



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

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Παρουσία θαλάσσιων θερμόφιλων βακτηρίων κατά την ψυχρή  
περίοδο του έτους»**

**Καλτσάτου Ηλιάννα  
Παπαδημητρίου Βασιλική**

**ΒΟΛΟΣ 2018**

**«Παρουσία θαλάσσιων θερμόφιλων βακτηρίων κατά την ψυχρή περίοδο του έτους»**

**Διμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

- 1. Κωνσταντίνος Κορμάς,** Καθηγητής, Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπων.*
- 2. Ελένη Γκολομάζου,** Επίκουρη Καθηγήτρια, Προστασία-Ευζωία ιχθύων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος.*

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε όλους όσους μας έδωσαν τη δυνατότητα να δουλέψουμε αυτήν τη διπλωματική εργασία, είτε ανήκουν στο προσωπικό της σχολής είτε όχι, και να είμαστε τώρα στο τέλος των σπουδών μας, στην ευχάριστη θέση να την καταθέτουμε.

Συγκεκριμένα θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον επιβλέποντα αυτής της διπλωματικής, κ. Κωνσταντίνο Κορμά, ο οποίος από την αρχή μας βοήθησε στην επιλογή του κατάλληλου θέματος και μας καθοδήγησε τόσο στη συλλογή πληροφοριών όσο και στη συγγραφή της εργασίας, καθώς και τους συνεργάτες του για τη βοήθεια τους κατά τη διεξαγωγή του πειράματος.

Επίσης θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε το μέλος της εξεταστικής επιτροπής, κα. Ελένη Γκολομάζου, για τον χρόνο που αφιέρωσε στην παρούσα διπλωματική και τις χρήσιμες συμβουλές της.

Τέλος θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τις οικογένειές μας, οι οποίες με την ψυχική τους υποστήριξη, την κατανόηση αλλά και τις πρακτικές συμβουλές, μας βοήθησαν να φθάσουμε επιτυχώς στο τέλος των σπουδών μας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μικροοργανισμοί είναι οι πιο άφθονοι και ποικίλοι οργανισμοί στη Γη και ο ρόλος τους είναι πολύ σημαντικός τόσο για τα φυτά και τα ζώα αλλά και για την υγεία και τη ζωή των ανθρώπων. Συγκεκριμένα η συμμετοχή των θαλάσσιων βακτηρίων σε πολλές θεμελιώδεις διεργασίες στα θαλάσσια ιζήματα, όπως η οξειδωση της οργανικής ύλης, η παραγωγή μεθανίου και άλλων υδρογονανθράκων, η απομάκρυνση των θειικών αλάτων από τον ωκεανό και η εξωκυτταρική ενζυματική υδρόλυση, δείχνει πόσο σημαντική είναι η ύπαρξη τους στο θαλάσσιο περιβάλλον.

Δυστυχώς τα στοιχεία που υπάρχουν μέχρι σήμερα σχετικά με την παγκόσμια μικροβιακή αφθονία και βιογεωγραφία είναι λίγα και μόνο τα τελευταία χρόνια εμφανίζονται έρευνες οι οποίες καταρρίπτουν το μέχρι πρότινος υποστηριζόμενο δόγμα, ότι δηλαδή «όλοι οι μικροοργανισμοί βρίσκονται παντού». Κεντρικό ρόλο στην εύρεση των προτύπων βιογεωγραφίας των θαλάσσιων βακτηρίων κατέχουν τα ενδοσπόρια των θερμόφιλων βακτηρίων, τα οποία καθώς καθιζάνουν παθητικά στο ψυχρό θαλασσινό νερό και δεν υφίστανται περιβαλλοντική επιλογή, είναι ιδανικά για τέτοιου είδους μελέτες. Για αυτό το λόγο διεξήγαμε μια έρευνα στην οποία προσπαθήσαμε να αποδείξουμε την ύπαρξη θερμόφιλων βακτηρίων σε ψυχρό θαλασσινό νερό αλλά και να μετρήσουμε την ακριβή τους αφθονία. Η έρευνα έλαβε μέρος στον Παγασητικό κόλπο, στο λιμάνι του Βόλου.

Για την διεξαγωγή του πειράματος πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο LB και παρακολούθηση της ανάπτυξης των αποικιών για διάρκεια επτά ημερών. Μετά την δειγματοληψία, η οποία έγινε στις αρχές και στα τέλη του χειμώνα, ακολούθησε εμβολιασμός του θρεπτικού υλικού με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: αναραίωτο δείγμα,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ . Οι επώσεις τόσο στις αρχές όσο και στα τέλη του χειμώνα, χωρίστηκαν σε δύο θερμοκρασίες και τα μισά τρυβλία επώστηκαν στους  $12^{\circ}\text{C}$  και τα υπόλοιπα στους  $41^{\circ}\text{C}$ .

Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την ύπαρξη θερμόφιλων βακτηρίων και στις δύο περιόδους που πραγματοποιήθηκε η πειραματική διαδικασία. Έτσι γίνεται κατανοητό, πως αυτά τα θερμόφιλα βακτήρια, τα οποία μπορεί να είναι ενδοσπόρια ή άλλες αδρανείς μορφές βακτηρίων που δεν σχηματίζουν σπόρια, έχουν τη δυνατότητα

μεταφοράς τους από τις πηγές προέλευσής τους μέσω της παθητικής διασποράς στο θαλάσσιο περιβάλλον. Όσον αφορά τον ακριβή αριθμό των θαλάσσιων θερμοφίλων βακτηρίων, η μέγιστη τιμή που βρέθηκε στις αρχές του χειμώνα ήταν 1.200.000 cfu/ml και η αντίστοιχη στα τέλη του χειμώνα ήταν 47.000 cfu/ml. Επίσης το ποσοστό των θερμοφίλων βακτηρίων σε σχέση με τα συνολικά ψυχρόφιλα βακτήρια που επικρατούν στο επιφανειακό θαλασσινό νερό, κατά τους χειμερινούς μήνες, ήταν αρκετά μεγαλύτερο στην αρχή (0,031%) σε σχέση με το τέλος του χειμώνα (0,001%).

**Λέξεις κλειδιά:** *Θερμόφιλα βακτήρια, ενδοσπόρια, θαλασσινό νερό, επιφανειακό νερό, χειμερινή περίοδος.*

# **Occurrence of marine thermophilic bacteria during the cold period of the year**

I. Kaltsatou, V. Papadimitriou

## **ABSTRACT**

Microorganisms are the most abundant and diverse organisms on Earth and their role is very important for plants, animals as well as for the human health and life. In particular, the involvement of marine bacteria in many fundamental processes in marine sediments, such as organic matter oxidation, methane and other hydrocarbon production, removal of sulphates and extracellular enzymatic hydrolysis, shows how important their existence is in marine environment.

Unfortunately, the evidence which are available so far about the global abundance and microbial biogeography is minimum and only recently studies have started to appear that disprove the previously supported dogma, that "all microorganisms are everywhere." The endospores of thermophilic bacteria, which passively pass into the cold sea water and are not under environmental selection, have a decisive role in finding the biogeography patterns of marine bacteria and are ideal for such studies. This is the reason why, we conducted a study in which we tried to prove the existence of thermophilic bacteria in cold sea water but also to measure their abundance. The survey took place in Pagasitikos gulf, in the port of Volos, central Greece.

We conducted cultures in LB agar plates and colony development was monitored for seven days. After sampling, which took place at the beginning and end of winter, the nutrient medium inoculation was followed by the sequential dilution method. The used dilutions are: natural sample and diluted at  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  times. Incubations in both early and late winter were divided into two temperatures and half of the plates were incubated at 12 ° C and the rest at 41 ° C.

The results confirmed the existence of thermophilic bacteria in both the experimental procedures. Thus, it is understood that these thermophilic bacteria, which

may be endospores or other inactive forms of spore-free bacteria, are capable of being transferred from their sources of origin through passive dispersion in the marine environment. Regarding the exact number of marine thermophilic bacteria, the maximum value found at the beginning of winter was 1,200,000 cfu/ml and the equivalent at the end of winter was 47,000 cfu/ml. Also, the percentage of thermophilic bacteria relative to the total psychrophilic bacteria present in surface marine water during the winter months was significantly higher at the beginning (0.031%) than at the end of winter (0.001%).

**Keywords:** *Thermophilic bacteria, endospores, marine water, surface water, winter season*



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	7
2.1. Δειγματοληψία.....	7
2.2. Προετοιμασία θρεπτικού υλικού .....	7
2.3. Εμβολιασμός θρεπτικού υλικού με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων .....	8
2.4. Επώαση και παρακολούθηση των τρυβλίων .....	9
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	10
3.1. Πείραμα στους 12°C (14/12/2016) .....	10
3.2. Πείραμα στους 41°C (13/12/2016) .....	10
3.3. Πείραμα στους 12°C (03/03/2017) .....	11
3.4. Πείραμα στους 41°C (03/03/2017) .....	12
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	14
<i>Ανάπτυξη ψυχρόφιλων βακτηρίων στις αρχές και στα τέλη του χειμώνα. ....</i>	<i>17</i>
<i>Ανάπτυξη θερμοφίλων βακτηρίων στις αρχές και στα τέλη του χειμώνα. ....</i>	<i>20</i>
<i>Σύγκριση ψυχρόφιλων και θερμοφίλων βακτηρίων στις αρχές του χειμώνα. ....</i>	<i>23</i>
<i>Σύγκριση ψυχρόφιλων και θερμοφίλων βακτηρίων στα τέλη του χειμώνα. ....</i>	<i>23</i>
<i>Σύγκριση αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας με δεδομένα προηγούμενων μελετών. ....</i>	<i>24</i>
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	26

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ρόλος των βακτηρίων γενικά είναι πολύ σημαντικός γιατί τα βακτήρια ελέγχουν κύριους βιογεωχημικούς κύκλους θρεπτικών στοιχείων και επηρεάζουν άμεσα τα φυτά, την υγεία των ζώων και των ανθρώπων (Nemergut et al. 2011). Συγκεκριμένα όσον αφορά το θαλασινό νερό, τα βακτήρια συμμετέχουν σε πολλές θεμελιώδεις διεργασίες στα θαλάσσια ιζήματα, όπως η οξείδωση της οργανικής ύλης, η παραγωγή μεθανίου και άλλων υδρογονανθράκων, η απομάκρυνση των θεικών αλάτων από τον ωκεανό (Jørgensen 1982, D'Hondt et al. 2004, Hinrichs et al. 2006) και η εξωκυτταρική ενζυματική υδρόλυση (Hubert et al. 2010). Αν και ο ρόλος τους στο θαλάσσιο περιβάλλον είναι τόσο σημαντικός, μέχρι και σήμερα οι διάφοροι ερευνητές δεν έχουν καταφέρει να καταλήξουν σε μια συγκεκριμένη τιμή για την παγκόσμια ιζηματογενή μικροβιακή αφθονία.

Επίσης αν και οι μικροοργανισμοί γενικά αλλά και τα βακτήρια στη συγκεκριμένη περίπτωση, είναι οι πιο άφθονοι και ποικίλοι οργανισμοί στη Γη (Whitman et al. 1998), σχετικά λίγα είναι γνωστά για τα πρότυπα ή τον έλεγχο της μικροβιακής κατανομής τους εντός και μεταξύ των μεγάλων τύπων οικοτόπων του πλανήτη (Nemergut et al. 2011). Ένας από τους κύριους λόγους που ακόμα και σήμερα δεν υπάρχουν αυτές οι πληροφορίες είναι γιατί μέχρι πρόσφατα, οι μεθοδολογικοί περιορισμοί απέτρεψαν τη διεξαγωγή δοκιμών μεγάλης κλίμακας σχετικά με το πού υπάρχουν ορισμένοι μικροοργανισμοί και γιατί (Hugenholtz et al. 1998, Prosser et al. 2007).

Βέβαια ο κυριότερος ίσως λόγος είναι ότι μέχρι πρότινος θεωρούνταν ότι δεν μπορεί να υπάρξει «μικροοργανισμική βιογεωγραφία». Η άποψη αυτή υποστηρίζονταν από το γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί λόγω (1) του μικρού τους μεγέθους, (2) της τεράστιας αφθονίας τους, (3) των ελάχιστων γεωγραφικών εμποδίων και (4) της ανάμιξης και κυματισμού του νερού (Collins 2001), διασπείρονται ευκολότερα από κάθε άλλο οργανισμό, ή με άλλα λόγια «όλοι οι μικροοργανισμοί βρίσκονται παντού» (Dolan, 2006). Ωστόσο ένας όλο και αυξανόμενος αριθμός εργασιών φαίνεται να καταρρίπτουν το δόγμα «όλοι οι μικροοργανισμοί βρίσκονται παντού» (Oda et al. 2003, Giovannoni & Stingl 2005, Martiny et al. 2006), το οποίο είχε επικεντρωθεί σε θαλάσσια περιβάλλοντα (Ionescu et al. 2010) και να υποστηρίζουν την ύπαρξη

ενδημικών ειδών και διακριτών κατανομών taxa μικροοργανισμών στην ανώτερη υδάτινη στήλη των ωκεανών ( Rocop et al. 2003, Selje et al. 2004, Taylor et al. 2005, Bouman et al. 2006, Pommier et al. 2007) αλλά και σε όλα τα ενδιαιτήματα (Nemergut et al. 2011).

