

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

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Αφθονία καλλιεργήσιμων μεσόφιλων μικροοργανισμών από  
θερμοπηγές της Ικαρίας»**

**Ελένη Βουδαντά**

**Βόλος 2014**

**«Αφθονία καλλιεργήσιμων μεσόφιλων μικροοργανισμών από θερμοπηγές της  
Ικαρίας»**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

- 1. Κωνσταντίνος Κορμάς**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**.
- 2. Δημήτριος Καρπούζας**, Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.
- 3. Ιωάννης Μποζιάρης**, Μόνιμος Επίκουρος Καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

*Στην οικογένεια μου*

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους αυτούς τους ανθρώπους που συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασία αυτής, τον κύριο Κορμά Κωνσταντίνο για την πολύτιμη βοήθεια του και την υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους Καρπούζα Δημήτριο και Μποζιάρη Ιωάννη, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Παρλαπάνη Φωτεινή για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθεια της κατά τη διάρκεια του πειράματος, καθώς και το συμφοιτητή μου Βέρδο Γεώργιο.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στα άτομα του στενού οικογενειακού και φιλικού μου περιβάλλοντος και ιδιαίτερα στους γονείς μου για τις ενθαρρύνσεις και τη συμπαράστασή τους σε κάθε μου απόφαση.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ανάμεσα στα φυσικώς θερμά περιβάλλοντα, οι θερμές πηγές αποτελούν τα πιο κοινά και προσιτά ενδιαιτήματα. Είναι καλά απομονωμένα ενδιαιτήματα τα οποία κατανέμονται σε όλο τον κόσμο και οι μικροοργανισμοί οι οποίοι διαβιούν εκεί είναι καλά προσαρμοσμένοι στις συνθήκες οι οποίες είναι εντελώς διαφορετικές από τα γύρω περιβάλλοντα. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών η πρόοδος στη μικροβιακή οικολογία έχει διερευνηθεί περισσότερο περιλαμβάνοντας και τα ακραία αυτά περιβάλλοντα των θερμών πηγών. Η ανάπτυξη των καλλιεργητικών μεθόδων επέτρεψε την ανάλυση της φυσιολογίας των φυσικά απαντώμενων μικροβιακών ενδιαιτημάτων.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η καταμέτρηση της βακτηριακής ποικιλότητας των καλλιεργήσιμων μεσόφιλων βακτηρίων στις θερμές πηγές Σπήλαιο Θερμών (Θ) και Λευκάδα (Λ) Ικαρίας. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στην παράκτια περιοχή νότια ανατολικά της νήσου Ικαρίας την περίοδο 2012 - 2013. Δείγματα συλλέχθηκαν από 3 και 2 σταθμούς για την πηγή των Θερμών και της Λευκάδας αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα ο σταθμός 0 αντιστοιχεί στη σημειακή πηγή ανάβλυσσης του ιαματικού νερού, ο σταθμός 1 στο σημείο ανάμιξης με το θαλασσινό νερό και ο σταθμός 3 σε καθαρά θαλασσινό νερό.

Στο εργαστήριο χρησιμοποιήθηκε η καλλιεργητική τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης σε θρεπτικό μέσο TSA Agar στους 39<sup>0</sup>C στο σκοτάδι, αφού πρώτα πραγματοποιήθηκε η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων, μέχρις ότου παρατηρηθεί αύξηση αποικιών. Η απαρίθμηση των αποικιών εκφράστηκε ως μονάδα σχηματιζόμενων αποικιών (cfu/ml). Ενώ παράλληλα, πραγματοποιήθηκε ταξινόμηση των μικροοργανισμών ως προς τα φαινοτυπικά τους χαρακτηριστικά (μέγεθος, σχήμα, μορφολογία αποικιών).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ταχύτερη αύξηση των αποικιών στο σταθμό 1 και για τις δύο πηγές, λόγω της προσαρμογής τους στη θερμοκρασία επώασης. Ακόμα, η αύξηση των αποικιών για τις αραιώσεις 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup> και 10<sup>-2</sup> ήταν μικρότερη (αύξηση σε 24h) σε σχέση με τις αραιώσεις 10<sup>-3</sup> και 10<sup>-4</sup> που ενώ παρατηρήθηκε μεγαλύτερος χρόνος επώασης, η απαρίθμηση των αποικιών (logcfu/ml) παρουσίασε μεγαλύτερες τιμές. Στατιστικώς σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν

τόσο ανάμεσα στις δύο πηγές όσο και ανάμεσα στους σταθμούς της κάθε πηγής ξεχωριστά.

Η καταμέτρηση, η δομή και η απομόνωση βακτηριών από τα συγκεκριμένα ακραιόφιλα ενδιαυτήματα αποκαλύπτει μιας υψηλής πυκνότητας και βιοποικιλότητας βακτηριακό πληθυσμό και έχει μελετηθεί αρκετά. Ακόμα, έχει προσδιοριστεί ο τρόπος με τον οποίο οι αβιοτικοί παράγοντες (θερμοκρασία) καθορίζουν το σχηματισμό των μικροβιακών κοινοτήτων στις φυσικές γεωθερμικές πηγές, Ως εκ τούτου είναι φανερή η δράση των συγκεκριμένων μικροοργανισμών στις βιογεωχημικές διεργασίες οι οποίες λαμβάνουν χώρα στα συγκεκριμένα υδροθερμικά ενδιαυτήματα, ενώ παράλληλα αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο για τη βιοτεχνολογία. Η παρούσα εργασία, έδειξε οι θερμοπηγές της Ικαρίας φιλοξενούν ένα σημαντικό αριθμό γηγενών ανώτερων-μεσόφιλων βακτηριών που μπορούν να αυξηθούν μόνο σε συνθήκες παρόμοιες με αυτές των θερμοπηγών.

**Λέξεις κλειδιά:** μεσόφιλα βακτήρια, θερμές πηγές, Ικαρία, αφθονία

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
1. Εισαγωγή.....	1
1.1. Σκοπός και αντικείμενο της έρευνας.....	8
2. Υλικά και μέθοδοι.....	9
2.1. Περιοχή μελέτης.....	9
2.2. Δειγματοληψία.....	11
2.3. Καταμέτρηση αριθμού ζωντανών αερόβιων κυττάρων - μικροβιολογική ανάλυση δειγμάτων.....	13
2.4. Μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων.....	14
2.5. Καταμέτρηση και ταξινόμηση των αποικιών - μικροοργανισμών.....	15
2.6. Στατιστική επεξεργασία - ανάλυση.....	17
3. Αποτελέσματα.....	18
3.1. Μικροβιακή αύξηση.....	18
3.1.1. Καταμέτρηση του βακτηριακού πληθυσμού.....	18
3.2. Στατιστική επεξεργασία.....	27
4. Συζήτηση.....	35
5. Βιβλιογραφία.....	42
6. ABSTRACT.....	49



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μικροοργανισμοί ζουν σε όλα τα μέρη της βιόσφαιρας όπου υπάρχει νερό σε υγρή μορφή, όπως στο έδαφος, σε θερμές πηγές και στον πυθμένα του ωκεανού. Είναι σημαντικοί για την ανακύκλωση των θρεπτικών συστατικών στα οικοσυστήματα, αφούν ενεργούν ως αποικοδομητές (Christner et al., 2008).

Τα ηφαίστεια, οι ατμίδες και οι πηγές θερμού νερού μαρτυρούν ότι το εσωτερικό της γης περιέχει μεγάλες ποσότητες θερμότητας. Εξ άλλου η εμπειρία από την όρυξη γεωτρήσεων έχει δείξει ότι η θερμοκρασία του εσωτερικού της γης αυξάνεται με το βάθος. Συνήθως η αύξηση αυτή κυμαίνεται στα επίπεδα των 25-30 °C/Km, σε ορισμένες όμως περιπτώσεις (σε περιοχές που παρουσιάζουν θερμική ανωμαλία) γίνεται πολύ μεγαλύτερη (π.χ. 300 °C/Km). Σε πολύ μεγάλα βάθη, η θερμοκρασία δεν είναι γνωστή με ακρίβεια. Στα όρια μεταξύ μανδύα και φλοιού, στην ασυνέχεια Mohorovicic, πιστεύεται ότι η θερμοκρασία φτάνει στους 6000 °C, ενώ στο κέντρο της γης στους 60.000 °C. Φαίνεται ότι η παραγωγή θερμότητας από ραδιενεργά ισότοπα είναι συγκεντρωμένη περισσότερο στο φλοιό παρά στον πυρήνα, με αποτέλεσμα η γεωθερμική βαθμίδα να μειώνεται με το βάθος (Καστανιάς, 2003).

Οι φυσικές γεωθερμικές πηγές είναι ευρέως διαδεδομένες στην επιφάνεια της γης (e.g. Kormas et al. 2009, Tomova et al. 2010). Ανάμεσα στα φυσικώς θερμά περιβάλλοντα, οι θερμές πηγές αποτελούν τα πιο κοινά και προσιτά ενδιαιτήματα. Τα συγκεκριμένα ενδιαιτήματα έχουν αποκτήσει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της μοναδικότητας των ιδιοτήτων – χαρακτηριστικών των θερμόφιλων οργανισμών, που διαβιούν και του όλο και αυξανόμενου αριθμού των νέων ειδών, τα οποία διαβιούν στα συγκεκριμένα ενδιαιτήματα (Satyanarayana et al. 2005).

Τα συγκεκριμένα υδροθερμικά συστήματα εκτιμάται ότι υπάρχουν στη γη, εδώ και δισεκατομμύρια χρόνια (Gold, 1992). Είναι καλά απομονωμένα ενδιαιτήματα τα οποία κατανέμονται σε όλο τον κόσμο και οι μικροοργανισμοί οι οποίοι διαβιούν εκεί είναι καλά προσαρμοσμένοι στις συνθήκες οι οποίες είναι εντελώς διαφορετικές από τα γύρω περιβάλλοντα (Song et al., 2013).

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών η πρόοδος στη μικροβιακή οικολογία έχει διερευνηθεί περισσότερο περιλαμβάνοντας και τα ακραία αυτά περιβάλλοντα των θερμών πηγών και τις υδροθερμικές πηγές βαθιάς θάλασσας (Priour et al. 1995,

Ward et al. 1998, Jeantho, 2000, Fouke et al. 2003). Η ανάπτυξη των καλλιεργητικών μεθόδων επέτρεψε την ανάλυση της φυσιολογίας των φυσικά απαντώμενων μικροβιακών ενδαιτημάτων (Kogure et al. 1987, Rodriguez et al. 1992, Karner & Fuhrman 1997, Miskin et al. 1998).

Οι καλλιεργητικές προσεγγίσεις, αν και είναι σημαντικές για την κατανόηση των βιοτεχνολογικών εφαρμογών – για την πιθανή χρήση των απομονωμένων μικροοργανισμών στον κλάδο της βιοτεχνολογίας, ωστόσο αναγνωρίζουν μόνο ένα μικρό ποσοστό των μικροοργανισμών (0.1 – 10%) στα φυσικά τους περιβάλλοντα (Ranjard et al. 2000).

Η σύνθεση των μικροβιακών κοινοτήτων των υδροθερμικών πηγών, μέχρι πρόσφατα είχε μελετηθεί με τη χρήση καλλιεργητικών τεχνικών. Έτσι, είχε υποθεθεί λόγω της συχνής απομόνωσης Archaea ότι στα συγκεκριμένα ενδαιτήματα κυριαρχούν μικροοργανισμοί από αυτήν την επικράτεια της ζωής (Stetter et al., 1990, Baross & Deming, 1995). Ωστόσο, με την εφαρμογή των μη καλλιεργητικών τεχνικών διαπιστώθηκε ότι τα Bacteria κυριαρχούν στα συγκεκριμένα περιβάλλοντα (Reysenbach et al., 1994, Harmsen et al., 1997a, Hugenholtz et al., 1998, Takai & Sako, 1999).

Αντίθετα, η τεχνολογία η οποία βασίζεται στο DNA παρέχει ένα σημαντικό κίνητρο για την άμεση αξιοποίηση των γονιδίων των θερμόφιλων μικροοργανισμών με *in situ* ανίχνευση. Η μοριακή τεχνική, η οποία περιλαμβάνει την εκχύλιση του DNA, ακολουθούμενη από την ενίσχυση του μέρους του γονιδιώματος με τη χρήση PCR και η κλωνοποίηση του 16S r - RNA, αναπτύχθηκε για ξεπεραστεί ο περιορισμός που σχετίζεται με τις κοινές καλλιεργητικές προσεγγίσεις (e.g. Kormas et al. 2009, Tomova et al. 2010).

Η χρήση των καλλιεργητικών και μοριακών τεχνικών έχει αποκαλύψει μια αξιοσημείωτη ποικιλομορφία όσον αφορά τα Bacteria και τα Archaea στις θερμές πηγές παγκοσμίως. Οι ακραιόφιλες μικροοργανισμικές κοινότητες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, επειδή τα συγκεκριμένα ενδαιτήματα προσομοιάζουν με τα ανοξικά ηφαιστειακά ενδαιτήματα και γιατί πιστεύεται ότι οι συγκεκριμένοι οικότοποι υπήρχαν στην πρώιμη Γη (Gold 1992, Pace 1997).

Τα περισσότερα αναφερόμενα στοιχεία - δεδομένα τα οποία έχουν καταγραφεί αφορούν βακτηριακούς πληθυσμούς με χαμηλή αφθονία των κυττάρων τους. Παρόλα αυτά, η επίδραση των μικροοργανισμών στις γεωχημικές διεργασίες, οι οποίες λαμβάνουν χώρα στις θερμές πηγές είναι προφανής. Επομένως, η μέτρηση του TBA (total bacteria abundance), ιδίτερα το κλάσμα των μεταβολικώς ενεργών βακτηρίων στη μικροβιακή κοινότητα των θερμών πηγών είναι ιδιαίτερα σημαντική (Belkova et al., 2007).

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον για τα θερμοφιλά περιβάλλοντα και η μελέτη των μικροοργανισμών, οι οποίοι απαντώνται στα ακραία αυτά περιβάλλοντα (Nielsen et al. 1993, Dvoryanchikova et al., 2011). Πολλά νέα είδη θερμοφίλων μικροοργανισμών, τα περισσότερα από αυτά αναερόβια, έχουν απομονωθεί, από θερμές πηγές. Ένα μεγάλο ποσοστό των απομονωθέντων στελεχών είναι βακτήρια με εξωκυττάρια ένζυμα τα οποία παρουσιάζουν μεγάλο εμπορικό ενδιαφέρον (π.χ. ξυλανάσες, αμυλάσες) (Sonne-Hansen & Ahring, 1999). Ακόμα, θερμοσταθερά ένζυμα συνθέτονται από θερμοφίλους μικροοργανισμούς, οι οποίοι είναι μεταβολικώς ενεργοί κάτω από τα συγκεκριμένα ακραία ενδιαιτήματα (Tomova et al., 2010).

Έχει μελετηθεί η βιολογία τους, οι χρήσεις τους για την παραγωγή καυσίμων και χημικών (Zeikus et al., 1981) και η χρησιμότητά τους σε τεχνολογικές διεργασίες (Bergquist et al., 1989, Mathrani & Ahring 1992). Επίσης, οι οργανισμοί οι οποίοι έχουν απομονωθεί από τα περιβάλλοντα των θερμών πηγών (π.χ. *Thermus aquaticus*) έχει αποδεχθεί ότι είναι σημαντικοί στον τομέα της βιοτεχνολογίας αλλά και σε ερευνητικές εφαρμογές (Brock, 1997). Ο φαινοτυπικός και γονοτυπικός χαρακτηρισμός των θερμοφίλων βακτηρίων έχει προσδιοριστεί σε πολλές γεωθερμικές περιοχές, σε διαφορετικές περιοχές – μέρη του κόσμου (Alves et al. 2003, Chen et al. 2005, Haouari et al. 2008, Adiguzel 2009).

Μικροβιακές μελέτες σε θερμά περιβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένων των χερσαίων και των υπογείων ενδιαιτημάτων, έχουν αποκαλύψει την παρουσία πολύπλοκων βακτηριακών κοινοτήτων, αρκετές εκ των οποίων εμπλέκονται στην αναγωγή θειούχων ενώσεων σε σουλφίδιο (Ollivier et al., 2010). Μεταξύ αυτών, οι θερμοφιλοί θειικο – αναγωγικοί κατέχουν ένα σημαντικό οικολογικό ρόλο στον κύκλο

του θείου μέσω οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων (π.χ. οξείδωση του  $\text{H}_2\text{S}$  και θεϊκή αναγωγή) (Haouari et al., 2008).

Παράλληλα, μία πληρέστερη εικόνα από είδη υπερθερμόφιλων μικροοργανισμών οι οποίοι κατοικούν σε ελαφρώς αλκαλικό έδαφος (pH 7.8 – 8.9) σε θερμές πηγές έχει αρχίσει να καταγράφεται. Μοριακές και καλλιεργητικές μέθοδοι δείχνουν σε πολλά από αυτά τα οικοσυστήματα, συμπεριλαμβανομένων και αυτών με υψηλές και χαμηλές συγκεντρώσεις σουλφιδίων στην Ιαπωνία, την Ισλανδία, την Kamchatka και το Yellowstone National Park, ότι οι κυρίαρχοι οργανισμοί ανήκουν στην τάξη των *Aquificales* (Huber et al. 1998, Hugenholtz et al. 1998, Hjorleifsdottir et al. 2001). Στα συγκεκριμένα οικοσυστήματα απαντώνται επίσης και τα φύλλα *Thermotoga*, *Thermus*, *Thermodesulfobacteria* (Blank et al., 2002).

Οι μικροβιακές κοινότητες οι οποίες απαντώνται στα θερμά και όξινα περιβάλλοντα παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον στις μελέτες των οικολόγων και των μικροβιολόγων καθώς οι θερμο- οξύφιλοι οργανισμοί αποτελούν χρήσιμο εργαλείο για την κατανόηση της βιοποικιλότητας και για τις βιοτεχνολογικές εφαρμογές τους (Wilson et al., 2008). Οι όξινες θερμές πηγές προσφέρουν ιδανικά περιβάλλοντα για τη μελέτη των διεργασιών της ακραιόφιλης μικροβιακής κοινότητας (Mathur et al., 2007).

