

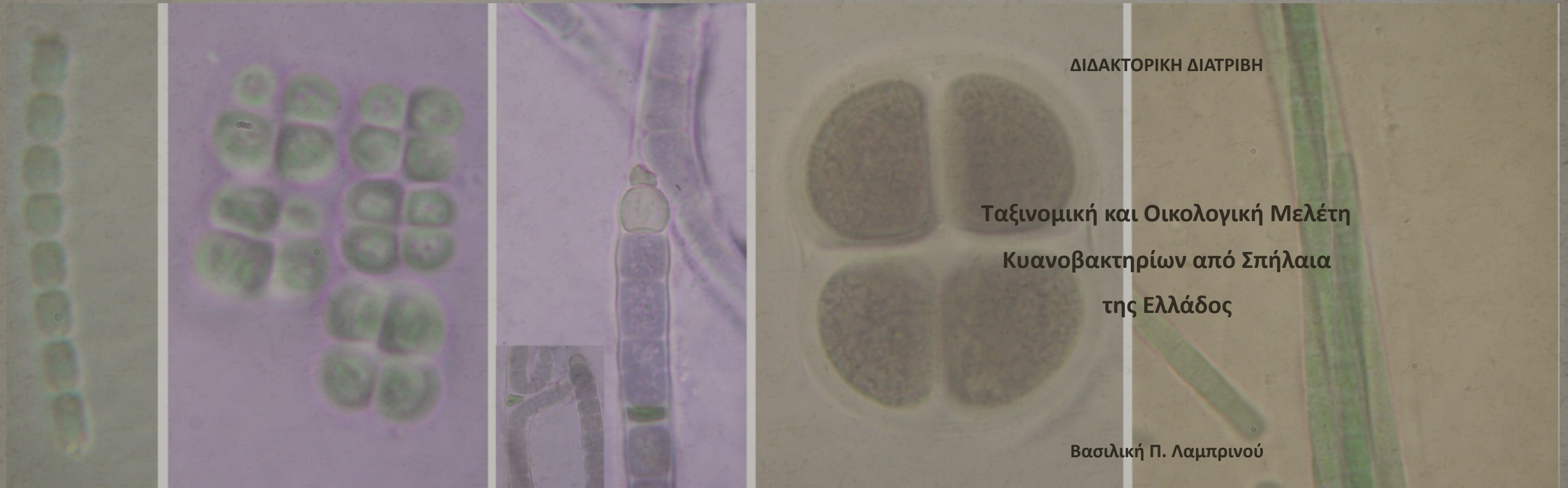


ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗΣ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ταξινόμική και Οικολογική Μελέτη
Κυανοβακτηρίων από Σπήλαια
της Ελλάδος

Βασιλική Π. Λαμπρινού

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ταξινομική και Οικολογική Μελέτη Κυανοβακτηρίων από Σπήλαια της Ελλάδος

Βασιλική Π. Λαμπρινού

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

Αδριανή Πανταζίδου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Αδριανή Πανταζίδου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Αθηνά Οικονόμου-Αμίλλη, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Σμαραγδή Αντωνοπούλου, Καθηγήτρια, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αδριανή Πανταζίδου,
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Αθηνά Οικονόμου-Αμίλλη,
Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Σμαραγδή Αντωνοπούλου,
Καθηγήτρια, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Δανιήλ Δανιηλίδης,
Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Κατσαρός Χρήστος,
Καθηγητής ΕΚΠΑ

Κωνσταντίνος Κορμάς,
Αναπληρωτής Καθηγητής
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αλκιβιάδης Βατόπουλος,
Καθηγητής, Σχολή Δημόσιας Υγείας