Η επιλογή ενός ενδιαιτήματος από μία ή και πολλές ομάδες βακτηρίων, γίνεται κυρίως με κριτήρια τις περιβαλλοντικές παραμέτρους που επικρατούν σε αυτό το ενδιαιτήμα και οι οποίες θα επιτρέψουν στον πληθυσμό των βακτηρίων, όχι μόνο να επιβιώσει αλλά και να αναπαραχθεί και να αναπτυχθεί. Η θερμοκρασία ως περιβαλλοντική παράμετρος ασκεί μεγάλη επίδραση στους μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί εμφανίζουν ποικίλα θερμοκρασιακά εύρη αύξησης καθώς και βέλτιστες τιμές θερμοκρασιακής αύξησης, στις οποίες εμφανίζουν το μέγιστο τάχος αύξησης και αναπαραγωγής. Οι μικροοργανισμοί έχουν επίσης και ελάχιστες τιμές θερμοκρασίας κάτω από τις οποίες είναι μεταβολικώς ανενεργοί καθώς και ανώτερες τιμές θερμοκρασίας κάτω από τις οποίες η αύξηση δεν είναι δυνατή. Ανάλογα με το θερμοκρασιακό εύρος αντοχής οι μικροοργανισμοί διακρίνονται σε ψυχρόφιλους, μεσόφιλους, θερμόφιλους και υπερθερμόφιλους (Πίν. 1) (Κορμάς 2010).

**Πίνακας 1:** Θερμοκρασιακά εύρη μικροοργανισμών (Κορμάς 2010).

	Εύρος (°C)
<b>Ψυχρόφιλοι</b>	0-20
<b>Μεσόφιλοι</b>	20-40
<b>Θερμόφιλοι</b>	40-80
<b>Υπερθερμόφιλοι</b>	80-121

Εφόσον οι συνθήκες είναι ιδανικές τα βακτήρια προσαρμόζονται και έτσι ξεκινάει η μικροβιακή αύξηση. Με τον όρο μικροβιακή αύξηση εννοούμε την αύξηση στον αριθμό των μικροβιακών κυττάρων, η οποία μπορεί επίσης να προσδιοριστεί ως αύξηση της μικροβιακής μάζας. Κάθε μικροβιακή αύξηση χαρακτηρίζεται από ένα συγκεκριμένο ρυθμό αύξησης ο οποίος είναι η μεταβολή του αριθμού των κυττάρων ή της κυτταρικής μάζας ανά μονάδα χρόνου. Επίσης ο χρόνος που απαιτείται για να σχηματιστούν δύο κύτταρα από ένα προϋπάρχον ονομάζεται χρόνος γενεάς ή χρόνος διπλασιασμού. Ο χρόνος γενεάς ποικίλλει από οργανισμό σε οργανισμό και ως κάποιος

βαθμό εξαρτάται από το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται και από τις συνθήκες της καλλιέργειας (Madigan et al. 2013).

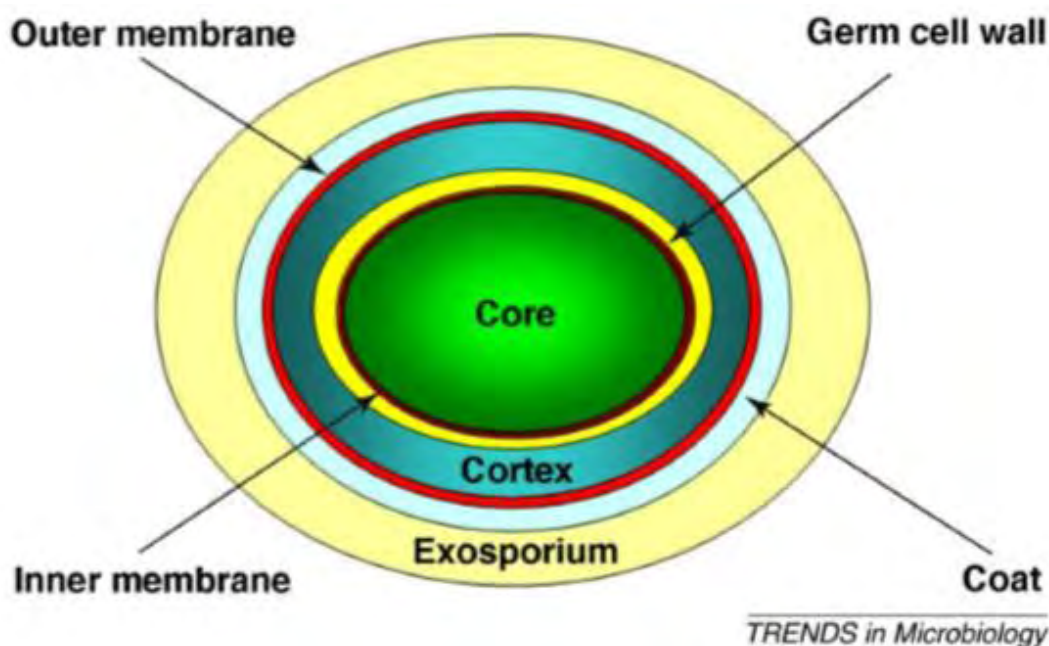
Ο κύκλος αύξησης ενός μικροβιακού πληθυσμού, σε ένα κλειστό σύστημα καλλιέργειας, αποτελείται από τέσσερις επιμέρους φάσεις που φέρουν τις ονομασίες φάση υστέρησης, φάση εκθετικής αύξησης, στάσιμη φάση και φάση θανάτου. Όλες αυτές οι φάσεις μαζί σχηματίζουν τη καμπύλη αύξησης ενός βακτηριακού πληθυσμού. Η ανάπτυξη ενός βακτηριακού πληθυσμού δεν αρχίζει αμέσως μετά την τοποθέτηση του σε φρέσκο θρεπτικό υλικό αλλά ύστερα από μια περίοδο που ονομάζεται φάση υστέρησης και η οποία ποικίλλει ανάλογα με το ιστορικό και τις συνθήκες της καλλιέργειας. Στην φάση εκθετικής αύξησης ο ρυθμός αύξησης των κυττάρων είναι αργός στην αρχή αλλά κατόπιν αυξάνεται και επηρεάζεται από περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς και από γενετικά χαρακτηριστικά του ίδιου του οργανισμού (Madigan et al. 2013).

Σε μια κλειστή καλλιέργεια η εκθετική αύξηση δεν μπορεί να συμβαίνει επ'άοριστον. Αυτό που συμβαίνει συνήθως και περιορίζει την αύξηση του πληθυσμού είναι είτε (1) η εξάντληση ενός ουσιώδους θρεπτικού συστατικού από το καλλιεργητικό μέσο, είτε (2) κάποιο άχρηστο κατάλοιπο των λειτουργιών του οργανισμού συσσωρεύεται σε τέτοιο επίπεδο ώστε να δρα ανασταλτικά και να τερματίζει την εκθετική αύξηση, είτε συμβαίνουν και τα δύο. Σε αυτό το σημείο ο πληθυσμός έχει φθάσει στη στάσιμη φάση. Αν η επώαση συνεχίζεται και αφού ο πληθυσμός φθάσει στη στάσιμη φάση, τα κύτταρα μπορεί είτε να παραμείνουν ζωντανά και να συνεχίζουν τον μεταβολισμό, είτε να νεκρωθούν. Αν συμβεί αυτό, τότε ο πληθυσμός βρίσκεται στη φάση θανάτου που είναι και η τελική φάση (Madigan et al. 2013).

Σε περιπτώσεις δυσμενών συνθηκών, ορισμένα είδη θετικών κατά Gram βακτηρίων, έχουν τη δυνατότητα παραγωγής ειδικών ενδοκυτταρικών δομών που καλούνται ενδοσπόρια. Τα ενδοσπόρια είναι διαφοροποιημένα κύτταρα, με ιδιαίτερη αντοχή στις υψηλές θερμοκρασίες και σε άλλες δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες και ανθεκτικότητα πολύ μεγαλύτερη από τα συνήθη κύτταρα. Τα ενδοσπόρια μπορούν να επιβιώσουν σε λανθάνουσα φάση, για εξαιρετικά μεγάλες χρονικές περιόδους. Εντυπωσιακό παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση αλόφιλων ενδοσπορίων βακτηρίων τα οποία παγιδεύτηκαν σε αλατούχα διαλύματα κατά το σχηματισμό κρυστάλλου που χρονολογείται από την Πέρμια περίοδο και παρέμειναν σε βιώσιμη κατάσταση καθ'

όλο το χρονικό διάστημα που μεσολάβησε, δηλαδή για τουλάχιστον 250 εκατομμύρια χρόνια (Vreeland et al. 2000).

Τα ενδοσπόρια ονομάζονται έτσι διότι το σπόριο σχηματίζεται μέσα στο κύτταρο. Η δομή του σπορίου (Εικ. 1) διαφέρει σημαντικά από αυτή του βλαστητικού κυττάρου (Henriques and Moran 2007), καθώς το σπόριο είναι δομικά πολυπλοκότερο και διαθέτει πολλές στιβάδες που απουσιάζουν από το βλαστητικό κύτταρο. Η εξώτατη στιβάδα, δηλαδή το εξωσπόριο περικλείει τους σποριομανδύες, που συνίσταται από στιβάδες ειδικών πρωτεϊνών. Κάτω από τον σποριομανδύα είναι ο φλοιός και εσωτερικότερα βρίσκεται ο σποριοπυρήνας, που περιέχει το σύνθηες κυτταρικό τοίχωμα, κυτταροπλασματική μεμβράνη, κυτταρόπλασμα, πυρηνοειδές κ.ο.κ. Τα σπόριο επομένως διαφέρει από το βλαστικό κύτταρο κυρίως ως προς τα είδη των δομών που βρίσκονται εξωτερικά του τοιχώματος του σποριοπυρήνα (Madigan et al. 2013).



**Εικόνα 1:** Δομή ενός βακτηριακού σπορίου (Setlow, 2007).

Παράλληλα ο σποριοπυρήνας του ώριμου ενδοσπορίου διαφέρει σημαντικά από το βλαστικό κύτταρο από το οποίο προέρχεται. Αρχικά περιέχει διπικολινικό οξύ το οποίο είναι μια χημική ουσία η οποία είναι χαρακτηριστική των ενδοσπορίων. Η κατάσταση του σποριοπυρήνα είναι μερικώς αφυδατωμένη καθώς περιέχει 10-30% της ποσότητας νερού που περιέχει το βλαστικό κύτταρο. Αυτή η αφυδάτωση του

σποριοπυρήνα είναι που αυξάνει σημαντικά τη θερμοανθεκτικότητα του ενδοσπορίου. Επίσης το pH του κυτταροπλάσματος του σποριοπυρήνα είναι μία μονάδα περίπου χαμηλότερο από το pH του βλαστητικού κυττάρου και περιέχει υψηλά επίπεδα ειδικών πρωτεϊνών, γνωστών ως SASP (Madigan et al. 2013).

Αν και η όλη διαδικασία σχηματισμού ενδοσπορίου έχει αναλυθεί σε λίγα μόνο είδη *Bacillus* και *Clostridium* (Setlow 2003, Setlow 2007, Setlow 2014), έχει διαπιστωθεί ότι είκοσι περίπου γένη θετικών κατά Gram βακτηρίων έχουν την ικανότητα σχηματισμού ενδοσπορίων (Madigan et al. 2013). Το ψυχρό επιφανειακό θαλασσινό νερό και τα ψυχρά θαλάσσια ιζήματα φιλοξενούν συνήθως ενδοσπόρια των ζυμωτικών και των θειοαναγωγικών, θερμόφιλων βακτηρίων (Volpi et al. 2017). Τα θειοαναγωγικά θερμόφιλα ενδοσπόρια συνδέονται κυρίως με το γένος *Desulfotomaculum* της οικογένειας *Peptococcaceae* (Isaksen et al. 1994, Hubert et al. 2009, Hubert et al. 2010, de Rezende et al. 2013, Müller et al. 2014, Sullivan et al. 2015). Τα ζυμωτικά βακτήρια συνδέονται κυρίως με το γένος *Clostridium* (Madigan et al. 2013).