Οι ηπειρωτικές θερμές πηγές φιλοξενούν μια μεγάλη ποικιλία από θερμόφιλα βακτήρια τα οποία ανήκουν σε διάφορες ταξινομικές ομάδες και παρουσιάζουν χημειολιθότροφο, φωτολιθότροφο και χημειοργανότροφο μεταβολισμό (Tomona et al., 2010). Μελέτες για τα μεθανιότροφα βακτήρια τα οποία βρίσκονται σε ενδιαίτηματα υψηλής θερμοκρασίας είναι σπάνιες (Trotsenko et al. 2009). Οι κύριες κατηγορίες θερμόφιλων και θερμο – ανθεκτικών βακτηρίων τα οποία έχουν περιγραφεί ανήκουν κυρίως στα γένη *Methylothermus* (Tsubota et al. 2005, Hirayama et al. 2010), *Methylococcus* και *Methylocaldum* (Romanovskaya et al., 2006).

Επιπρόσθετα, οι μικροβιακοί τάπητες, αναπτύσσονται σε ένα ευρύ φάσμα υδάτινων οικοτόπων, όπως οι γεωθερμικές πηγές, οι υπεράλμυρες λίμνες και οι υδροθερμικές αναβλύσεις. Οι μικροβιακοί τάπητες όσον αφορά τις χερσαίες ιαματικές πηγές αποτελούνται κυρίως από φωτότροφα βακτήρια (Friedrich 2002, Hanada 2003,

Kubo et al. 2011). Αν και έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες για τις ιαματικές πηγές, ωστόσο δεν υπάρχουν αρκετές πληροφορίες σχετικά με τις μικροβιακές κοινότητες των συγκεκριμένων οικοτόπων (Weidler et al., 2007).

Παρόλα αυτά, οι γνώσεις σχετικά με τη βιοποικιλότητα στις θερμές πηγές, εξακολουθεί να είναι λιγοστή (Tomona et al. 2010) λόγω της σχετικά πρόσφατης γνώσης και χρήσης των μοριακών μεθόδων (Amann et al., 1995). Πριν από τη χρήση μοριακών τεχνικών για την εξερεύνηση – της μικροβιακής ποικιλότητας, οι καλλιεργητικές τεχνικές αποτελούσαν το κύριο μέσο για τον εντοπισμό – προσδιορισμό – χαρακτηρισμό νέων οργανισμών. Οι μοριακές μελέτες, οι οποίες αφορούν τα γεωθερμικά οικοσυστήματα έχουν αποκαλύψει αρκετές πληροφορίες για τη μικροβιακή ποικιλομορφία των συγκεκριμένων ενδιατημάτων (Mathur et al., 2007).

Όσον αφορά την Ελλάδα, λόγω της γεωλογίας η οποία σχετίζεται με την ηφαιστειακή δραστηριότητα παρατηρούνται αρκετές χερσαίες και παράκτιες περιοχές οι οποίες φιλοξενούν γεωθερμικές πηγές, με θερμοκρασίες μεταξύ 30 και 90° C (Lambrakis & Kallergis, 2005). Αν και έχουν δημοσιευθεί αρκετές μελέτες σχετικά με τη γεωλογία και τη γεωθερμία των θερμών πηγών αυτών (Καστανιάς 2003, Lambrakis & Kallergis 2005, Karakatsanis et al., 2011), ωστόσο οι αναφορές σε μικροβιολογικές μελέτες (Anagnostidis 1961, Anagnostidis & Pantazidou 1988, Komarek & Anagnostidis 1998, Sievert et al. 2000, Komarek & Anagnostidis 2005, Kormas et al. 2009, Radea et al. 2010) είναι ελάχιστες. Ενώ οι περισσότερες από αυτές έχουν εστιάσει στα θερμοφιλά κυανοβακτήρια και όχι στο σύνολο των προκαρυωτών των θερμοληγών.

Τα γεωθερμικά πεδία στην Ελλάδα, συχνά συνδέονται με την ηφαιστειακή δραστηριότητα, ειδικά κατά μήκος του νότιου ηφαιστειακού τόξου στο Αιγαίο (Megalovasilis 2005, Lambrakis & Kallergis 2005).

Η παρουσία των γεωθερμικών πεδίων χαμηλής, μέσης και υψηλής θερμοκρασίας εκφράζεται με τη μετα-ηφαιστειακή δραστηριότητα. Η περιοχή του νότιου ηφαιστειακού τόξου στο Αιγαίο χαρακτηρίζεται από μη φυσιολογική ροή θερμότητας, η οποία προήλθε από έντονες ηφαιστειακές δραστηριότητες (Fytikas 1977). Η ηφαιστειακή δραστηριότητα είναι στενά δυνδεδεμένη με την κυκλοφορία των υπόγειων

υδάτων και την ανάπτυξη των ιαματικών πηγών. Σε μια μεγάλη έκταση πίσω από το ηφαιστειακό τόξο, καταγράφονται ρήγματα με κατεύθυνση Α – Δ. Στις συγκεκριμένες περιοχές εκρέουν πολλές ιαματικές πηγές (Karakatsanis et al., 2011).

Τα νερά των γεωθερμικών πηγών στα νησιά και στις παράκτιες περιοχές είναι χαρακτηριστικό των θαλάσσιων διαλυμάτων και προκύπτουν από την ανάμιξη των βαθέων ταμιευτήτων νερού με το μετεωρικό νερό (Kormas et al., 2009). Η επίδραση των μικροοργανισμών στις γεωχημικές διεργασίες, οι οποίες συμβαίνουν στις θερμές πηγές είναι προφανής (Belkova et al., 2007).

Στα εμπλουτισμένα με σίδηρο φυσικά περιβάλλοντα περιλαμβάνονται και οι θερμές πηγές, όπου η κυτταρική επιβίωση επιτυγχάνεται μέσω μηχανισμών αποβολής-αποικοδόμησης αποτοξίνωσης του σιδήρου (detoxification) (Radea et al., 2010).

Μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί στην περιοχή της Μήλου, όπου μελετήθηκαν διαφορετικές κοινότητες Archaea και Bacteria (Sievert et al. 1999, 2000) και στη Σαντορίνη όπου η συγκεκριμένη μελέτη επικεντρώθηκε στην απομόνωση θερμοφίλων στελεχών από τα ιζήματα και το νερό, που υπάρχουν στο ηφαιστειογενές νησί της Σαντορίνης (Meintanis et al. 2006), καθώς και σε άλλες περιοχές της Ελλάδας (Kormas et al., 2009)

Το υδρογεωλογικό καθεστώς της Ικαρίας είναι άμεσα συνδεδεμένο με τη λιθολογική σύνθεση των γεωλογικών σχηματισμών και την τεκτονική ένταση. Οι πηγές της Ικαρίας εμφανίζονται στα μετα – ορογενητικά τμήματα του τόξου του Αιγαίου, το οποίο χαρακτηρίζεται από παρουσία γεωθερμικών πεδίων. Η παρουσία του υδροφόρου ορίζοντα η οποία εκκενώνεται από τον υδροφόρο ορίζοντα μέσω των θερμών πηγών, συνδέονται με τη διείσδυση του θαλασσινού νερού και με την ανάμιξη μετεωρικού νερού και θερμού νερού από τη βαθιά υποεπιφάνεια. Υπάρχει ένα ευρύ φάσμα των τιμών των ιόντων στην Ικαρία το οποίο υποδεικνύει σημαντική γεωθερμική ανωμαλία. Η παρουσία ιχνοστοιχείων αποδίδεται στη διάλυση (dissolution) μεταλλικών στοιχείων και τα ηφαιστειογενή υδροθερμικά διαλύματα (Karakatsanis et al., 2011).

Το 53,3% του νερού στην νήσο Ικαρία ανήκει στον Na – Cl ή στον Na – Ca – Cl υδροχημικό τύπο, οι οποίοι κατατάσσονται στα πρωτοβάθμια γεωθερμικά ρευστά (Nicholson 1993). Η θερμοκρασία κυμαίνεται μεταξύ 28.1° C – 58.3° C. Η μέση τιμή

του  $pH$  είναι μικρότερη από 7, υποδηλώνοντας τον ελαφρώς όξινο χαρακτήρα των υδάτων με μέγιστη τιμή 7.23. η ηλεκτρική αγωγιμότητα κυμαίνεται μεταξύ 22.030 – 50.600 Ms/cm, και αυτό είναι ενδεικτικό λόγω των διαλυμάτων τα οποία βρίσκονται κοντά στη θαλάσσια σύνθεση. (Karakatsanis et al., 2011).

Στις παράκτιες περιοχές, της Ικαρίας όπου υπάγονται και οι πηγές οι οποίες μελετώνται στην παρούσα εργασία εκτός από την ανάμιξη του επιφανειακού νερού, το οποίο έχει κατεισδύσει και υπέρθερμου νερού που φτάνει από μεγάλα βάθη, καθώς και ατμών και αερίων, είναι πολύ συχνή η ανάμιξη, εκείνη με το θαλασσινό νερό (Εικ. 1.1), που με την αυξημένη συμμετοχή του διαμορφώνει ουσιαστικά του ποιοτικούς χαρακτήρες των ιαματικών νερών.



**Εικόνα 1.1.:** Ανάμιξη ιαματικού με θαλασσινό νερό  
(Πηγή: Καστανιάς, 2003)

Στην παράκτια ζώνη της Ικαρίας (γύρω από το νησί) υπάρχουν πολλές μεταλλικές πηγές, επίσης στην υπο – παραλιακή ζώνη υπάρχουν πηγές οι οποίες αναβλύζουν από τον πυθμένα της θάλασσας (Trabidou et al., 1996, Trabidou & Florou, 2005).

Το υδροθείο ( $H_2S$ ) αποτελεί ένα μόριο το οποίο εκλύεται από ηφαίστεια, στάσιμα νερά, ιαματικές πηγές και από υποβρύχιες θερμικές αναβλύσεις. Οι συγκεκριμένες φυσικές πηγές αντιπροσωπεύουν το 90% του συνολικού υδροθείου στην ατμόσφαιρα. Το υδροθείο βρίσκεται διαλυμένο σε αρκετές ιαματικές πηγές και σε ποικίλες

συγκεντρώσεις (Giampaoli et al., 2013). Σε γενικές γραμμές, η διακύμανση της συγκέντρωσης του υδροθείου στις πηγές εξαρτάται από τη θέση της πηγής (περιοχές κοντά στη θάλασσα, γεωθερμικές, ορεινές και ηφαιστειακές περιοχές). Τα ιαματικά νερά περιγράφονται ως αλμυρά, θειώδη, όξινα, ανθρακικά ανάλογα με τη σύσταση των μεταλλικών στοιχείων που εμπεριέχονται (Andreassi & Flori 1996, Giampaoli et al. 2013).

### **1.1. Σκοπός και αντικείμενο της έρευνας**

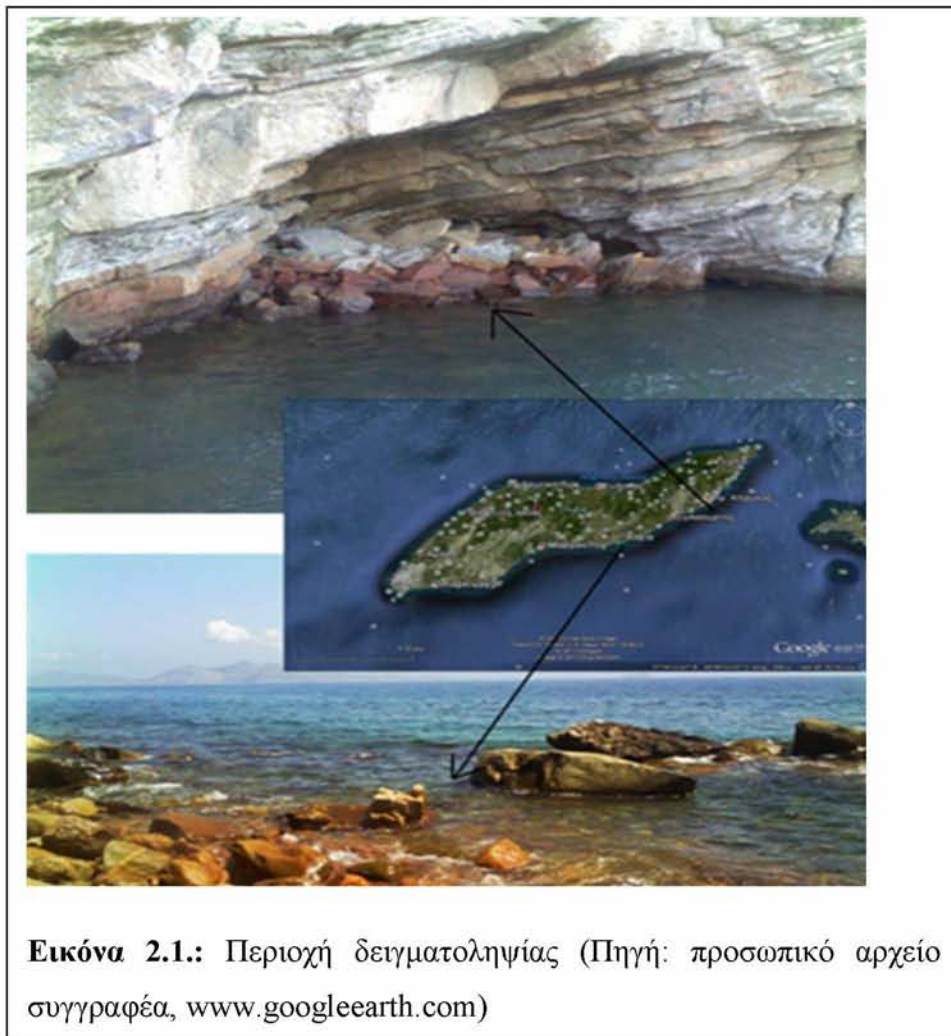
Η παρούσα εργασία είχε ως στόχο την καταμέτρηση της αφθονίας και τον προσδιορισμό της μικροβιακής κοινότητας των μεσόφιλων καλλιεργήσιμων βακτηρίων που διαβιούν στις θερμές πηγές Σπήλαιο και Λευκάδα Ικαρίας και τη μεταξύ τους σύγκριση.



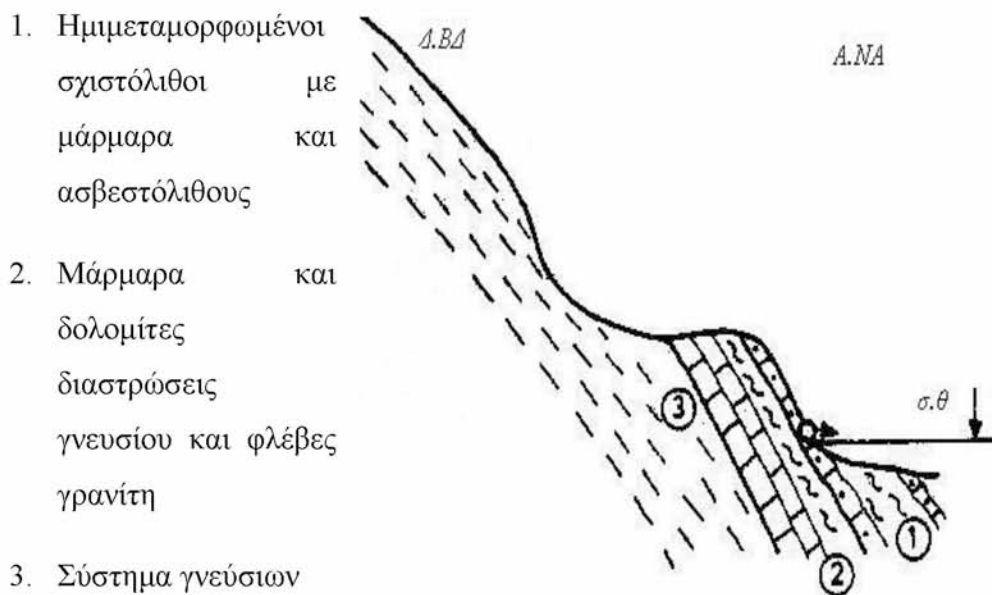
## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Περιοχή μελέτης

Οι πηγές Θέρμα και Λευκάδα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, βρίσκονται στη νήσο Ικαρία. Η Ικαρία ανήκει στο ΝΑ σύμπλεγμα των νησιών του Αιγαίου και η γεωγραφική της θέση ορίζεται από τους ( $37.31^{\circ}$  -  $37,418^{\circ}$ ) παραλλήλους και ( $25.978$  -  $26.278$ ) μεσημβρινούς (Βέκιος, 1999). Όλες οι παράκτιες πηγές των νότιων ακτών της Ικαρίας βρίσκονται διατεταγμένες κατά μήκος μεγάλου τεκτονικού βυθίσματος διεύθυνσης Α - Δ, το οποίο καθορίζει την άνοδο των ιαματικών νερών στην επιφάνεια (Καστανιάς, 2003). Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στη θαλάσσια περιοχή νότια ανατολικά της νήσου Ικαρίας στις θερμές πηγές Σπήλαιο Θερμών και Λευκάδα Θερμών (Εικ.2.1).



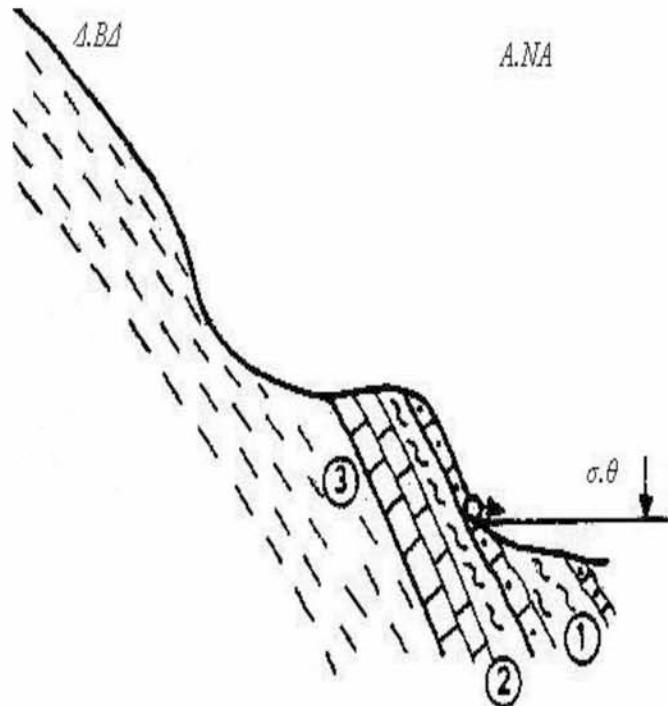
Πιο συγκεκριμένα η πηγή του Σπηλαιίου (Σχ.2.1.) βρίσκεται στην περιοχή των Θερμών, εντός φυσικού σπηλαιίου στο νοτιοδυτικό άκρο του όρμου των Θερμών. Χαρακτηρίζεται ως υπέρθερμος, ασθενώς ραδιενεργή αλοπηγή. Ο ροή είναι συνεχής και η ανάβλυση του νερού διάσπαρτη. Η ραδιενέργεια της συγκεκριμένης πηγής είναι 6,5 Mache (Πιν.2.1) (Καστανιάς, 2003).



