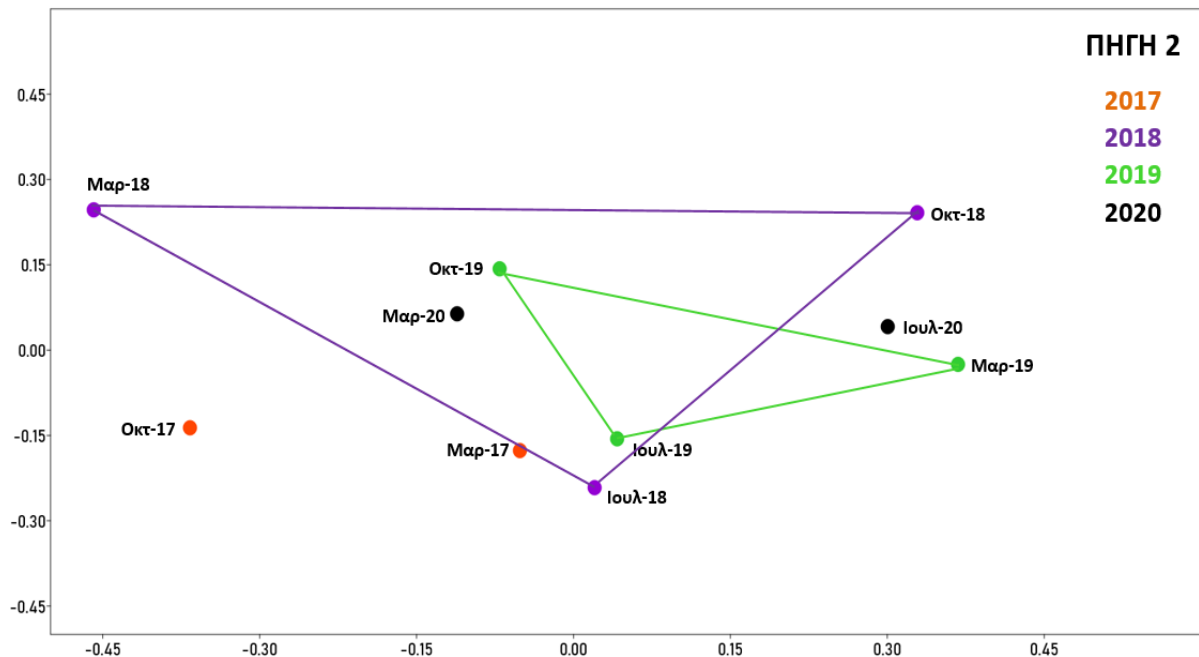
Διάγραμμα 11. Σύγκριση των δειγματοληψιών της πηγής 3 με βάση τις σχετικές αφθονίες των βακτηρίων με τον δείκτη Morisita

Ύστερα, θέλοντας να πραγματοποιηθεί συσχέτιση στη διαχρονική μεταβλητότητα της βακτηριακής ποικιλότητας των τριών πηγών σχεδιάστηκαν τρία μη παραμετρικά διαγράμματα πολυδιάστατης κλίμακας (NMDS) με τον δείκτη ομοιότητας Bray-Curtis. Στα συγκεκριμένα διαγράμματα θα επισημανθούν οι διαφορές και οι ομοιότητες των ετών των δειγματοληψιών σε κάθε μια από τις πηγές. Στη πηγή 1 (**Διάγραμμα 12**) τα έτη με τις μεγαλύτερες ομοιότητες είναι το 2018 και το 2019 τα οποία μάλιστα φαίνεται να παρουσιάζουν αξιοσημείωτη διαχρονική μεταβλητότητα. Βέβαια, εξαίρεση αποτελεί ο Μάρτιος 2018, καθώς είναι αρκετά διαφοροποιημένος σε σχέση με τα υπόλοιπα έτη και μήνες όπως ακριβώς προέκυψε και με τον δείκτη ομοιότητας κατά Morisita για την πηγή 1.



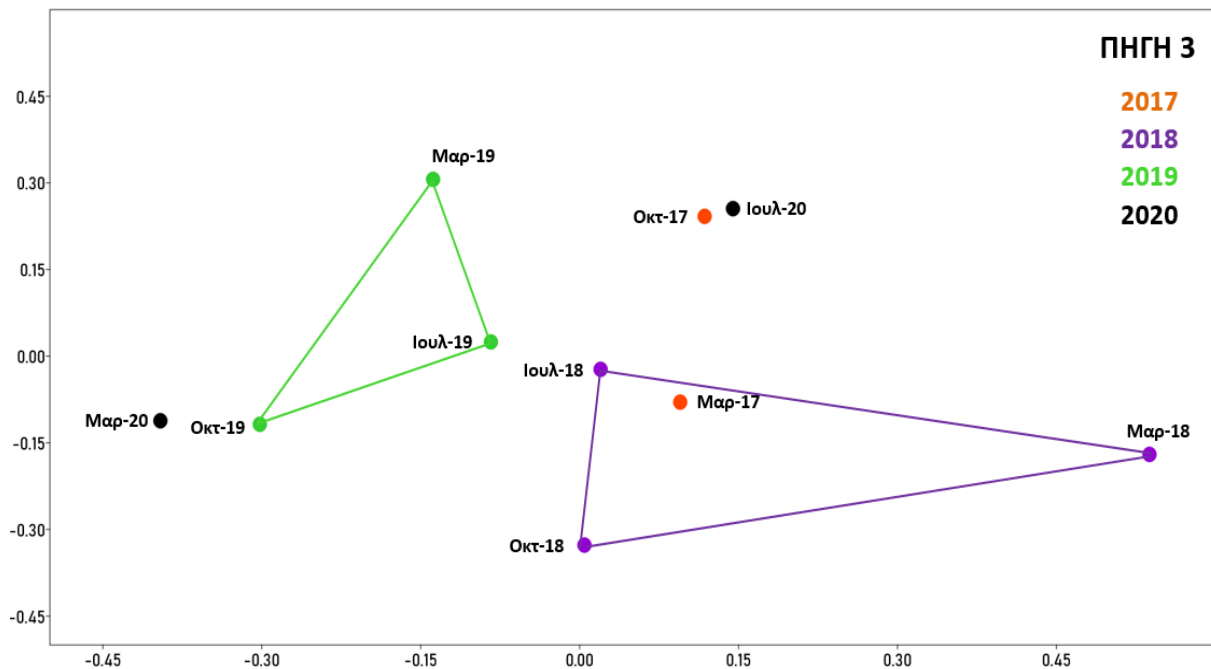
Διάγραμμα 12. Μη παραμετρικό διάγραμμα πολυδιάστατης κλίμακας (NMDS) κατά Bray-Curtis με τα έτη των δειγματοληψιών της πηγής 1

Στη πηγή 2 (**Διάγραμμα 13**) απεικονίζεται ακόμα μεγαλύτερη διαχρονική διαφοροποίηση του έτους 2018. Ωστόσο, οι ομοιότητες μεταξύ των ετών είναι μεγαλύτερες (με εξαίρεση τον Μάρτιο 2018) σε σχέση με εκείνες της πηγής 1 και αφορούν σχεδόν όλα τα έτη και μήνες δειγματοληψίας. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα ταιριάζει επίσης με εκείνο του δενδρογράμματος με ομοιότητα κατά Morisita της πηγής 2.



Διάγραμμα 13. Μη παραμετρικό διάγραμμα πολυδιάστατης κλίμακας (NMDS) κατά Bray-Curtis με τα έτη των δειγματοληψιών της πηγής 2

Στην τρίτη και τελευταία πηγή (**Διάγραμμα 14**) γίνεται αντιληπτό ότι το 2018 εξακολουθεί να αποτελεί το πιο διαχρονικά μεταβαλλόμενο και διαφοροποιημένο έτος ενώ, παράλληλα παρουσιάζει και μερικές ομοιότητες με το έτος 2017. Συμπληρωματικά, διαφοροποιημένο έτος συνίσταται και το 2019 δεν είναι όμως τόσο διαχρονικά διαφοροποιημένο όσο είναι το 2018. Γενικά και στη πηγή 3 φαίνεται πως η δειγματοληψία του Μαρτίου 2018 είναι η πιο ανόμοια ως προς την βακτηριακή ποικιλότητα ανά τα έτη αλλά και μεταξύ των δειγματοληψιών της ίδιας χρονιάς.



Διάγραμμα 14. Μη παραμετρικό διάγραμμα πολυδιάστατης κλίμακας (NMDS) κατά Bray-Curtis με τα έτη των δειγματοληψιών της πηγής 3