Και τα δύο γένη βακτηρίων που εμφανίζονται κυρίως στο ψυχρό επιφανειακό θαλασσινό νερό είναι μέλη του φύλου *Firmicutes*, το οποίο είναι το μόνο φύλο που έχει τη δυνατότητα σχηματισμού ανθεκτικών στη θερμότητα ενδοσπορίων (Green and Cutting 1999, Galperin et al. 2012) και το δεύτερο πιο άφθονο φύλο που εκπροσωπείται στις συλλογές βακτηριακών καλλιιεργειών (Wunderlin et al. 2014). Γενικά η εμφάνιση θερμόφιλων ενδοσπορίων του φύλου *Firmicutes* σε τέτοια περιβάλλοντα φαίνεται να είναι ο κανόνας και όχι η εξαίρεση (Bartholomew and Paik 1966, Isaksen et al. 1994, Thamdrup et al. 1998, Vandieken et al. 2006b, Mathis et al. 2008, Hubert et al. 2009).

Όπως φαίνεται, κύριο εργαλείο για την επιβίωση των μικροοργανισμών στις αντίξοες συνθήκες, είναι η αδράνεια. Η αδράνεια η οποία είναι μια αναστρέψιμη κατάσταση μειωμένης μεταβολικής δραστηριότητας (Lennon & Jones 2011), επιτρέπει στον πληθυσμό να διατηρεί μια δεξαμενή γενετικής και φαινοτυπικής ποικιλίας (δηλαδή μια τράπεζα σπορίων) που μπορεί να συμβάλει στη μακροπρόθεσμη επιβίωση του (Shoemaker & Lennon 2018). Το πιο γνωστό παράδειγμα της αδράνειας είναι το ενδοσπόριο, αλλά και τα είδη που δεν δημιουργούν σπόρια πιστεύεται ότι έχουν τη δική τους αδρανή κατάσταση (Erstein 2009). Η μελέτη της αδρανούς κατάστασης των ειδών που δεν έχουν την ικανότητα σχηματισμού σπορίων, βρίσκεται ακόμη σε πρώιμα

στάδια. Αυτό συμβαίνει κυρίως γιατί αυτοί οι μικροοργανισμοί έχουν διαφορετικό μηχανισμό αναβίωσης από εκείνους στους οποίους είμαστε συνηθισμένοι (Erstein 2009). Η αναβίωση τους όπως αποδεικνύεται είναι αποτέλεσμα στοχαστικών συμβάντων χαμηλής συχνότητας που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια μιας μακράς χρονικής περιόδου και ανεξάρτητα από περιβαλλοντικές ενδείξεις (Buerger et al. 2012).

Τα ενδοσπόρια πέρα από το μορφολογικό ενδιαφέρον που παρουσιάζουν, χρησιμοποιούνται ως ιχνηθέτες για τη μελέτη της επίδρασης της διασποράς από τα ωκεάνια ρεύματα στη βιογεωγραφία των θαλάσσιων μικροοργανισμών (Müller et al. 2014). Οι μικροοργανισμοί εμφανίζουν ξεχωριστά βιογεωγραφικά πρότυπα (Foissner 2006, Green and Bohannan 2006, Martiny et al. 2006, Ramette and Tiedje 2007, Lindstrom and Langenheder 2012), τα οποία επηρεάζονται από τις συνδυασμένες επιδράσεις της παθητικής διασποράς και της περιβαλλοντικής επιλογής. Τα θερμοφιλά βακτήρια δεν μπορούν να αναπτυχθούν στον κρύο βυθό και έτσι τα αδρανή σπόρια τους δεν υπόκεινται σε περιβαλλοντική επιλογή. Έτσι η παθητική τους καθίζηση στο ψυχρό θαλασσινό νερό τα καθιστά ιδανικά για μελέτες τέτοιου είδους. Η μελέτη της μικροβιακής βιογεωγραφίας απασχολεί όλο και περισσότερες έρευνες τα τελευταία χρόνια (Ramette and Tiedje 2007) γιατί η κατανόηση ενός τέτοιου τομέα μπορεί να προσφέρει οφέλη σε πολλούς ερευνητικούς τομείς.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής ήταν η διαπίστωση της παρουσίας και καταμέτρησης των καλλιεργήσιμων θερμοφίλων βακτηρίων στην επιφάνεια του θαλασσινού νερού, κατά την ψυχρή περίοδο του έτους.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Δειγματοληψία

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στο λιμάνι του Βόλου και έγινε δύο φορές, στις 12/12/2016 και στις 01/03/2017. Κατά την δειγματοληψία χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένη φιάλη των 500 ml, μέσα στην οποία συλλέχθηκε θαλασσίνο νερό. Μετά την συλλογή του, το δείγμα μεταφέρθηκε στο εργαστήριο και τοποθετήθηκε στο ψυγείο μέχρι την διαδικασία του εμβολιασμού (<1 ημέρα).

### 2.2. Προετοιμασία θρεπτικού υλικού

Για την διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό Luria Bertani (35 g/l). Για την παρασκευή υγρού θρεπτικού υλικού χρησιμοποιήθηκαν δύο δοχεία των 400 ml. Σε κάθε δοχείο τοποθετήθηκαν 14 gr θρεπτικού υλικού με την προσθήκη 400 ml απιονισμένου νερού. Έπειτα ακολούθησε ανάδευση των δοχείων για την καλύτερη διάλυση του θρεπτικού υλικού.

Η αποστείρωση του θρεπτικού υλικού πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ενός αυτόκαυστου και το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν για 15 λεπτά στους 121°C. Μετά το τέλος της αποστείρωσης τα δοχεία με το θρεπτικό υλικό, τοποθετήθηκαν στον πάγκο του εργαστηρίου για μερικά λεπτά, προκειμένου να κρυώσουν λίγο πριν την τοποθέτηση του θρεπτικού υλικού στα τρυβλία.

Έπειτα από την αποστείρωση του πάγκου με αιθανόλη, ακολούθησε η τοποθέτηση του θρεπτικού υλικού στα τρυβλία. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής, ένα αναμμένο φλόγιστρο ήταν τοποθετημένο δίπλα στα τρυβλία, έτσι ώστε να διατηρούνται ασηπτικές συνθήκες. Η ιδανική ποσότητα θρεπτικού υλικού που πρέπει να περιέχουν τα τρυβλία, είναι τόση ώστε να καλύπτεται ο πυθμένας του τρυβλίου (ca. 10 ml). Στην συνέχεια τα τρυβλία με το θρεπτικό υλικό τοποθετήθηκαν στον πάγκο, όπου και παρέμειναν για περίπου 30 λεπτά, μέχρι να στερεοποιηθεί το θρεπτικό υλικό.

Στο τέλος της διαδικασίας πραγματοποιήθηκε η μεταφορά των τρυβλίων στις πλαστικές σακούλες από τις οποίες πάρθηκαν εξαρχής και η αποθήκευσή τους στο ψυγείο μέχρι τη διαδικασία του εμβολιασμού.



Η ίδια διαδικασία για την προετοιμασία του θρεπτικού υλικού, όπως περιγράφηκε παραπάνω, χρησιμοποιήθηκε τόσο για το πρώτο όσο και για το δεύτερο πείραμα.

### 2.3. Εμβολιασμός θρεπτικού υλικού με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 36 τρυβλία για το πρώτο δείγμα και άλλα τόσα για το δεύτερο δείγμα. Από αυτά, τα 18 επώστηκαν στους 12°C και τα άλλα 18 στους 41°C. Έπειτα τα 18 τρυβλία ομαδοποιήθηκαν σε έξι ομάδες των τριών, με κάθε μία ομάδα να αντιπροσωπεύει μια διαφορετική αραιώση. Οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: αναραιώτο δείγμα και αραιωμένο κατά  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  φορές. Ο ίδιος διαχωρισμός χρησιμοποιήθηκε και για τα 36 τρυβλία του δεύτερου δείγματος.

Για την παρασκευή του εμβολίου χρησιμοποιήθηκαν έξι διαφορετικοί σωλήνες erpendorf, μέσα στους οποίους δημιουργήθηκαν οι έξι διαφορετικές αραιώσεις του. Αρχικά 1 ml νερό δείγματος τοποθετήθηκε στον πρώτο σωλήνα (αναραιώτο δείγμα). Σε κάθε ένα από τους υπόλοιπους πέντε σωλήνες τοποθετήθηκαν 900 μl διηθημένο θαλασσινό νερό, με φίλτρο 0,2 μm αλλά και αποστειρωμένο στο αυτόκαυστο για 10 λεπτά στους 121°C. Έπειτα με τη χρήση πιπέτας, 100 μl δείγματος αφαιρέθηκαν από το αναραιώτο δείγμα και προστέθηκαν στο δεύτερο σωλήνα, δημιουργώντας την αραιώση  $10^{-1}$ . Έτσι με τον ίδιο τρόπο, δηλαδή αφαιρώντας διαδοχικά 100 μl από τον κάθε σωλήνα και προσθέτοντας τα στον επόμενο, δημιουργήθηκαν και οι υπόλοιπες αραιώσεις του εμβολίου.

Κατά τη μεταφορά του εμβολίου στο θρεπτικό υλικό, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν ξανά δίπλα σε ένα αναμμένο φλόγιστρο, έτσι ώστε να διατηρούνται ασηπτικές συνθήκες. Με τη χρήση πιπέτας, 100 μl εμβολίου πάρθηκαν από τον κάθε σωλήνα και μεταφέρθηκαν στο θρεπτικό υλικό του κάθε τρυβλίου με την αντίστοιχη αραιώση. Προκειμένου να ξεχωρίζουμε την αραιώση του εμβολίου που περιέχεται σε κάθε τρυβλίο, αυτή αναγράφεται στα τοιχώματα του κάτω μέρους του.

Κατά την επιστροφή του εμβολίου στο θρεπτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε ράβδος επιστροφής. Αφού αποστειρώθηκε, περνώντας μέσα από την φωτιά, τοποθετήθηκε στην απέναντι πλευρά από εκείνη που είχε τοποθετηθεί το εμβόλιο,

προκειμένου να κρυώσει. Στο τέλος και με τη χρήση απαλών κυκλικών κινήσεων έγινε η διασπορά και η επίστρωση του εμβολίου.

Ο εμβολιασμός του θρεπτικού υλικού για το πρώτο δείγμα έγινε στις εξής ημερομηνίες: Τα τρυβλία που επώαστηκαν στους 41°C, εμβολιάστηκαν στις 12/12/2016 ενώ τα τρυβλία που επώαστηκαν στους 12°C, εμβολιάστηκαν στις 13/12/2016. Όσον αφορά τον εμβολιασμό του θρεπτικού υλικού του δεύτερου δείγματος, αυτός έγινε στις 02/03/2017, τόσο για τα τρυβλία που επώαστηκαν στους 41°C όσο και για τα τρυβλία που επώαστηκαν στους 12°C.

Η ίδια διαδικασία για τον εμβολιασμό του θρεπτικού υλικού, όπως περιγράφηκε παραπάνω, χρησιμοποιήθηκε τόσο για το πρώτο όσο και για το δεύτερο πείραμα.

#### 2.4. Επώαση και παρακολούθηση των τρυβλίων

Αμέσως μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας του εμβολιασμού, τα τρυβλία κλείστηκαν και μεταφέρθηκαν στους επωαστήρες για την έναρξη της επώασης. Για τη διαδικασία της επώασης χρησιμοποιήθηκαν δύο επωαστήρες, οι οποίοι ρυθμίστηκαν σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι δύο διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης ήταν οι 12°C και οι 41°C και έτσι τα μισά τρυβλία επώαστηκαν στην πρώτη και τα άλλα μισά στη δεύτερη θερμοκρασία.