**Σχήμα 2.1.:** Σχηματική γεωλογική τομή της περιοχής δειγματοληψίας, Σπήλαιο Θερμών (Πηγή: Καστανιάς, 2003)

Η πηγή της Λευκάδας (Θέρμα Λευκάδας) (Σχ.2.2.) βρίσκεται δυτικά του Αγ. Κηρύκου σε απόσταση 2.500 m στην περιοχή της Λευκάδας. Χαρακτηρίζεται ως υπέρθερμος αλοπηγή μη ραδιενεργή. Τα ιαματικά νερά της πηγής μετά την εξοδό τους από το μητρικό πέτρωμα και μέχρι την επιφανειακή εκροή τους διέρχονται από τα επιφανειακά αυτά αποθέματα και χάνουν τη ραδιενεργειά τους σε αντίθεση με την πηγή Σπήλαιο Θερμών, τα οποία αναβλύζουν κατευθείαν από το μητρικό πέτρωμα. Η ροή του ιαματικού νερού είναι συνεχής, και η ανάβλυσή του διάσπαρτη. Στο νερό έχουν βρεθεί ίχνη υδρόθειου ( $H_2S$ ) (Πιν.2.1.).

1. Πλειοκαινικά στρώματα  
κροκαλοπαγών, μαργών  
και ασβεστολίθων
2. Ημιμεταμορφωμένοι  
σχιστόλιθοι με μάρμαρα  
και ασβεστόλιθους
3. Μάρμαρα και δολομίτες  
με διαστρώσεις και  
φλέβες γρανίτη
4. Σύστημα γενύσεων
5. Γρανίτης



**Σχήμα 2.2:** Σχηματική γεωλογική τομή της περιοχής δειγματοληψίας, Θέρμα Λευκάδας (Πηγή: Καστανιάς, 2003)

## 2.2. Δειγματοληψία

Τα δείγματα συλλέχθηκαν την περίοδο 2012 - 2013 από δύο σταθμούς. Συνολικά ελήφθησαν 40 ml δείγματος με τη χρήση αποστειρωμένων πλαστικών φιαλιδίων τύπου falkon 50 ml από τις πηγές Θέρμα (Θ) και Λευκάδα (Λ).

Πιο συγκεκριμένα ο σταθμός Θ x-0 και ο σταθμός Λ x-0 αντιστοιχούν στη σημειακή πηγή ανάβλυσης του ιαματικού νερού. Οι σταθμοί Θ x-1 και Λ x-1 αντιστοιχούν σε απόσταση 1 - 2 m από τη σημειακή πηγή, σε θαλάσσιο τόπο δειγματοληψίας όπου πραγματοποιείται ανάμειξη του ιαματικού νερού με το θαλασσινό, και η θερμοκρασία παραμένει ακόμα υψηλή αλλά χαμηλότερη του σημείου ανάβλυσης και τέλος ο σταθμός Θ x-2 αντιστοιχεί σε καθαρά θαλασσινό νερό λίγα μέτρα από το αναμιγμένο νερό. Κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας καταγράφηκε στο πεδίο η θερμοκρασία του νερού με τη βοήθεια φορητού θερμομέτρου υδραργύρου και το pH με πεχαμετρικές ταινίες. Οι μετρήσεις των φυσικοχημικών παραμέτρων

παρατίθενται στον Πίν. 2.2. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους 5°C μέχρι τη μεταφορά τους στο εργαστήριο για περαιτέρω επεξεργασία.

**Πίνακας 2.1.:** Συγκριτικός πίνακας χημικών αναλύσεων των πηγών Θέρμα και Λευκάδα Ικαρίας (τροποποιημένο από Καστανιάς, 2003)

	Σπήλαιο	Λευκάδα		Σπήλαιο	Λευκάδα
Κατιόντα	p.p.m		Ανιόντα	p.p.m.	
Ca	1290,58	1314,62	Cl	21800.7	21978.02
Mg	880,13	894,72	SO <sub>4</sub>	2968.78	3005.76
Na	12068,96	12126,43	HCO <sub>3</sub>	122.02	113.48
K	586,62	586,62	CO <sub>3</sub>	-	-
NH <sub>4</sub>	0,5	0,6	F	1.35	1.7
Ολ. Fe	0,85	0,67	Br	1.12	1
Sr	10,92	10,28	I	0.45	0.45
Li	0,52	0,57	Σ. ανιόντων	24894.42	25100.41
Ba	0,9	1,2	SiO <sub>2</sub>	23	25
Σ.κατιόντων	14839,98	14935,71	Br	4.5	4.5
Ολική αλκαλικότητα	106,55	92,62	Σ.διαλυμένων αλάτων	38791.9	40065.14
Ολική σκληρότητα	6840	6959,99			
Αγωγιμότητα	62.000/29 °C μmho/cm	62.000/29 °C μmho/cm			

**Πίνακας 2.2.:** Μετρήσεις θερμοκρασίας και pH

	Μετρήσεις θερμοκρασίας (°C)					pH
25.9.12	Λ 4-0	Λ 4-1	Θ 4-0	Θ 4-1	Θ 4-2	
	59°C	40°C	54°C	43°C	32°C	5-6
03.01.13	Λ 5-0	Λ 5-1	Θ 5-0	Θ 5-1	Θ 5-2	
	57	33	49-51	42	25,5	5-6

	$\Lambda$ 6-0	$\Lambda$ 6-1	$\Theta$ 6-0	$\Theta$ 6-1	$\Theta$ 6-2	
11.05.13	58	39	55	40	25	5-6

### **2.3. Καταμέτρηση αριθμού ζωντανών αερόβιων κυττάρων – μικροβιολογική ανάλυση δειγμάτων**

Η απομόνωση, η διατήρηση και η απαρίθμηση των μικροοργανισμών επιτυγχάνεται σε εργαστηριακά θρεπτικά υποστρώματα. Το υπόστρωμα περιέχει όλα τα θρεπτικά συστατικά τα οποία είναι απαραίτητα για την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών. Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος πρέπει να χρησιμοποιηθεί ένας πηκτικός παράγοντας – συστατικό (Madigan et al., 2003).

Η καλλιεργητική τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (pour plate technique) βασίζεται στην υπόθεση ότι τα μικροβιακά κύτταρα που υπάρχουν σε ένα δείγμα τοποθετούνται σε θρεπτικά υλικά που περιέχουν πεπτόνες, διάφορα εκχυλίσματα, σάκχαρα και σχηματίζουν ξεχωριστές ορατές αποικίες. Η συγκεκριμένη μέθοδος δεν μετρά απαραίτητα τον πραγματικό συνολικό αριθμό των ζωντανών κυττάρων ανά γραμμάριο/ml δείγματος αλλά μερικούς από τους βιώσιμους μικροοργανισμούς του δείγματος. Έτσι, οι μετρήσεις που προκύπτουν από τη μέθοδο αυτή δεν πρέπει να αναφέρονται ως μετρήσεις ζωντανών κυττάρων, αλλά ως μετρήσεις βιώσιμων αποικιών ανά μονάδα ή μονάδες σχηματισμού αποικιών (Colony Forming Units, cfu).

Με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης το αποστειρωμένο τηγμένο θρεπτικό μέσο με άγαρ απλώνεται πρώτα σε αποστειρωμένο τρυβλίο Petri. Έπειτα, από τη στερεοποίηση, τα τρυβλία προεπιάζονται κατά τη διάρκεια της νύκτας. Η επώαση ξηραίνει την επιφάνεια του θρεπτικού μέσου, έτσι ώστε οι μικροοργανισμοί να μην συνενωθούν κατά το άπλωμά τους πάνω στο άγαρ. Για τις καλλιέργειες των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν πλαστικά τρυβλία Petri χωρητικότητας ίσης με 15ml το καθένα και διαμέτρου περίπου 10 cm.

Το θρεπτικό μέσο το οποίο χρησιμοποιήθηκε ήταν το TSA Agar, το οποίο είναι ένα θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης (μη επιλεκτικό) το οποίο επιτρέπει την αύξηση όλων σχεδόν των μικροοργανισμών, που μπορούν να αναπτυχθούν σε εργαστηριακά υλικά. Για την παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος TSA (Tryptone Soy Agar) ζυγίστηκαν και προστέθηκαν σε φιάλη των 1000 ml τρυπτόνη 15,0 gr πεπτόνη σόγιας 5,0 gr, χλωριούχο νάτριο 5,0 gr και άγαρ 15,0 gr. έπειτα προστέθηκε απιονισμένο νερό.

Το θρεπτικό υλικό αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο για 15 λεπτά στους 121° C και μοιράστηκε στα τρυβλία Petri (Πίν.2.3).

<b>Πίνακας 2.3:</b> Σύσταση θρεπτικού υλικού TSA Agar (για 1000ml)	
Άγαρ	15 gr
Πεπτόνη σόγιας	5 gr
Χλωριούχο νάτριο	5 gr
Τρυπτόνη	15 gr
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

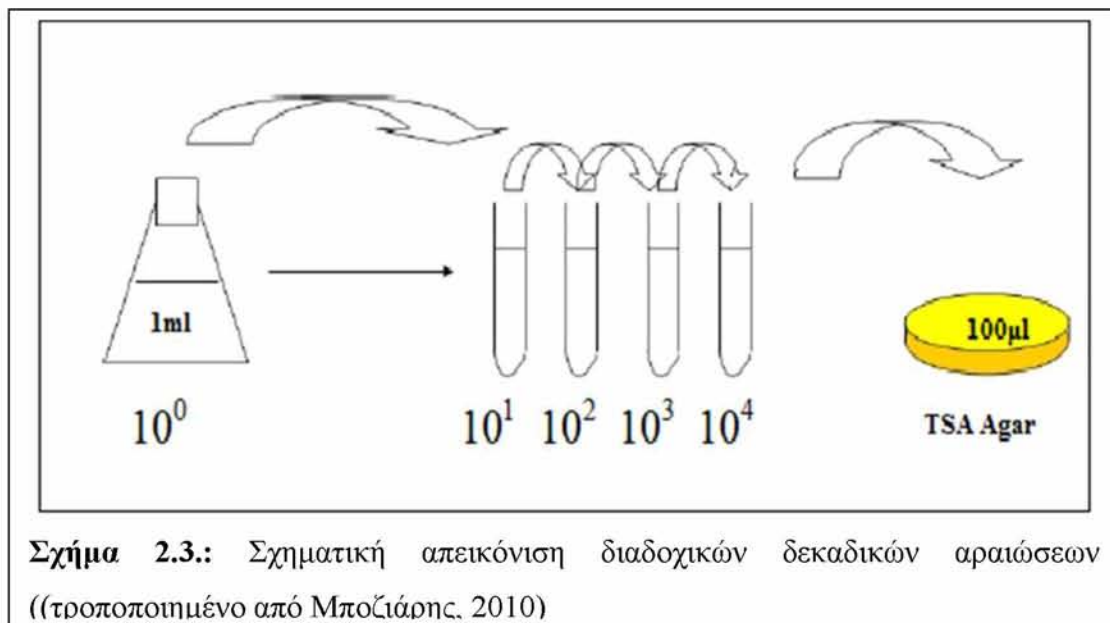
#### **2.4. Μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων**

Η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων πραγματοποιείται με σκοπό την απομόνωση – καταμέτρηση μικροοργανισμών, οι οποίοι έχουν μεγαλύτερη φάση προσαρμογής. Κατά τις διαδοχικές αραιώσεις το αρχικό εμβόλιο (με τη χρήση πιπέτας), αραιώνεται σε μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων - Eppendorfs. Μετά από κάθε αραιώση ο δοκιμαστικός σωλήνας θα περιέχει το 1/10 κυττάρων, σε σχέση με τον ακριβώς προηγούμενο. Κατόπιν, δείγματα από κάθε αραιώση εμβολιάζονται σε τρυβλία Petri όπου σχηματίζονται αποικίες και είναι δυνατό να καταμετρηθούν.

Η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων πραγματοποιήθηκε ως εξής: δείγμα 1ml λήφθηκε από τον κάθε σταθμό με τη χρήση πιπέτας και τοποθετήθηκε σε Eppendorf. Έπειτα ποσότητα δείγματος 900μl διηθήθηκε με τη χρήση ηθμού σύριγγας (0,2μm άνοιγμα πόρου) και κατανεμήθηκε στα Eppendorfs ώστε να μειωθεί όσο το δυνατόν περισσότερο το στρες των κυττάρων. Ακολούθησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις του δείγματος για την καλύτερη δυνατή καταμέτρηση των βιώσιμων κυττάρων και έπειτα ποσότητα 100μl από την κάθε αραιώση μεταφέρθηκε και εμβολιάστηκε στο θρεπτικό μέσο. Για την αποφυγή στατιστικού σφάλματος χρησιμοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις (n=3) (1, 2, 3) για κάθε αραιώση (Σχ.2.3).

Η τεχνική εμβολιασμού η οποία εφαρμόστηκε ήταν αυτή της επιφανειακής επίστρωσης (spread plate technique), η οποία αφορά στην προσθήκη 0,1 ml βακτηριακού ελαιώματος σε στερεοποιημένο θρεπτικό υλικό με άγαρ. Το δείγμα

επιστρώθηκε με τη χρήση αποστειρωμένης κεκαμένης γυάλινης ράβδου. Με την περιστροφή του τρυβλίου η ποσότητα του δείγματος επιστρώνεται σε ολόκληρη την επιφάνεια του τρυβλίου. Τέλος, ακολούθησε επώαση των τρυβλίων υπό αερόβιες συνθήκες στους 39° C για 7-10 μέρες. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων από τις καλλιεργητικές μεθόδους χρησιμοποιήθηκαν για μετέπειτα στατιστική επεξεργασία. Η απαρίθμηση των αποικιών εκφράστηκε ως μονάδα σχηματιζόμενων αποικιών (cfu).



## 2.5. Καταμέτρηση και ταξινόμηση των αποικιών - μικροοργανισμών

Υπάρχουν διάφορες τεχνικές παρακολούθησης της μικροβιακής ανάπτυξης των κυττάρων, οι οποίες βασίζονται στη μέτρηση του αριθμού ή της μάζας αυτών, παράμετροι που μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια της αύξησης.

Η μέτρηση του πλήθους των κυττάρων έγινε με την απευθείας μέτρηση του αριθμού τους (Εικ2.2.). Πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των αποικιών στα τρυβλία κάθε 24 ώρες. Για πρακτικούς λόγους, η απαρίθμηση των αποικιών εκφράζεται ως μονάδα σχηματιζόμενων αποικιών (cfu).

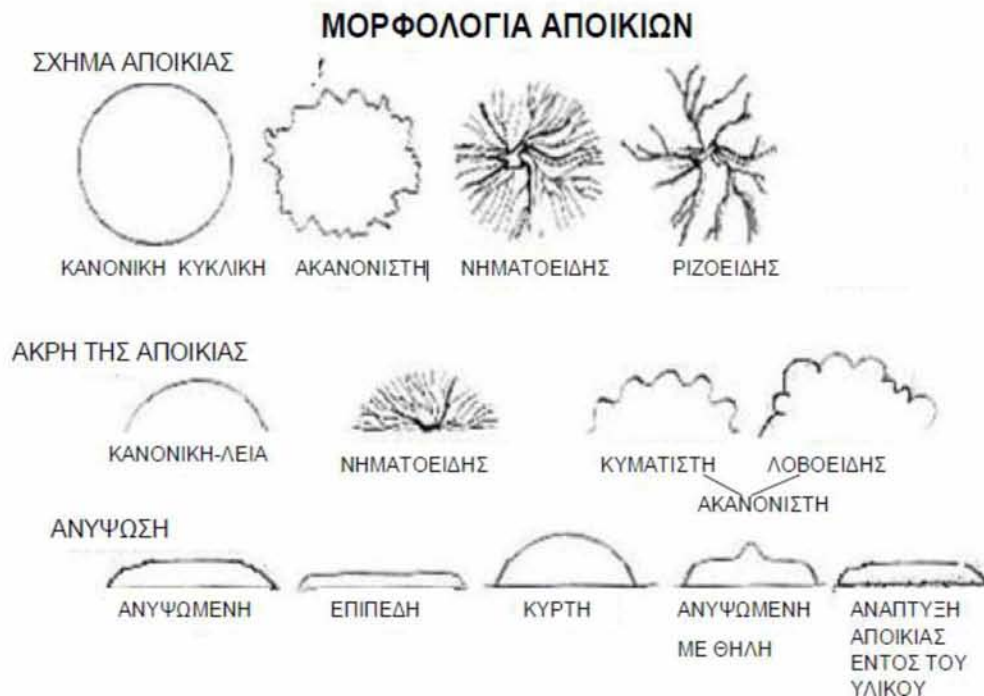
Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως εξής:

$$\text{cfu/ml} = (\text{μέσος όρος αριθμού αποικιών}) \times 10 \times \text{αραίωση}$$





Ως ταξινόμηση των μικροοργανισμών ορίζεται η κατάταξή τους σε ομάδες όπως οικογένεια, γένος. Κατά την κλασσική προσέγγιση η οποία ακολουθήθηκε και στην παρούσα εργασία, για την ταξινόμηση των μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκαν μορφολογικά χαρακτηριστικά για την περιγραφή του φαινότυπου των μικροβιακών κυττάρων. Το μέγεθος και το σχήμα των κυττάρων καθώς και η μορφολογία των αποικιών, αποτελούν τα βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά που χρησιμοποιούνται στην ταξινόμηση και ταυτοποίηση των μικροοργανισμών (Εικ. 2.3).