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 19/10/2012

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	11
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	15
1.1. ΣΠΗΛΛΙΑ – ΓΕΩΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	17
1.2. ΚΑΡΣΤΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ	18
1.3. ΣΠΗΛΛΙΟΓΕΝΕΣΗ	21
1.4. ΜΟΡΦΕΣ ΣΠΗΛΛΙΩΝ - ΣΠΗΛΛΙΟΔΙΑΚΟΣΜΟΣ	22
1.5. ΒΙΟΓΕΝΕΣΗ ΔΙΑΚΟΣΜΟΥ - ΣΠΗΛΛΙΟΘΕΜΑΤΩΝ.....	23
1.6. ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΣΠΗΛΛΙΩΝ	24
1.6.1. ΑΒΙΟΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ.....	24
1.6.2. ΟΙ ΜΙΚΡΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΤΩΝ ΣΠΗΛΛΙΩΝ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑ	24
1.6.3. ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑ ΣΠΗΛΛΙΩΝ	27
1.6.3.1. Ιστορική Ανασκόπηση	27
1.6.3.2. Σπηλαιοχλωρίδα και Κυανοβακτήρια	28
1.6.3.3. Ρόλος Των Κυανοβακτηρίων Στα Ανθρακικά Πετρώματα.....	29
1.6.3.3.1. Συμμετοχή Των Κυανοβακτηρίων Στις Διαδικασίες Δόμησης	30
1.6.3.3.2. Συμμετοχή Των Κυανοβακτηρίων Στην Αποδόμηση – Βιοδιάβρωση	32
1.7. ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΑ.....	35
1.7.1. ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	35
1.7.2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΤΟΙΧΩΜΑ - ΜΕΜΒΑΡΝΕΣ	36
1.7.3. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ	37
1.7.4. ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΑ - ΛΙΠΟΕΙΔΗ	38
1.7.5. ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ ΣΤΑ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΑ.....	40
1.7.6. ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΑΖΩΤΟΥ	42
1.7.7. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ – ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΤΩΝ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	42
1.7.8. ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	43
1.8. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ.....	45
1.8.1. ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ ΣΤΑ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΑ	45
1.8.2. ΚΛΑΣΙΚΗ ΚΑΙ ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ	47
1.8.3. ΧΡΗΣΗ ΣΥΓΧΡΟΝΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	52
1.8.4. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ – ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	55
1.8.5. ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΑ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΑ	55
1.9. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΑΙ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ	58
1.9.1. ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ.....	58
1.9.2. ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΑ- ΝΕΑ ΠΗΓΗ ΒΙΟΕΝΕΡΓΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ	59
1.10. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	62
2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ.....	63
2.1. ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	65
2.2. ΣΠΗΛΛΑΙΟ «ΚΑΣΤΡΙΑ» - ΘΕΣΗ / ΓΕΩΛΟΓΙΑ	66
2.3. ΣΠΗΛΛΑΙΟ «ΦΡΑΓΧΟΙ» - ΘΕΣΗ / ΓΕΩΛΟΓΙΑ	69
2.4. ΣΠΗΛΛΑΙΟ «ΣΕΛΗΝΙΤΣΑ» - ΘΕΣΗ / ΓΕΩΛΟΓΙΑ.....	70
2.5. ΣΥΛΛΟΓΗ ΥΛΙΚΟΥ – ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ	73
2.6. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ <i>IN VITRO</i>	73
2.7. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ.....	76