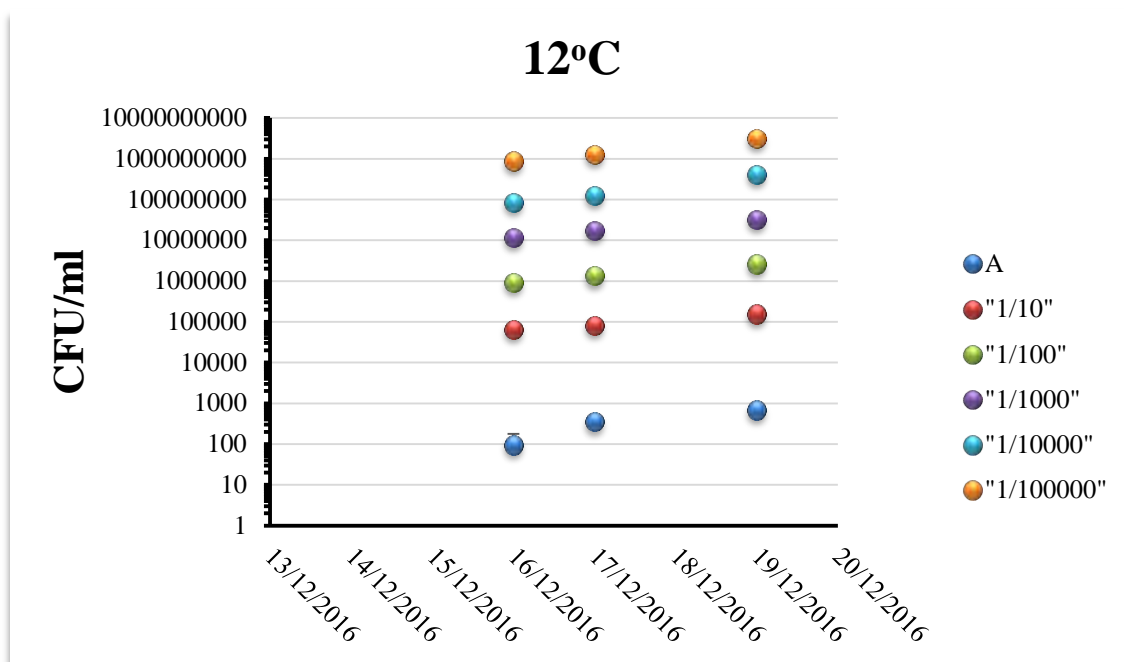
Έπειτα από την έναρξη της επώασης, ξεκίνησε η παρακολούθηση των τρυβλίων για τη δημιουργία αποικιών. Η παρακολούθηση διήρκεσε επτά ημέρες και ο έλεγχος των τρυβλίων γινόταν μία φορά την ημέρα, την ίδια ώρα.

Η ίδια διαδικασία για την επώαση και την παρακολούθηση των τρυβλίων, όπως περιγράφηκε παραπάνω, χρησιμοποιήθηκε τόσο για το πρώτο όσο και για το δεύτερο πείραμα.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Πείραμα στους 12°C (14/12/2016)

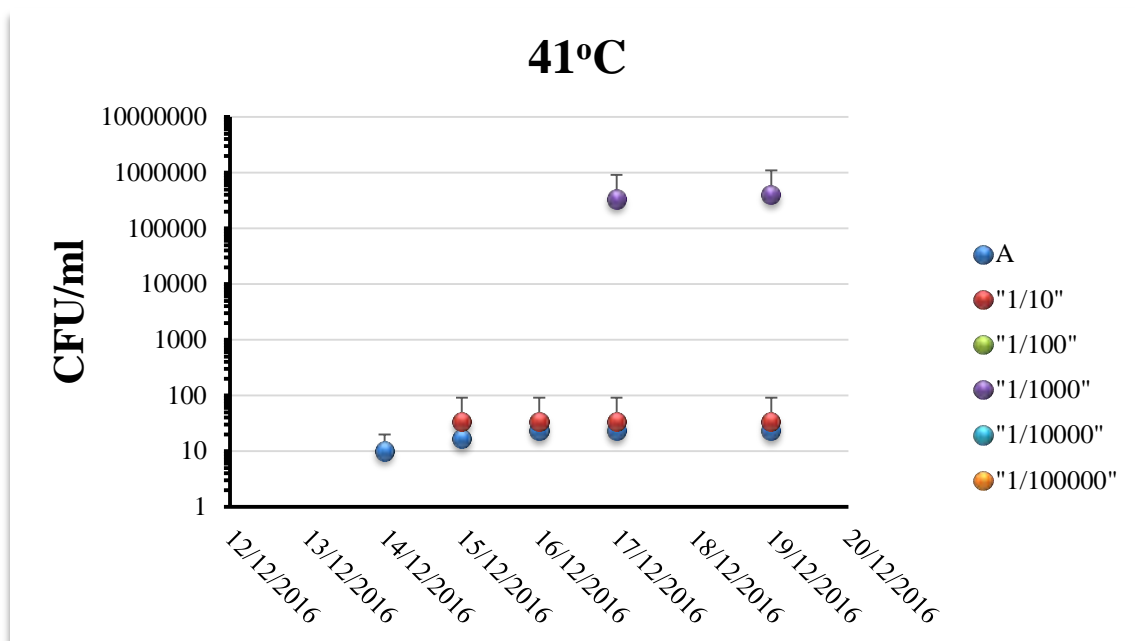
Τις δύο πρώτες μέρες του πειράματος (14/12 και 15/12) δεν υπήρξε καμία ανάπτυξη αποικιών. Στις 16/12 παρατηρήθηκαν οι πρώτες αποικίες σε όλα τα τρυβλία, οι οποίες και συνέχισαν την ανάπτυξη τους μέχρι την τελευταία ημέρα της παρακολούθησης (19/12/2016). Πιο συγκεκριμένα στο αναρραίοτο δείγμα σημειώθηκαν οι λιγότερες αποικίες, οι οποίες ήταν περίπου 677 cfu/ml. Όλες οι υπόλοιπες αραιώσεις εμφάνισαν πολύ μεγαλύτερη ανάπτυξη αποικιών. Την μεγαλύτερη ανάπτυξη εμφάνισε η αραιώση  $10^{-5}$  με κατά μέσο όρο 3.093.666.667 cfu/ml.



**Σχήμα 1:** Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της βακτηριακής ανάπτυξης από τις 14/12/2016 έως 19/12/2016 στους 12°C. Ο άξονας y είναι σε λογαριθμική κλίμακα. Όπου A=Αναρραίοτο δείγμα.

#### 3.2. Πείραμα στους 41°C (13/12/2016)

Σε αυτήν την πειραματική διαδικασία, υπήρξε σχεδόν μηδενική ανάπτυξη αποικιών. Στο αναρραίοτο δείγμα (AA), στις 15/12 αναπτύχθηκαν 10 cfu/ml, οι οποίες και παρέμειναν στον ίδιο αριθμό μέχρι και το τέλος της διεξαγωγής του πειράματος (19/12/2016). Στα υπόλοιπα αναρραιώτα δείγματα AB και AC, καταγράφηκαν στις 14/12, 20 και 10 cfu/ml αντίστοιχα, που αναπτύχθηκαν και αυξήθηκαν σε 30 cfu/ml μέχρι την τελευταία μέρα. Η αραιώση  $10^{-1}$  B ακολούθησε ίδια πορεία ανάπτυξης με το αναρραίοτο δείγμα (AA), καθώς στις 15/12 εμφάνισε 100 cfu/ml και τις διατήρησε στον ίδιο αριθμό μέχρι το τέλος της παρακολούθησης. Τέλος, στην αραιώση  $10^{-3}$  B αναπτύχθηκαν σχετικά καθυστερημένα (17/12/2016) 1.000.000 cfu/ml, φτάνοντας στην τελευταία μέρα σε 1.200.000 cfu/ml.

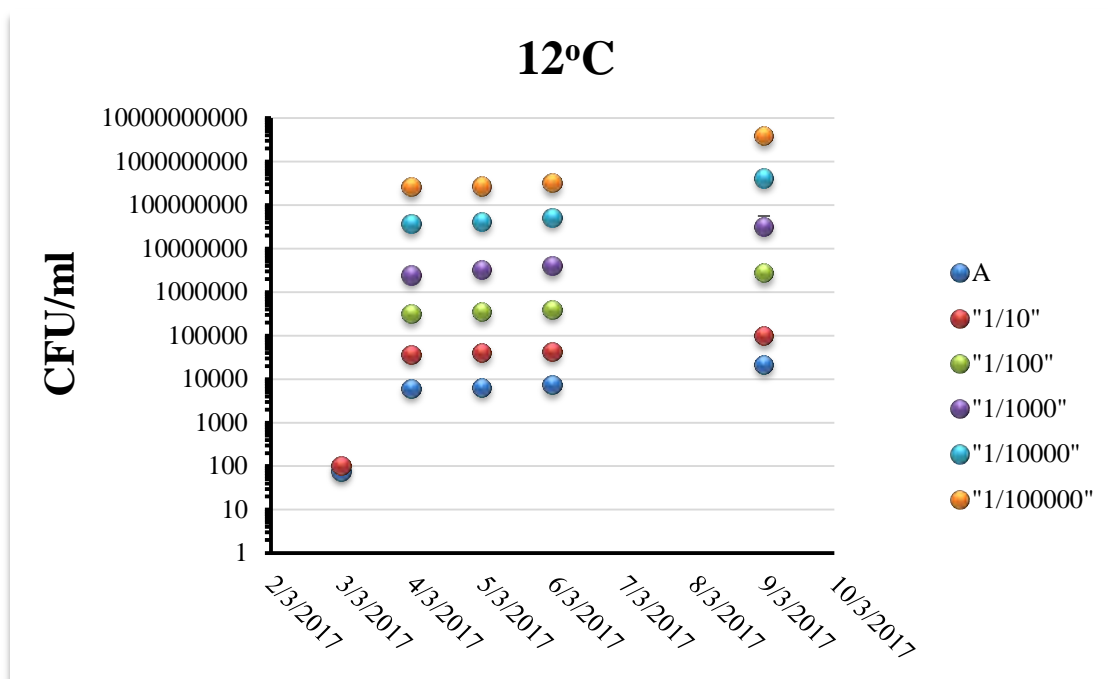


**Σχήμα 2:** Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της βακτηριακής ανάπτυξης από τις 13/12/2016 έως 19/12/2016 στους 41°C. Ο άξονας y είναι σε λογαριθμική κλίμακα. Όπου A=Αναρραίοτο δείγμα.

### 3.3. Πείραμα στους 12°C (03/03/2017)

Σε αυτήν την περίοδο, παρατηρήθηκαν αποικίες από την πρώτη κιόλας ημέρα διεξαγωγής του πειράματος, και συγκεκριμένα στα τρυβλία με το αναρραίοτο δείγμα

καθώς και στο τρυβλίο  $10^{-1}$  B. Την επόμενη μέρα όλα τα τρυβλία είχαν απότομη ανάπτυξη αποικιών σε όλη την επιφάνειά τους. Στη λήξη του πειράματος (9/3/2017), το αναρραίοτο δείγμα εμφάνισε τις λιγότερες αποικίες με μέση τιμή τις 21.670 cfu/ml. Περισσότερες αποικίες εμφάνισε η αραιώση  $10^{-5}$  με μέση τιμή τις 3.948.000.000 cfu/ml.

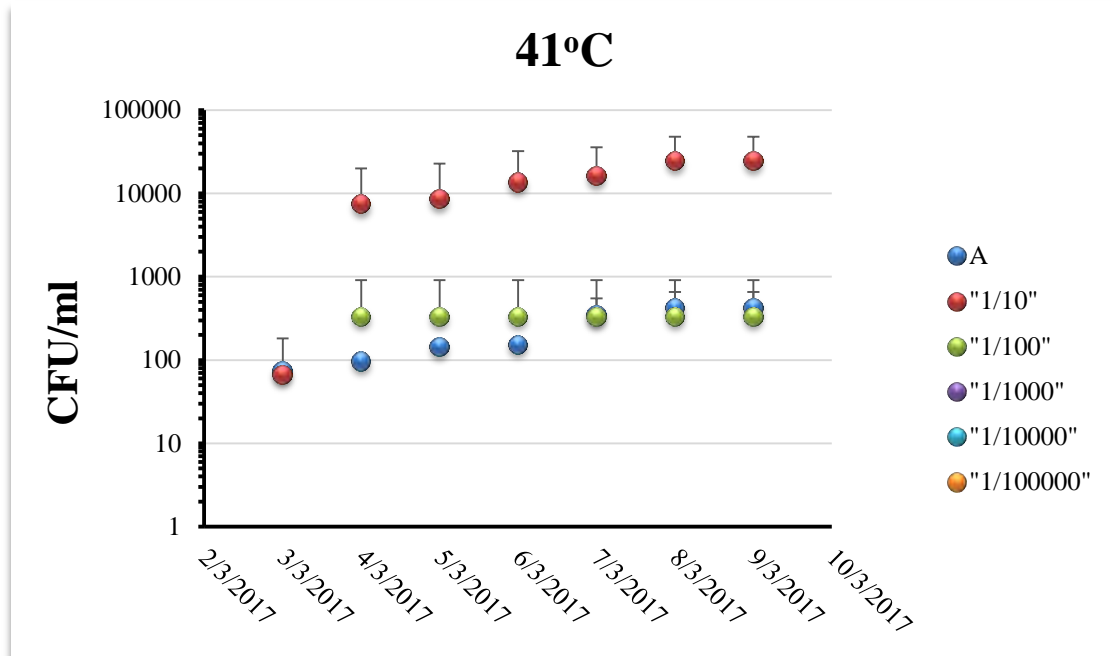


**Σχήμα 3:** Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της βακτηριακής ανάπτυξης από τις 03/03/2017 έως 09/03/2017 στους 12°C. Ο άξονας y είναι σε λογαριθμική κλίμακα. Όπου A=Αναρραίοτο δείγμα.