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι δειγματοληψίες του έτους 2016 αφαιρέθηκαν από τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης (αλλά όχι της ποιοτικής) λόγω της διαφορετικής μεθόδου αλληλούχησης που είχε χρησιμοποιηθεί, η οποία ήταν η 454 pyrosequencing αντί της μεθόδου τεχνολογίας Illumina που εφαρμόστηκε σε όλα τα υπόλοιπα έτη.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα ο δείκτης ποικιλότητας Shannon-Weaner (H') παρουσίασε υψηλές τιμές και στις τρεις πηγές, όπου υψηλός δείκτης (H') συνεπάγεται μεγάλη ποικιλότητα. Γενικά η ποικιλότητα ορίζεται ως «το σύνολο της γενετικά καθορισμένης ποικιλομορφίας, από τα γονίδια ενός τοπικού πληθυσμού ή είδους, τα είδη που αποτελούν μια κοινότητα, ως τις κοινότητες που αποτελούν τα διάφορα πλανητικά οικοσυστήματα». Μάλιστα, οι υψηλότερες τιμές εμφανίστηκαν στη πηγή 3 ενώ οι μικρότερες στη πηγή 2. Η μελέτη του δείκτη Simpson (D) από την άλλη χάρις τις εξίσου υψηλές τιμές του στις τρεις πηγές, αποκάλυψε πως οι βακτηριακές κοινότητες των πηγών εκφράζονται από υψηλή ποικιλότητα όπως ακριβώς φάνηκε και από τον δείκτη Shannon-Weaner (H') όπως επίσης έγινε αντιληπτό το γεγονός ότι είναι και αρκετά ισοκατανεμημένες. Η ισοκατανομή εκφράζει τον αριθμό των ατόμων ανά OTU οπότε σε μια εξαιρετικά ισοκατανεμημένη κοινότητα παρατηρούνται πολλά OTU με λίγα άτομα όπως και στη περίπτωση της υπάρχουσας μελέτης όπου παρατηρήθηκαν λίγα άφθονα OTU's και πολλά σπάνια. Η συγκεκριμένη συλλογή σπάνιων OTU's έχει χαρακτηριστεί ως «σπάνια βιόσφαιρα» (Sogin et al., 2006) όπου μάλιστα σε αρκετές περιπτώσεις μπορεί να βρίσκεται σε διαδικασία διασποράς μεταξύ των γειτονικών ενδιαιτημάτων και να γίνει κυρίαρχη (Fuhrman et al., 2009). Ο παραπάνω χαρακτηρισμός είναι αρκετά συνήθης για τους προκαρυώτες ιδίως για εκείνους των γλυκών νερών διότι τείνουν να εμφανίζουν περισσότερα OTU's σε τέτοια περιβάλλοντα απ' ό,τι σε θαλάσσιες και ωκεάνιες υδάτινες στήλες (Lozupone and Knight, 2007) λόγω του ότι τα πρώτα ενδιαιτήματα επηρεάζονται από τους εδαφόβιους μικροοργανισμούς που δέχονται μέσω των χερσαίων απορροών. Ωστόσο, ο οικολογικός ρόλος που διαδραματίζουν αυτά τα σπάνια είδη στις διεργασίες των υπόγειων υδάτων μπορεί να είναι ασαφής αλλά, η φαινομενικά χαμηλή τους αφθονία δεν συνεπάγεται με αμελητέο ρόλο τους στη λειτουργία του οικοσυστήματος (Shade et al., 2018). Επιπλέον, συνυπολογίζοντας το αποτέλεσμα του **Διαγράμματος 3** πράγματι επαληθεύονται όσα ειπώθηκαν σχετικά με την κατάσταση της βακτηριακής ποικιλότητας των πηγών καθώς, ο μεγαλύτερος αριθμός OTU's παρατηρήθηκε στη πηγή 3 με τον Οκτώβριο 2017 να ξεπερνάει κατά πολύ σε αριθμό όλες τις υπόλοιπες περιόδους δειγματοληψίας, ενώ συνολικά ο μικρότερος αριθμός OTU's σημειώθηκε στη πηγή 2. Ωστόσο, απ' όλες τις δειγματοληψίες σε εκείνη που σημειώθηκε ο μικρότερος αριθμός παρατηρούμενων OTU's ήταν τον Μάρτιο 2017 στη πηγή 1. Ο τελευταίος δείκτης ποικιλότητας που χρησιμοποιήθηκε, ο Chao-1, υπολόγισε με επιτυχία τον εκτιμώμενο αριθμό OTU's για την πλειονότητα των δειγματοληψιών με το ποσοστό κάλυψης να παρουσιάζει υψηλά ποσοστά. Μια από τις δειγματοληψίες που αδυνάτισε να εκτιμήσει με ακρίβεια ήταν του Μαρτίου 2017 στη πηγή 1 πιθανώς λόγω του πολύ μικρού αριθμού παρατηρούμενων OTU's εκείνης της περιόδου σε σχέση με τον αριθμό των υπόλοιπων δειγματοληψιών. Στη παρούσα μελέτη η υψηλή ποικιλότητα της πηγής 3 σε σχέση με τις υπόλοιπες δύο μπορεί να οφείλεται στο ότι πιθανώς να βρίσκεται σε περιοχή με έντονα φαινόμενα χιονόπτωσης και λόγω της επιφανειακής απορροής να μεταφέρονται οι μικροοργανισμοί ιδιαίτερα του υπεδάφους στα υπόγεια ύδατα. Κάτι παρόμοιο βρέθηκε και σε μια έρευνα όπου μάλιστα τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της πηγής όπως το pH, η αγωγιμότητα και η θολότητα

παρέμειναν αμετάβλητα πριν, κατά τη διάρκεια και μετά το συμβάν της επιφανειακής απορροής. Βέβαια, η μικροβιακή διείσδυση μέσω της επιφανειακής απορροής φάνηκε να είναι η πιο πιθανή εξήγηση για τις διαφορές που εντοπίστηκαν στις μικροβιακές κοινότητες της πηγής για έναν συγκεκριμένο μήνα δειγματοληψίας της παραπάνω έρευνας (Knobloch et al., 2021).

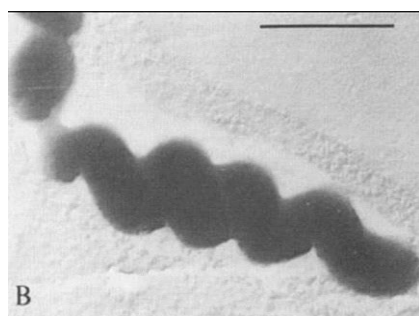
Στη συνέχεια, χάρις την ταυτοποίηση των προκαρυωτικών μικροοργανισμών και φτάνοντας για τους περισσότερους σε επίπεδο γένους, η διαγραμματική απεικόνιση των πιο άφθονων βακτηρίων (δηλαδή εκείνων που εμφάνισαν σχετική αφθονία πάνω από 1% έστω σε μια δειγματοληψία) για κάθε πηγή αλλά και κάθε περίοδο δειγματοληψίας, μας επέτρεψε να αντιληφθούμε ποιοι είναι εκείνοι οι μικροοργανισμοί που πιθανώς να κυριαρχούν στις υπό μελέτη πηγές. Γενικά η λειτουργική ομάδα μικροοργανισμών που θα κυριαρχήσει ως προς την μικροβιακή δραστηριότητα είναι εκείνη που μπορεί να χρησιμοποιήσει τον πιο ενεργειακά ευνοϊκό δέκτη ηλεκτρονίων από όσους δέκτες είναι διαθέσιμοι (Chapelle et al., 1995). Αρχικά, αποκαλύφθηκε ότι στη πηγή 1 υπήρξαν 24 άφθονα γένη βακτηρίων εκ' των οποίων το γένος *Leptospirillum* δεν απουσίασε σε καμία δειγματοληψία. Σε σύγκριση μάλιστα με όλα τα υπόλοιπα γένη, το *Leptospirillum* είχε σε αρκετές από τις δειγματοληψίες, υψηλά ποσοστά σχετικής αφθονίας με τα *Omnitrophica* και *Nomurabacteria* να ακολουθούν και να εμφανίζονται επίσης σε αρκετές δειγματοληψίες. Ακολούθως, στη πηγή 2 γίνεται εμφανές ότι η συγκεκριμένη πηγή αποτελείται από πολλά περισσότερα άφθονα βακτηριακά γένη που μάλιστα η σχετική τους αφθονία έφτασε να καταλαμβάνει το 41% του συνολικού πληθυσμού της πηγής. Επιπλέον, κάποια από τα γένη που βρέθηκαν σε αυτή την πηγή δεν εμφανίστηκαν σε αφθονία σε καμία από τις υπόλοιπες δύο. Το γένος το οποίο ξεχώρισε με την συχνότητα εμφάνισης και την αφθονία του ήταν και σε αυτή την πηγή το *Leptospirillum* το οποίο είχε πολύ υψηλότερη σχετική αφθονία από εκείνη της πηγής 1 και 3 και ιδιαίτερα τον Οκτώβριο 2018 που σημαίνει ότι ευνοήθηκε περισσότερο στη συγκεκριμένη πηγή σε σχέση με την σχετική αφθονία που παρουσίασε στις υπόλοιπες δύο. Αυτό μπορεί να οφείλεται στον μειωμένο ανταγωνισμό μιας και η ποικιλότητα σε αυτή την πηγή είναι συγκριτικά μικρότερη. Γενικά στη συγκεκριμένη περίοδο δειγματοληψίας φαίνεται πως το αναφερόμενο γένος παρουσιάζει υψηλά ποσοστά σχετικής αφθονίας και στις τρεις πηγές. Μια ακόμη παρατήρηση που αφορά την πηγή 2 είναι ότι φαίνεται να αποτελεί έναν συνδυασμό της πηγής 1 και της πηγής 3 αναφορικά με την σύνθεση της βακτηριακής της ποικιλότητας καθώς, αρκετά γένη εμφανίστηκαν μόνο στις πηγές 1 και 2 και κάποια άλλα στις πηγές 2 και 3. Βέβαια, οι πηγές 1 και 3 μοιράζονται εξίσου κάποια όμοια βακτηριακά γένη. Η τρίτη και τελευταία πηγή αποτελείται από λιγότερα άφθονα βακτηριακά γένη με τα περισσότερα όμως να εμφανίζουν υψηλές σχετικές αφθονίες. Τα βακτηριακά γένη που γίνονται περισσότερο αντιληπτά σε αυτή την πηγή είναι το *Leptospirillum*, το *Gallionella* και το *Sphaerotilus*. Αυτή η πηγή φαίνεται να κυριαρχείται από βακτήρια με ικανότητα οξειδωσης του σιδήρου αποθέτοντας τον πιθανώς σε επιφάνειες αγωγών και σχηματίζοντας τελικά τα λεγόμενα βιοϋμένια (Shukla et al., 2021). Στα βιοϋμένια συγκεκριμένα μπορούν να αναπτυχθούν και να προστατευθούν διάφοροι μικροοργανισμοί (Zhang et al., 2009), καθώς επίσης να παγιδευτούν θρεπτικά συστατικά (Chandy and Angles et al, 2001) παρέχοντας έτσι πρόσφορο έδαφος για την ανάπτυξη σταθερών κοινοτήτων (Stanish et al., 2016). Μάλιστα, τα ώριμα βιοϋμένια τείνουν να έχουν μεγαλύτερο πλούτο των ειδών (Martiny et al., 2003). Σύμφωνα λοιπόν