**Εικόνα 2.3:** Παρουσίαση και χαρακτηρισμός των συνηθέστερων μορφολογικών χαρακτηριστικών των αποικιών (τροποποιημένο από Μποζιάρης, 2010)

## 2.6. Στατιστική επεξεργασία - ανάλυση

Όλες οι αναλύσεις από τις καλλιεργητικές μεθόδους πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Για τους υπολογισμούς (cfu/ml) και τα διαγράμματα χρησιμοποιήθηκε το Microsoft Excel. Όσο αφορά τη στατιστική επεξεργασία χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα Past (Hammer et al., 2005) για τον έλεγχο της ανάλυσης της διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (Analysis of Variance: ( **One - way Anova**), προκειμένου να διαπιστωθεί αν υπάρχει ή όχι στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των πηγών. Επίσης, πραγματοποιήθηκε σύγκριση κατά ζεύγη (**Post hoc**), για να διερευνηθεί η ύπαρξη πιθανών διαφορών με όλους τους δυνατούς συνδυασμούς ζευγών – ομάδων. Τέλος, η διόρθωση για τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων (Post Hoc) έγινε με τη χρήση του **Tukey test**. Σε όλες τις αναλύσεις το επίπεδο σημαντικότητας ήταν  $p \leq 0.05$  (95%).

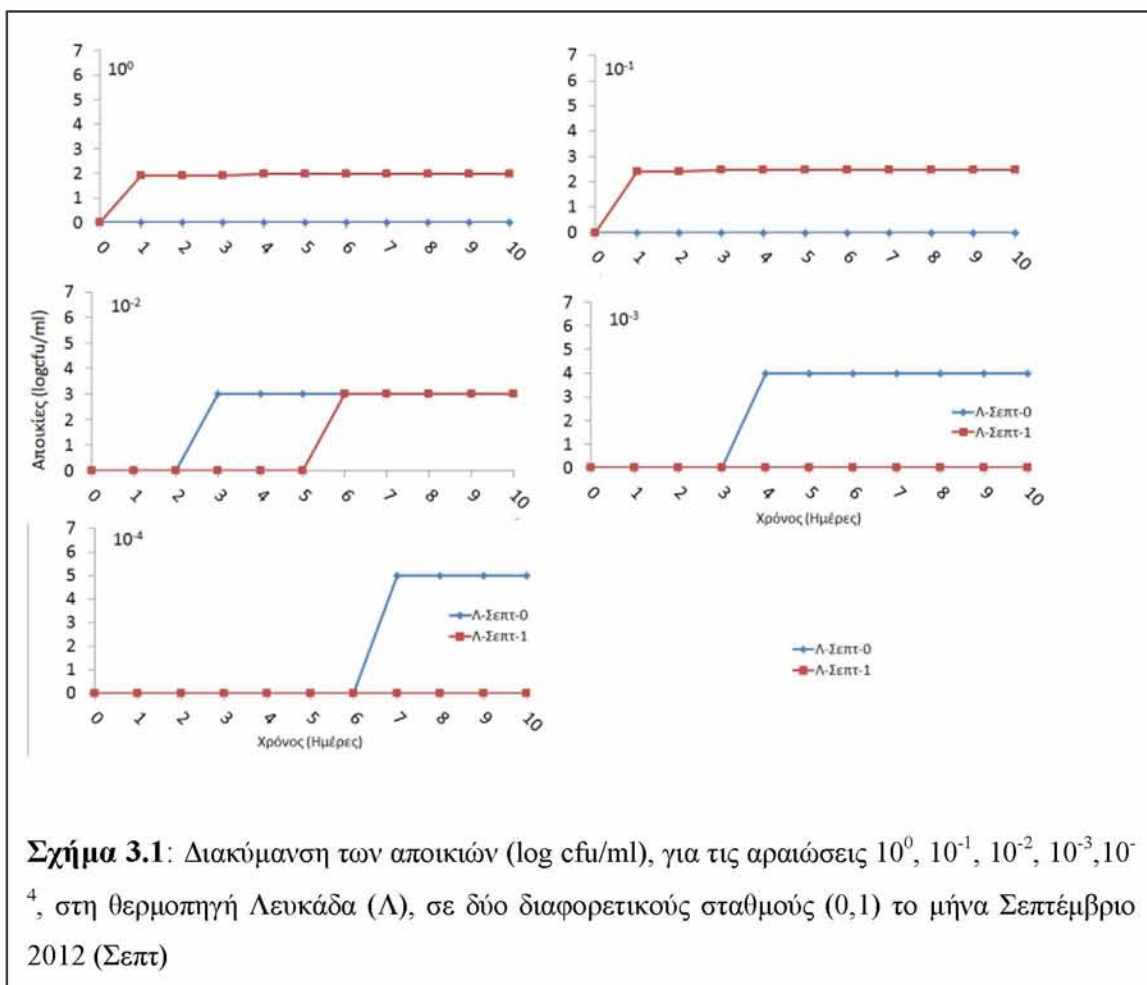
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η μέγιστη θερμοκρασία για την περιοχή της Λευκάδας καταγράφηκε το φθινόπωρο και η χαμηλότερη την άνοιξη και για την περιοχή των Θερμών για τη σημειακή πηγή ανάβλυσης του θερμού ιαματικού νερού η υψηλότερη καταγράφηκε την άνοιξη και η χαμηλότερη το χειμώνα, για το ενδιαμέσο σημείο και το θαλασσίνο νερό η υψηλότερη το φθινόπωρο και η χαμηλότερη την άνοιξη. Δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή στο pH της περιοχής δειγματοληψίας.

#### 3.1. Μικροβιακή αύξηση

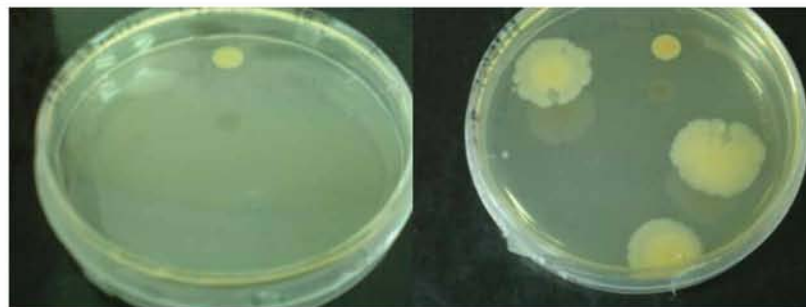
##### 3.1.1. Καταμέτρηση του βακτηριακού πληθυσμού

Οι μεταβολές του ολικού μικροβιακού πληθυσμού (ΟΜΠ) κατά τη διάρκεια της επώασης, οι οποίες καταμετρήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA παρουσιάζονται στα παρακάτω Γραφήματα 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5.



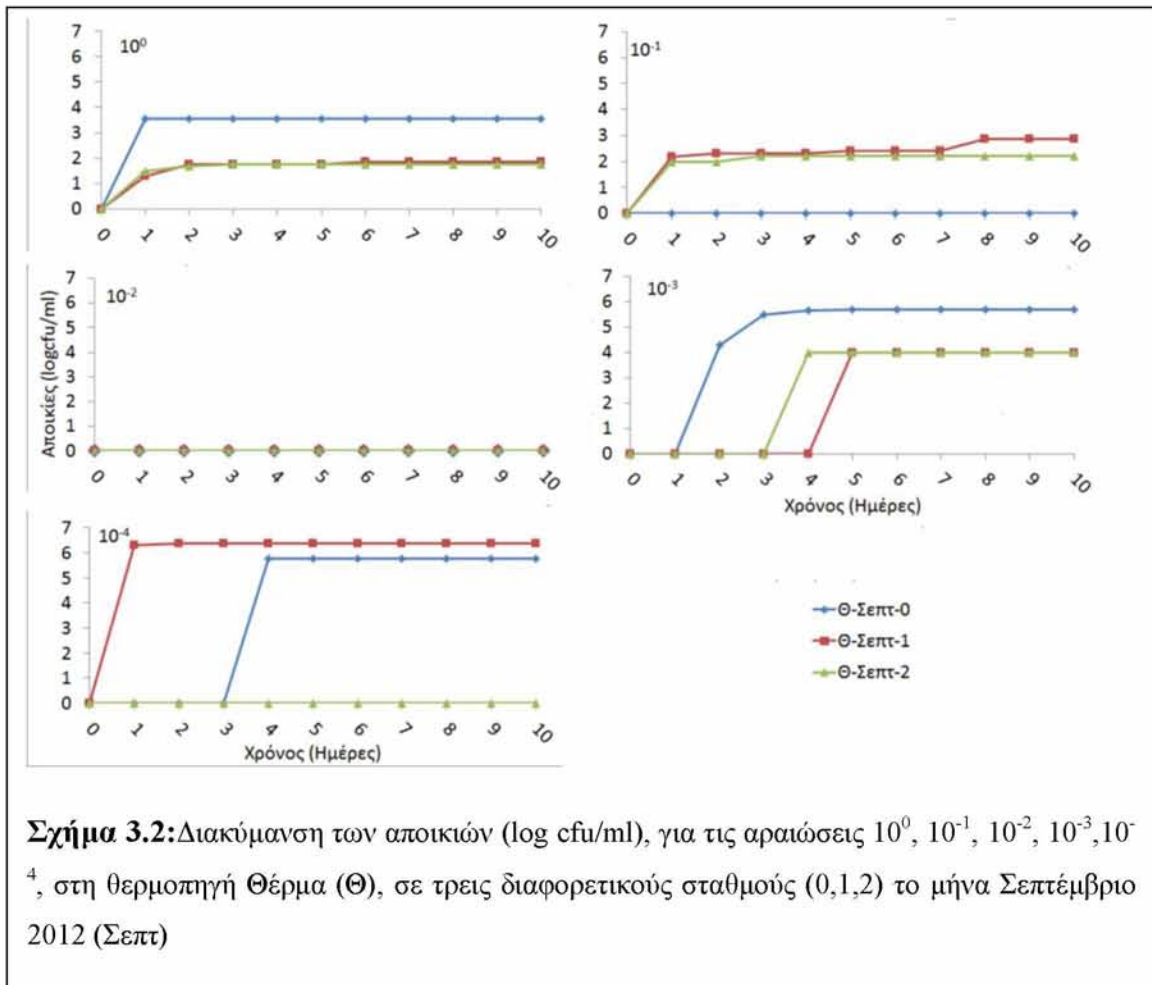
Κατά την επώαση των μικροοργανισμών από τη θερμοπηγή της Λευκάδας, η ΟΜΠ παρουσιάζει ταχεία αύξηση στο σταθμό 1 για τις αραιώσεις  $10^0$  και  $10^{-1}$ , αντίθετα δεν παρουσιάζεται αύξηση μικροοργανισμών στο σταθμό 0. Η αύξηση των μικροοργανισμών είναι ταχεία (1<sup>η</sup> μέρα) και το επίπεδο του πληθυσμού στη στατική φάση είναι 2 log cfu/ml και 3 log cfu/ml αντίστοιχα. Το αντίθετο συμβαίνει στις αραιώσεις  $10^{-3}$  και  $10^{-4}$  όπου παρατηρείται αύξηση των μικροοργανισμών μόνο στο σταθμό 0. Ωστόσο, η αύξηση είναι βραδεία (4<sup>η</sup> και 6<sup>η</sup> μέρα αντίστοιχα και το επίπεδο του πληθυσμού στη στατική φάση 4 log cfu/ml και 5 log cfu/ml αντίστοιχα. Στην  $10^{-2}$  αραιώση παρατηρείται αύξηση των μικροοργανισμών και στους δύο σταθμούς. Ο μεν σταθμός 0 παρουσιάζει γρηγορότερη αύξηση (3<sup>η</sup> μέρα επώασης), ενώ ο σταθμός 1 την 6<sup>η</sup> μέρα επώασης. Ωστόσο, ο πληθυσμός στη στατική φάση είναι 3 log cfu/ml.

Μορφολογικά οι κυρίαρχες αποικίες στο σταθμό 0 είναι κανονικές κυκλικές με ομαλή και λεία άκρη, επίπεδες χρώματος σωμόν. Οι αποικίες στο σταθμό 1 είναι μορφολογικά ακανόνιστες λοβοειδής, επιπεδες χρώματος ανοικτό κίτρινο (Εικ.3.1.).



**Εικόνα 3.1.:** (αριστερά) σταθμός 0, αραιώση  $10^{-3}$ , (δεξιά) σταθμός 1 αραιώση  $10^{-1}$



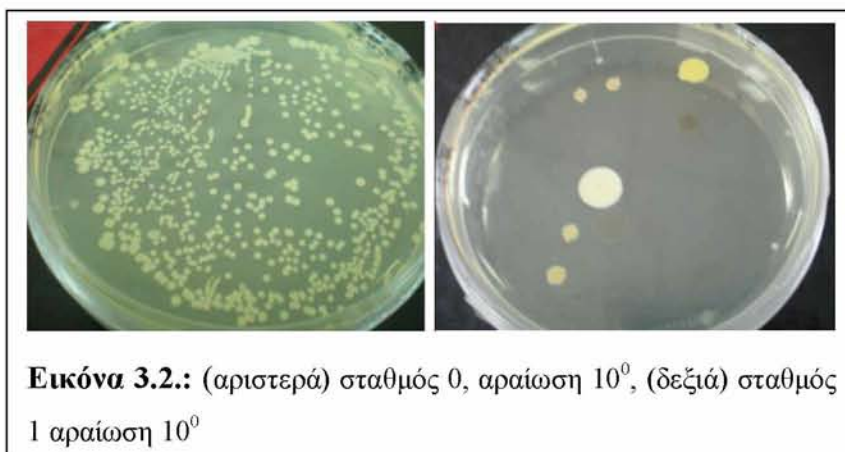


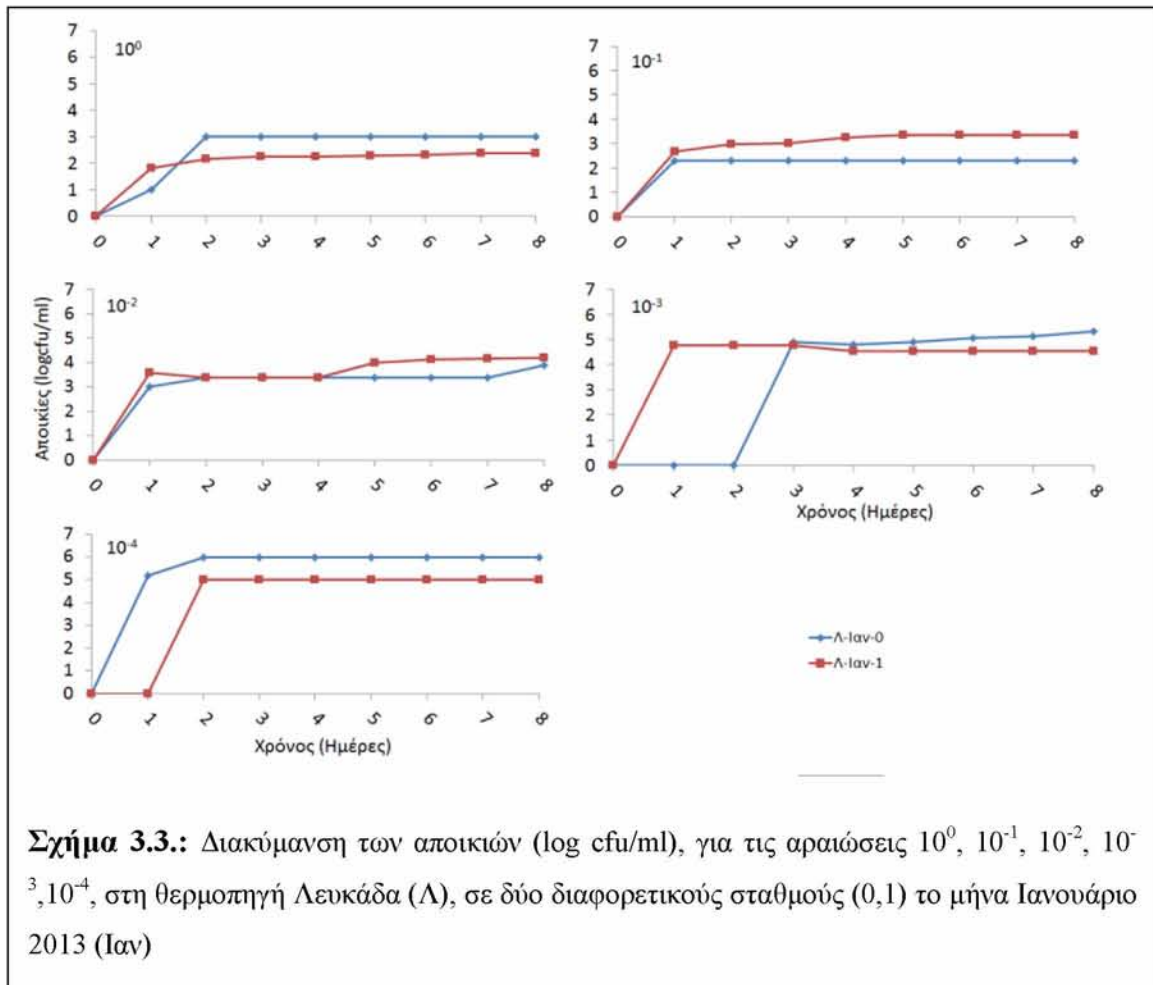
**Σχήμα 3.2:** Διακύμανση των αποικιών (log cfu/ml), για τις αραιώσεις  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , στη θερμοπηγή Θέρμα (Θ), σε τρεις διαφορετικούς σταθμούς (0,1,2) το μήνα Σεπτέμβριο 2012 (Σεπτ)

Στη θερμοπηγή των Θερμών η ΟΜΠ παρουσιάζει ταχεία αύξηση για την  $10^0$  αραιώση, καθώς από την πρώτη μέρα, παρατηρούνται αποικίες και στους τρεις σταθμούς. Η σημειακή πηγή ανάβλυσης του θερμού νερού (0) παρουσιάζει μεγαλύτερη αύξηση μικροοργανισμών ( $3.54 \log \text{cfu/ml}$ ), σε σχέση με το σταθμό 1 και 2 όπου το επίπεδο του πληθυσμού στη στατική φάση είναι  $1.87 \log \text{cfu/ml}$  και  $1.75 \log \text{cfu/ml}$  αντίστοιχα. Στην  $10^{-1}$  αραιώση δεν παρουσιάζεται αύξηση στο σταθμό 0, ενώ στους σταθμούς 1 και 2 η αύξηση είναι παρόμοια (αύξηση από την πρώτη μέρα επώασης) και ο πληθυσμός στη στατική φάση είναι  $2.87 \log \text{cfu/ml}$  και  $2.22 \log \text{cfu/ml}$ . Στις παραπάνω περιπτώσεις η φάση προσαρμογής διήρκεσε περί τις 24 ώρες. Στην αραιώση  $10^{-2}$  δεν παρατηρήθηκε καμία αύξηση σε κανέναν από τους τρεις σταθμούς. Στην αραιώση  $10^{-3}$  παρουσιάζεται αργή αύξηση για το σταθμό 1 (5<sup>η</sup> ημέρα επώασης) και 2 (4<sup>η</sup> ημέρα επώασης) με το επίπεδο του πληθυσμού στη στατική φάση να είναι  $4 \log \text{cfu/ml}$ . Αντίθετα, ο σταθμός 0 παρουσιάζει γρηγορότερη αύξηση (2<sup>η</sup> ημέρα) με το

επίπεδο του πληθυσμού να αγγίζει τα 5,70 log cfu/ml. Η ΟΜΠ στην  $10^{-4}$  αραίωση η αύξηση στο σταθμό 0 παρουσιάζει αργή αύξηση (5<sup>η</sup> ημέρα) με το επίπεδο του πληθυσμού να είναι περί τους 6 log cfu/ml. Σε αντίθεση με το σταθμό 1 όπου παρουσιάζεται αύξηση από τη πρώτη ημέρα της επώασης και η ΟΜΠ στη στατική φάση είναι περί τους 6 log cfu/ml. Τέλος, στο σταθμό 2 δεν παρατηρείται κάποια αύξηση.