2.8. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ – ΜΕΘΟΔΟΣ BUGH DYER	78
2.9. ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΤΑ ΑΝΤΙΡΡΟΗ – ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ	79
2.10. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΟΣ (TLC).....	81
2.10.1. ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΓΛΥΚΟΛΙΠΟΕΙΔΩΝ ΣΤΗΝ TLC	82
2.11. ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ, ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΧΥΣΗΣ ΔΙΣΚΙΩΝ ΣΕ ΑΓΑΡ - KIRBY-BAUER.....	83
2.12. ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ, ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΡΑΙΩΣΗΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΥΓΡΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ – BROTH MICRODILUTION METHOD (MIC).....	84
2.12.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΔΙΑΛΥΜΕΝΗΣ ΥΠΟ ΕΞΕΤΑΣΗ ΟΥΣΙΑΣ (ΛΙΠΙΔΙΟΥ)	84
2.12.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ ΕΜΒΟΛΙΟΥ– ΕΠΩΑΣΗ.....	86
2.12.3. ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΑΠΟΙΚΙΩΝ (COLONY COUNT)	86
2.12.4 ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	87
2.13. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	87
2.13.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA.....	87
2.13.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ (1%)	89
2.13.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ PCR – ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 16S rRNA.....	90
2.13.4. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR.....	90
2.13. 5. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR - ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ	91
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	95
3.1. ΧΛΩΡΙΔΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	97
3.1.1. ΣΠΗΛΛΑΙΟ «ΚΑΣΤΡΙΑ»	97
3.1.2. ΣΠΗΛΛΑΙΟ «ΦΡΑΓΧΘΙ»	102
3.1.3. ΣΠΗΛΛΑΙΟ «ΣΕΛΗΝΙΤΣΑ»	106
3.2. ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	112
3.2.1. ΝΕΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΓΕΝΗ ΚΑΙ ΕΙΔΗ	113
3.2.3 «ΣΠΗΛΛΑΙΟ ΚΑΣΤΡΙΑ»: ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΕΣ ΜΟΝΑΔΕΣ ΜΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΘΕΙΣΕΣ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΕΙΔΟΥΣ	156
3.2.4. «ΣΠΗΛΛΑΙΟ ΦΡΑΓΧΘΙ»: ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΕΣ ΜΟΝΑΔΕΣ ΜΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΘΕΙΣΕΣ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΕΙΔΟΥΣ	163
3.2.5. «ΣΠΗΛΛΑΙΟ ΣΕΛΗΝΙΤΣΑ»: ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΕΣ ΜΟΝΑΔΕΣ ΜΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΘΕΙΣΕΣ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΕΙΔΟΥΣ.....	170
3.3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΙΟΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ	177
3.3.1. ΣΠΗΛΛΑΙΟ «ΚΑΣΤΡΙΑ»	177
3.3.2. ΣΠΗΛΛΑΙΟ «ΦΡΑΓΧΘΙ»	180
3.3.3. ΣΠΗΛΛΑΙΟ «ΣΕΛΗΝΙΤΣΑ»	181
3.3.4. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΤΡΙΩΝ ΣΠΗΛΛΑΙΩΝ	182
3.4. ΑΒΙΟΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΤΩΝ ΜΕΛΕΤΗΘΕΝΤΩΝ ΣΠΗΛΛΑΙΩΝ	186
3.5. ΛΙΠΟΕΙΔΗ	188
3.5.1. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ –ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ TLC	188
3.6. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ.....	191
3.6.1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΧΥΣΗΣ ΣΕ ΑΓΑΡ (KIRBY BAUER).....	191
3.6.1.1. Αντιβακτηριακός έλεγχος έναντι του <i>Staphylococcus aureus</i> (NCTC 6571)	192
3.6.1.2. Αντιβακτηριακός έλεγχος έναντι του <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA 1629)	194
3.6.1.3. Αντιβακτηριακός έλεγχος έναντι του <i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA 1646).....	196
3.6.1.4. Αντιβακτηριακός έλεγχος έναντι του <i>Escherichia coli</i> (ATCC 2592)	198
3.6.1.5. Αντιβακτηριακός έλεγχος έναντι του <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853).....	200
3.6.1.6. Αντιβακτηριακός έλεγχος έναντι του <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212).....	202
3.6.1.7. Αντιβακτηριακός έλεγχος έναντι του <i>Enterococcus faecalis</i> (VRE 880).....	204
3.6.1.8. Αντιβακτηριακός έλεγχος έναντι του <i>Enterococcus faecium</i> (VRE 1291)	206

3.6.2. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΟΥΣΙΑΣ ΣΕ ΥΓΡΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ – ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ (MIC)	211
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	215
4.1. ΧΛΩΡΙΔΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	217
4.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΙΟΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ ΣΤΑ ΜΕΛΕΤΗΘΕΝΤΑ ΣΠΗΛΛΑΙΑ	218
4.3. ΣΧΟΛΙΑ ΕΠΙ ΤΗΣ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΤΩΝ ΣΠΗΛΛΙΩΝ	219
4.4. Η ΕΝΑΣΒΕΣΤΩΣΗ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΑ ΥΠΟΓΕΙΑ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ	220
4.5. Η ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΑ ΣΠΗΛΛΑΙΑ	221
4.6. ΣΧΟΛΙΑ ΕΠΙ ΤΗΣ ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗΣ ΤΩΝ ΑΝΕΥΡΕΘΕΝΤΩΝ ΝΕΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ .	222
4.6.1. ΤΟ ΓΕΝΟΣ <i>Irhinoe</i> gen. nov. ΚΑΙ ΤΟ ΕΙΔΟΣ <i>Irhinoe spelaeobios</i> sp. nov.	222
4.6.1.1. Προσδιορισμός βάσει μορφολογίας	222
4.6.1.2. Προσδιορισμός βάσει Μοριακών Δεδομένων	223
4.6.1.3. Ο μορφότυπος <i>Irhinoe</i> cf. <i>spelaeobios</i>	223
4.6.2. ΤΟ ΜΟΝΟΤΥΠΙΚΟ ΓΕΝΟΣ <i>Toxopsis</i> gen. nov. ΚΑΙ ΕΙΔΟΣ <i>Toxopsis calypsus</i> sp.nov.	227
4.6.2.1. Προσδιορισμός βάσει μορφολογίας	227
4.6.2.2. Προσδιορισμός βάσει Μοριακών Δεδομένων	227
4.6.3. ΤΟ ΝΕΟ ΕΙΔΟΣ <i>Phormidium melanochroun</i> sp. nov.....	228
4.6.3.1. Προσδιορισμός βάσει μορφολογίας	228
4.6.3.2 Προσδιορισμός βάσει Μοριακών Δεδομένων	228
4.7. ΣΧΟΛΙΑ ΕΠΙ ΤΟΥ ΕΝΔΗΜΙΣΜΟΥ ΣΤΑ ΣΠΗΛΛΑΙΑ	229
4.8. ΛΙΠΟΕΙΔΗ ΜΕ ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΑΠΟ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΠΗΛΛΙΩΝ ..	230
5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ - SUMMARY	233
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	249

From Jonathan Livingston Seagull by Richard Bach.