με το **Διάγραμμα 6** το γένος *Gallionella* αυξήθηκε απότομα τον Δεκέμβριο 2016 και παρέμεινε σε υψηλή σχετική αφθονία μέχρι τον Οκτώβριο 2018, αλλά από τον Μάρτιο 2019 μέχρι τον Μάρτιο 2020 φαίνεται πως αντικαταστάθηκε από ένα άλλο σιδηροοξειδωτικό γένος το *Sphaerotilus* του οποίου η σχετική αφθονία παρουσιάστηκε χαμηλή, όμως με την πάροδο του χρόνου αυξήθηκε εκθετικά. Λόγω του ότι και το γένος *Leptospirillum* αποτελεί σιδηροοξειδωτικό βακτήριο θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι λειτουργεί συνεργατικά με τα υπόλοιπα δύο εφόσον συνυπάρχει με αυτά, με σκοπό την σύνθεση της τροφής του, σε αντίθεση με το *Gallionella* και το *Sphaerotilus* τα οποία φαίνεται να λειτουργούν ανταγωνιστικά. Οι μικροοργανισμοί *Gallionella* και *Sphaerotilus* ανήκουν στα ουδετερόφιλα αερόβια σιδηροοξειδωτικά βακτήρια τα οποία είναι κοινά σε περιβάλλοντα γλυκού νερού όμως, η διαφορά τους έγκειται στο γεγονός ότι το γένος *Sphaerotilus* ενώ συμμετέχει σε σιδηροοξειδωτικές διεργασίες δεν φαίνεται να αποθηκεύει ενέργεια από αυτές τις αντιδράσεις (Brock 2018). Ειδικότερα, η συνθήκη των περιορισμένων πόρων σε ολιγότροφα περιβάλλοντα όπως οι υπόγειοι υδροφορείς, μπορεί να οδηγήσει σε ανταγωνισμό μεταξύ των μικροοργανισμών για τα θρεπτικά συστατικά, καταλήγοντας τελικά σε μεγαλύτερη ποικιλομορφία (Interlandi and Kilham, 2001). Όσον αφορά τους παράγοντες που μπορούν να καθορίσουν τη βακτηριακή ποικιλότητα στα υπόγεια ύδατα, όπως προαναφέρθηκε δεν έχουν αποσαφηνιστεί και χρήζουν περαιτέρω έρευνας όμως, από την επιστήμη της μικροβιακής οικολογίας μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι αν μια υπόγεια πηγή παρουσιάσει μεγαλύτερη μικροβιακή ποικιλότητα από κάποια άλλη τότε οι εκάστοτε συνθήκες πιθανώς θα είναι περισσότερο μεταβαλλόμενες καθώς επίσης θα υπάρχει μεγαλύτερη χωρική ή και χημική πολυπλοκότητα με μεγαλύτερο αριθμό μικροπεριβαλλόντων (Tecon and Or, 2017). Ωστόσο, επειδή οι συνθήκες στις υπόγειες πηγές τείνουν να είναι ιδιαίτερα σταθερές και δεν έχει αποσαφηνιστεί αν επηρεάζονται τελικά από τις εποχιακές διακυμάνσεις ή όχι καθώς υπάρχουν ενδείξεις πως ισχύουν και οι δυο εκδοχές δεν μπορεί να γίνει εύκολα αντιληπτό ποιοι από αυτούς τους παράγοντες συντέλεσαν περισσότερο ή λιγότερο στη μικροβιακή σύνθεση των υπό μελέτη πηγών. Συμπληρωματικά, τα υλικά που είναι κατασκευασμένοι οι σωλήνες όπου αντλείται το νερό μπορούν επίσης να επηρεάσουν τη δομή της μικροβιακής κοινότητας τόσο στα ίδια τα βιοϋμένια που μπορεί να έχουν σχηματιστεί, όσο και στο αντλούμενο νερό (Yu et al., 2010) καθώς έχει βρεθεί ότι ο σχηματισμός βιοϋμενίων ήταν πιο αργός στους χάλκινους σωλήνες από ότι στους σωλήνες πολυαιθυλενίου και ότι τα ιόντα χαλκού οδήγησαν σε χαμηλότερο αριθμό μικροβίων στο νερό (Lehtola et al., 2004). Τέλος, οι (Hubalek et al., 2016) διαπίστωσαν πως υπάρχουν διαφορές μεταξύ των ρηχών και βαθιών υδροφόρων οριζόντων όπως επίσης και η κάθε στιβάδα του υδροφόρου ορίζοντα, μπορεί να ανταποκρίνεται διαφορετικά σε αλλαγές στις υδρολογικές συνθήκες (Smith and Johnson, 2018). Πιο συγκεκριμένα οι ρηχοί υδροφόροι ορίζοντες παρουσίασαν μεγαλύτερη διακύμανση στην ποικιλότητά τους (Hubalek et al., 2016), υποδεικνύοντας ότι το βάθος αποτελεί πιθανό παράγοντα που μπορεί να επηρεάσει την μικροβιακή σύνθεση των υπόγειων πηγών.

Τα βακτηριακά γένη και φύλα που εμφανίστηκαν σε αφθονία και ήταν κοινά και στις τρεις πηγές ήταν τα *Leptospirillum*, *Omnitrophica*, *Flavobacterium* και *Nomurabacteria*.

Leptospirillum:

Το γένος *Leptospirillum* αποτελεί ένα Gram⁻ αερόβιο χημειολιθότροφο βακτήριο περίπου 10μm με ικανότητα οξείδωσης του σιδήρου (Walton and Johnson, 1992). Λόγω των παραπάνω έχει βρεθεί σε αποστραγγιστικά ύδατα ορυχείων (Coram and Rawlings, 2002) και σε δεξαμενές που υφίσταται βιοεπεξεργασία χρυσού και κοβαλτίου όπως επίσης παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία βιοαπόπλυσης-bioleaching (Sand et al., 1992). Μάλιστα, κάποια οξεόφιλα σιδηροοξειδωτικά στελέχη του γένους απαντούν σε όξινες, πλούσιες σε σίδηρο πηγές ηφαιστειακών περιοχών (Brock et al., 2018). Μπορεί να επιβιώσει σε ένα θερμοκρασιακό εύρος μεταξύ 20-40°C (είναι δηλαδή μεσόφιλο-θερμοανεκτικό) και σε εξαιρετικά όξινα περιβάλλοντα σε τιμές pH μικρότερες των 2-3. Επιπλέον, συγκαταλέγεται στα oligότροφα βακτήρια καθώς έχει βρεθεί εργαστηριακά ότι είναι πολύ ευαίσθητα στην οργανική ύλη καθώς αυτός είναι και ένας από τους λόγους που καλλιεργούνται δύσκολα σε στερεά μέσα (Rawlings et al., 2002). Επιπρόσθετα, σε μια μελέτη που σύγκρινε δύο σιδηροοξειδωτικά βακτηριακά είδη βρέθηκε ότι η χρήση συνθετικών μέσων πλούσιων σε σίδηρο ευνόησε το κοπιότροφο είδος το οποίο και επικράτησε έναντι του oligότροφου *Leptospirillum* (Johnson et al., 2009), καθώς το δεύτερο έχει μικρές απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά όπως ο σίδηρος, το CO₂ και N₂ ως πηγές ενέργειας, άνθρακα και αζώτου, αντίστοιχα. Βέβαια, όσον αφορά τους παράγοντες (πέραν της συγκέντρωσης του σιδήρου) που φαίνεται να επηρεάζουν τον ανταγωνισμό του *Leptospirillum* με άλλα σιδηροοξειδωτικά βακτήρια είναι η θερμοκρασία και το pH (Johnson et al., 2009).



Εικόνα 1. Απεικόνιση σπειροειδούς κυττάρου του είδους *Leptospirillum ferrooxidans* από Applied and Environmental Biology
<https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Leptospirillum>

Εκτός των παραπάνω, το γένος *Leptospirillum* περιέχει όλα τα γονίδια που είναι απαραίτητα για τη δέσμευση του αζώτου όπως εκείνα που κωδικοποιούν τη νιτρογενάση Mo-Fe, τον ειδικό ρυθμιστή (*nifA*) και διάφορα συστήματα μεταφοράς που με κάποιο τρόπο σχετίζονται με την αφομοίωση του αζώτου (Parro and Moreno-Paz et al., 2004). Μάλιστα, μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε ένα όξινο ποτάμι της ΝΔ Ισπανίας βρέθηκε ότι το *Leptospirillum* μπόρεσε να αναπτυχθεί διαζωτροφικά, όπου διαζώτροφος θεωρείται ένας μικροοργανισμός που μπορεί να δεσμεύει το ατμοσφαιρικό άζωτο. Βέβαια, η συγκεκριμένη διαδικασία απόκτησης ενέργειας είναι εξαιρετικά απαιτητική η οποία απαιτεί πολύπλοκες κυτταρικές προσαρμογές. Με λίγα λόγια το αναφερόμενο γένος έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιεί όχι μόνο τα νιτρικά, τα αμμωνιακά και τα νιτρώδη ως δέκτες ηλεκτρονίων αλλά και το ατμοσφαιρικό άζωτο (Levicap et al., 2009). Αντίστοιχα, σε μια εργασία που επίσης έγινε αντιληπτή η κυριαρχία του *Leptospirillum*, αποδόθηκε στην ικανότητα του να δεσμεύει το άζωτο,

παρέχοντας του με αυτόν τον τρόπο οικολογικό πλεονέκτημα με τελικό αποτέλεσμα την αφθονία του (Huang et al., 2016). Σύμφωνα λοιπόν με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η παρουσία οξειδωτικών βακτηρίων του σιδήρου είναι συχνό φαινόμενο στα συστήματα παροχής πόσιμου νερού (Eichler et al., 2006). Παρομοίως, μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε αλτικές πηγές νερού στο Τρεντίνο της Ιταλίας έδειξε απομόνωση του συγκεκριμένου γένους αποτελώντας ένα από τα πέντε κυρίαρχα βακτηριακά γένη των πηγών (Pedron et al., 2022). Όσον αφορά τους λόγους για τους οποίους μπορεί αυτό το γένος να βρεθεί σε περιβάλλοντα υπόγειων πηγών συγκεντρώθηκαν τρεις υποθέσεις. Η πρώτη υποστηρίζει ότι το *Leptospirillum* προσελκύεται από τη διάβρωση σωλήνων κατασκευασμένων από χάλυβα λόγω της απελευθέρωσης Fe (II) (Coral et al., 2018), καθώς η χημική διάβρωση τέτοιων αγωγών παρέχει ένα κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξη σιδηροοξειδωτικών βακτηρίων. Η δεύτερη υπόθεση ισχυρίζεται πως πρόκειται για αυτόχθονο γένος στα υπόγεια ύδατα χωρίς να μπορεί να αποδειχτεί στη παρούσα πτυχιακή εργασία και τέλος η τρίτη πως μπορεί να προήλθε από το υπέδαφος μέσω της επιφανειακής απορροής. Ωστόσο, η απομόνωση του γένους *Leptospirillum* δεν έχει περιγραφεί ακόμα από εδαφικά περιβάλλοντα (Sato et al., 2009).