#### 3.4. Πείραμα στους 41°C (03/03/2017)

Στην συγκεκριμένη θερμοκρασία, σε τρυβλία αραιώσης από  $10^{-2}$  μέχρι  $10^{-5}$  (εκτός του τρυβλίου  $10^{-2}$  B που αναπτύχθηκαν 1.000 cfu/ml και διατήρησαν τον ίδιο αριθμό μέχρι το τέλος του πειράματος) δεν υπήρξε καμία ανάπτυξη. Στο αναρραίοτο δείγμα παρουσιάστηκαν με κατά μέσο όρο 427 cfu/ml, την τελευταία ημέρα της παρακολούθησης (09/03/2017), σε αντίθεση με τα τρυβλία  $10^{-1}$  A και  $10^{-1}$  B με 26.500 cfu/ml και 47.000 cfu/ml αντίστοιχα. Σε αντίθεση έρχεται η ανάπτυξη στο τρυβλίο  $10^{-1}$

C, στο οποίο παρουσιάστηκαν 200 cfu/ml στις 04/03 και συνέχισαν με τον ίδιο αριθμό αποικιών μέχρι την τελευταία ημέρα.



**Σχήμα 4:** Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της βακτηριακής ανάπτυξης από τις 03/03/2017 έως 09/03/2017 στους 41°C. Ο άξονας y είναι σε λογαριθμική κλίμακα. Όπου A=Αναραίωτο δείγμα.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, σκοπός της παρούσας διπλωματικής ήταν η εύρεση θερμοφίλων βακτηρίων στο επιφανειακό θαλασσίνο νερό κατά τους χειμερινούς μήνες. Σύμφωνα με έρευνες που έχουν γίνει, τα θερμοφιλά βακτήρια που έχουν βρεθεί σε τέτοια περιβάλλοντα, είναι αδρανείς μορφές αυτών των βακτηρίων γνωστές και ως ενδοσπόρια. Τουλάχιστον όμως από το 1920 υπάρχουν υποψίες, πως ακόμα και τα βακτήρια που δεν σχηματίζουν σπόρια, έχουν τη δική τους αδρανή κατάσταση (Erstein 2009). Η φύση μιας τέτοιας κατάστασης ακόμα και σήμερα παραμένει άγνωστη (Buerger et al. 2012). Βέβαια το να διαχωρίσουμε ποσοτικά τους δραστικούς από τους αδρανείς μικροβιακούς πληθυσμούς σε περιβαλλοντικά δείγματα, θεωρείται πρόκληση (de Rezende et al. 2017). Το γεγονός αυτό ενισχύεται σε μικροβιακά είδη που δεν σχηματίζουν σπόρια αλλά δεν αποκλείει τα θερμοφιλά βακτήρια που έχουν βρεθεί σε ψυχρό επιφανειακό θαλασσίνο νερό, πέρα από αδρανή ενδοσπόρια να είναι αδρανείς μορφές βακτηρίων που δεν σχηματίζουν σπόρια.

Τα θερμοφιλά βακτήρια που βρίσκονται στο ψυχρό θαλασσίνο νερό, δεν αναπτύσσονται φυσικά σε αυτό το περιβάλλον αλλά υπάρχουν ως μεταβολικά αδρανείς μορφές οι οποίες απλώς επιβιώνουν. Η ύπαρξη θερμοφίλων ενδοσπορίων πιστεύεται ότι προκύπτει από παθητική διασπορά από θερμότερα περιβάλλοντα (Hubert et al. 2009). Τέτοια πιθανά περιβάλλοντα μπορεί να είναι γεωθερμικές και ορυκτές πηγές, γεωτρήσεις (Filippidou et al. 2016) αλλά και θερμές πηγές οι οποίες είναι γεωγραφικά απομονωμένες σε νησιά (Parke et al. 2003), σαν και αυτές που υπάρχουν στη Μήλο. Ωστόσο, τα αναερόβια θερμοφιλά ενδοσπόρια ανήκουν σε ταξινομικές ομάδες που παρατηρούνται επίσης σε θερμούς ωκεάνιους φλοιούς και σε θαλάσσιες δεξαμενές πετρελαίου κάτω από την επιφάνεια της γης και είναι πιθανό να διαχέονται συνεχώς από αυτά τα περιβάλλοντα στην υπερκείμενη στήλη του ύδατος (Hubert et al. 2009, Aüllo et al. 2013, de Rezende et al. 2013).

Εάν βρεθούν σε ιδανικές συνθήκες, μπορούν γρήγορα να μετατραπούν από αδρανή σε πλήρως ενεργά (βλαστητικά) κύτταρα, σύμφωνα με μια συγκεκριμένη διαδικασία (Sinai et al. 2015) και να αρχίσουν την ανάπτυξη τους. Αυτό συνήθως συμβαίνει σε πειράματα επώασης σε θερμοκρασία πολύ υψηλότερη από την επιτόπου θερμοκρασία (Hubert et al. 2010), όπως και στις επώσεις της παρούσας διπλωματικής

στους 41°C. Ωστόσο εάν οι ιδανικές συνθήκες δεν βρεθούν, παραμένουν σε μορφή ενδοσπορίου, για ίσως και μερικά εκατομμύρια χρόνια (Cano και Borucki 1995, Parkes 2000, Vreeland et al. 2000).

Εφόσον όμως τα ενδοσπόρια θεωρούνται οι πιο ανθεκτικές κυτταρικές δομές στη Γη (Abecasis et al. 2013), οι οποίες μπορούν να ανεχτούν από έναν έως πολλούς περιοριστικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες, είναι ίσως οι μόνες δομές οι οποίες μπορούν να αντέξουν μεταφορά μεγάλων αποστάσεων, οδηγώντας σε υψηλότερο ρυθμό διασποράς από άλλα βακτήρια (Roberts and Cohan 1995, Martiny et al. 2006). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την παραδοσιακή άποψη που έθεσε ο Beijerinck (1913) και αργότερα ο Baas-Becking (1934), ότι δηλαδή στην περίπτωση των μικροοργανισμών «όλα είναι παντού και η φύση επιλέγει» και που σύμφωνα με τους Falcon et al. (2008) εξακολουθεί ακόμα και σήμερα να είναι ένα μεγάλο πρότυπο μεταξύ των μικροβιακών οικολόγων, έχει δημιουργήσει την εικόνα ότι όλα τα είδη των ενδοσπορίων μπορούν να διασκορπίζονται εύκολα και να υπάρχουν παντού.

Δυστυχώς στην πράξη αυτό αποδεικνύεται ότι δεν ισχύει. Τα θαλάσσια βακτήρια γενικά αλλά και τα θερμόφιλα ενδοσπόρια στη συγκεκριμένη περίπτωση, παρουσιάζουν σημαντικά μεγαλύτερο περιορισμό διασποράς από αυτόν που προβλέπονταν μέχρι σήμερα (Sul et al. 2013). Οι πιο σημαντικοί περιορισμοί είναι οι εξής:

- Οι διαφορετικές μάζες νερού από τις οποίες αποτελείται η κάθε περιοχή (Galand et al. 2010).
- Ο ρυθμός με τον οποίο τα σπόρια κατατίθενται στο θαλασσινό πυθμένα, ο οποίος εξαρτάται από το πάχος και την ηλικία των ιζημάτων της κάθε περιοχής (Müller et al. 2014).
- Οι ανθρωπογενείς πηγές οι οποίες μπορούν να συμβάλουν στην παρουσία διαφορετικών θερμόφιλων ειδών σε κάθε περιοχή (de Rezende et al. 2013, Müller et al. 2014).
- Ο τρόπος με τον οποίο τα τοπικά ρεύματα της κάθε περιοχής συνδέονται με την παγκόσμια κυκλοφορία των ωκεανών (Müller et al. 2014).
- Η γεωγραφική απομόνωση κάποιων περιοχών η οποία έχει αντίκτυπο στην κατανομή και την εξέλιξη των βακτηριακών ειδών (Parke et al. 2003).



- Το γεγονός ότι τα βακτήρια που έχουν διαφορετικές εξελικτικές ιστορίες μπορεί να έχουν διαφορετικές δυνατότητες διασποράς (Parke et al. 2003).

Επίσης σύμφωνα με διάφορες έρευνες που έχουν γίνει σε τοποθεσίες που χωρίζονται με μεγάλες αποστάσεις (δυτικά του Svalbard, στη Βαλτική Θάλασσα και στον Κόλπο της Καλιφόρνιας) εντοπίστηκε συνύπαρξη αρκετών φυλοτύπων ενδοσπορίων. Αντίθετα, σε αρκτικές περιοχές με μαζικές ποσότητες νερού που είναι σχετικά απομονωμένες από την παγκόσμια κυκλοφορία των ωκεανών (Baffin Bay και ανατολικά του Svalbard) η ποικιλία των φυλοτύπων ήταν χαμηλότερη και οι συνθέσεις διαφορετικές (Müller et al. 2014). Συνεπώς η διασπορά τους μπορεί να είναι μεγάλη αλλά όχι απεριόριστη (Mallon et al. 2015).

Οι ωκεανοί δεν είναι ομοιόμορφοι, αλλά αποτελούνται από περιφερειακά διαμορφωμένες μάζες νερού, με ξεχωριστά χαρακτηριστικά θερμοκρασίας και αλατότητας, που μετακινούνται σε όλο τον κόσμο σε διαφορετικές χωρικές κλίμακες (Stommel 1958, Broecker 1991). Σύμφωνα με τους Galand et al. (2010), αποδείχθηκε ότι τρεις διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές του Αρκτικού Ωκεανού, όπως η λεκάνη του Καναδά, η Ευρασιανή λεκάνη και ο κόλπος του Baffin, με διαφορετικές μάζες νερού, φιλοξενούν διαφορετικές βακτηριακές κοινότητες. Σε συμφωνία με αυτά τα δεδομένα έρχονται και οι Hamdan et al. (2013). Έτσι η συνδεσιμότητα των τοπικών υδάτινων μαζών με την ωκεάνια κυκλοφορία θα μπορούσαν να αποτελέσουν έναν από τους βασικότερους παράγοντες που εξηγεί την επίδραση της παθητικής διασποράς στη θαλάσσια μικροβιακή βιογεωγραφία (Müller et al. 2014).

Στην παρούσα εργασία και προκειμένου να βρεθεί ο αριθμός των θερμόφιλων ειδών που επικρατεί στη θάλασσα σε αυτό το διάστημα, πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες σε τρυβλία. Με τη χρήση της μεθόδου των διαδοχικών αραιώσεων, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το αρχικό δείγμα αραιώθηκε διαδοχικά σε υψηλές αραιώσεις, έτσι ώστε οι τελευταίες αραιώσεις να περιέχουν παρά μόνο ελάχιστους έως καθόλου μικροοργανισμούς. Έτσι τα αφθονότερα είδη (από τις υψηλότερες αραιώσεις) μπόρεσαν να ανακτηθούν από το ενδιαίτημα, εφόσον το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε τους επέτρεψε την ανάπτυξη (Κορμάς 2010). Γενικά όμως υπολογίζεται ότι οι διαδικασίες καλλιέργειας φανερώνουν λιγότερο από το 0,1% των ολικών βακτηρίων από τυπικά φυσικά δείγματα (Staley & Konopka 1985).

Οι επωάσεις των τρυβλίων τόσο στο πρώτο (12/12/2016) όσο και στο δεύτερο πείραμα (02/03/2017), δηλαδή στις αρχές και στο τέλος του χειμώνα, χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες. Τα μισά τρυβλία επώαστηκαν στους 12°C και τα άλλα μισά στους 41°C. Τα τρυβλία που επώαστηκαν στους 12°C αποτέλεσαν τους μάρτυρες, οι οποίοι αποκάλυψαν τον αριθμό των ψυχρόφιλων βακτηρίων που επικρατούν στο επιφανειακό θαλασσινό νερό, κατά τη διάρκεια των χειμερινών μηνών. Αντίθετα τα τρυβλία που επώαστηκαν στους 41°C έδειξαν πως η ύπαρξη θερμοφίλων βακτηρίων, στο επιφανειακό θαλασσινό νερό κατά τους χειμερινούς μήνες είναι δυνατή, αν και σε πολύ μικρότερους αριθμούς.