“ How much more there is now to living! Instead of our drab slogging forth and back to the fishing boats, there’s reason to life! We can lift ourselves out of ignorance, we can find ourselves as creatures of excellence and intelligence and skill.

We can be free! We can learn to fly!”

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Τα κυανοβακτήρια μελετώνται ήδη από τις αρχές του 19ου αιώνα. Εντούτοις, οι μελέτες που αναφέρονται στα κυανοβακτήρια από σπήλαια και μάλιστα από τα ελληνικά σπήλαια είναι σχετικά ολιγάριθμες. Η έρευνα των σπηλαίων προσέλκυσε από πολύ νωρίς το ενδιαφέρον των ερευνητών. Ωστόσο, οι εμπειριστατωμένες μελέτες είναι λίγες και κυρίως ασχολούνται με τα σπήλαια από γεωλογική σκοπιά. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στις μεγάλες δυσχέρειες που παρουσιάζει η έρευνα των οργανισμών των σπηλαίων και ιδιαίτερα των μικροοργανισμών όπως τα κυανοβακτήρια, καθώς και στο γεγονός ότι η συλλογή και η ανάπτυξή τους σε εργαστηριακές συνθήκες αποτελούν μία επίπονη και όχι πάντοτε επιτυχή διαδικασία. Τα αδιατάρακτα σπήλαια αποτελούν ένα σχετικά σταθερό αλλά δύσκολα προσβάσιμο οικοσύστημα, το οποίο χαρακτηρίζεται από δυσμενείς για την ανάπτυξη της φωτοσυνθετικής μικροχλωρίδας συνθήκες (χαμηλή παρουσία έως απουσία φωτός). Από τις περισσότερες έρευνες επί της φωτοσυνθετικής μικροχλωρίδας που έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα παγκοσμίως, γίνεται αντιληπτό ότι τα κυανοβακτήρια αποτελούν τους κυρίαρχους και πιο ενδιαφέροντες μικροοργανισμούς στα σπήλαια, που συμμετέχουν ενεργά στη δημιουργία-δόμηση αλλά και στην αποδόμηση των υποστρωμάτων. Αρκετά είδη θεωρούνται οργανισμοί πρωτοπόροι εποίκησης και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδοχή πετρώματος → ευκαρυωτικών φυκών → ανώτερων φυτών. Η μελέτη τους από συστηματική, ταξινομική και οικολογική σκοπιά παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον και αποτελεί το υπόβαθρο για περαιτέρω έρευνα. Εξαιρετικά ελκυστική είναι η ταξινομική τους μελέτη, καθώς νέα για την επιστήμη είδη κυανοβακτηρίων με ιδιαίτερες ιδιότητες αποκαλύπτονται από την έρευνα των ελάχιστα μελετημένων οικοσυστημάτων των σπηλαίων. Σε παγκόσμιο επίπεδο, εκτός από την παραδοσιακή μορφολογική προσέγγιση των κυανοβακτηρίων υπάρχουν διαθέσιμα μοριακά και βιοχημικά δεδομένα που χρησιμοποιούνται ως συμπληρωματικά για την ταξινόμηση ειδών και στελεχών. Επομένως, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός 'συλλογών' ζωντανού και φυσικού υλικού σε τράπεζες καλλιιεργειών, αλλά και σύγχρονες τράπεζες αλληλουχιών DNA με πληροφορίες γενετικών δεικτών που συνεχώς εμπλουτίζονται, όπως για παράδειγμα η GenBank. Στην Ελλάδα, η οποία συγκαταλέγεται στις χώρες με τα περισσότερα σπήλαια παγκοσμίως, η κυανοβακτηριακή μικροχλωρίδα παραμένει σχεδόν άγνωστη. Συμβολή στη μελέτη αποτελούν οι κάτωθι εργασίες: Anagnostidis et al. (1981), Ilioroulou-Georgoudaki et al. (1993), Pantazidou (1996, 1997), Pantazidou & Roussomoustakaki (2005), Lamprinou et al. (2009), Pantazidou et al. (2012).