Omnitrophica:

Το μη καλλιεργημένο φύλο *Omnitrophica* όπου προηγουμένως ήταν γνωστό και ως OP3 αποτελεί μαγνητοτακτικό βακτήριο (Lin et al., 2018). Τα μαγνητοτακτικά βακτήρια έχουν την ικανότητα ανίχνευσης του γεωμαγνητικού πεδίου και ως κινητικοί μικροοργανισμοί κολυμπούν κατά μήκος των γραμμών του μαγνητικού πεδίου της Γης (Uebe and Schüller et al., 2016). Επιπλέον, απαραίτητη λειτουργία τους είναι η βιομεταλλοποίηση ενδοκυτταρικών μαγνητικών κρυστάλλων αποτελούμενοι είτε από μαγνητίτη (Fe_3O_4) είτε από οργκρειγίτη (Fe_3S_4) που βρίσκονται στη μεμβράνη τους ονόματι μαγνητοσώματα τα οποία είναι υπεύθυνα για τον μαγνητοτακτισμό (Lin et al., 2018). Μάλιστα, πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι τα συγκεκριμένα βακτήρια περιέχουν πέντε διάσπαρτα γονίδια (Kolinko et al., 2016) που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και συνδέονται με τη βιοσύνθεση και την οργάνωση των μαγνητοσωμάτων (Lin et al., 2018), καθώς επίσης και με τη μείωση των νιτρικών (Rasigraf et al., 2017). Μέλη του φύλου *Omnitrophica* έχουν βρεθεί σε ποικίλα υδάτινα περιβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένων των λιμνών, ποταμών, ορυζώνων (Lin et al., 2018), υπόγειων πηγών (Perez-Molphe-Montoya et al., 2022) και σε μονίμως παγωμένα εδάφη (permafrost) (Wurzbacher et al., 2017). Όσον αφορά την εμφάνιση του φύλου στα υπόγεια ύδατα, οι πληθυσμοί του ανιχνεύονται συνήθως σε oligότροφα υπόγεια ύδατα (Hershey et al., 2018) και έχει αποδειχθεί ότι αντιπροσωπεύουν έως και το 34 % της μικροβιακής κοινότητας (Fiedler et al., 2018). Μια μελέτη ενός υπόγειου πορώδη υδροφόρου ορίζοντα στη ΝΔ Ισλανδία που χρησιμοποιείται για εξόρυξη πόσιμου νερού ανιχνεύτηκε το αναφερόμενο φύλο το οποίο μάλιστα αποτελούσε ένα από τα κυρίαρχα της πηγής (Knobloch et al., 2021). Σε μια ακόμα έρευνα ανακατασκευάστηκαν μεταγονιδιακά συναρμολογημένα γονιδιώματα

(metagenomically - assembled genomes, MAG) από Omnitrophica και προβλέφθηκε ότι κάποια από αυτά εξοικονομούν ενέργεια μέσω ετεροτροφίας ενώ κάποια άλλα μέσω μιξοτροφίας (Perez-Molphe-Montoya et al., 2022). Επιπρόσθετα, ανάλογα με το υπό μελέτη MAG μπορούν να εκτελούν αερόβια ή και αναερόβια αναπνοή, ενώ αρκετά από αυτά ήταν μικροαερόφιλα. Στην ίδια έρευνα ανιχνεύθηκαν γονίδια που φαίνεται να σχετίζονται και να είναι απαραίτητα για την επιφανειακή αίσθηση, τη σύνδεση σε βιοϋμένια, τη χημειοταξία, και την οργάνωση σε μικροαποικίες (Craig et al., 2019), γεγονός που συμβαδίζει με προηγούμενες πειραματικές έρευνες που έδειξαν πως πληθυσμοί του Omnitrophica μπορούν να προσκολληθούν σε άλλα κύτταρα (Rotaru et al., 2012) και να εμφανιστούν μέσα σε πολύπλοκα βιοϋμένια (Haas et al., 2018). Τέλος, κάποιοι από τους ρόλους που έχουν προταθεί πως διαδραματίζει το φύλο Omnitrophica είναι ο σχηματισμός υδατανθράκων μέσω του κύκλου του άνθρακα (Dombrowski et al., 2017), η δευτερογενής ζύμωση υπό ανοξικές συνθήκες (Probst et al., 2017) και αερόβια ή αναερόβια τερματική αναπνοή (Glöckner et al., 2010).

Flavobacterium:

Το γένος *Flavobacterium* αποτελείται από ραβδοειδή, κατά Gram⁻ αρνητικά, αερόβια βακτήρια με μερικά είδη να έχουν χαρακτηριστεί ως ψυχρόφιλα και μερικά άλλα ως ψυχροανθεκτικά. Τα περισσότερα βέβαια ανήκουν στα ψυχρόφιλα είδη και αναπτύσσονται καλά στους 4°C με βέλτιστο θερμοκρασιακό εύρος τους 20-30°C (Bernardet and Bowman et al., 2006). Γενικά τα μέλη του συγκεκριμένου γένους κατοικούν σε ένα ευρύ φάσμα εύκρατων και ψυχρών ενδιαιτημάτων εδάφους και νερού. Όσον αφορά τα εδάφη το γένος αυτό έχει απομονωθεί τόσο σε ένυδρες (λασπώδη εδάφη) όσο και σε άνυδρες περιοχές, ενώ εκείνα που έχουν βρεθεί σε υδάτινα ενδιαιτήματα παρουσίασαν μια ευδιάκριτη προτίμηση σε χαμηλή αλατότητα και δροσερά προς ψυχρά περιβάλλοντα όπως οι πολικές λίμνες (Van Trappen et al., 2002, p. 7), ρυάκια και ποτάμια. Βέβαια, λόγω του ότι έχουν απομονωθεί και από το θαλασσίνο νερό τα είδη αυτού του γένους έχουν χωριστεί σε δύο κατηγορίες. Η μια που αποτελείται από θαλασσινά είδη και η δεύτερη που απαρτίζεται από είδη του γλυκού νερού (Bernardet and Bowman et al., 2006). Μάλιστα, μερικά είδη του γλυκού νερού είναι ή τουλάχιστον δυνητικώς αιτιολογικοί παράγοντες για ασθένειες των ψαριών, αλλά τα περισσότερα πρόκεινται για αβλαβή, χημειοετερότροφα βακτήρια που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοργανοποίηση διαφόρων τύπων οργανικής ύλης όπως οι υδατάνθρακες, τα αμινοξέα, οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες (Bernardet and Bowman et al., 2006). Αρκετά από αυτά χρησιμοποιούν τη γλυκόζη ως πηγή άνθρακα και πιθανώς εμπλέκονται με τη μεταβολική οδό Embden-Meyerhof-Parnas για τον καταβολισμό τους (Reichardt Wolfgang and Morita Richard Y., 1982). Επίσης, έχει βρεθεί ότι ο ενεργειακός μεταβολισμός τους μπορεί να πραγματοποιηθεί και με αναγωγή νιτρικών σε νιτρώδη από πολλά είδη *Flavobacterium*, ιδιαίτερα όμως από εκείνα του γλυκού νερού (Bernardet and Bowman et al., 2006). Βέβαια, οι μεταβολικοί οδοί του άνθρακα και του αζώτου είναι ελάχιστα κατανοητές σε αυτό γένος. Ένα

ακόμα σημαντικό στοιχείο που φαίνεται να αιτιολογεί την συνύπαρξη του *Flavobacterium* με τα υπόλοιπα βακτήρια είναι ο σημαντικός του ρόλος στον σχηματισμό βιοϋμενίων, καθώς βάσει της ολισθαίνουσας κινητικότητας πολλών μελών του γένους αναμένεται να διευκολύνονται στον αποικισμό των επιφανειών των βιοϋμενίων (Kirchman, 2002). Όσον αφορά την κατανομή του πιστεύεται πως κάποια είδη του γένους είναι κοσμοπολίτικα, αλλά υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα σχετικά με αυτό. Επιπρόσθετα, το γένος *Flavobacterium* έχει βρεθεί σε αρκετές έρευνες όπου πραγματοποιήθηκαν μελέτες για τη σύνθεση της μικροβιακής ποικιλότητας υπόγειων πηγών, το νερό των οποίων προορίζεται για πόσιμο, αλλά μια που αξίζει να αναφερθεί είναι εκείνη της (Lerm et al., 2011) όπου έλαβε χώρα στη Βόρεια Γερμανία. Εκεί έγινε αντιληπτό ότι ύστερα από απολύμανση των φρεατίων με αντιδραστικό οξειδωτικό υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) κυριάρχησαν ετερότροφα βακτήρια όπως το *Flavobacterium*, ενώ κάποια άλλα ενώ βρισκόντουσαν στις συγκεκριμένες πηγές δεν κατάφεραν να επιβιώσουν. Η ανθεκτικότητα του γένους σε αυτόν τον ισχυρό οξειδωτικό παράγοντα πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι είναι θετικό στη καταλάση και μπορεί να αποικοδομεί το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο (Holmes and Owen et al., 1979). Αντίστοιχη έρευνα παρουσίασε ότι το *Flavobacterium* ήταν ανθεκτικό και σε άλλες απολυμαντικές χημικές ουσίες, όπως το χλώριο και οι χλωραμίνες, που προκάλεσαν την εξαφάνιση άλλων μικροοργανισμών σε μια δεξαμενή πόσιμου νερού (Wolfe et al., 1985). Τέλος, μια έρευνα σε δύο παρθέτους ασβεστολιθικούς υδροφορείς στη περιοχή Hainich της Γερμανίας, όπου ο ένας βρισκόταν πιο επιφανειακά και ο άλλος σε μεγαλύτερο βάθος ανιχνεύθηκαν κυρίαρχα μέλη του γένους *Flavobacterium* στον ανώτερο υδροφόρο ορίζοντα, ενώ στον βαθύτερο όχι (Herrmann et al., 2015).