*Ανάπτυξη ψυχρόφιλων βακτηρίων στις αρχές και στα τέλη του χειμώνα.* Όσον αφορά την ανάπτυξη ψυχρόφιλων βακτηρίων στις αρχές του χειμώνα, τις δύο πρώτες ημέρες της παρακολούθησης ήταν μηδενική για όλες τις αραιώσεις. Από την τρίτη (16/12/2017) και μέχρι την τελευταία ημέρα της παρακολούθησης (19/12/2017), παρατηρήθηκε σταδιακή ανάπτυξη των αποικιών, με διαφορετικούς ρυθμούς σε κάθε αραιώση. Η καθυστερημένη έναρξη της ανάπτυξης μπορεί να οφείλεται στους εξής παράγοντες:

- Ο χρόνος που χρειάζεται για να διπλασιαστεί ένας κυτταρικός πληθυσμός ονομάζεται χρόνος γενεάς ή χρόνος διπλασιασμού. Ο χρόνος γενεάς ποικίλλει από οργανισμό σε οργανισμό. Πολλά βακτήρια έχουν χρόνο γενεάς διάρκειας 10 λεπτών, 1-3 ώρες ή και αρκετές ημέρες (Madigan et al. 2013).
- Το πρότυπο πληθυσμιακής αύξησης κατά το οποίο ο αριθμός των κυττάρων διπλασιάζεται στη μονάδα του χρόνου είναι γνωστό ως εκθετική αύξηση. Ένα από τα χαρακτηριστικά της εκθετικής αύξησης είναι ότι ο ρυθμός αύξησης του αριθμού των κυττάρων είναι στην αρχή αργός αλλά στην συνέχεια αυξάνεται επιταχυνόμενος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα στα τελευταία στάδια της εκθετικής αύξησης να παρατηρείται εκρηκτική ανάπτυξη του αριθμού των κυττάρων (Madigan et al. 2013).
- Όταν ένας βακτηριακός πληθυσμός τοποθετείται σε φρέσκο θρεπτικό μέσο η ανάπτυξή του δεν αρχίζει αμέσως αλλά συνήθως ύστερα από μια περίοδο (φάση υστέρησης) η οποία μπορεί να είναι σύντομη ή παρατεταμένη, ανάλογα με το ιστορικό και τις συνθήκες της καλλιέργειας. Ουσιαστικά κάθε μικροβιακός

πληθυσμός που τοποθετείται σε φρέσκο θρεπτικό υλικό, ακολουθεί μια φάση προσαρμογής μέχρι να αρχίσει να αναπτύσσεται (Madigan et al. 2013).

Το αναρραίοτο δείγμα παρουσίασε την μικρότερη και πιο σταδιακή ανάπτυξη. Παρόμοιο ρυθμό ανάπτυξης με μεγαλύτερο αριθμό αποικιών, ακολούθησαν με την σειρά οι αραιώσεις  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  και  $10^{-3}$  αντίστοιχα. Οι δύο τελευταίες αραιώσεις,  $10^{-4}$  και  $10^{-5}$ , ακολούθησαν μια διαφορετική πορεία ανάπτυξης, καθώς ο αριθμός των αποικιών τους τις πρώτες μέρες της ανάπτυξης, ήταν πολύ μικρότερος σε σχέση με αυτόν που παρατηρήθηκε την τελευταία ημέρα της παρακολούθησης. Σε σχέση με τον αριθμό των αποικιών καθόλη την διάρκεια του πειράματος, το αναρραίοτο δείγμα συγκέντρωσε τις λιγότερες αποικίες σε αντίθεση με την αραιώση  $10^{-5}$  η οποία συγκέντρωσε τις περισσότερες αποικίες. Επίσης το αναρραίοτο δείγμα ήταν το μόνο σε σχέση με τις υπόλοιπες αραιώσεις το οποίο εμφάνισε τις μεγαλύτερες σε μέγεθος αποικίες.

Όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν την ύπαρξη τριών διαφορετικών ρυθμών ανάπτυξης οι οποίοι αντιπροσωπεύονται πρώτον από το αναρραίοτο δείγμα, δεύτερον από τις αραιώσεις  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  και  $10^{-3}$  και τρίτον από τις αραιώσεις  $10^{-4}$  και  $10^{-5}$ . Αυτοί οι διαφορετικοί ρυθμοί ανάπτυξης υποδεικνύουν διαφορετικά είδη βακτηρίων τα οποία αναπτύσσονται σε καθεμία από αυτές τις τρεις ομάδες. Στην πρώτη ομάδα εμφανίστηκαν τα πιο άφθονα είδη βακτηρίων στο θαλασσινό νερό, τα οποία με αργή και σταδιακή ανάπτυξη, δημιούργησαν αποικίες οι οποίες ήταν λίγες σε αριθμό αλλά μεγάλες σε μέγεθος. Στη δεύτερη ομάδα ακολουθήθηκε μια πιο γρήγορη αλλά ταυτόχρονα σταδιακή ανάπτυξη με τη δημιουργία περισσότερων αποικιών σε αριθμό αλλά μικρότερων σε μέγεθος. Στην τελευταία ομάδα η ανάπτυξη των βακτηρίων αυξήθηκε απότομα τις τελευταίες ημέρες της παρακολούθησης και δημιούργησε βακτήρια τα οποία ήταν περισσότερα σε αριθμό από τις άλλες δύο ομάδες και παρόμοια σε μέγεθος με τη δεύτερη ομάδα. Η απομόνωση των λιγότερο άφθονων βακτηρίων στις πιο υψηλές αραιώσεις ήταν αυτή που οδήγησε στην ανάκτηση τους από το ενδιαίτημά τους (Κορμάς 2010).

Στα τέλη του χειμώνα η ανάπτυξη των αποικιών για το αναρραίοτο δείγμα και την αραιώση  $10^{-1}$  B, ξεκίνησε κιόλας από την πρώτη ημέρα της παρακολούθησης. Για όλες τις υπόλοιπες αραιώσεις ανάπτυξη εμφανίστηκε από την δεύτερη ημέρα και μετά και συγκεκριμένα την δεύτερη ημέρα της παρακολούθησης, καταγράφηκε απότομη ανάπτυξη αποικιών για όλες τις αραιώσεις. Η καθυστερημένη έναρξη της ανάπτυξης

εξηγείται σύμφωνα με αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω από τους Madigan et al. (2013). Το αναραιώτο δείγμα ξεκίνησε την πρώτη ημέρα με έναν αριθμό αποικιών, τη δεύτερη ημέρα αναπτύχθηκε απότομα και συνέχισε σταδιακά την ανάπτυξη μέχρι και το τέλος του πειράματος. Παρόμοια κινήθηκε και η αραιώση  $10^{-1}$  B αλλά με αρκετά μεγαλύτερο αριθμό αποικιών. Οι υπόλοιπες αραιώσεις  $10^{-1}$  και οι αραιώσεις  $10^{-2}$  και  $10^{-3}$ , ξεκίνησαν με απότομη ανάπτυξη στις 04/03/2017 και συνέχισαν την ανάπτυξη με αυτήν τη σειρά και λιγότερο σταδιακό ρυθμό μέχρι το τέλος. Οι αραιώσεις  $10^{-4}$  και  $10^{-5}$ , όπως και στο πείραμα στις αρχές του χειμώνα εμφάνισαν πολύ μεγαλύτερο αριθμό αποικιών στο τέλος της παρακολούθησης, σε σχέση με τον αριθμό των αποικιών που ξεκίνησαν.

Όσον αφορά το συνολικό αριθμό αποικιών στο τέλος του πειράματος, το αναραιώτο δείγμα ήταν αυτό που συγκέντρωσε τις λιγότερες αποικίες και η αραιώση  $10^{-5}$  τις περισσότερες. Σε σχέση με το μέγεθος των αποικιών το αναραιώτο δείγμα ήταν αυτό που εμφάνισε τις μεγαλύτερες σε μέγεθος αποικίες.

Οι ρυθμοί ανάπτυξης που ξεχώρισαν σε αυτό το πείραμα ήταν τέσσερις και σε κάθε ομάδα τρυβλίων με διαφορετικό ρυθμό ανάπτυξης, αναπτύχθηκαν διαφορετικά είδη βακτηρίων. Πρώτον στο αναραιώτο δείγμα το οποίο ξεκίνησε την ανάπτυξή του κιόλας από την πρώτη ημέρα και εκτός από την απότομη ανάπτυξη της δεύτερης ημέρας, συνέχισε σταδιακά μέχρι το τέλος, αναπτύχθηκαν αποικίες σχετικά λίγες σε αριθμό αλλά μεγάλες σε μέγεθος. Έπειτα ακολούθησε η αραιώση  $10^{-1}$  B με παρόμοιο ρυθμό ανάπτυξης αλλά αποικίες οι οποίες ήταν περισσότερες σε αριθμό και μικρότερες σε μέγεθος. Τρίτον οι υπόλοιπες αραιώσεις  $10^{-1}$  και οι αραιώσεις  $10^{-2}$  και  $10^{-3}$  με απότομη έναρξη ανάπτυξης τη δεύτερη ημέρα, ακολούθησαν ένα λιγότερο σταδιακό ρυθμό ανάπτυξης και οδηγήθηκαν στο τέλος του πειράματος σε αποικίες περισσότερες σε αριθμό αλλά παρόμοιες σε μέγεθος με την προηγούμενη ομάδα. Τέλος στις αραιώσεις  $10^{-4}$  και  $10^{-5}$  και μετά από την απότομη έναρξη ανάπτυξης τη δεύτερη ημέρα, ακολούθησε μια δεύτερη απότομη ανάπτυξη τις τελευταίες ημέρες της παρακολούθησης με τη δημιουργία αποικιών οι οποίες ήταν πολύ περισσότερες σε αριθμό και πολύ μικρότερες σε μέγεθος.

Σε αυτό το πείραμα όπως και στο προηγούμενο, οι πιο άφθονοι μικροοργανισμοί εμφανίστηκαν στο αναραιώτο δείγμα και τα λιγότερο άφθονα βακτήρια, αν και είχαν μια μεγαλύτερη περίοδο προσαρμογής, κατάφεραν να

ανακτηθούν στις υψηλότερες αραιώσεις. Σε σχέση με τον αριθμό των ψυχρόφιλων βακτηρίων στις αρχές του χειμώνα, το τρυβλίο  $10^{-5}$  B συγκέντρωσε τον μεγαλύτερο αριθμό με 3.846.000.000 cfu/ml. Στα τέλη του χειμώνα τα ψυχρόφιλα βακτήρια ήταν γενικά περισσότερα σε όλες τις αραιώσεις και τον μεγαλύτερο αριθμό συγκέντρωσε το τρυβλίο  $10^{-5}$  B με 4.244.000.000 cfu/ml. Το γεγονός αυτό έρχεται σε συμφωνία με τους Winter et al. (2009), οι οποίοι υποστηρίζουν πως οι επιφανειακές βακτηριακές κοινότητες ποικίλλουν εποχιακά.

*Ανάπτυξη θερμοφίλων βακτηρίων στις αρχές και στα τέλη του χειμώνα.* Στις αρχές του χειμώνα η ανάπτυξη των αποικιών ήταν σχεδόν μηδενική, καθόλη τη διάρκεια της παρακολούθησης. Την πρώτη ημέρα (13/12/2016) παρατηρήθηκε μηδενική ανάπτυξη για όλες τις αραιώσεις. Αυτή η καθυστερημένη έναρξη της ανάπτυξης εξηγείται σύμφωνα με τους παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω (Madigan et al. 2013). Αποικίες εμφανίστηκαν στα αναραιώτα δείγματα AB και AC τη δεύτερη ημέρα και στο αναραιώτο δείγμα AA την τρίτη ημέρα της παρακολούθησης. Η ανάπτυξή τους μέχρι το τέλος του πειράματος ήταν ελάχιστη έως μηδενική. Η ανάπτυξη της αραιώσης  $10^{-1}$  B ήταν παρόμοια με το αναραιώτο δείγμα AA, καθώς στις 15/12/2016 εμφάνισε ένα λίγο μεγαλύτερο αριθμό αποικιών, τον οποίο και διατήρησε μέχρι το τέλος. Οι αραιώσεις  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  και  $10^{-5}$  εμφάνισαν μηδενική ανάπτυξη μέχρι το τέλος της παρακολούθησης. Μόνο η αραιώση  $10^{-3}$  B εμφάνισε σχετικά καθυστερημένα (17/12/2016), ένα σχετικά μεγάλο αριθμό αποικιών, ο οποίος μέχρι τις 19/12/2016 αυξήθηκε.