Οι κυρίαρχες αποικίες στο σταθμό 0 είναι μορφολογικά κανονικές κυκλικές, με τις άκρες της αποικίας λείες και χρώματος σωμόν. Οι αμέσως επόμενες διαφέρουν μόνο ως προς το χρωματισμό (λευκές και κίτρινες). Στο σταθμό 1, ως κυρίαρχες μορφολογικά απαντώνται αποικίες σχήματος κυκλικού, λείες και χρώματος άσπρου, με τις αμέσως επόμενες διαφέρουν πάλι μόνο ως προς το χρωματισμό (κίτρινες). Στο σταθμό 2 οι αποικίες είναι λείες, κυκλικές χρώματος κίτρινου (Εικ. 3.2).



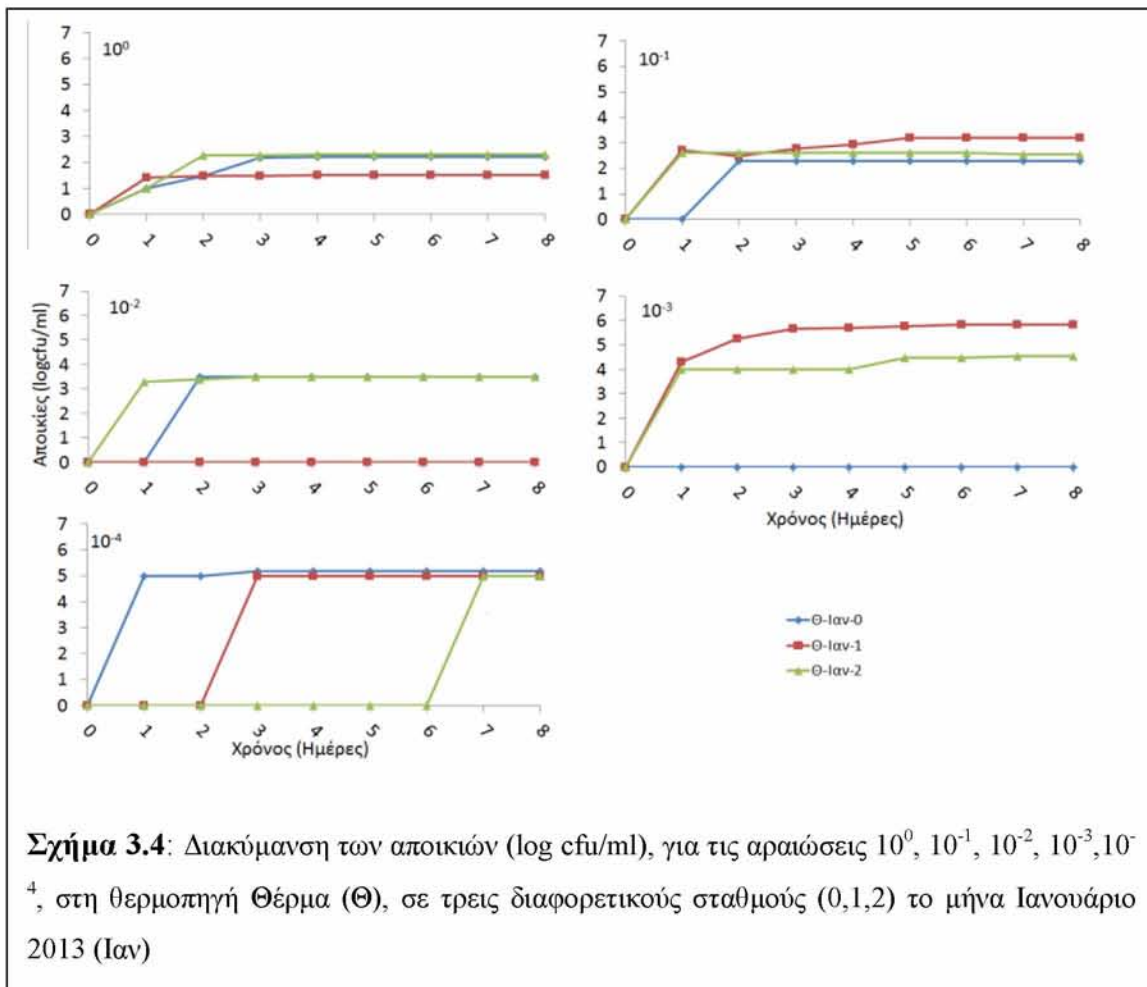
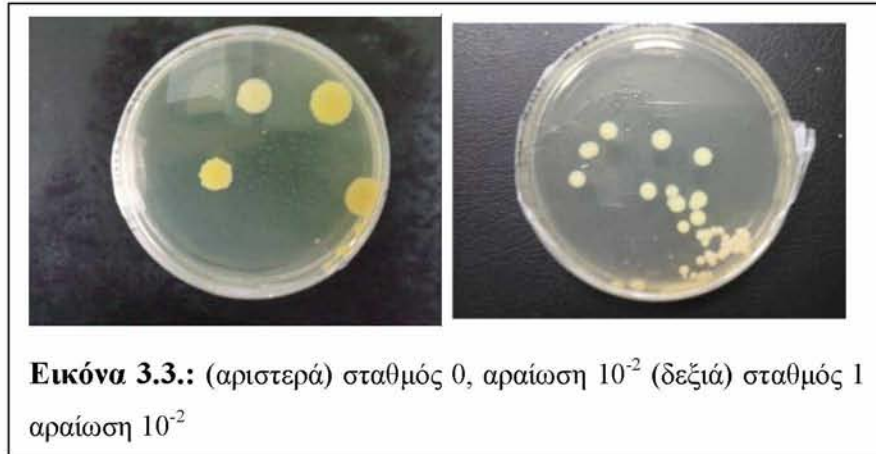


**Σχήμα 3.3.:** Διακύμανση των αποικιών (log cfu/ml), για τις αραιώσεις  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , στη θερμοπηγή Λευκάδα (Λ), σε δύο διαφορετικούς σταθμούς (0,1) το μήνα Ιανουάριο 2013 (Ιαν)

Η μικροβιακή αύξηση για τη θερμοπηγή της Λευκάδας όπως φαίνεται από τα διαγράμματα έλαβε χώρα και για τους δύο σταθμούς (0,1). Παρατηρείται ότι στις αραιώσεις  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  και  $10^{-4}$  υπάρχει ταχεία αύξηση των οργανισμών, από την δεύτερη κιόλας ημέρα επώασης, σε αντίθεση με την αραιώση  $10^{-3}$  όπου παρατηρείται αύξηση των μικροοργανισμών από την δεύτερη ημέρα για το σταθμό 1 και από την τέταρτη ημέρα για το σταθμό 0. Ο πληθυσμός φτάνει στην στατική φάση από τη δεύτερη ή τρίτη ημέρα επώασης, εκτός από την αραιώση  $10^{-3}$  για το σταθμό 0 όπου φτάνει στη στατική φάση τέταρτη ημέρα επώασης. Το επίπεδο του πληθυσμού στη στατική φάση κυμαίνεται περί τα 3 log cfu/ml για τις αραιώσεις  $10^0$  και  $10^{-1}$ , περί τα 4 log cfu/ml για τις αραιώσεις  $10^{-2}$  και  $10^{-3}$  και περί τα 5 log cfu/ml για την  $10^{-4}$  αραιώση 6 log cfu/ml.

Οι κυρίαρχες αποικίες για το σταθμό 0 ως προς το σχήμα είναι κυκλικές, με λείες άκρες χρώματος ανοιχτό πορτοκαλί και ακολουθούν οι ίδιες μορφολογικά αποικίες ο

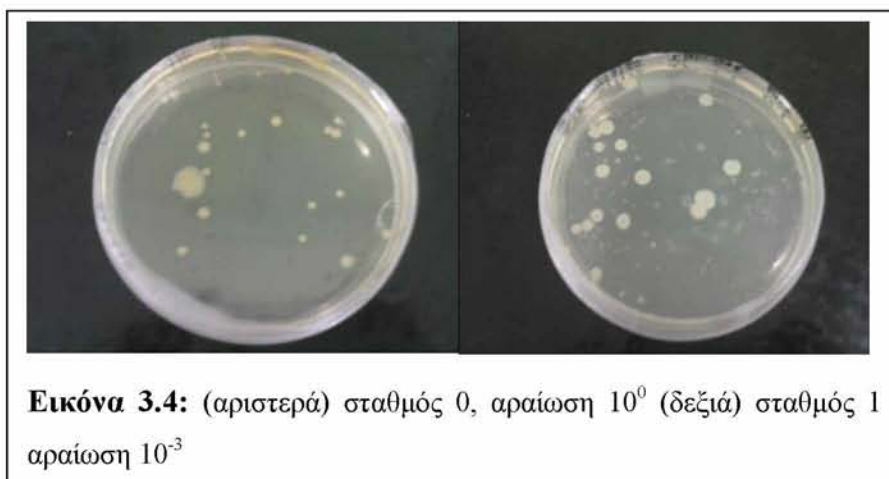
οποίες διαφέρουν μόνο ως προς το χρώμα (κίτρινο). Το ίδιο συμβαίνει και στο σταθμό ένα με τις ίδιες μορφολογικά αποικίες να κυριαρχούν (Εικ. 3.3).

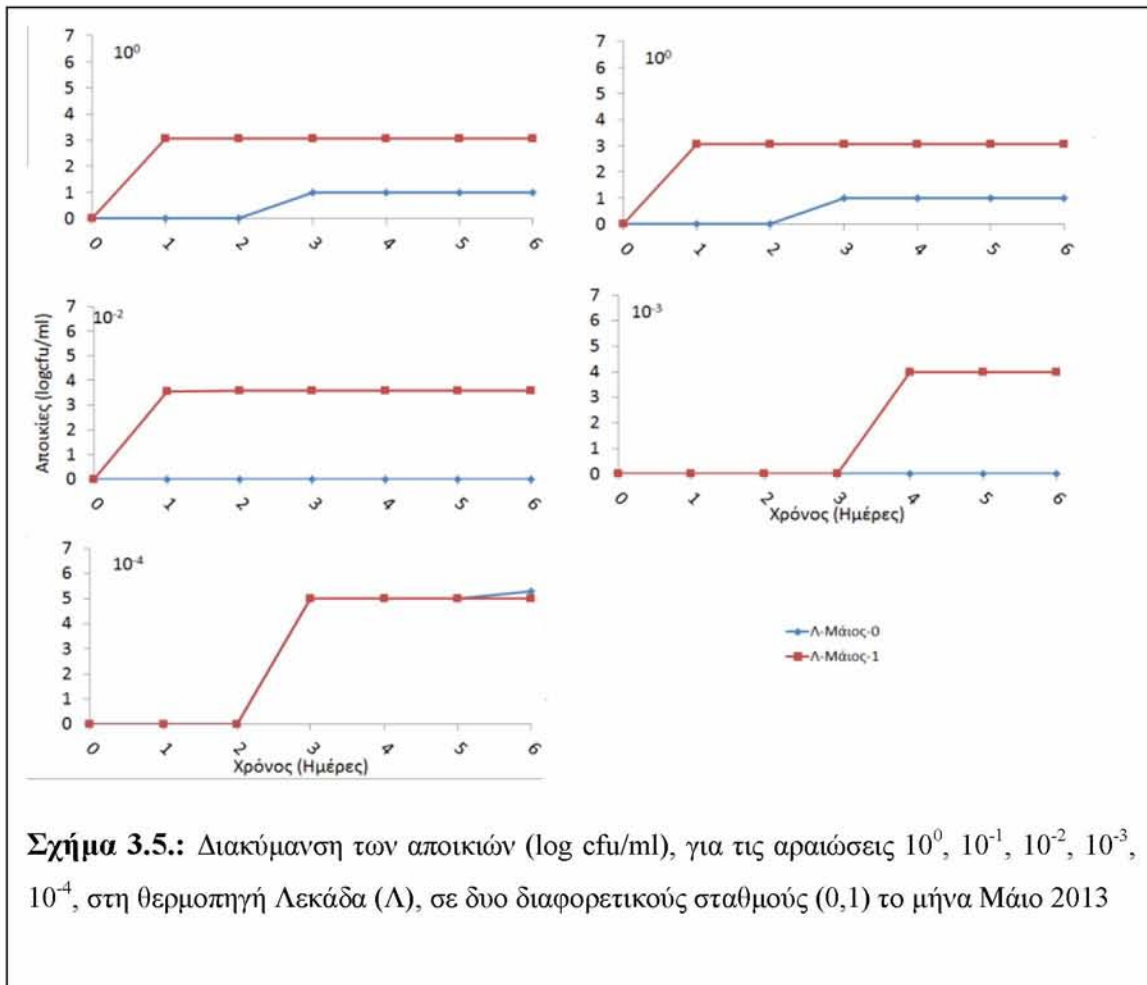




Κατά την επώαση του δείγματος από τη θερμοπηγή των Θερμών παρατηρείται η ταχεία αύξηση και γρήγορη φάση προσαρμογής των μικροοργανισμών στις αραιώσεις  $10^0$  και  $10^{-1}$ , αφού οι μικροοργανισμοί φαίνεται να αρχίζουν τον πολλαπλασιασμό τους μετά τις 24 ώρες επώασης. Ο πληθυσμός έφτασε τη στατική φάση έπειτα από 96 ώρες για την αραιώση  $10^0$  και έπειτα από 48 ώρες για την αραιώση  $10^{-1}$ . Το επίπεδο του πληθυσμού στη στατική φάση είναι περί τα 2 log cfu/ml. Το ίδιο ισχύει και για τις αραιώσεις  $10^{-2}$  και  $10^{-3}$  όπου η μεταβολή της ΟΜΠ παρουσιάζει παρόμοια αύξηση. Ωστόσο, δεν παρουσιάζεται αύξηση των μικροοργανισμών στο σταθμό 1 για την  $10^{-2}$  αραιώση και στο σταθμό 0 για την αραιώση  $10^{-3}$ . Η αύξηση των μικροοργανισμών είναι γρήγορη για την  $10^{-2}$  αραιώση (3<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> ημέρα επώασης για το σταθμό 0 και 2 αντίστοιχα). Το επίπεδο του πληθυσμού στη στατική φάση είναι περί τα 2,5 log cfu/ml. Όσο αφορά την αραιώση  $10^{-3}$  η αύξηση των μικροοργανισμών είναι παρόμοια, αλλά το επίπεδο του πληθυσμού στη στατική φάση αρκετά υψηλότερο (5 log cfu/ml). Στην αραιώση  $10^{-4}$ , η μεταβολή της ΟΜΠ παρουσιάζει αργή αύξηση για το σταθμό 1 και 2, τέταρτη και έβδομη ημέρα επώασης αντιστοίχα. Αντίθετα για το σταθμό 0 η αύξηση είναι γρηγορότερη (2<sup>η</sup> ημέρα επώασης). Τέλος, και για τους τρεις σταθμούς ο πληθυσμός φτάνει στη στατική φάση έπειτα από 24 ώρες και το επίπεδο του πληθυσμού στη στατική φάση είναι περί τα 5 log cfu/ml.

Στο σταθμό 0 οι κυρίαρχες αποικίες με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά είναι αποικίες σχήματος κυκλικού, με λείες άκρες, χρώματος άσπρου και ανοικτού κίτρινου. Οι ίδιες μορφολογικά αποικίες παρατηρούνται και στο σταθμό 1,. Αποικίες σχήματος κυκλικού, με λείες άκρες, χρώματος κίτρινου και άσπρου παρατηρούνται στο σταθμό 2 της θερμοπηγής των Θερμών (Εικ. 3.4).