Nomurabacteria:

Το γένος *Nomurabacteria* ανήκει στο φύλο Parcubacteria και στο υπέρφυλο Patescibacteria, και αποτελεί πολύ μικρού μεγέθους (ultra small) μικροοργανισμό με τα κύτταρα του υπέρφυλου να περνούν ακόμη και από φίλτρα μεγέθους πόρων 0,2 μm (Castelle et al., 2018). Ωστόσο, επειδή δεν υπάρχουν πολλές μελέτες που έχει να ανιχνευθεί το συγκεκριμένο γένος σε υπόγειες πηγές αλλά και γενικότερα, θα συμπεριληφθούν πληροφορίες και από το υπέρφυλο και από το φύλο στο οποίο ανήκει. Αρχικά, σε oligότροφα ενδιαίτηματα όπως τα παρθένα υπόγεια ύδατα, το μικρό μέγεθος κυττάρων θεωρείται εξελικτικό πλεονέκτημα, καθώς η αυξημένη αναλογία επιφάνειας προς όγκο βελτιστοποιεί την πρόσληψη των αραιών θρεπτικών συστατικών (Sowell et al., 2009). Γι' αυτό λοιπόν δεν είναι καθόλου τυχαίο που το μη καλλιεργήσιμο υπέρφυλο Patescibacteria είναι μια από τις πιο άφθονες ομάδες βακτηρίων στις υπό μελέτη πηγές, καθώς επίσης εκτιμάται ότι αποτελούν έως και το ήμισυ της παγκόσμιας βακτηριακής ποικιλότητας (Castelle et al., 2018). Τα υπόγεια ύδατα συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι περιέχουν ιδιαίτερα υψηλή αφθονία του υπέρφυλου έως και 38% των συνολικών μικροβιωμάτων (Bruno et al., 2021). Η μείωση

του μεγέθους των κυττάρων προκαλείται λόγω της έλλειψης θρεπτικών συστατικών σε περιβάλλοντα όπως του υπό μελέτη (Hood and MacDonell et al., 1987) με συνεπακόλουθο τη μείωση του μεγέθους του γονιδιώματος τους. Τα παραπάνω συνεπάγονται απώλεια γονιδίων, όπου τελικά οδηγεί σε χαμηλότερο μεταβολικό κόστος αναπαραγωγής (Giovannoni et al., 2014). Βάσει των παραπάνω υπάρχει περίπτωση αυτά τα βακτήρια να οδηγηθούν σε απώλεια βασικών μεταβολικών λειτουργιών όπως εκείνων που είναι απαραίτητα για τη βιοσύνθεση αμινοξέων ή νουκλεοτιδίων (Brown et al., 2015). Αυτό αναπόφευκτα σημαίνει πως βρίσκονται σε εξάρτηση από άλλους οργανισμούς (Giovannoni et al., 2014) γεγονός που συμβαδίζει με ευρήματα τα οποία αποδεικνύουν πως τα *Patescibacteria* κωδικοποιούν πρωτεΐνες κυτταρικής επιφάνειας, που πιθανότατα εμπλέκονται στην προσκόλληση με άλλους μικροοργανισμούς (Castelle et al., 2018). Παλαιότερες μελέτες είχαν δηλώσει ότι τα περισσότερα μέλη του υπέρφυλου *Patescibacteria* είναι αναερόβια που βασίζονται στην έλλειψη αναπνευστικών αλυσίδων (Castelle et al., 2018), τελικά όμως βρέθηκε ότι παρουσιάζουν εξαιρετικά υψηλές αφθονίες σε οξικά υπόγεια ύδατα (Herrmann et al., 2019). Βέβαια, αξίζει να σημειωθεί ότι η υψηλή σχετική αφθονία αυτού του μικροοργανισμού στα οξικά υπόγεια νερά δεν υποδηλώνει απαραίτητα έναν ανεξάρτητο δείκτη αερόβιου τρόπου ζωής (Gios et al., 2023). Ακολούθως, τα ultra-small βακτήρια του φύλου αυτού εμφάνισαν υψηλή γονιδιωματική ευελιξία όσον αφορά τα καθεστώτα οξυγόνωσης, όμως ακόμα πιο διαδομένες μεταβολικές προσαρμογές μεταξύ των μελών ήταν εκείνες που σχετίζονται με το σχηματισμό και τη συντήρηση βιοϋμένων (Gios et al., 2023). Στην εργασία τους οι Herrmann et al., 2019 αποκάλυψαν τον κεντρικό ρόλο που διαδραματίζει το αναφερόμενο υπέρφυλο στις μικροβιακές κοινότητες των υπόγειων υδάτων, ενώ παράλληλα επισημάνθηκαν πιθανές συσχετίσεις με συγκεκριμένους μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων άφθονων αυτότροφων που εμπλέκονται σε διεργασίες ανακύκλωσης του αζώτου, του θείου και του σιδήρου με σκοπό την πρόσληψη τροφής. Παρόλα αυτά, δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα αν ο συνεντοπισμός και οι σχέσεις μεταξύ τους πρόκεινται για παρασιτικές ή συμβιωτικές (Brown et al., 2015). Συνεπώς, οι λόγοι που πιστεύεται ότι συντελούν στη κυριαρχία των *Patescibacteria* στις υπόγειες πηγές είναι οι υδροχημικές παράμετροι, η διαθεσιμότητα πόρων και οι αλληλεπιδράσεις-βαθμός εξάρτησης τους από τα υπάρχον άφθονα βακτηριακά είδη (Herrmann et al., 2019). Τέλος, οι περιορισμένες δυνατότητες μεταβολικού δυναμικού των *Patescibacteria*, όχι μόνο θα μπορούσε να εξηγήσει τις δυσκολίες καλλιέργειάς τους σε εργαστηριακές συνθήκες, αλλά και να δώσει έμφαση στις αλληλεξαρτήσεις μεταξύ των μικροοργανισμών στα συγκεκριμένα ενδιαίτηματα (Bruno et al., 2021).

Επομένως, σύμφωνα με τα παραπάνω ευρήματα η συνύπαρξη των αναλυθέντων άφθονων βακτηρίων δεν είναι τυχαία καθώς προκύπτει πως μοιράζονται μια πληθώρα αλληλεπιδράσεων και συσχετίσεων όπως η αναζήτηση παρόμοιων θρεπτικών μέσων, η εγκατάσταση σε ίδια μικροπεριβάλλοντα και η συνεισφορά τους στους διάφορους βιοχημικούς κύκλους, υποδηλώνοντας ντετερμινιστικούς παράγοντες οι οποίοι τελικά είναι εκείνοι που διαμορφώνουν τις μικροβιακές κοινότητες (Horner-Devine et al., 2007).

Ακολουθώντας, βάσει των μη παραμετρικών μεθόδων που εφαρμόστηκαν, πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις μεταξύ των τριών πηγών, των περιόδων δειγματοληψίας εντός της ίδιας πηγής και των ετών δειγματοληψίας με σκοπό την εύρεση ομοιοτήτων και διαφορών ως προς την σύνθεση της βακτηριακής ποικιλότητας χώρο-χρονικά. Στο δενδρόγραμμα του **Διαγράμματος 8** γίνεται αντιληπτό πως δεν υπάρχει έντονο μοτίβο ταύτισης ως προς την ομοιότητα ή την ανομοιότητα μεταξύ των πηγών, όμως φαίνεται πως οι πηγές 1 και 2 και οι πηγές 2 και 3 μοιράζονται πιο όμοιους μικροοργανισμούς με τα ποσοστά ομοιότητας να είναι πάνω από 90%. Αντιθέτως, οι πηγές 1 και 3 εμφανίζουν πολύ μικρότερα ποσοστά ομοιότητας με μια εξαίρεση να παρατηρείται στη δειγματοληψία του Ιουλίου 2018. Αυτό το συμπέρασμα αναφέρθηκε και προηγουμένως στην διαγραμματική απεικόνιση των βακτηρίων, όμως με τη βοήθεια του δενδρογράμματος κατά Morisita επαληθεύεται. Ύστερα, στις συγκρίσεις των δειγματοληψιών εντός των ίδιων πηγών εξακολουθεί να μην υπάρχει κάποιο σταθερό μοτίβο, αλλά το γενικό συμπέρασμα που ισχύει και για τις τρεις πηγές είναι πως οι μήνες Οκτώβριος και Μάρτιος στη πλειονότητα των δειγματοληψιών παρουσιάζουν ομοιότητες από 70% και πάνω, γεγονός που πιθανώς να σχετίζεται με παρόμοιες υδρολογικές και συνεπώς φυσικοχημικές συνθήκες στις υπόγειες πηγές. Όσον αφορά τον μήνα Οκτώβριο που ανήκει στην εποχή του φθινοπώρου, επικρατούν συνθήκες με μεγάλη διάρκεια βροχοπτώσεων και κατακρημνισμάτων γενικότερα, οπότε και η επιφανειακή απορροή θα είναι αυξημένη. Τον Μάρτιο από την άλλη πλευρά, όπου συγκαταλέγεται στην εποχή της άνοιξης στις περισσότερες περιοχές των εύκρατων κλιμάτων σηματοδοτεί την περίοδο του τήξης του χιονιού. Συνεπώς, οι δύο αυτοί μήνες ταυτίζονται ως προς τα υδρολογικά φαινόμενα με τελικό αποτέλεσμα την παρατεταμένη και έντονη επιφανειακή απορροή. Εν αντιθέσει, οι μήνες Ιούλιος και Δεκέμβριος (ο οποίος δεν συμπεριλήφθηκε στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων καθώς αποτελεί δειγματοληψία του 2016) δεν μπορούν να ταυτιστούν εποχιακά ούτε μεταξύ τους αλλά ούτε και με τους προηγούμενους δύο, γεγονός που δικαιολογεί την αυξημένη ανομοιογένεια τους ως προς την σύνθεση της βακτηριακής ποικιλότητας των πηγών. Τέλος, τα μη παραμετρικά διαγράμματα πολυδιάστατης κλίμακας (NMDS) που συνέκριναν τα έτη δειγματοληψίας για κάθε μια από τις πηγές έδειξαν ότι το πιο διαχρονικά μεταβαλλόμενο έτος αποτέλεσε το 2018 με τη δειγματοληψία του Μαρτίου 2018 να είναι η πιο διαφοροποιημένη απ' όλες. Αναφορικά με τη πηγή 1 (**Διάγραμμα 12**) και τη πηγή 3 (**Διάγραμμα 14**) φαίνεται πως τα έτη είναι σχετικά διαφοροποιημένα μεταξύ τους σε αντίθεση με τη πηγή 2 (**Διάγραμμα 13**) όπου οι ομοιότητες μεταξύ των ετών είναι περισσότερες γεγονός που σημαίνει ότι με το πέρασμα των χρόνων οι βακτηριακές κοινότητες παρέμεναν ίδιες. Τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούν να καταλήξουν στο συμπέρασμα και να δικαιολογήσουν την υψηλή ποικιλότητα που βρέθηκε στη πηγή 1 και 3 και την συγκριτικά μειωμένη της πηγής 2.