Όπως φαίνεται τις περισσότερες αποικίες, αν και σχετικά καθυστερημένα, συγκέντρωσε η αραιώση  $10^{-3}$  B. Τις λιγότερες αποικίες συγκέντρωσαν οι αραιώσεις  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  και  $10^{-5}$  όπως αναφέρθηκαν και παραπάνω αλλά και οι αραιώσεις  $10^{-1}$  A,  $10^{-1}$  C,  $10^{-3}$  A και  $10^{-3}$  C, καθώς εμφάνισαν μηδενική ανάπτυξη αποικιών σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Από τα τρυβλία που παρουσίασαν αποικίες, αυτό της αραιώσης  $10^{-3}$  B είχε τις μικρότερες σε μέγεθος αποικίες. Το μέγεθος των αποικιών σε όλα τα αναραιώτα δείγματα ήταν αρκετά μεγαλύτερο.

Και τα τρία τρυβλία του αναραιώτου δείγματος φαίνεται ότι ακολούθησαν έναν κοινό ρυθμό ανάπτυξης με την εμφάνιση αποικιών τη δεύτερη και την τρίτη ημέρα της παρακολούθησης και την ελάχιστη ανάπτυξή τους σε αριθμό μέχρι το τέλος του

πειράματος. Το μέγεθος των αποικιών και στα τρία τρυβλία, ήταν αρκετά μεγάλο από την πρώτη ημέρα της ανάπτυξης και συνέχισε να αυξάνεται μέχρι το τέλος. Η αραιώση  $10^{-1}$  B ακολούθησε έναν παρόμοιο ρυθμό ανάπτυξης αλλά με αποικίες αρκετά περισσότερες σε αριθμό και μικρότερες σε μέγεθος. Ο ρυθμός ανάπτυξης της αραιώσης  $10^{-3}$  B ξεχώρισε, καθώς τις τρεις τελευταίες μέρες της παρακολούθησης εμφανίστηκαν αποικίες οι οποίες ήταν πολύ περισσότερες σε αριθμό και πολύ μικρότερες σε μέγεθος, από όλες τις προηγούμενες περιπτώσεις. Τέλος, όλες οι υπόλοιπες αραιώσεις του πειράματος εμφάνισαν ένα δικό τους ρυθμό ανάπτυξης, με την ύπαρξη μηδενικών αποικιών μέχρι το τέλος του πειράματος.

Επομένως οι ρυθμοί ανάπτυξης που εμφανίστηκαν σε αυτό το πείραμα ήταν τέσσερις και αντιπροσωπεύονται από καθεμία από τις τέσσερις ομάδες που περιγράφηκαν παραπάνω. Έτσι γίνεται κατανοητό πως σε καθεμία από αυτές τις ομάδες αναπτύχθηκαν διαφορετικά είδη βακτηρίων. Στην πρώτη ομάδα, δηλαδή στα τρυβλία του αναραιώτου δείγματος, αναπτύχθηκαν κανονικά τα πιο άφθονα βακτήρια. Στην τελευταία ομάδα στην οποία δεν αναπτύχθηκαν καθόλου βακτήρια, πιθανώς να υπήρχαν οργανισμοί οι οποίοι σε αυτό το πείραμα των επτά ημερών, δεν κατάφεραν να ανακτηθούν. Επίσης στις πιο υψηλές αραιώσεις ο αριθμός των θερμοφίλων βακτηρίων πιθανώς να ήταν ελάχιστος έως μηδενικός. Ιδιαίτερη εντύπωση προκάλεσαν οι αραιώσεις  $10^{-1}$  B και  $10^{-3}$  B, οι οποίες ήταν οι μοναδικές από ολόκληρη την τριάδα της αραιώσης τους, οι οποίες οδήγησαν στη δημιουργία αποικιών.

Όσον αφορά την ανάπτυξη θερμοφίλων βακτηρίων στα τέλη του χειμώνα, την πρώτη ημέρα της παρακολούθησης παρατηρήθηκε μηδενική ανάπτυξη για όλες τις αραιώσεις εκτός από το αναραιώτο δείγμα και την αραιώση  $10^{-1}$  A. Αυτή η καθυστερημένη έναρξη της ανάπτυξης εξηγείται σύμφωνα με τους παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω (Madigan et al. 2013). Στις 04/03/2017 ξεκίνησε η ανάπτυξη για τα τρυβλία  $10^{-1}$  B,  $10^{-1}$  C και  $10^{-2}$  B. Σε όλα τα υπόλοιπα τρυβλία ( $10^{-2}$  A,  $10^{-2}$  C και στις αραιώσεις  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ) υπήρξε μηδενική ανάπτυξη καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Το αναραιώτο δείγμα μετά την πρώτη ημέρα αναπτύχθηκε σταδιακά μέχρι το τέλος της παρακολούθησης. Παρόμοια αναπτύχθηκε και η αραιώση  $10^{-1}$  A με αρκετά μεγαλύτερο αριθμό αποικιών. Η αραιώση  $10^{-1}$  B ξεκίνησε με μια απότομη ανάπτυξη τη δεύτερη ημέρα και συνέχισε σταδιακά μέχρι το τέλος. Σε αντίθεση με τα παραπάνω έρχονται οι αραιώσεις  $10^{-1}$  C και  $10^{-2}$  B, οι οποίες ξεκίνησαν με ένα αριθμό

αποικιών τη δεύτερη ημέρα της παρακολούθησης ( η αραιώση  $10^{-1}$  C με λιγότερες αποικίες από την αραιώση  $10^{-2}$  B), τον οποίο και διατήρησαν μέχρι το τέλος του πειράματος.

Σε σχέση με το συνολικό αριθμό αποικιών στο τέλος της παρακολούθησης, η αραιώση  $10^{-1}$  B ήταν αυτή που συγκέντρωσε τις περισσότερες αποικίες. Μηδενική ανάπτυξη άρα και τις λιγότερες αποικίες κατά τη διάρκεια του πειράματος είχαν οι αραιώσεις  $10^{-2}$  A,  $10^{-2}$  C,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  και  $10^{-5}$ . Όσον αφορά το μέγεθος των αποικιών, όλες οι αραιώσεις που εμφάνισαν αποικίες είχαν ένα σχετικά παρόμοιο και μεγάλο μέγεθος αποικιών εκτός από τις αραιώσεις  $10^{-1}$  A και  $10^{-1}$  B, οι οποίες είχαν αποικίες με μικρότερο μέγεθος.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το αναραιώτο δείγμα ακολούθησε ένα δικό του ρυθμό ανάπτυξης με τη σταδιακή ανάπτυξη αποικιών, από την πρώτη μέχρι την τελευταία ημέρα του πειράματος. Τα πιο άφθονα βακτήρια τα οποία εμφανίστηκαν στο αναραιώτο δείγμα, εμφάνισαν τελικές αποικίες οι οποίες ήταν ενδιάμεσες σε αριθμό και μεγάλες σε μέγεθος. Ο ρυθμός ανάπτυξης της αραιώσης  $10^{-1}$  A ήταν παρόμοιος με αυτόν του αναραιώτου δείγματος, αλλά ήταν λιγότερο σταδιακός και οδήγησε στη δημιουργία αποικιών που ήταν περισσότερες σε αριθμό και μικρότερες σε μέγεθος. Η αραιώση  $10^{-1}$  B ακολούθησε ένα δικό της ρυθμό ανάπτυξης, ο οποίος με απότομη έναρξη ανάπτυξης τη δεύτερη ημέρα και σταδιακή ανάπτυξη τις υπόλοιπες ημέρες, δημιούργησε αποικίες οι οποίες ήταν οι περισσότερες σε αριθμό και μικρότερες σε μέγεθος από όλες τις αποικίες του πειράματος. Διαφορετικό ρυθμό ανάπτυξης ακολούθησε η αραιώση  $10^{-1}$  C, η οποία ξεκίνησε στις 04/03/2017 με αποικίες λίγες σε αριθμό και μεγάλες σε μέγεθος και τις διατήρησε μέχρι το τέλος της παρακολούθησης. Ανάλογα κινήθηκε και η αραιώση  $10^{-2}$  B αλλά με αποικίες περισσότερες σε αριθμό και μικρότερες σε μέγεθος. Παράλληλα όλες οι υπόλοιπες αραιώσεις, εμφάνισαν μηδενικές αποικίες καθόλη τη διάρκεια του πειράματος.

Στο συγκεκριμένο πείραμα δημιουργήθηκαν πέντε ομάδες διαφορετικών αραιώσεων, καθεμία από τις οποίες αντιπροσώπευε ένα διαφορετικό ρυθμό ανάπτυξης. Σε καθεμία από αυτές τις ομάδες αναπτύχθηκαν διαφορετικά είδη βακτηρίων. Στην τελευταία ομάδα δηλαδή στα λιγότερο άφθονα βακτήρια, πιθανώς στις πολύ υψηλές αραιώσεις ο αριθμός των θερμοφίλων βακτηρίων να ήταν ελάχιστος έως μηδενικός ή και να υπήρχαν οργανισμοί οι οποίοι δεν κατάφεραν να ανακτηθούν. Όπως και στο

πείραμα στις αρχές του χειμώνα, ιδιαίτερη εντύπωση προκάλεσε η αραιώση  $10^{-2}$  B, η οποία ήταν η μοναδική από ολόκληρη την τριάδα της αραιώσης  $10^{-2}$ , η οποία οδήγησε στη δημιουργία αποικιών.

Ο μέγιστος αριθμός θερμοφίλων βακτηρίων στις αρχές του χειμώνα, ανακτήθηκε στην αραιώση  $10^{-3}$  B η οποία συγκέντρωσε 1.200.000 cfu/ml. Στα τέλη του χειμώνα τον μεγαλύτερο αριθμό θερμοφίλων βακτηρίων συγκέντρωσε το τρυβλίο  $10^{-1}$  B με 47.000 cfu/ml. Αν και στο σύνολο των αραιώσεων ο αριθμός των βακτηρίων στα τέλη του χειμώνα ήταν μεγαλύτερος, η μεγαλύτερη τιμή αποκτήθηκε στις αρχές του χειμώνα. Το γεγονός αυτό έρχεται σε συμφωνία με τους Winter et al. (2009), οι οποίοι υποστηρίζουν πως οι επιφανειακές βακτηριακές κοινότητες ποικίλλουν εποχιακά.

#### ***Σύγκριση ψυχρόφιλων και θερμοφίλων βακτηρίων στις αρχές του χειμώνα.***

Το πρώτο πείραμα πραγματοποιήθηκε στις 12/12/2016, δηλαδή στις αρχές του χειμώνα. Σε αυτό το διάστημα ήταν δυνατή η ύπαρξη τόσο ψυχρόφιλων όσο και θερμοφίλων βακτηρίων, στο επιφανειακό θαλασσινό νερό, καθώς τα τρυβλία που επωάστηκαν στους  $12^{\circ}\text{C}$  και στους  $41^{\circ}\text{C}$  αντίστοιχα, οδήγησαν στη δημιουργία αποικιών. Με βάση τα τρυβλία που επωάστηκαν στους  $12^{\circ}\text{C}$ , δηλαδή τα τρυβλία μάρτυρες, βλέπουμε πως ο μέγιστος αριθμός αποικιών που δημιουργείται από τα ψυχρόφιλα βακτήρια που επικρατούν αυτό το διάστημα είναι 3.846.000.000 cfu/ml. Στα θερμοφιλα βακτήρια αντίστοιχα ο μέγιστος αριθμός αποικιών είναι 1.200.000 cfu/ml. Έτσι προκύπτει ότι τα θερμοφιλα βακτήρια είναι το 0,031% των ψυχρόφιλων βακτηρίων.

#### ***Σύγκριση ψυχρόφιλων και θερμοφίλων βακτηρίων στα τέλη του χειμώνα.***

Το δεύτερο πείραμα πραγματοποιήθηκε στις 02/03/2017, δηλαδή στα τέλη του χειμώνα. Σε αυτό το διάστημα όπως και στο προηγούμενο, παρατηρήθηκαν ψυχρόφιλα αλλά και θερμοφιλα βακτήρια, στο επιφανειακό θαλασσινό νερό, καθώς τα τρυβλία που επωάστηκαν στους  $12^{\circ}\text{C}$  και στους  $41^{\circ}\text{C}$  αντίστοιχα, οδήγησαν στη δημιουργία αποικιών. Βέβαια ο αριθμός των αποικιών, τόσο των ψυχρόφιλων όσο και των θερμοφίλων βακτηρίων, σε αυτό το πείραμα ήταν λίγο διαφορετικός. Με βάση τα τρυβλία μάρτυρες, βλέπουμε πως ο μέγιστος αριθμός αποικιών που δημιουργείται από τα ψυχρόφιλα βακτήρια που επικρατούν αυτό το διάστημα είναι 4.244.000.000 cfu/ml. Στα θερμοφιλα βακτήρια αντίστοιχα ο μέγιστος αριθμός αποικιών είναι 47.000 cfu/ml.



Έτσι προκύπτει ότι τα θερμόφιλα βακτήρια είναι το 0,001% των ψυχρόφιλων βακτηρίων.