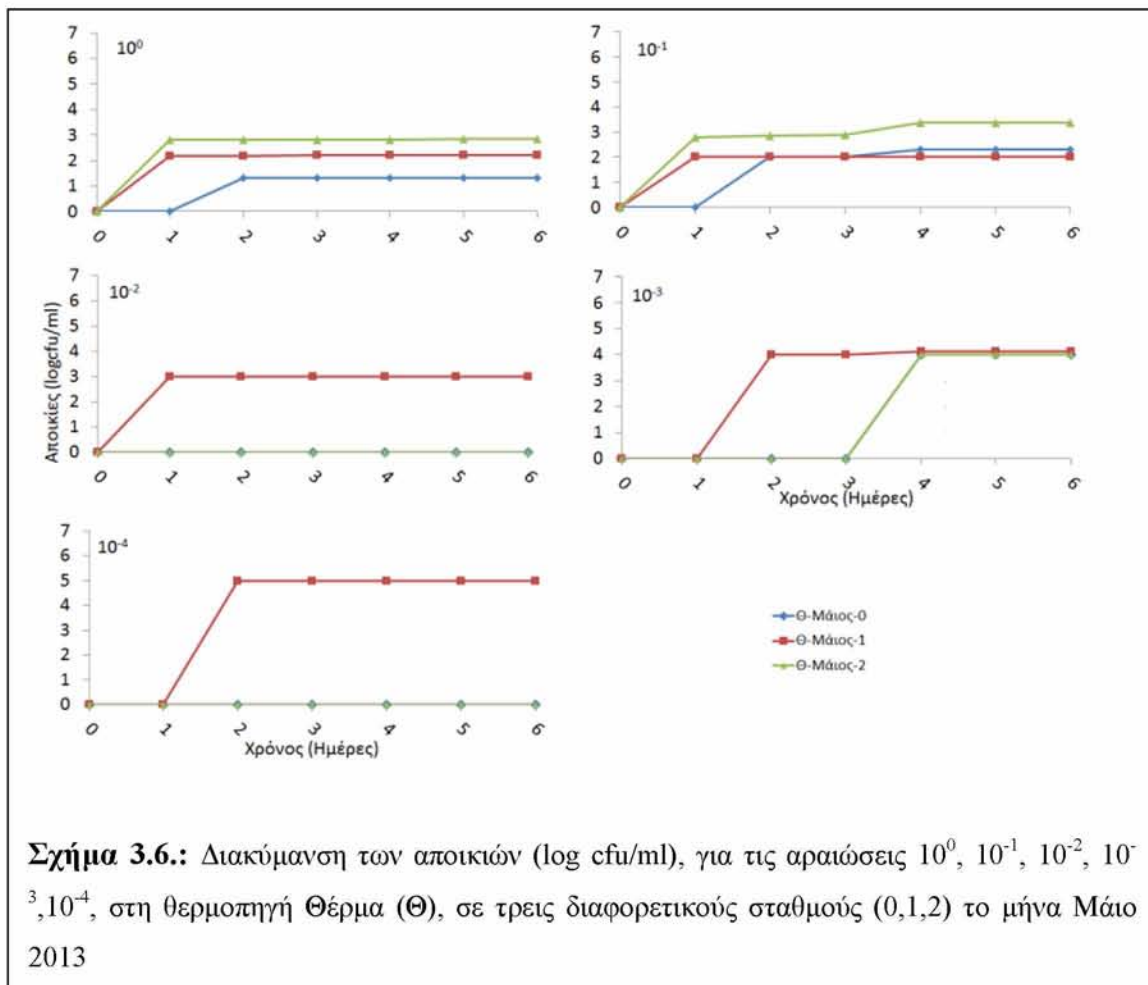


**Σχήμα 3.5.:** Διακύμανση των αποικιών (log cfu/ml), για τις αραιώσεις  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , στη θερμοπηγή Λεκάδα (Λ), σε δυο διαφορετικούς σταθμούς (0,1) το μήνα Μάιο 2013

Στο σταθμό 0 δεν παρατηρείται αύξηση μικροοργανισμών, για τις αραιώσεις  $10^{-2}$  και  $10^{-3}$ , σε αντίθεση με το σταθμό 1 όπου παρατηρείται αύξηση των μικροοργανισμών τη δεύτερη και τέταρτη ημέρα επώασης για την τις αραιώσεις  $10^{-2}$  και  $10^{-3}$  αντίστοιχα. Ο πληθυσμός έφτασε στη στατική φάση, έπειτα από 24 ώρες και το επίπεδο του πληθυσμού ήταν 3,60 log cfu/ml και 4 log cfu/ml για την τις αραιώσεις  $10^{-2}$  και  $10^{-3}$  αντίστοιχα. Στις περιπτώσεις των αραιώσεων  $10^0$  και  $10^{-1}$  παρατηρείται αύξηση των μικροοργανισμών στο σταθμό 0, η οποία όμως ξεκινάει από την τέταρτη ημέρα, ενώ το επίπεδο του πληθυσμού είναι περί τα 1 log cfu/ml, σε αντίθεση με το σταθμό 1, όπου παρουσιάζεται γρήγορη αύξηση (2<sup>η</sup> ημέρα επώασης) και ο πληθυσμός φτάνει στα 3 log cfu/ml (κατά προσέγγιση). Ωστόσο, και στους δύο σταθμούς για τις προαναφερθείσες αραιώσεις ο πληθυσμός φτάνει στη στατική φάση έπειτα από 24 ώρες. Στην αραιώση  $10^{-4}$  παρατηρείται και για τους δύο σταθμούς αργή αύξηση (3<sup>η</sup> ημέρα επώασης), ενώ η ΟΜΠ παρουσιάζει παρόμοια αύξηση. Η φάση προσαρμογής

του πληθυσμού διήρκησε περί τις 24 ώρες και το επίπεδο του πληθυσμού στη στατική φάση ήταν περί τα 5 log cfu/ml.

Οι κυρίαρχες αποικίες για το σταθμό 0 έχουν σχήμα ακανόνιστο, με κυματιστές άκρες και είναι ανυψωμένες, ακολουθούν αποικίες κυκλικές με λείες άκρες και ανυψωμένες, χρώματος κίρινου. Όσον αφορά το σταθμό 1, παρατηρούνται αποικίες κυκλικές, λείες χρώματος κίτρινου και ανοικτού κίτρινου.



Κατά την επώαση των μικροοργανισμών από την περιοχή των Θερμών παρατηρήθηκε ταχεία αύξηση (2<sup>η</sup> ημέρα επώασης), με γρήγορη φάση προσαρμογής (24 ώρες) για τις αραιώσεις  $10^0$  και  $10^{-1}$ . Ωστόσο, στο σταθμό 0 παρατηρήθηκε μεγαλύτερος χρόνος αύξησης πληθυσμού, ο οποίος και στις δύο παραπάνω αραιώσεις ήταν μικρότερος σε σχέση με τους άλλους δύο σταθμούς δειγματοληψίας. Οι αποικίες



για το σταθμό 0 κυμαίνονταν μεταξύ 1,30 και 2,30 log cfu/ml και για τους σταθμούς 1 και 2 μεταξύ 2 και 3,37 log cfu/ml. Όσον αφορά τις αραιώσεις  $10^{-2}$  και  $10^{-4}$  παρατηρείται αύξηση μόνο στο σταθμό δειγματοληψίας 1. Η αύξηση στη  $10^{-2}$  αραιώση λαμβάνει χώρα από τη δεύτερη ημέρα επώασης και για την  $10^{-4}$  αραιώση από την τρίτη ημέρα αερώσεως. Το επίπεδο του πληθυσμού στη στατική φάση είναι 3 log cfu/ml και 5log cfu/ml για τις αραιώσεις  $10^{-2}$  και  $10^{-4}$  αντίστοιχα. Τέλος, στην αραιώση  $10^{-3}$  παρατηρείται αύξηση της ΟΜΠ στους σταθμούς 1 και 2 κατά την τρίτη και πέμπτη ημέρα επώασης αντίστοιχα. Η φάση προσαρμογή είναι 24 ώρες και το επίπεδο του πληθυσμού και για τους δύο σταθμούς είναι περί τα 4 log cfu/ml.

Οι κυρίαρχες αποικίες με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά για το σταθμό 1 είναι κυκλικές με λείες άκρες, επίπεδες, χρώματος σωμόν και ακολουθούν αποικίες σχηματικά ακανόνιστες, με κυματιστές άκρες χρώματος ανοικτού κίτρινου. Στο σταθμό 1, ως κυρίαρχες εμφανίζονται αποικίες σχήματος κυκλικού, με λείες άκρες, χρώματος ανοικτού κίτρινου. Το ίδιο ισχύει και για τον σταθμό 2.

### 3.2. Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική ανάλυση των δειγμάτων (One – Way ANOVA) και η σύγκριση κατά ζεύγη (Post hoc) παρατίθενται στους πίνακες που ακολουθούν:

<b>Πίνακας 3.1:</b> Συγκριτική απεικόνιση των δεδομένων για τις αραιώσεις $10^0$ , $10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ και $10^{-4}$ για το μήνα Σεπτέμβριο 2012, για τη θερμοπηγή της Λευκάδας (Λ)						
		Λ 4 - 1				
Λ-4 – 0		$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
	$10^0$	< 0,001*				
	$10^{-1}$		< 0,001*			
	$10^{-2}$			0,262		
	$10^{-3}$				0,02*	
	$10^{-4}$					0,191

\*παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά

<b>Πίνακας 3.2.:</b> Συγκριτική απεικόνιση των δεδομένων για τις αραιώσεις $10^0$ , $10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ και $10^{-4}$ για το μήνα Ιανουάριο 2013, για τη θερμοπηγή της Λευκάδας (Λ)						
		Λ 5 - 1				
Λ-5 – 0		$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
	$10^0$	0,749				
	$10^{-1}$		0,450			
	$10^{-2}$			0,973		
	$10^{-3}$				0,873	
	$10^{-4}$					0,68

<b>Πίνακας 3.3.:</b> Συγκριτική απεικόνιση των δεδομένων για τις αραιώσεις $10^0$ , $10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ και $10^{-4}$ για το μήνα Μάιο 2013, για τη θερμοπηγή της Λευκάδας (Λ)						
		Λ 6 - 1				
Λ-6 – 0		$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
	$10^0$	< 0,001*				
	$10^{-1}$		0,201			
	$10^{-2}$			< 0,001*		
	$10^{-3}$				0,445	
	$10^{-4}$					1

\*παρτηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά

Όσο αφορά τη θερμοπηγή της Λευκάδας παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές για το μήνα Σεπτέμβριο μεταξύ των αραιώσεων  $10^0$ ,  $10^{-1}$  και  $10^{-3}$ , αντίστοιχα για το μήνα Μάιο στις αραιώσεις  $10^0$  και  $10^{-2}$ . Ωστόσο στη δειγματοληψία του Ιανουαρίου 2013 δεν παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ της σημειακής πηγής ανάβλυσης του θερμού νερού και στο σημείο ανάμειξης με το θαλασσινό νερό (Πιν. 3.1., 3.2. & 3.3.).

**Πίνακας 3.4.:** Συγκριτική απεικόνιση των δεδομένων για τις αραιώσεις  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  και  $10^{-4}$  για το μήνα Σεπτέμβριο 2012, για τη θερμοπηγή των Θερμών (Θ). Σύγκριση μεταξύ 0-1 (1<sup>η</sup> γραμμή), 1-2 (2<sup>η</sup> γραμμή), 0-2 (3<sup>η</sup> γραμμή)

		Θ 4 – 1					
		$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	
Θ4 – 0	$10^0$	< 0,001*					Θ 4 - 2
		0,9999					
		< 0,001*					
	$10^{-1}$		< 0,001*				
			0,767				
			< 0,001*				
	$10^{-2}$			1			
				1			
				1			
	$10^{-3}$				0,040		
					0,991		
					0,116		
	$10^{-4}$					0,090	
						< 0,001*	
						< 0,001*	

\* παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά

Στατιστικώς σημαντικές διαφορές παρατηρούνται, για το μήνα Σεπτέμβριο 2012 και τη θερμοπηγή των Θερμών μεταξύ των σημειακών σημείων δειγματοληψίας 0 - 1 και 0 - 2 για τις αραιώσεις  $10^0$  και  $10^{-1}$ , μεταξύ των σταθμών 0 – 1 για την αραιώση  $10^{-3}$  και μεταξύ των σταθμών 1 – 2 και 0 – 2 για την αραιώση  $10^{-4}$  (Πιν 3.4.).

**Πίνακας 3.5.:** Συγκριτική απεικόνιση των δεδομένων για τις αραιώσεις  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  και  $10^{-4}$  για το μήνα Ιανουάριο 2013, για τη θερμοπηγή των Θερμών (Θ). Σύγκριση μεταξύ 0-1 (1<sup>η</sup> γραμμή), 1-2 (2<sup>η</sup> γραμμή), 0-2 (3<sup>η</sup> γραμμή)

		Θ 5 – 1					
		$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	
Θ5 – 0	$10^0$	0,825					Θ 5 - 2
		0,606					
		0,995					
	$10^{-1}$		0,349				
			0,945				
			0,79				
	$10^{-2}$			< 0,001*			
				< 0,001*			
				0,965			
	$10^{-3}$				< 0,001*		
					0,625		
					< 0,001*		
	$10^{-4}$					0,738	
						0,198	
						0,011	

\* παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά

Το μήνα Ιανουάριο 2013, για τη θερμοπηγή των Θερμών, παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των σημείων δειγματοληψίας 0 – 1 και 1 – 2 για την αραιώση  $10^{-2}$ , 0 – 1 και 0 – 2 για την αραιώση  $10^{-3}$  και μεταξύ των σημείων 0 – 2 για την αραιώση  $10^{-4}$  (Πιν 3.5.).

**Πίνακας 3.6.:** Συγκριτική απεικόνιση των δεδομένων για τις αραιώσεις  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  και  $10^{-4}$  για το μήνα Μάιο 2013, για τη θερμοπηγή των Θερμών (Θ). Σύγκριση μεταξύ 0-1 (1<sup>η</sup> γραμμή), 1-2 (2<sup>η</sup> γραμμή), 0-2 (3<sup>η</sup> γραμμή)

		Θ 6 – 1					
		$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	
Θ 6 – 0	$10^0$	0,276					Θ 6 – 2
		0,774					
		0,025*					
	$10^{-1}$		0,998				
			0,443				
			0,294				
	$10^{-2}$			< 0,001*			
				< 0,001*			
				1			
	$10^{-3}$				0,757		
					0,757		
					1		
	$10^{-4}$					0,019*	
						0,019*	
						1	

\* παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά

**Πίνακας 3.7.:** Συγκριτική απεικόνιση των δεδομένων για τις αραιώσεις  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  και  $10^{-4}$  για το μήνα Σεπτέμβριο 2012, για το σημειακό σταθμό 0 της θερμοπηγής της Λευκάδας (Λ) και των Θερμών

		Θ 4 – 0				
		$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
Λ-4 – 0	$10^0$	< 0,001*				
	$10^{-1}$		1			
	$10^{-2}$			< 0,001*		
	$10^{-3}$				0,116	
	$10^{-4}$	$10^0$				0,173

\* παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά



Όσο αφορά το μήνα Μάιο 2013, στατιστικώς σημαντικές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ των σημείων δειγματολήψιας 0 - 1 και 1 - 2 για τις αραιώσεις  $10^{-2}$  και  $10^{-4}$  και ανάμεσα στους σταθμούς 0 – 2 για την αραιώση  $10^0$  (Πιν. 3.6.).

<b>Πίνακας 3.8.:</b> Συγκριτική απεικόνιση των δεδομένων για τις αραιώσεις $10^0$ , $10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ και $10^{-4}$ για το μήνα Ιανουάριο 2013, για το σημειακό σταθμό 0 της θερμοπηγής της Λευκάδας (Λ) και των Θερμών						
		<b>Θ 5 - 0</b>				
Λ 5 - 0		$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
	$10^0$	0,386				
	$10^{-1}$		0,979			
	$10^{-2}$			0,974		
	$10^{-3}$				< 0,001*	
	$10^{-4}$					0,965

\* παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά

<b>Πίνακας 3.9.:</b> Συγκριτική απεικόνιση των δεδομένων για τις αραιώσεις $10^0$ , $10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ και $10^{-4}$ για το μήνα Μάιο 2013, για το σημειακό σταθμό 0 της θερμοπηγής της Λευκάδας (Λ) και των Θερμών						
		<b>Θ 6 - 0</b>				
Λ 6 - 0		$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
	$10^0$	0,94				
	$10^{-1}$		0,944			
	$10^{-2}$			1		
	$10^{-3}$				0,445	
	$10^{-4}$					0,080

Ανάμεσα στους σημειακούς σταθμούς 0 της θερμοπηγής της Λευκάδας και των Θερμών, όσο αφορά τη δειγματοληψία του Σεπτεμβρίου 2012 και του Ιανουαρίου 2013, παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις αραιώσεις  $10^0$  και  $10^{-2}$  για την πρώτη δειγματοληψία και στην αραιώση  $10^{-3}$  για τη δεύτερη αντίστοιχα (Πίν3.7. &

3.8.). Ωστόσο για τη δειγματοληψία του Μαΐου 2013 δεν παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε καμία αραιώση (Πιν. 3.9.).

<b>Πίνακας 3.10.:</b> Συγκριτική απεικόνιση των δεδομένων για τις αραιώσεις $10^0$ , $10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ και $10^{-4}$ για το μήνα Σεπτέμβριο 2012, για το σημειακό σταθμό 1 της θερμοπηγής της Λευκάδας (Λ) και των Θερμών						
		<b>Θ 4 – 1</b>				
		$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
Λ 4 – 1	$10^0$	0,960				
	$10^{-1}$		1			
	$10^{-2}$			0,011		
	$10^{-3}$				0,064	
	$10^{-4}$					< 0,001*

\*παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά

<b>Πίνακας 3.11.:</b> Συγκριτική απεικόνιση των δεδομένων για τις αραιώσεις $10^0$ , $10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ και $10^{-4}$ για το μήνα Ιανουάριο 2013, για το σημειακό σταθμό 1 της θερμοπηγής της Λευκάδας (Λ) και των Θερμών						
		<b>Θ 5 – 1</b>				
		$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
Λ 5 – 1	$10^0$	0,469				
	$10^{-1}$		0,995			
	$10^{-2}$			< 0,001*		
	$10^{-3}$				0,856	
	$10^{-4}$					0,981

Στατιστικώς σημαντικές διαφορές για τους σημειακό σταθμό δειγματοληψίας 1 ανάμεσα στη θερμοπηγή της Λευκάδας και των Θερμών παρατηρούνται για τη δειγματοληψία του Σεπτεμβρίου (2012) στις αραιώσεις  $10^{-2}$  και  $10^{-4}$ , για τη δειγματοληψία του Ιανουαρίου στην αραιώση  $10^{-2}$ , ενώ δεν παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές στη δειγματοληψία του Μαΐου (2013) (Πιν 3.10, 3.11. & 3.12.).