Όμοια έρευνα του Pedron et al., 2022 όπως της παρούσας διπλωματικής εργασίας έδειξε ότι η ποικιλομορφία των πηγών ποικίλλει ανάλογα με την εποχή, αναδεικνύοντας μια εποχική διακύμανση που είναι η χαμηλότερη το χειμώνα και υψηλότερη την άνοιξη. Μάλιστα, σε αντίστοιχη σύγκριση των πηγών βρέθηκε ότι

μερικές μοιάζουν αρκετά ως προς την βακτηριακή τους σύνθεση ενώ κάποιες άλλες όχι, καθώς επίσης πως η διακύμανση της ποικιλομορφίας δεν είναι ίδια σε όλες τις πηγές. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι σύνθεση του μικροβιώματος κάθε πηγής τείνει να παραμένει ίδια με το πέρασμα των ετών παρά να μοιάζει με άλλες πηγές της ίδιας εποχής, γεγονός που υποδηλώνει ισχυρή επιλογή εξειδικευμένης θέσης. Σε μια ακόμη έρευνα στη περιοχή Hainich της Γερμανίας, μελετήθηκαν πέντε πηγές όπου αποκαλύφθηκε πως κάποιες από αυτές έμοιαζαν ως προς την βακτηριακή τους σύνθεση αλλά διέφεραν στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά όπως η οξυγόνωση για παράδειγμα, πιθανώς λόγω των διαφορετικών απαιτήσεων και των διεργασιών που εκτελούσαν οι παρόντες μικροοργανισμοί (Wegner et al., 2019). Στην ίδια μελέτη τα δεδομένα έδειξαν ότι η σύνθεση του μικροβιώματος των παραπάνω πηγών διακρίθηκε έντονα από τις υδροχημικές παραμέτρους (Wegner et al., 2019) όπως αναμένεται να έχει συμβεί και στη παρούσα πτυχιακή εργασία. Παρομοίως, οι Herrmann et al., 2015 πραγματοποίησαν έρευνα στην ίδια περιοχή μελέτης με τη παραπάνω σε δύο υπόγειους υδροφορείς με τη διαφορά ότι ο ένας ήταν βαθύτερος από τον άλλον. Εκεί λοιπόν έγινε αντιληπτό ότι η συνολική μικροβιακή αφθονία δεν επηρεάστηκε από τις φυσικοχημικές διαφορές των δύο υδροφορέων παρόλο που υπήρξαν έντονες διαφορές στις συνθέσεις των μεταβολικά ενεργών μικροβιακών κοινοτήτων, μια διαπίστωση που φαίνεται να αντικρούει τη μελέτη του (Knobloch et al., 2021) όπου δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στη σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας των υπόγειων υδάτων, όμως σε μια πηγή εντοπίστηκε μικρότερος αριθμός taxa σε σύγκριση με τις υπόλοιπες, το οποίο μπορεί να οφείλεται στη διαφορά βάθους.

Εν κατακλείδι, και οι τρεις πηγές παρουσίασαν υψηλή ποικιλότητα σύμφωνα με τους δείκτες ποικιλότητας που εφαρμόστηκαν και φαίνεται να αποτελούν ένα ξεχωριστό ενδιαίτημα, το οποίο προσφέρει συνθήκες ικανές να επιτρέψουν την ανάπτυξη του ιδιαίτερα εκτεταμένου πλούτου των ειδών που παρατηρήθηκε. Επιπρόσθετα, οι πηγές εμφάνισαν ορισμένες ομοιότητες ως προς την βακτηριακή τους σύνθεση με τα πιο άφθονα γένη και φύλα που βρέθηκαν να ανιχνεύονται συχνά σε πηγές γλυκού νερού. Παρόλα αυτά καμία πηγή και σε κανένα έτος δεν ταυτίστηκε με κάποια άλλη στο 100%. Τέλος, θα ήταν εξαιρετικά χρήσιμο μελλοντικά να πραγματοποιείται όχι μόνο ταυτοποίηση και αναγνώριση των μικροοργανισμών σε τέτοιου είδους ενδιαίτηματα αλλά και μελέτη των παραγόντων που αυτοί επηρεάζονται καθώς παραμένουν αμφιλεγόμενοι.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bar-On, Y.M., Phillips, R., Milo, R., 2018. The biomass distribution on Earth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 6506–6511.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1711842115>
2. Bernardet, J.-F., Bowman, J.P., 2006. The Genus *Flavobacterium*, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer New York, New York, NY, pp. 481–531.
https://doi.org/10.1007/0-387-30747-8_17
3. Brown, C.T., Hug, L.A., Thomas, B.C., Sharon, I., Castelle, C.J., Singh, A., Wilkins, M.J., Wrighton, K.C., Williams, K.H., Banfield, J.F., 2015. Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria. *Nature* 523, 208–211. <https://doi.org/10.1038/nature14486>
4. Bruno, A., Sandionigi, A., Magnani, D., Bernasconi, M., Pannuzzo, B., Consolandi, C., Camboni, T., Labra, M., Casiraghi, M., 2021. Different Effects of Mineral Versus Vegetal Granular Activated Carbon Filters on the Microbial Community Composition of a Drinking Water Treatment Plant. *Front. Ecol. Evol.* 9.
5. Casamayor, E.O., Pedrós-Alió, C., Muyzer, G., Amann, R., 2002. Microheterogeneity in 16S Ribosomal DNA-Defined Bacterial Populations from a Stratified Planktonic Environment Is Related to Temporal Changes and to Ecological Adaptations. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1706–1714.
<https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1706-1714.2002>
6. Castelle, C.J., Brown, C.T., Anantharaman, K., Probst, A.J., Huang, R.H., Banfield, J.F., 2018. Biosynthetic capacity, metabolic variety and unusual biology in the CPR and DPANN radiations. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 629–645.
<https://doi.org/10.1038/s41579-018-0076-2>
7. Chandy, J.P., Angles, M.L., 2001. Determination of nutrients limiting biofilm formation and the subsequent impact on disinfectant decay. *Water Res.* 35, 2677–2682. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00572-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00572-8)
8. Chapelle, F.H., McMahon, P.B., Dubrovsky, N.M., Fujii, R.F., Oaksford, E.T., Vroblesky, D.A., 1995. Deducing the Distribution of Terminal Electron-Accepting Processes in Hydrologically Diverse Groundwater Systems. *Water Resour. Res.* 31, 359–371. <https://doi.org/10.1029/94WR02525>
9. Coral, T., Descostes, M., De Boissezon, H., Bernier-Latmani, R., De Alencastro, L.F., Rossi, P., 2018. Microbial communities associated with uranium in-situ recovery mining process are related to acid mine drainage assemblages. *Sci. Total Environ.* 628–629, 26–35.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.321>

10. Coram, N.J., Rawlings, D.E., 2002. Molecular relationship between two groups of the genus *Leptospirillum* and the finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. dominates South African commercial biooxidation tanks that operate at 40 degrees C. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 838–845.
<https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.838-845.2002>
11. Craig, L., Forest, K.T., Maier, B., 2019. Type IV pili: dynamics, biophysics and functional consequences. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 429–440.
<https://doi.org/10.1038/s41579-019-0195-4>
12. Danielopol, D.L., Pospisil, P., Rouch, R., 2000. Biodiversity in groundwater: a large-scale view. *Trends Ecol. Evol.* 15, 223–224.
[https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)01868-1](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)01868-1)
13. Danielopol, D.L., Pospisil, P. Hidden biodiversity in the groundwater of the Danube Flood Plain National Park (Austria). *Biodiversity and Conservation* 10, 1711–1721 (2001). <https://doi.org/10.1023/A:1012098706986>
14. Dombrowski, N., Seitz, K.W., Teske, A.P., Baker, B.J., 2017. Genomic insights into potential interdependencies in microbial hydrocarbon and nutrient cycling in hydrothermal sediments. *Microbiome* 5, 106.
<https://doi.org/10.1186/s40168-017-0322-2>
15. Dröge, M., Pühler, A., Selbitschka, W., 1999. Horizontal gene transfer among bacteria in terrestrial and aquatic habitats as assessed by microcosm and field studies. *Biol. Fertil. Soils* 29, 221–245.
<https://doi.org/10.1007/s003740050548>
16. Ehrlich, G G, Godsy, E M, Goerlitz, D F, and Hult, M F. 1983. "Microbial ecology of a creosote-contaminated aquifer at St. Louis Park, Minnesota". United States.
17. Ehrlich, HL, Newman, DK, Kappler, A, 2015. Geomicrobial interactions with other transition metals (chromium, molybdenum, vanadium, technetium), metalloids (polonium), actinides (uranium, neptunium, and plutonium), and the rare earth elements [WWW Document]. URL https://hero.epa.gov/hero/index.cfm/reference/details/reference_id/8631808 (accessed 8.25.23).
18. Eichler, S., Christen, R., Hölte, C., Westphal, P., Bötzel, J., Brettar, I., Mehling, A., Höfle, M., 2006. Composition and Dynamics of Bacterial Communities of a Drinking Water Supply System as Assessed by RNA-and DNA-Based 16S rRNA Gene Fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1858–72.
<https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1858-1872.2006>
19. Falkenmark, M., 2005. Water Usability Degradation: Economist Wisdom or Societal Madness? *Water Int.* 30, 136–146.
<https://doi.org/10.1080/02508060508691854>

20. Farnleitner, A.H., Wilhartitz, I., Ryzinska, G., Kirschner, A.K.T., Stadler, H., Burtscher, M.M., Hornek, R., Szewzyk, U., Herndl, G., Mach, R.L., 2005. Bacterial dynamics in spring water of alpine karst aquifers indicates the presence of stable autochthonous microbial endokarst communities. *Environ. Microbiol.* 7, 1248–1259. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00810.x>
21. Feris, K.P., Hristova, K., Gebreyesus, B., Mackay, D., Scow, K.M., 2004. A Shallow BTEX and MTBE Contaminated Aquifer Supports a Diverse Microbial Community. *Microb. Ecol.* 48, 589–600. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0001-2>
22. Fiedler, C.J., Schöner, C., Proksch, P., Kerschbaumer, D.J., Mayr, E., Zunabovic-Pichler, M., Domig, K.J., Perfler, R., 2018. Assessment of Microbial Community Dynamics in River Bank Filtrate Using High-Throughput Sequencing and Flow Cytometry. *Front. Microbiol.* 9.
23. Fuhrman, J. Microbial community structure and its functional implications. *Nature* 459, 193–199 (2009). <https://doi.org/10.1038/nature08058>
24. Gans, J., Wolinsky, M., Dunbar, J., 2005. Computational Improvements Reveal Great Bacterial Diversity and High Metal Toxicity in Soil. *Science* 309, 1387–90. <https://doi.org/10.1126/science.1112665>
25. Ghiorse, W.C., Wilson, J.T., 1988. Microbial Ecology of the Terrestrial Subsurface, in: Laskin, A.I. (Ed.), *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, pp. 107–172. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70206-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70206-5)
26. Gibert, J., Culver, D.C., Dole-Olivier, M.-J., Malard, F., Christman, M.C., Deharveng, L., 2009. Assessing and conserving groundwater biodiversity: synthesis and perspectives. *Freshw. Biol.* 54, 930–941. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2009.02201.x>
27. Gibert, J., Deharveng, L., 2002. Subterranean Ecosystems: A Truncated Functional Biodiversity: This article emphasizes the truncated nature of subterranean biodiversity at both the bottom (no primary producers) and the top (very few strict predators) of food webs and discusses the implications of this truncation both from functional and evolutionary perspectives. *BioScience* 52, 473–481. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2002\)052\[0473:SEATFB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2002)052[0473:SEATFB]2.0.CO;2)
28. Gios, E., Mosley, O.E., Weaver, L., Close, M., Daughney, C., Handley, K.M., 2023. Ultra-small bacteria and archaea exhibit genetic flexibility towards groundwater oxygen content, and adaptations for attached or planktonic lifestyles. *ISME Commun.* 3, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s43705-023-00223-x>
29. Giovannoni, S.J., Cameron Thrash, J., Temperton, B., 2014. Implications of streamlining theory for microbial ecology. *ISME J.* 8, 1553–1565. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.60>