*Σύγκριση αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας με δεδομένα προηγούμενων μελετών.* Όσον αφορά τα ενδοσπόρια θερμόφιλων βακτηρίων, οι μελέτες που έχουν γίνει για να επιβεβαιώσουν την ύπαρξη τους σε ψυχρό θαλασσινό νερό είναι λίγες και κυρίως έχουν γίνει σε περιοχές της Βαλτικής Θάλασσας και της Αρκτικής. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν πρώτον οι de Rezende et al. (2013), οι οποίοι επιβεβαίωσαν την ύπαρξη θερμόφιλων ενδοσπορίων στα ιζήματα του κόλπου Aarhus στη Βαλτική Θάλασσα. Ανάλογα αποτελέσματα βρέθηκαν από τους Müller et al. (2014), στα φιόρδ του Svalbard στην Αρκτική και στον κόλπο Baffin, ο οποίος συνδέεται με τον Αρκτικό Ωκεανό. Παρόμοιες έρευνες είναι και αυτές των Volpi et al. (2017), με την εύρεση θερμόφιλων ζυμωτικών ενδοσπορίων στον κόλπο Aarhus και των de Rezende et al. (2017), με την εύρεση θερμόφιλων θειοαναγωγικών ενδοσπορίων στον κόλπο Aarhus.

Αν και αυτές είναι από τις πρώτες ενδιαφέρουσες αποδείξεις για τη διασπορά των θερμόφιλων ενδοσπορίων σε μεγάλες αποστάσεις, η μεγάλης κλίμακας βιογεωγραφία τους στον παγκόσμιο ωκεανό, παραμένει ανεξερεύνητη. Καθώς τα θερμόφιλα βακτήρια εναποτίθενται παθητικά με καθίζηση στο κρύο θαλασσινό νερό, μπορούν να εξηγήσουν την ύπαρξη τους στον Παγασητικό κόλπο και συγκεκριμένα στο λιμάνι του Βόλου, μέσω της διασποράς τους από τα ωκεάνια ρεύματα.

Συγκεκριμένα, οι de Rezende et al. (2013), μελέτησαν την ύπαρξη θερμόφιλων ενδοσπορίων στα ιζήματα του κόλπου Aarhus στη Βαλτική Θάλασσα και βρήκαν ότι ο αριθμός τους κυμαίνεται από 4 έως  $9 \times 10^3$  θερμόφιλα ενδοσπόρια ανά  $\text{cm}^3$  ιζήματος. Παρόμοια αποτελέσματα βρήκαν και οι de Rezende et al. (2017), οι οποίοι επικεντρώθηκαν στην ύπαρξη θερμόφιλων θειοαναγωγικών ενδοσπορίων στον κόλπο Aarhus και βρήκαν ότι ο αριθμός τους κυμαίνεται από  $1,3 \times 10^0$  έως  $6,8 \times 10^3$  θερμόφιλα ενδοσπόρια ανά  $\text{cm}^3$  ιζήματος.

Η έρευνα των Volpi et al. (2017), ακολούθησε μια διαφορετική πορεία. Αρχικά βρήκαν τον αριθμό των θερμόφιλων ζυμωτικών ενδοσπορίων στον κόλπο Aarhus, ο οποίος υπολογίστηκε ότι είναι  $6 \times 10^6$  θερμόφιλα ενδοσπόρια ανά ml ιζήματος. Έπειτα και με τον υπολογισμό του ρυθμού καθίζησης που επικρατεί στην περιοχή εκτίμησαν

ότι τα θερμόφιλα ενδοσπόρια που υπάρχουν στη στήλη του νερού, πριν πέσουν στο ίζημα, είναι περίπου 200-1.000 ενδοσπόρια ανά ml νερού. Έτσι κατάφεραν με έμμεσο τρόπο να υπολογίσουν τα θερμόφιλα ενδοσπόρια που υπάρχουν στο επιφανειακό θαλασσινό ψυχρό νερό.

Μετά τη σύγκριση των θερμόφιλων βακτηρίων, στο πρώτο και το δεύτερο πείραμα, σε σχέση με τα συνολικά ψυχρόφιλα βακτήρια που επικρατούν στο επιφανειακό θαλάσσιο νερό τους χειμερινούς μήνες, έγινε αντιληπτό σε ποιο διάστημα εντοπίζονται τα περισσότερα θερμόφιλα βακτήρια. Το ποσοστό των θερμόφιλων βακτηρίων είναι αρκετά μεγαλύτερο στην αρχή (0,031%) σε σχέση με το τέλος του χειμώνα (0,001%).

Η παρούσα διπλωματική εργασία ακολουθώντας μια εντελώς διαφορετική προσέγγιση, όπως είδαμε και παραπάνω, κατάφερε να επιβεβαιώσει την ύπαρξη θερμόφιλων βακτηρίων σε επιφανειακό θαλασσινό νερό κατά την ψυχρή περίοδο του έτους και να υπολογίσει με άμεσο τρόπο τον ακριβή αριθμό τους. Ο αριθμός των θερμόφιλων ενδοσπορίων που βρέθηκε τόσο στην αρχή (1.200.000 cfu/ml) όσο και στο τέλος του χειμώνα (47.000 cfu/ml), ήταν αρκετά μεγαλύτερος από αυτόν που βρέθηκε από τους Volpi et al. (2017).

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ξένη Βιβλιογραφία

- Buerger S., Spoering A., Gavrish E., Leslin C., Ling L., Epstein S.S., (2012) Microbial Scout Hypothesis, Stochastic Exit from Dormancy, and the Nature of Slow Growers. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(9):3221–3228.
- De Rezende J.L., Kjeldsen K.U., Hubert C.RJ., Finster K., Loy A., Jørgensen B.B., (2013) Dispersal of thermophilic *Desulfotomaculum* endospores into Baltic Sea sediments over thousands of years. *The ISME Journal*, 7:72–84.
- De Rezende J.L., Hubert C.RJ., Røy H., Kjeldsen K.U., Jørgensen B.B., (2017) Estimating the Abundance of Endospores of Sulfate-Reducing Bacteria in Environmental Samples by Inducing Germination and Exponential Growth. *Geomicrobiology Journal*, 34(4):338-345.
- Dolan J.R., (2006) Microbial biogeography? *Journal of Biogeography*, 33(2):199-200.
- Epstein S.S., (2009) Microbial awakenings. *Nature*, 457:1083.
- Falcon L.I., Noguez A.M., Espinosa-Asuar L., Eguiarte L.E., Souza V., (2008) Evidence of biogeography in surface ocean bacterioplankton assemblages. *Marine Genomics*, 1:55-61.
- Filippidou S., Wunderlin T., Junier T., Jeanneret N., Dorador C., Molina V., Johnson D.R., Junier P., (2016) A Combination of Extreme Environmental Conditions Favor the Prevalence of Endospore-Forming Firmicutes. *Frontiers in Microbiology*, 7:1707.
- Galand P.E., Potvin M., Casamayor E.O., Lovejoy C., (2010) Hydrography shapes bacterial biogeography of the deep Arctic Ocean. *The ISME Journal*, 4:564–576.
- Hamdan L.J., Coffin R.B., Sikaroodi M., Greinert J., Treude T., Gillevet P.M., (2013) Ocean currents shape the microbiome of Arctic marine sediments. *The ISME Journal*, 7:685–696.
- Henriques A.O., Moran C.P.Jr., (2007) Structure, assembly, and function of the spore surface layers. *Annual Review of Microbiology*, 61:555-588.
- Hubert C., Loy A., Nickel M., Arnosti C., Baranyi C., Brüchert V., Ferdelman T., Finster K., Christensen F.M., De Rezende J.L., Vandieken V., Jørgensen B.B.,

- (2009) A constant flux of diverse thermophilic bacteria into the cold arctic seabed. *Science*, 325: 1541–1544.
- Hubert C., Arnosti C., Brüchert V., Loy A., Vandieken V., Jørgensen B.B., (2010) Thermophilic anaerobes in Arctic marine sediments induced to mineralize complex organic matter at high temperature. *Environmental Microbiology*, 12(4):1089–1104.
- Ionescu D., Hindiyeh M., Malkawi H., Oren A., (2010) Biogeography of thermophilic cyanobacteria: insights from the Zerka Ma'in hot springs (Jordan). *FEMS Microbiology Ecology*, 72:103–113.
- Jørgensen B.B., Loy A., (2014) Endospores of thermophilic bacteria as tracers of microbial dispersal by ocean currents. *The ISME Journal*, 8:1153–1165.
- Mallon C.A., Van Elsas J.D., Falcao-Sales J., (2015) Microbial Invasions: The Process, Patterns and Mechanisms. *Trends in Microbiology*, 23(11):719-729.
- Martiny J.B.H., Bohannan B.J.M., Brown J.H., Colwell R.K., Fuhrman J.A., Green J.L., Horner-Devine M.C., Kane M., Adams Krumins J., Kuske C.R., Morin P.J., Naeem S., Øvreås L., Reysenbach A-L., Smith V.H., Staley J.T., (2006) Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology*, 4(2):102-112.
- Müller A.L., De Rezende J.R., Hubert C.R.J., Kjeldsen K.U., Lagkouvardos I., Berry D., Jørgensen B.B., Loy A., (2014) Endospores of thermophilic bacteria as tracers of microbial dispersal by ocean currents. *The ISME Journal*, 8:1153–1165.
- Papke R.T., Ramsing N.B., Bateson M.M., Ward D.M., (2003) Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 5(8):650–659.
- Pommier T., Canbäck B., Riemann L., Boström K.H., Simu K., Lundberg P., Tunlid A., Hagström A., (2007) Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. *Molecular Ecology*, 16(4):867-80.
- Nemergut D.R., Costello E.K., Hamady M., Lozupone C., Jiang L., Schmidt S.K., Fierer N., Townsend A.R., Cleveland C.C., Stanish L., Knight R., (2011) Global patterns in the biogeography of bacterial taxa. *Environmental Microbiology*, 13(1):135–144.

- Ramette A., Tiedje J.M., (2007) Biogeography: An Emerging Cornerstone for Understanding Prokaryotic Diversity, Ecology, and Evolution. *Microbial Ecology*, 53: 197–207.
- Setlow P., (2003) Spore germination. *Current Opinion in Microbiology*, 6:550–556.
- Setlow P., (2007) I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends in Microbiology*, 15(4):172-180.
- Setlow P., (20014) Germination of Spores of *Bacillus* Species: What We Know and Do Not Know. *Journal of Bacteriology*, 196(7):1297–1305.
- Shoemaker W.R., Lennon J.T., (2018) Evolution with a seed bank: the population genetic consequences of microbial dormancy. *Evolutionary Application*, 11(1):60-75.
- Sinai L., Rosenberg A., Smith Y., Segev E., Ben-Yehuda S., (2015) The Molecular Timeline of a Reviving Bacterial Spore. *Molecular cell*, 57:695-707.
- Sul W.J., Oliver T.A., Ducklow H.W., Amaral-Zettler L.A., Sogin M.L., (2013) Marine bacteria exhibit a bipolar distribution. *PNAS*, 110(6):2342-2347.
- Volpi M., Lomstein B.A., Sichert A., Røy H., Jørgensen B.B., Kjeldsen K.U., (2017) Identity, Abundance, and Reactivation Kinetics of Thermophilic Fermentative Endospores in Cold Marine Sediment and Seawater. *Frontiers in Microbiology*, 8:131.
- Vreeland R.H., Rosenzweig W.D., Powers D.W., (2000) Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature*, 407:897-900.
- Winter C., Kerros M.E., Weinbauer M.G., (2009) Seasonal changes of bacterial and archaeal communities in the dark ocean: Evidence from the Mediterranean Sea. *Limnology and Oceanography*, 54:160–170.
- Wunderlin T., Junier T., Roussel-Delif L., Jeanneret N., Junier P., (2014) Endospore-enriched sequencing approach reveals unprecedented diversity of *Firmicutes* in sediments. *Environmental Microbiology Reports*, 6(6):631–639.

### **Ελληνική Βιβλιογραφία**

- Κορμάς Κ.Α., (2010) Οικολογία υδρόβιων μικροοργανισμών. Εκδόσεις Γαρταγάνη. Θεσσαλονίκη. Ελλάς. Ε.Ε.

## **Μεταφρασμένη Βιβλιογραφία**

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J., (2013) Brock Τόμος 1: Βιολογία των μικροοργανισμών. Απόδοση στα ελληνικά: Γεωργακόπουλος Δ., Διαλλινάς Γ., Ζαχαριουδάκης Γ., Καραγκούνη-Κύρτσου Α., Κοκκορόγιανης Θ., Φριλίγγος Σ., Χατζηλουκάς Σ., Χριστιάς Χ. Επιστημονική επιμέλεια: Οικονόμου Τ. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. Ηράκλειο.