**Πίνακας 3.12.:** Συγκριτική απεικόνιση των δεδομένων για τις αραιώσεις  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  και  $10^{-4}$  για το μήνα Μάιο 2013, για το σημειακό σταθμό 1 της θερμοπηγής της Λευκάδας (Λ) και των Θερμών

		Θ 6 - 1				
		$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
Λ 6 – 1	$10^0$	0,524				
	$10^{-1}$		0,7566			
	$10^{-2}$			0,7535		
	$10^{-3}$				0,7577	
	$10^{-4}$					0,9633

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η καταμέτρηση της αφθονίας των μεσόφιλων μικροοργανισμών από δύο διαφορετικές πηγές της Ικαρίας (Λευκάδα και Θέρμα). Παράλληλα με την καταμέτρηση των αποικιών (logcfu/ml) και την στατιστική ανάλυση των δεδομένων (ANOVA, Tukey Test) πραγματοποιήθηκε και ομαδοποίηση των αποικιών βάση των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών.

Ο προσδιορισμός της μικροβιακής κοινότητας καθώς και η σύγκριση των μικροοργανισμών που διαβιούν στα δύο αυτά διαφορετικά θερμοκρασιακά περιβάλλοντα παρουσιάζουν ένα ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως προς την ποικιλομορφία τους, τη βιολογία τους, τη χρησιμότητά τους σε βιοτεχνολογικές διεργασίες καθώς και τη συμμετοχή τους στις βιογεωχημικές διεργασίες οι οποίες λαμβάνουν χώρα στις υδροθερμικές πηγές. Ενδιαφέρον παρουσιάζει εάν και κατά πόσο οι συγκεκριμένοι οργανισμοί οι οποίοι διαβιούν στα συγκεκριμένα καλά απομονωμένα ενδιαιτήματα (υπέρθεμα, όξινα, αλκαλικά, θειούχα νερά) και έχουν αναπτύξει ειδικές λειτουργίες για την επιβίωσή τους (αναερόβια αναπνοή, χημειοργανότροφος / χημειολιθότροφος μεταβολισμός εξωκυττάρια ένζυμα, αναγωγή χημικών ενώσεων), μπορούν να προσαρμοστούν σε διαφορετικές συνθήκες.

Η προσαρμογή των μικροοργανισμών από τρεις διαφορετικούς θερμοκρασιακά σταθμούς στις συνθήκες επώασης, μελετήθηκε στην παρούσα διατριβή. Ο σταθμός 0 αποτελεί το σημείο ανάβλυσης του υπέρθερμου νερού (54° C – 58° C), ο σταθμός 1 αποτελεί σημείο ανάμιξης του ιαματικού με το θαλασσινό νερό (33° C – 43° C) και ο σταθμός 2 αμιγώς θαλασσινό νερό (25° C). Η θερμοκρασία επώασης του δείγματος πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό μέσο TSA Agar στους 39° C (σκοτάδι). Η συγκεκριμένη θερμοκρασία επώασης αποτελεί το όριο για την αύξηση των ανώτερων μεσόφιλων μικροοργανισμών (όριο μεσόφιλων μικροοργανισμών 20° C – 40° C). Αναμένεται λοιπόν, ο φυσικός παράγοντας – θερμοκρασία όχι μόνο να επηρεάζει αλλά και να επιδρά στον έλεγχο της μικροβιακής αύξησης.

Αξιοσημείωτο λοιπόν είναι, ότι σε γενικά πλαίσια η αύξηση των βακτηρίων – ο χρόνος επώασης στις αραιώσεις  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  ήταν μεγαλύτερος, σε σχέση με τις υπόλοιπες αραιώσεις, ακόμα και για τη μηδενική αραιώση. Οι αραιώσεις  $10^0$ ,  $10^{-1}$  και  $10^{-2}$  παρουσίασαν γρηγορότερο ρυθμό αύξησης (24h) για τα δείγματα τα οποία

αντιστοιχούν στην περιοχή ανάμιξης του θαλασσινού με το ιαματικό νερό σε όλες τις δειγματοληψίες (Λ-χ-1, Θ-χ-1). Πιθανόν, η αύξηση στις αραιώσεις  $10^0$ ,  $10^{-1}$  και  $10^{-2}$  είναι μικρότερη λόγω του ανταγωνισμού των μικροοργανισμών οι οποίοι αυξάνονται.

Αντίθετα οι υψηλότερες τιμές logcfu/ml παρατηρήθηκαν στις αραιώσεις  $10^{-3}$  και  $10^{-4}$  για τα συγκεκριμένα δείγματα. Ίσως αυτό οφείλεται, στο γεγονός ότι η θερμοκρασία επώασης ( $39^{\circ}\text{C}$ ) προσομοίαζε στην θερμοκρασιακές περιβαλλοντικές συνθήκες για το σταθμό 1 και στις δύο πηγές. Παρατηρείται λοιπόν, ότι η υπόθεσή μας ότι η θερμοκρασία επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την αύξηση των μικροοργανισμών οι οποίοι λήφθηκαν από τις ακραίες αυτές συνθήκες, ισχύει.

Ακόμα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα όσον αφορά τη δειγματοληψία η οποία πραγματοποιήθηκε το χειμώνα του 2013, παρατηρήθηκε ότι μεγαλύτερη και γρηγορότερη αύξηση των μικροοργανισμών σε όλες τις αραιώσεις και στους δύο σταθμούς δειγματοληψίας. Ακολούθησε η δειγματοληψία της άνοιξης του 2013 και τέλος η δειγματοληψία του φθινοπώρου του 2012.

Ανάμεσα στα δείγματα των σημειακών σταθμών ανάβλυσης του ιαματικού νερού παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα της άνοιξης (Λ-Μάιος-0, Θ-Μάιος-0) παρουσιάζουν το μεγαλύτερο χρόνο επώασης και ακολουθούν τα δείγματα του φθινοπώρου (Λ-Σεπτ-0, Θ-Σεπτ-0). Ωστόσο, ανάμεσα στα δείγματα της άνοιξης δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές, όπως συμβαίνει με τα δείγματα του φθινοπώρου (Λ-Σεπτ-0, Θ-Σεπτ-0) αλλά και του χειμώνα (Λ-Ιανουα-0, Θ-Ιανουα-0).

Όσον αφορά τους σταθμούς, οι οποίοι αντιστοιχούν σε απόσταση 1 – 2 m από τη σημειακή πηγή και πραγματοποιείται ανάμιξη του ιαματικού νερού με το θαλασσινό τα δείγματα του φθινοπώρου (Λ-Σεπτ-1, Θ-Σεπτ-1) παρουσιάζουν το μεγαλύτερο χρόνο επώασης και ακολουθούν τα δείγματα της άνοιξης (Λ-Μάιος-1, Θ-Μάιος-1). Και στο συγκεκριμένο σταθμό 1 δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές για τη δειγματοληψία της άνοιξης (Μάιος 2013) σε σχέση με τις υπόλοιπες δειγματοληψίες.

Στη δειγματοληψία στη θαλάσσια περιοχή των Θερμών παρατηρήθηκε αύξηση σε όλες τις αραιώσεις και σε όλες τις δειγματοληψίες και γρηγορότερος ρυθμός επώασης (24h) σε σχέση με τις υπόλοιπους σταθμούς.

Η διακύμανση του αριθμού των αποικιών στη θερμοπηγή της Λευκάδας για το μήνα Σεπτέμβριο 2012, για το σταθμό 1 παρουσίασε ταχεία αύξηση σε αντίθεση με το σταθμό 0 όπου δεν παρατηρείται αύξηση στις αραιώσεις  $10^0$  και  $10^{-1}$ . Το αντίθετο συμβαίνει για τις αραιώσεις  $10^{-3}$  και  $10^{-4}$ . Η αύξηση των μικροοργανισμών στην  $10^{-2}$  αραιώση ήταν ταχεία για το σταθμό 0 σε αντίθεση με το σταθμό 1 (6<sup>η</sup> ημέρα επώασης). Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα η διακύμανση των αποικιών στη θερμοπηγή της Λευκάδας εποχικά στο σταθμό 1 παρουσιάζει γρηγορότερη και πολλές φορές μεγαλύτερη ανάπτυξη (logcfu/ml) σε σχέση με το σταθμό 0. Σε αρκετές αραιώσεις, ωστόσο δεν παρατηρείται αύξηση των μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της επώασης.

Το ίδιο ισχύει και για τη θερμοπηγή των Θερμών, όπου η ταχύτερη αύξηση των μικροοργανισμών παρατηρήθηκε στο σταθμό 1, ειδικά στη δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε τον Μαίο του 2013. Η μεγαλύτερη διάρκεια επώασης αντίθετα, παρατηρήθηκε στο σταθμό δειγματοληψίας 0.

Οι μικροβιακές μελέτες έχουν αποκαλύψει την παρουσία πολύπλοκων βακτηριακών κοινοτήτων. Τα περισσότερα αναφερόμενα στοιχεία σχετικά με την καταγραφή, τη φυσιολογία και την απομόνωση των μικροοργανισμών από θερμές πηγές είναι αρκετά πρόσφατα. Τις τελευταίες δεκαετίες έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον για τα θερμόφιλα περιβάλλοντα, παράλληλα με την ανάπτυξη των μοριακών μεθόδων, όπου αρκετοί μικροοργανισμοί έχουν μελετηθεί και απομονωθεί. Οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί όπως προαναφέρθηκε παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία δεν έχουν δημοσιευθεί μελέτες για την καταμέτρηση της αφθονίας των μεσόφιλων μικροοργανισμών. Αντίθετα αρκετές μελέτες εστιάζουν στις όξινες, αλκαλικές, θεικές ιαματικές πηγές καθώς και στους θερμό- και υπερθεμόφιλους μικροοργανισμούς οι οποίοι διαβιούν σε αυτές.

Στην εργασία των Belkova et al., (2007) μελετήθηκε η ολική βακτηριακή αφθονία (TBA), σε δείγματα νερού τα οποία συλλέχτηκαν από τις πηγές Nalychevskie, Oksinskie, Aparelskie και Dachny, στη Ρωσία. Το p-H για τις συγκεκριμένες πηγές κατά τη διάρκεια λήψης των δειγμάτων ήταν ουδέτερο έως ελαφρώς αλκαλικό (6.0 – 7.8) και η θερμοκρασία κυμαινόταν από 36° C – 91° C. Οι αποικίες (ετερότροφα βακτήρια) αναπτύχθηκαν σε τρυβλία έπειτα από επώαση για 3-7 ημέρες στους 20° C.

Φανερή είναι η δράση των μικροοργανισμών, οι οποίοι διαβιούν στα νερά των θερμών πηγών, στις γεωχημικές διεργασίες οι οποίες λαμβάνουν χώρα στα συγκεκριμένα υδροθερμικά συστήματα.

Στην εργασία των Tomova et al., (2010) μελετήθηκαν τα θερμοφιλά βακτήρια τα οποία διαβιούν σε μία θερμή πηγή στην περιοχή Rupī στην νοτιο – δυτική Βουλγαρία. Η ανάλυση της βακτηριακής ποικιλότητας στη συγκεκριμένη μελέτη αποκάλυψε ένα μεγάλο φυλογενετικό πλούτο και κατέδειξε τη βιοποικιλότητα η οποία υπάρχει στα συγκεκριμένα ακραία ενδιαίτηματα και δεν έχει ακόμα αποκαλυφθεί. Η σύγκριση της βιοποικιλότητας σε σχέση με άλλες χερσαίες θερμές πηγές κατέδειξε ότι τα Proteobacteria, τα *Hydrogenobacter* / *Aquifex* και *Thermus* είναι κοινές βακτηριακές ομάδες οι οποίες παρατηρούνται και σε άλλα γεωθερμικά πεδία. Οι μικροοργανισμοί ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση μοριακών μεθόδων και φυλογενετικής ανάλυσης για την ταυτοποίηση των κυρίαρχων μικροοργανισμών. Η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας ήταν 79° C και το p - H 8.6.

Στην εργασία των Blank et al., (2002) μελετήθηκε το μέγεθος της υπερθερμόφιλης μικροβιακής ποικιλότητας που σχετίζεται με πυριτικά συσσωματώματα (siliceous sinter, - geyserite) σε επτά θερμές πηγές σε τρεις διαφορετικές πηγές στην περιοχή Yellowstone National Park. Το είδος *Thermocrinis ruber*, της οικογένειας Aquificales, ήταν το κυρίαρχο, κάτι το οποίο υποδηλώνει ότι η πρωτογενής παραγωγή στις πηγές οδηγείται από την οξείδωση του υδρογόνου. Οι κοινότητες αυτές φαίνεται να αποτελούνται εξ ολοκλήρου από θερμοφιλά βακτήρια, ενώ οι κοινότητες των αρχαίων είναι αρκετά σπάνιες.

Σύμφωνα με την εργασία των Mathur et al., (2007) προσδιορίστηκε ο τρόπος με τον οποίο οι αβιοτικοί παράγοντες (θερμοκρασία) καθορίζουν τις οξύφιλες μικροβιακές κοινότητες στην περιοχή του Yellowstone National Park. Φυλογενετικές – στατιστικές αναλύσεις βρήκαν αρκετές συσχετίσεις ανάμεσα στη σύνθεση της βακτηριακής κοινότητας και της σύνθεσης των ιζημάτων, ακολουθούμενη από βραδύτερες αλλά σημαντικές συσχετίσεις με τις διαβαθμίσεις της θερμοκρασίας. Ιζήματα τα οποία περιείχαν θείο περιείχαν ένα μεγάλο ποσοστό οργανισμών που σχετίζονται με το *Hydrogenobaculum spp.*, ενώ σε ιζήματα τα οποία περιείχαν σίδηρο κυρίαρχοι οργανισμοί ήταν ένα ευρύ φάσμα από gram + σίδηρο – οξειδωτικά βακτήρια. Σύμφωνα

με την ανάλυση σε κύριες συνιστώσες (PCA) διαπιστώθηκε ότι οι δύο παράγοντες οι οποίοι εξηγούν το 95% της γενετικής ποικιλομορφίας αποδίδεται στα χημικά συστατικά και σε ένα μικρότερο ποσοστό – βαθμό στη θερμοκρασία.

Μία από τις καλύτερα διερευνημένες θερμές πηγές αποτελεί η ελαφρώς αλκαλική θειούχα πηγή στη Nakabusa, Nagano Prefecture, στην Ιαπωνία. Λόγω των υψηλών θερμοκρασιών (πάνω από 70° C), οι θερμοφιλοι οργανισμοί προστατεύονται από τη βόσκηση μέσω των μικροβιακών ταπήτων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας η θερμοκρασία και η συγκέντρωση των σουλφιδίων αποτελούν βασικούς παράγοντες για τη δομή της μικροβιακής κοινότητας, καθώς παρατηρείται σημαντική αλλαγή στη δομή της μικροβιακής κοινότητας όταν η θερμοκρασία του νερού είναι 70° C- μειώνεται κατά 5 μονάδες (Kubo et al., 2011).

Ένα νέο θερμο – θειϊκό - αναγωγικό βακτήριο (στέλεχος HBR5T) απομονώθηκε από μία χερσαία θερμοπηγή στη BA Τυνησία. Η συγκέντρωση των διαλυμένων θεικών στο νερό της πηγής ήταν 70mg/l. Η θερμοκρασία στο σημείο δειγματοληψίας ήταν 73° C, (τα δείγματα επώαστηκαν στους 55° C) και το p - H 6.9 (Haouari et al., 2008).

Στην εργασία των Dvoryanchikova et al., (2011) μελετήθηκε η ύπαρξη μεθανιότροφων αερόβιων βακτηρίων από ιζήματα στις ιαματικές πηγές του Uzon Caldera, Kamchatka με τη χρήση μοριακών τεχνικών. Οι θερμοκρασία στις ανωτέρω πηγές κυμαίνεται μεταξύ 40.6 – 85.2o C και το p H μεταξύ 2.6 – 6.8. Ωστόσο, τα δείγματα επώαστηκαν στους 60o C. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη μεθανιότροφων βακτηρίων στις πηγές Uzon. Τόσο η ποικιλομορφία όσο και η ποσότητα των μεθανιο- οξειδωτικών βακτηρίων ήταν χαμηλά, κάτι το οποίο μπορεί να αποδοθεί στο χαμηλό ποσοστό – στη χαμηλή περιεκτικότητα διαλυμένου μεθανίου και οξυγόνου λόγω της υψηλής θερμοκρασίας και της ανοργανοποίησης.

Μικροβιακοί πληθυσμοί είναι παρόντες σε ιζήματα πλούσια σε σίδηρο, σε μια ομάδα γεωθερμικών πεδίων – θερμών πηγών (Orange Spring) στη Ν. Ζηλανδία. Η θερμοκρασία κυμαίνεται μεταξύ 50° C - 80° C και το p H 2.1 – 2.4. για την ανάλυση των δειγμάτων στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι όπως η φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης και η χρωματογραφία ιόντων. Χωρίς να είναι



άμεσα εμφανείς, οι παράγοντες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την κατανομή των βακτηριακών πληθυσμών στις ανωτέρω πηγές, βρέθηκαν μικροοργανισμοί ορυκτά γκετίτη αλλά όχι σε ιζήματα λεπιδοκροδίτη (lepidocrocite) ή γιοροδίτη (jarosite). Η απουσία των βακτηρίων πιθανών να οφείλεται σε οικολογικούς παράγοντες οι οποίοι περιορίζουν την ανάπτυξή τους ή στους διαφορετικούς ρυθμούς καθίζησης των ορυκτών – ιζημάτων (Jones & Renaut, 2007).

Αρκετά μη χρωματισμένα (non - pigmented) βακτήρια απομονώθηκαν σε μία βέλτιστη θερμοκρασία 50ο C από την πηγή São Gemil (180 C, 7.8 p-H) στην Κεντρική Πορτογαλία. Σύμφωνα με τις φυλογενετικές αναλύσεις της 16S r-RNA γονιδιακή αλληλουχία, παρατηρήθηκε ότι ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός αντιπροσωπεύει ένα νέο γ- Protobacteria είδος, το οποίο είναι στενά συνδεδεμένο με το θερμόφιλο είδος *Thermomonas haemolytica* το οποίο έχει πρόσφατα περιγραφεί. Τα δείγματα επωάστηκαν στους 50ο C για επτά ημέρες. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών εξετάστηκε σε διάφορα θρεπτικά υποστρώματα (Alves et al., 2003).