30. Glöckner, J., Kube, M., Shrestha, P.M., Weber, M., Glöckner, F.O., Reinhardt, R., Liesack, W., 2010. Phylogenetic diversity and metagenomics of candidate division OP3. *Environ. Microbiol.* 12, 1218–1229. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02164.x>
31. Goldscheider, N., Hunkeler, D. & Rossi, P. Review: Microbial biocenoses in pristine aquifers and an assessment of investigative methods. *Hydrogeol J* 14, 926–941 (2006). <https://doi.org/10.1007/s10040-005-0009-9>
32. Griebler, C., Lueders, T., 2009. Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshw. Biol.* 54, 649–677. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.02013.x>
33. Griebler, C., Malard, F., Lefébure, T., 2014. Current developments in groundwater ecology—from biodiversity to ecosystem function and services. *Curr. Opin. Biotechnol., Energy biotechnology • Environmental biotechnology* 27, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.018>
34. Griebler, C., Mindl, B., Slezak, D., Geiger-Kaiser, M., 2002. Distribution patterns of attached and suspended bacteria in pristine and contaminated shallow aquifers studied with an in situ sediment exposure microcosm. *Aquat. Microb. Ecol.* 28, 117–129. <https://doi.org/10.3354/ame028117>
35. Haas, S., de Beer, D., Klatt, J.M., Fink, A., Rench, R.M., Hamilton, T.L., Meyer, V., Kakuk, B., Macalady, J.L., 2018. Low-Light Anoxygenic Photosynthesis and Fe-S-Biogeochemistry in a Microbial Mat. *Front. Microbiol.* 9.
36. Hazen, T.C., Jiménez, L., López De Victoria, G., Fliermans, C.B., 1991. Comparison of bacteria from deep subsurface sediment and adjacent groundwater. *Microb. Ecol.* 22, 293–304. <https://doi.org/10.1007/BF02540231>
37. Herrmann, M., Rusznyák, A., Akob, D.M., Schulze, I., Opitz, S., Totsche, K.U., Küsel, K., 2015. Large Fractions of CO₂-Fixing Microorganisms in Pristine Limestone Aquifers Appear To Be Involved in the Oxidation of Reduced Sulfur and Nitrogen Compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2384–2394. <https://doi.org/10.1128/AEM.03269-14>
38. Herrmann, M., Wegner, C.-E., Taubert, M., Geesink, P., Lehmann, K., Yan, L., Lehmann, R., Totsche, K.U., Küsel, K., 2019. Predominance of *Candidatus* Patescibacteria in Groundwater Is Caused by Their Preferential Mobilization From Soils and Flourishing Under Oligotrophic Conditions. *Front. Microbiol.* 10.
39. Hershey, O.S., Kallmeyer, J., Wallace, A., Barton, M.D., Barton, H.A., 2018. High Microbial Diversity Despite Extremely Low Biomass in a Deep Karst Aquifer. *Front. Microbiol.* 9.
40. Holmes, B., Owen, R.J., 1979. Proposal That *Flavobacterium breve* Be Substituted as the Type Species of the Genus in Place of *Flavobacterium*

- aquatile and Emended Description of the Genus *Flavobacterium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 29, 416–426. <https://doi.org/10.1099/00207713-29-4-416>
41. Hood, M.A., MacDonell, M.T., 1987. Distribution of ultramicrobacteria in a gulf coast estuary and induction of ultramicrobacteria. *Microb. Ecol.* 14, 113–127. <https://doi.org/10.1007/BF02013017>
 42. Horner-Devine, M.C., Silver, J.M., Leibold, M.A., Bohannon, B.J.M., Colwell, R.K., Fuhrman, J.A., Green, J.L., Kuske, C.R., Martiny, J.B.H., Muyzer, G., Øvreås, L., Reysenbach, A.-L., Smith, V.H., 2007. A Comparison of Taxon Co-Occurrence Patterns for Macro- and Microorganisms. *Ecology* 88, 1345–1353. <https://doi.org/10.1890/06-0286>
 43. Hu, A., Wang, H., Li, J., Liu, J., Chen, N., Yu, C.-P., 2016. Archaeal community in a human-disturbed watershed in southeast China: diversity, distribution, and responses to environmental changes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 4685–4698. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7318-x>
 44. Hubalek, V., Wu, X., Eiler, A., Buck, M., Heim, C., Dopson, M., Bertilsson, S., Ionescu, D., 2016. Connectivity to the surface determines diversity patterns in subsurface aquifers of the Fennoscandian shield. *ISME J.* 10, 2447–2458. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.36>
 45. Hull, N.M., Ling, F., Pinto, A.J., Albertsen, M., Jang, H.G., Hong, P.-Y., Konstantinidis, K.T., LeChevallier, M., Colwell, R.R., Liu, W.-T., 2019. Drinking Water Microbiome Project: Is it Time? *Trends Microbiol.* 27, 670–677. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.03.011>
 46. Interlandi, S.J., Kilham, S.S., 2001. Limiting Resources and the Regulation of Diversity in Phytoplankton Communities. *Ecology* 82, 1270–1282. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2001\)082\[1270:LRATRO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2001)082[1270:LRATRO]2.0.CO;2)
 47. Jang-Cheon Cho and Sang-Jong Kim, 2000. Increase in Bacterial Community Diversity in Subsurface Aquifers Receiving Livestock Wastewater Input [WWW Document]. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.3.956-965.2000>
 48. Johnson, D.B., 2009. Extremophiles: Acidic Environments, in: Schaechter, M. (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology* (Third Edition). Academic Press, Oxford, pp. 107–126. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00278-9>
 49. Kirchman, D.L., 2002. The ecology of Cytophaga–Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39, 91–100. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00910.x>
 50. Knobloch, S., Klonowski, A.M., Tómasdóttir, S., Kristjánsson, B.R., Guðmundsson, S., Marteinsson, V.P., 2021. Microbial intrusion and seasonal dynamics in the groundwater microbiome of a porous basaltic rock aquifer used as municipal water reservoir. *FEMS Microbiol. Ecol.* 97, fiab014. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab014>

51. Kolinko, S., Richter, M., Glöckner, F.-O., Brachmann, A., Schüler, D., 2016. Single-cell genomics of uncultivated deep-branching magnetotactic bacteria reveals a conserved set of magnetosome genes. *Environ. Microbiol.* 18, 21–37. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12907>
52. Lai, T.V., Ryder, M.H., Rathjen, J.R., Bolan, N.S., Croxford, A.E., Denton, M.D., 2021. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium increased with rising temperature. *Biol. Fertil. Soils* 57, 363–372. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01529-x>
53. Lazar, C.S., Lehmann, R., Stoll, W., Rosenberger, J., Totsche, K.U., Küsel, K., 2019. The endolithic bacterial diversity of shallow bedrock ecosystems. *Sci. Total Environ.* 679, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.281>
54. Lehtola, M.J., Miettinen, I.T., Keinänen, M.M., Kekki, T.K., Laine, O., Hirvonen, A., Vartiainen, T., Martikainen, P.J., 2004. Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes. *Water Res.* 38, 3769–3779. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.06.024>
55. Lerm, S., Alawi, M., Miethling-Graff, R., Wolfgramm, M., Rauppach, K., Seibt, A., Würdemann, H., 2011. Influence of microbial processes on the operation of a cold store in a shallow aquifer: impact on well injectivity and filter lifetime. *Grundwasser* 16, 93–104. <https://doi.org/10.1007/s00767-011-0165-x>
56. Levican, G., Ugalde, J., Ehrenfeld, N., Maass, A., Parada, P., 2009. Comparative genomic analysis of carbon and nitrogen assimilation mechanisms in three indigenous bioleaching bacteria: Predictions and validations. *BMC Genomics* 9, 581. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-581>
57. Lin, W., Zhang, W., Zhao, X., Roberts, A.P., Paterson, G.A., Bazylinski, D.A., Pan, Y., 2018. Genomic expansion of magnetotactic bacteria reveals an early common origin of magnetotaxis with lineage-specific evolution. *ISME J.* 12, 1508–1519. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0098-9>
58. Lin, X., McKinley, J., Resch, C.T., Kaluzny, R., Lauber, C.L., Fredrickson, J., Knight, R., Konopka, A., 2012. Spatial and temporal dynamics of the microbial community in the Hanford unconfined aquifer. *ISME J.* 6, 1665–1676. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.26>
59. Lozupone, C.A., Knight, R., 2007. Global patterns in bacterial diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 11436–11440. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611525104>
60. Madsen, E L, 2000. Nucleic-acid characterization of the identity and activity of subsurface microorganisms - ProQuest [WWW Document]. URL <https://www.proquest.com/openview/9d15dbb01d66db7464fb13a8f921974f/1?pq-origsite=gscholar&cbl=55405> (accessed 8.24.23).