Στην εργασία των Radea et al., (2010) μελετήθηκαν οι φωτότροφες μικροβιακές κοινότητες, οι οποίες προσκολλούνται σε βιοτικά υποστρώματα (επιβιώτες), στην πλούσια σε FeO<sub>2</sub> θερμοπηγή της Κύθνου (Αγ. Ανάργυροι, Ελλάδα). Η θερμοκρασία στη συγκεκριμένη πηγή είναι 38° C. Στην παρούσα μέλετη μέσω παρατηρήσεων με τη χρήση μικροσκοπίου παρατηρήθηκε η παρουσία ενός βιοφίλμ το οποίο αποτελείται κυρίως από κυανοβακτήρια και διάτομα. Οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί δεν επηρεάζουν την ανάπτυξη του οργανισμού στον οποίο προσκολλώνται (γαστερόποδο) (Radea et al., 2010). Η μικροβιακή σύνθεση η οποία βρέθηκε, φαίνεται να συμφωνεί με αποτελέσματα άλλων ερευνών, σε παρόμοια θερμικά υδρόβια περιβάλλοντα. Θερμόφιλοι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί και κυρίως κυανοβακτήρια φαίνεται να συνιστούν τη μικροβιακή σύνθεση στα συγκεκριμένα περιβάλλοντα (Anagnostidis 1961, Brock & Brock 1966). Τα διάτομα, ειδικότερα, δίνουν περισσότερες πληροφορίες για τα συγκεκριμένα ενδιαίτηματα λόγω των καλά καθορισμένων οικολογικών τους απαιτήσεων (Economou–Amilli 1976, Anagnostidis & Economou–Amilli 1978, Pantazidou et al. 2001, Louvrou 2007).

Οι κυρίαρχοι οργανισμοί στα συγκεκριμένα περιβάλλοντα φαίνεται να είναι τα βακτήρια, χωρίς η θερμοκρασία να καθορίζει κυρίαρχα την αφθονία των βακτηρίων

στις υδροθερμικές πηγές (Sievert et al., 2000). Οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί προστατεύονται από τη βόσκηση, λόγω της απουσίας των ευκαρυωτικών θηρευτών τους. Η παρούσα εργασία, έδειξε ότι οι θερμοπηγές της Ικαρίας φιλοξενούν ένα σημαντικό αριθμό γηγενών ανώτερων-μεσόφιλων βακτηρίων που μπορούν να αυξηθούν μόνο σε συνθήκες παρόμοιες με αυτές των θερμοπηγών. Αν και τα αποτελέσματα έδειξαν να συμφωνούν με άλλες μελέτες, ωστόσο περαιτέρω έρευνα κρίνεται απαραίτητη, τόσο σε βάθος χρόνου όσο και εποχικά, για την κατανόηση της μικροβιακής ποικιλομορφίας και τη συσχέτιση της στο βιογεωχημικό κύκλο των συγκεκριμένων ακραίων ενδιαιτημάτων καθώς και για τη χρήση της στην ανθρώπινη τεχνολογία (βιοτεχνολογικές εφαρμογές).

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Adiguzel A., Ozkan H., Baris O., Inan K., Gulluce M., Sahin F., 2009. Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *Journal of Microbiological Methods* 79: 321 - 328
- Alves P. M., Rainey A. F., Nobre F. M., da Costa S. M., 2003. *Thermomonas hydrothermalis* sp. nov., A New Slightly Thermophilic  $\gamma$ -Proteobacterium Isolated from a Hot Spring in Central Portugal. *System. Appl. Microbio.*, 26,: 70 - 75
- Amann, R. I., W. Ludwig, and K. H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143 - 169
- Anagnostidis K., 1961. Untersuchungen über die Cyanophyceen einiger Thermen in Greichland. PhD Thesis, University of Thessaloniki
- Anagnostidis K., 1961. Untersuchungen uber die cyanophyceen einigerThermen inGriechenland in Greek, German Summary and discussion. *Inst. Syst. Bot. Pflanzegeogr*; Univ. Thessalniki, 322 p., 38 plates
- Anagnostidis K. & Pantazidou A., 1988. Endolithic cyanophtytes from the saline thermal springs of Aedipsos, Hellas (Greece). *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, 80: 555 - 559
- Andreassi L., & Flori L., 1996. Mineral water and spas in Italy. *Clin. Dermatol.*, 14: 627 - 632
- Belkova L. N., Tazaki K., Zakharova r. j., Parfenova V. V., 2007. Activity of bacteria in water of hot springs from Southern and Central Kamchatskaya geothermal provinces, Kamchatka Peninsula, Russia. *Microbiological Research* 162: 99 – 107

- Bergquist, P.L., Love D.R., Croft J.E., Streiff M.B., Daniel R.M., Morgan H.W. 1989. Genetics and potential biotechnological application of thermophilic and extremely thermophilic archaeobacteria and eubacteria. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 5: 199 - 244
- Blank E. C., Cady L. S., Pace R. N., 2002. Microbial Composition of Near - Boiling Silica - Depositing Thermal Springs throughout Yellowstone National Park. *Applied Environmental Microbiology*, 68: 5123 - 5135
- Brock T. D., 1997. The value of basic research: discovery of *Thermus aquaticus* and other extreme thermophiles. *Genetics* 146:1207 - 1210.
- Christner B. C., Morris C. E., Foreman C. M., Cai R., Sands D. C., 2008. Ubiquity of biological ice nucleators in snowfall. *Science* 319 (5867): 1214
- Dvoryanchikova E. N., Kizilova A. K., Men'ko E. V., Kravchenko I. K., Gal'chenko V. F., 2011. Molecular Detection of Methanotrophic Bacteria in the Hot Springs of the Uzon Caldera, Kamchatka. *Microbiology*, 80(6): 867 - 869
- Friedrich, M.W., 2002. Phylogenetic analysis reveals multiple lateral transfers of adenosine - 5\_ - phosphosulfate reductase genes among sulphate - reducing microorganisms. *J. Bacteriol.* 184, 278 - 289
- Fytikas M (1977) Geological and geothermal investigation of Milos. PhD thesis, Dept. of Geology, Aristotle University of Thessaloniki
- Gold, T. (1992) The deep, hot biosphere. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6045 - 6049
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)
- Hanada, S. (2003) Filamentous anoxygenic phototrophs in hot springs. *Microb. Environ.* 18, 51 - 61

- Haouari O., Fardeau M - L., Cayol J - L., Fauque G., Casiot C., Elbaz - Poulichet F., Hamdi M., Ollivier B., 2008. *Thermodesulfovibrio hydrogeniphilus* sp. nov., a new thermophilic sulphate-reducing bacterium isolated from a Tunisian hot spring. *Systematic and Applied Microbiology*, 31: 38 - 42
- Hjorleifsdottir S., Skirnisdottir S., Hreggvidsoon O. G., Holst O, Kristjansson K.J., 2001. Species composition of cultivated and noncultivated, 117 - 125
- Huber R., Eder W., Heldwein S, Wanner G, Huber H, Rachel R., Stetter O. K.,. 1998. *Thermocrinis ruber* gen. nov., sp. nov., a pink-filament-forming hyperthermophilic bacterium isolated from Yellowstone National Park. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (3): 576 - 3583
- Hugenholtz P., Pitulle C., Hershberger L. K., Pace N.R., 1998. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J. Bacteriol.*, 180:366 - 376.
- Jones B., Renaut W. R., 2007. Selective mineralization of microbes in Fe - rich precipitates (jarosite, hydrous ferric oxides) from acid hot springs in the Waiotapu geothermal area, North Island, New Zealand. *Sedimentary Geology*, 194: 77 - 98
- Komarek J & Anagnostidis K., 1998. Cyanoprokaryota, 1: Chroococcales. In: ETTL, H., PARTNER, G., HEYNIG, H., MOLLENHAUER, D., (eds), *Sósswasserflora Mitteleuropa* 19/1, 1 - 548. G. Fischer, Jena
- Komarek J. & Anagnostidis K., 2005. Cyanoprokaryota 2. Oscillatoriales, Vol. 19/2 (Budel B, Gartner G, Krienitz L & Schagerl M, eds), pp. 1 - 757. Spectrum Akademischer Verlag, Elsevier, Munchen
- Karakatsanis S., D'Alessandro W., Kyriakopoulos K., Voudouris K., 2011. Chemical characterization of the thermal springs along the South Aegean volcanic arc and Ikaria island. *Advances in the Research of Aquatic Environment*, 2: 239 - 247
- Kormas Ar. K., Tamaki H., Hanada S., Kamagata Y., 2009. Apparent richness and community composition of Bacteria and Archaea in geothermal springs. *Aquatic Microbial Ecology*, 57: 113 - 122

- Kubo K., Knittel K., Amann R., Fukui M., Matsuura K., 2011. Sulfur-metabolizing bacterial populations in microbial mats of the Nakabusa hot spring, Japan. *Systematic and Applied Microbiology*, 34: 293 - 302
- Lambrakis N., Kallergis G., 2005. Contribution to the study of Greek thermal springs: hydrogeological and hydrochemical characteristics and origin of thermal waters. *Hydrogeology Journal*. 13:506 - 521
- Madigan T. M., Martinko M. J., Parker J., 2003. Brock: *Biology of Microorganisms*, , Pearson Education, Inc, 10th Edition
- Mathrani, I.M. and Ahring, B.A. (1992) Thermophilic and alkalophilic xylanases from several *Dictyoglomus* isolates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 23 - 27
- Mathur J., Bizzoco W. R., Ellis G. D., Lipson A. D., Poole W. A., Levine R., Kelley T. S., 2007. Effects of Abiotic Factors on the Phylogenetic Diversity of Bacterial Communities in Acidic Thermal Springs. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 2612 - 2623
- Megalovasilis P (2005) Geochemical investigation of sediments of bottom and regions of Aegean volcanic arc. PhD thesis, University of Athens
- Meintanis C, Chalkou K, Kormas KA, Karagouni A (2006) Biodegradation of crude oil by thermophilic bacteria isolated from a volcano island. *Biodegradation* 17:3 - 9
- Ollivier B., Cayol J.-L, Fauque G., 2007. Sulphate-reducing bacteria from oil field environments and deep-sea hydrothermal vents, in: L.L. Barton, W.A. Hamilton (Eds.), *Sulphate-Reducing Bacteria, Environmental and Engineered Systems*, Cambridge University Press, UK, pp. 305 - 328 (Chapter 10)
- Pace, N. R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276:734 - 740
- Radea C., Louvrou I., Pantazidou A., Economou - Amilli A, 2010. Photosynthetic microorganisms as epibionts and euendoliths on biotic substrates in a thermal spring with ferric-iron deposits. *Fottea*, 10(1): 129 - 140

- Romanovskaya V.A., Rokinko P.V., Shilin S.O., Malashenko, Yu.R., 2006. Reclassification of Thermophilic Methane - Oxidizing Bacteria Using Sequence Analysis of 16S rRNA Genes, *Mikrobiol. Zh.*, 68 (1): 3 - 10
- Satyanarayana T., Raghukumar C., Shivaji S., 2005. Extremophilic microbes: diversity and perspectives. *Curr Sci* 89:78 - 90
- Sievert SM., Brinkhoff T., Muyzer G., Ziebis W., Kuever J., 1999. Spatial heterogeneity of bacterial populations along an environmental gradient at a shallow submarine hydrothermal vent near Milos Island (Greece). *Appl Environ Microbiol* 65:3834 - 3842
- Sievert M. S., Ziebis W., Kuever J., Sahm K., 2000. Relative abundance of Archaea and Bacteria along a thermal gradient of a shallow-water hydrothermal vent quantified by Rna slot-blot hybridization. *Microbiology*, 146: 1287 - 1293
- Song Z - Q., Wang F - P., Zhi X - Y., Chen J - Q., Zhou E - M., Liang F., Xiao X., Tang S - K., Jiang H - C., 2013. Bacterial and archaeal diversities in Yunnan and Tibetan hot springs, China. *Environmental Microbiology*, 15(4): 1160 - 1175
- Sonne - Hansen J., and Ahring K. B., 1999. *Thermodesulfobacterium hveragerdense* sp. nov., and *Thermodesulfovibrio islandicus* sp. nov., Two Thermophilic Sulfate Reducing Bacteria Isolated from a Icelandic Hot Spring. *System. Appl. Microbiol.* 22: 559 - 564
- Tielsen P., Mathrani M. I., Ahring K. B., 1993. Temperature-dependent enumeration and characterization of anaerobic, thermophilic xylan-degrading bacteria present in two Icelandic hot springs. *Microbiology Ecology* 12: 79 - 86
- Tomova I., Stoilova-Disheva M., Lyutskanova D., Pascual J., Petrov P., Kambourova M., 2010. Phylogenetic analysis of the bacterial community in a geothermal spring, Rupi Basin, Bulgaria. *World J Microbiol Biotechnol* 26: 2019 - 2028
- Trabidou, G., Florou, H., Angelopoulos, A., Sakelliou, L., 1996. Environmental study of the Spas in the Ikaria island. *Radiation Protection Dosimetry* 63 (1), 63 - 67



- Trabidou G., Florou H., 2005. Radiological impact in an area of elevated natural radioactivity background: the case of the island of Ikaria–Aegean Sea, Greece. International Congress Series 1276: 390 - 391
- Trotsenko Yu.A., Medvedkova K.A., Khmelenina V.N., Eshinimaev, B.Ts., 2009. Thermophilic and Thermo - tolerant Aerobic Methanotrophs, Mikrobiologiya, vol. 78, no. 4, pp. 435 - 450 [Microbiology (Engl. Transl.), 78 (4): 378 - 401
- Tsubota, J., Eshinimaev, B.T., Khmelenina, V.N., and Trotsenko, Y.A., 2005. *Methylothermus thermalis* gen. nov., sp. nov., a Novel Moderately Thermophilic Obligate Methanotroph from a Hot Spring in Japan, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 55:1877 - 1884
- Yamamoto H., Hiraishi A., Kato K., Chiura H.X., Maki Y., Shimizu A., 1998. Phylogenetic evidence for the existence of novel thermophilic bacteria in hot spring sulfur-turf microbial mats in Japan. Appl. Environ. Microbiol. 64:1680 - 1687
- Weidler W. G., Dornmayr-Pfaffenhuemer M., Gerbl W. F., Heinen W., Stan-Lotter H., 2007. Communities of Archaea and Bacteria in a Subsurface Radioactive Thermal Spring in the Austrian Central Alps, and Evidence of Ammonia-Oxidizing Crenarchaeota. Applied and Environmental Microbiology, 73: 259 - 270
- Wilson S. M., Siering L P., White L. C., Hauser E. M., Bartles N. A., 2008. Novel Archaea and Bacteria Dominate Stable Microbial Communities in North America's Largest Hot Spring. Microb. Ecology 56: 292 - 305
- Zeikus, J.G., Ben-Bassat A., Ng T.K., Lamed R.J., 1981. Thermophilic ethanol fermentations. In: A. Hollander (Ed.), Trends in the Biology of Fermentation for Fuels and Chemicals. Plenum Publishing Corp., New York, pp. 441 - 461

## Ελληνική βιβλιογραφία

- Βέκιος, 1999. Ιζηματολογική και γεωχημική μελέτη των Silcrete σχηματισμών της νήσου Ικαρίας και η μετ' αυτών συνδεδεμένη ουρανιούχος μεταλλοφορία. Διδακτορική Διατριβή. Τομέας Οικονομικής Γεωλογίας και Γεωχημείας, Τμήμα Γεωλογία, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα
- Καστανιάς Ι., 2003. Γεωθερμία – Ιαματικές πηγές: Η περίπτωση της Ικαρίας. Πτυχική διατριβή, Ανώτατο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Δυτικής Μακεδονίας, Σχολή Τεχνολογικών Εφαρμογών, Τμήμα Γεωτεχνολογίας και Περιβάλλοντος, Κοζάνη
- Μποζιάρης Σ. Ι., 2010. Επιστήμη και Τεχνολογία Αλιευμάτων. Πανεπιστημιακές Παραδόσεις

## 6. ABSTRACT

Among natural thermophilic environments, hot springs are the most common and accessible biotopes. They are well-isolated habitats distributed globally in different regions, and the microorganisms inhabiting therein are extremophiles adapted to conditions quite different from the surrounding environments. These habitats have attracted broad scientific interest because of the unique metabolic features of the organisms thriving in these systems.

These microorganisms, mostly Bacteria and Archaea, are well adapted to these extreme environmental conditions, and they are the key players in biogeochemical cycling but they also show several biotechnological applications of human interest. During the past couple of decades, the perspective on microbial ecology has expanded to include extreme environments, such as hot springs and deep-sea hydrothermal vents. Advances in cultivation-independent bacterial enumeration have enabled analysis of the physiological state of naturally occurring microbial habitats while the combination of culture-dependant and culture-independent methodologies has revealed a remarkable diversity of prokaryotes in the world's geothermal springs.

In this study, the abundance of culturable mesophilic bacteria from the coastal thermal springs of Therma (Thm) and Lefkada (Lfk), Ikaria Island, Aegean Sea, were investigated. Water samples were aseptically collected in 2012-13 directly from the source (Station 0), from the mixing point with the sea (Station 1) and from sea (Station 2) of each spring. These samples were inoculated on TSA agar plates after serial dilutions and incubated at 39<sup>0</sup>C in darkness until growth was observed (max 11 days). Counts were recorded as colony forming units (cfu/ml) for every distinct colony type based on size, shape and morphology.

Bacterial growth was higher in St. 1 in both springs, also supported by statistically significant differences, possibly due to the adaptability of these microorganisms at the in situ temperature. Still, the growth of colonies on the dilutions 10<sup>0</sup>, 10<sup>1</sup> and 10<sup>2</sup> was lower (growth in 24h) in comparison with dilutions of 10<sup>3</sup> and 10<sup>4</sup> and although longer incubation times were required to detect growth, the colony abundance was higher. Statistically significant differences were observed between the two sources and the stations of each source, too.

This study showed that the two investigated thermal spring in Ikaria Island, harbor viable upper-mesophilic bacteria which are able to grow only at the immediate proximity of the springs' source.

Keywords: mesophilic bacteria, hot springs, Ikaria, abundance