61. Martiny, A.C., Jørgensen, T.M., Albrechtsen, H.-J., Arvin, E., Molin, S., 2003. Long-term succession of structure and diversity of a biofilm formed in a model drinking water distribution system. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6899–6907. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6899-6907.2003>
62. Marshall, Kevin C. "Planktonic versus sessile life of prokaryotes." *The prokaryotes* 2 (2006): 3-15.
63. Matulich, K.L., Martiny, J.B.H., 2015. Microbial composition alters the response of litter decomposition to environmental change. *Ecology* 96, 154–163. <https://doi.org/10.1890/14-0357.1>
64. Meng, L., Zuo, R., Wang, J., Li, Q., Du, C., Liu, X., Chen, M., 2021. Response of the redox species and indigenous microbial community to seasonal groundwater fluctuation from a typical riverbank filtration site in Northeast China. *Ecol. Eng.* 159, 106099. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2020.106099>
65. Meyerhof, M.S., Wilson, J.M., Dawson, M.N., Michael Beman, J., 2016. Microbial community diversity, structure and assembly across oxygen gradients in meromictic marine lakes, Palau. *Environ. Microbiol.* 18, 4907–4919. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13416>
66. Morrissy, J.G., Currell, M.J., Reichman, S.M., Surapaneni, A., Megharaj, M., Crosbie, N.D., Hirth, D., Aquilina, S., Rajendram, W., Ball, A.S., 2022. The Variation in Groundwater Microbial Communities in an Unconfined Aquifer Contaminated by Multiple Nitrogen Contamination Sources. *Water* 14, 613. <https://doi.org/10.3390/w14040613>
67. Parro, V., Moreno-Paz, M., 2004. Nitrogen fixation in acidophile iron-oxidizing bacteria: the nif regulon of *Leptospirillum ferrooxidans*. *Res. Microbiol.* 155, 703–709. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.05.010>
68. Pedron, R., Esposito, A., Cozza, W., Paolazzi, M., Cristofolini, M., Segata, N., Jousson, O., 2022. Microbiome characterization of alpine water springs for human consumption reveals site- and usage-specific microbial signatures. *Front. Microbiol.* 13.
69. Perez-Molphe-Montoya, E., Küsel, K., Overholt, W.A., 2022. Redefining the phylogenetic and metabolic diversity of phylum Omnitrophota. *Environ. Microbiol.* 24, 5437–5449. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16170>
70. Probst, A.J., Castelle, C.J., Singh, A., Brown, C.T., Anantharaman, K., Sharon, I., Hug, L.A., Burstein, D., Emerson, J.B., Thomas, B.C., Banfield, J.F., 2017. Genomic resolution of a cold subsurface aquifer community provides metabolic insights for novel microbes adapted to high CO₂ concentrations. *Environ. Microbiol.* 19, 459–474. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13362>
71. Rasigraf, O., Schmitt, J., Jetten, M.S.M., Lüke, C., 2017. Metagenomic potential for and diversity of N-cycle driving microorganisms in the Bothnian

- Sea sediment. *MicrobiologyOpen* 6, e00475.
<https://doi.org/10.1002/mbo3.475>
72. Rawlings, D., 2002. Heavy Metal Mining Using Microbes 1. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 65–91.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.161052>
 73. Reichardt Wolfgang, Morita Richard Y., 1982. Influence of Temperature Adaptation on Glucose Metabolism in a Psychrotrophic Strain of *Cytophaga johnsonae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 1282–1288.
<https://doi.org/10.1128/aem.44.6.1282-1288.1982>
 74. Rogers, J.R., Bennett, P.C., 2004. Mineral stimulation of subsurface microorganisms: release of limiting nutrients from silicates. *Chem. Geol.* 203, 91–108. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2003.09.001>
 75. Rotaru, A.E., Schauer, R., Probian, C., Mussmann, M., Harder, J., 2012. Visualization of Candidate Division OP3 Cocci in Limonene-Degrading Methanogenic Cultures. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 457–461.
 76. Sand, W., Rohde, K., Sobotke, B., Zenneck, C., 1992. Evaluation of *Leptospirillum ferrooxidans* for Leaching. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 85–92.
 77. Sato, Y., Hosokawa, K., Fujimura, R., Nishizawa, T., Kamijo, T., Ohta, H., 2009. Nitrogenase Activity (Acetylene Reduction) of an Iron-Oxidizing *Leptospirillum* Strain Cultured as a Pioneer Microbe from a Recent Volcanic Deposit on Miyake-Jima, Japan. *Microbes Environ.* 24, 291–296.
<https://doi.org/10.1264/jsme2.ME09139>
 78. Shade, A., Dunn, R.R., Blowes, S.A., Keil, P., Bohannon, B.J.M., Herrmann, M., Küsel, K., Lennon, J.T., Sanders, N.J., Storch, D., Chase, J., 2018. Macroecology to Unite All Life, Large and Small. *Trends Ecol. Evol.* 33, 731–744. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2018.08.005>
 79. Shen, J., Liu, H., Zhou, H., Chen, R., 2022. Specific characteristics of the microbial community in the groundwater fluctuation zone. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 29, 76066–76077. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21166-1>
 80. Shukla, S.K., Khan, A., Rao, T.S., 2021. Chapter 22 - Microbial fouling in water treatment plants, in: Das, S., Dash, H.R. (Eds.), *Microbial and Natural Macromolecules*. Academic Press, pp. 589–622. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820084-1.00023-5>
 81. Smith, S.L., Johnson, D.B., 2018. Growth of *Leptospirillum ferriphilum* in sulfur medium in co-culture with *Acidithiobacillus caldus*. *Extremophiles* 22, 327–333. <https://doi.org/10.1007/s00792-018-1001-3>
 82. Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Welch, D.M., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J.M., Herndl, G.J., 2006. Microbial diversity in the deep sea and

- the underexplored “rare biosphere.” *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 12115–12120. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605127103>
83. Sowell, S., Wilhelm, L., Norbeck, A. et al. Transport functions dominate the SAR11 metaproteome at low-nutrient extremes in the Sargasso Sea. *ISME J* 3, 93–105 (2009). <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.83>
 84. Stanish, L.F., Hull, N.M., Robertson, C.E., Harris, J.K., Stevens, M.J., Spear, J.R., Pace, N.R., 2016. Factors Influencing Bacterial Diversity and Community Composition in Municipal Drinking Waters in the Ohio River Basin, USA. *PLOS ONE* 11, e0157966. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157966>
 85. Tan, B., Ng, C., Nshimyimana, J., Loh, L.-L., Gin, K., Thompson, J., 2015. Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: current progress, challenges, and future opportunities. *Front. Microbiol.* 6.
 86. Tecon, R., Or, D., 2017. Biophysical processes supporting the diversity of microbial life in soil. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 599–623. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux039>
 87. Uebe, R., Schöler, D., 2016. Magnetosome biogenesis in magnetotactic bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 621–637. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.99>
 88. Van Trappen, S., Mergaert, J., Van Eygen, S., Dawyndt, P., Cnockaert, M.C., Swings, J., 2002. Diversity of 746 Heterotrophic Bacteria Isolated from Microbial Mats from Ten Antarctic Lakes. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 603–610. <https://doi.org/10.1078/07232020260517742>
 89. 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., Fouts, D.E., Levy, S., Knap, A.H., Lomas, M.W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.-H., Smith, H.O., 2004. Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304, 66–74. <https://doi.org/10.1126/science.1093857>
 90. Vullo, D.L., Ceretti, H.M., Daniel, M.A., Ramírez, S.A.M., Zalts, A., 2008. Cadmium, zinc and copper biosorption mediated by *Pseudomonas veronii* 2E. *Bioresour. Technol.* 99, 5574–5581. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.060>
 91. Walton, K.C., Johnson, D.B., 1992. Microbiological and chemical characteristics of an acidic stream draining a disused copper mine. *Environ. Pollut.* 76, 169–175. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(92\)90105-J](https://doi.org/10.1016/0269-7491(92)90105-J)
 92. Wang, H., Edwards, M.A., Falkinham, J.O.I., Pruden, A., 2013. Probiotic Approach to Pathogen Control in Premise Plumbing Systems? A Review. *Environ. Sci. Technol.* 47, 10117–10128. <https://doi.org/10.1021/es402455r>

93. Wegner, C.-E., Gaspar, M., Geesink, P., Herrmann, M., Marz, M., Küsel, K., 2019. Biogeochemical Regimes in Shallow Aquifers Reflect the Metabolic Coupling of the Elements Nitrogen, Sulfur, and Carbon. *Appl. Environ. Microbiol.* 85, e02346-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02346-18>
94. Wolfe, R.L., Ward, N.R., Olson, B.H., 1985. Inactivation of heterotrophic bacterial populations in finished drinking water by chlorine and chloramines. *Water Res.* 19, 1393–1403. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(85\)90306-9](https://doi.org/10.1016/0043-1354(85)90306-9)
95. Wolters, Norbert, and W. Schwartz. Untersuchungen über Vorkommen und Verhalten von Mikroorganismen in reinen Grundwässern. 1956.
96. Wurzbacher, C., Nilsson, R.H., Rautio, M., Peura, S., 2017. Poorly known microbial taxa dominate the microbiome of permafrost thaw ponds. *ISME J.* 11, 1938–1941. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.54>
97. Yan, L., Herrmann, M., Kampe, B., Lehmann, R., Totsche, K.U., Küsel, K., 2020. Environmental selection shapes the formation of near-surface groundwater microbiomes. *Water Res.* 170, 115341. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115341>
98. Yavari-Bafghi, M., Rezaei Somee, M., Amoozegar, M.A., Dastgheib, S.M.M., Shavandi, M., 2023. Genome-resolved analyses of oligotrophic groundwater microbial communities along phenol pollution in a continuous-flow biodegradation model system. *Front. Microbiol.* 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1147162>
99. Yu, J., Kim, D., Lee, T.-H., 2010. Microbial diversity in biofilms on water distribution pipes of different materials. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 61, 163–71. <https://doi.org/10.2166/wst.2010.813>
100. Zarda, B., Mattison, G., Hess, A., Hahn, D., Höhener, P., Zeyer, J., 1998. Analysis of bacterial and protozoan communities in an aquifer contaminated with monoaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Ecol.* 27, 141–152. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1998.tb00532.x>
101. Zhang, Y., Love, N., Edwards, M., 2009. Nitrification in Drinking Water Systems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 39, 153–208. <https://doi.org/10.1080/10643380701631739>
102. Zhang, Y., Zhao, Z., Dai, M., Jiao, N. and Herndl, G.J. (2014), Drivers shaping the diversity and biogeography of total and active bacterial communities in the South China Sea. *Mol Ecol*, 23: 2260-2274. <https://doi.org/10.1111/mec.12739>
103. Zhou, Y., Kellermann, C., Griebler, C., 2012. Spatio-temporal patterns of microbial communities in a hydrologically dynamic pristine aquifer. *FEMS Microbiol. Ecol.* 81, 230–242. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01371.x>