Για τους ανωτέρω λόγους μου ανετέθη ως θέμα διδακτορικής διατριβής η «Ταξινομική και Οικολογική μελέτη Κυανοβακτηρίων από Σπήλαια της Ελλάδος» με υπεύθυνη την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Α. Πανταζίδου. Μετά από προκαταρκτικές έρευνες σε σπήλαια της Ελλάδος, επιλέχθηκαν τρία αδιατάρακτα σπήλαια που ανήκουν στο ασβεστολιθικό τόξο της Πελοποννήσου, εξ αιτίας κυρίως της σχετικά ευκολότερης προσβασιμότητας. Υλικό συλλέχθηκε

από 7 δειγματοληπτικές θέσεις εποχικώς σε έναν ετήσιο κύκλο για κάθε σπήλαιο, και καταγράφηκαν οι αβιοτικές παράμετροι (PAR, T, RH) σε κάθε δειγματοληψία για κάθε δειγματοληπτική θέση. Ο προσδιορισμός των κυανοβακτηρίων έγινε σε φυσικό και καλλιεργημένο υλικό κυρίως με οπτική μικροσκοπία και ενίοτε με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης και διέλευσης. Επίσης, η μοριακή προσέγγιση σε είδη που εμφάνιζαν ενδιαφέρον κρίθηκε απαραίτητη για την επίλυση ταξινομικών προβλημάτων.

Τέλος, απομονώθηκαν ενδιαφέροντα στελέχη και ορισμένα ύστερα από εκχύλιση και διαχωρισμό των λιπιδίων τους, ελέγχθηκαν για πιθανή εύρεση αντιβακτηριακής δράσης έναντι προτύπων και κλινικών βακτηριακών στελεχών.

Η έρευνα παραγματοποιήθηκε κατά το μεγαλύτερο μέρος της στο Εργαστήριο Οικολογίας και Ταξινομικής του Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ, υπό την επίβλεψη της Αναπλ. Καθ. κ. Αδριανής Πανταζίδου, αλλά και στο εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας και Φυσιολογίας Ανθρώπου και Μικροοργανισμών του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη της Καθ. κ. Σμαραγδής Αντωνοπούλου και στο Εργαστήριο Δημόσιας Υγείας ΚΕΔΥ στη Βάρη υπό την επίβλεψη των Καθ. κκ. Αλκιβιάδη Βατόπουλου και Εμμανουήλ Βελονάκη.

Από τη θέση αυτή θα ήθελα για μια ακόμη φορά να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της διδακτορικής κ. Πανταζίδου για την αμέριστη συμπαράσταση, καθοδήγηση και ουσιαστική βοήθεια σε όλες τις φάσεις εκπόνησης της εργασίας τόσο στο πειραματικό όσο και στο συγγραφικό μέρος. Επίσης, την Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας του Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής κ. Αθηνά Οικονόμου- Αμίλλη για την ενθάρρυνση, τη συμπαράσταση και τη διάθεση πολύτιμου χρόνου για την παρακολούθηση του συγγραφικού μέρους της εργασίας. Την Καθηγήτρια κ. Αντωνοπούλου Σμαραγδή για τη συμμετοχή στην τριμελή επιτροπή και τη συμβολή της στην επιτυχή περάτωση της εργασίας. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δανιήλ Δανιηλίδη για την αμέριστη συμπαράσταση καθ όλη τη διάρκεια και τη βοήθεια στην εξαγωγή των αποτελεσμάτων ανάλυσης βιοκοινοτήτων.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τους κκ. Βατόπουλο και Βελονάκη για τη δυνατότητα συνεργασίας και την πολύτιμη βοήθειά τους στις αντιβακτηριακές δοκιμές. Σημειώνω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες στους κάτωθι, που χωρίς τη βοήθειά τους η διδακτορική διατριβή δεν θα είχε παρατωθεί: α) την Επικ. Καθ. Ε. Φραγκοπούλου του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου Αθηνών για την πολύτιμη βοήθειά της και καθοδήγησή της σε όλη τη διαδικασία εκχύλισης και διαχωρισμού λιπιδίων επιλεγμένων κυανοβακτηρίων, β) τη μικροβιολόγο, υποψήφια διδάκτορα κ. Κ. Τρυφίνοπούλου στο εργαστήριο της Δημόσιας Υγείας στη Βάρη για την πολύτιμη βοήθειά της στις αντιβακτηριακές δοκιμές, γ) την υποψήφια διδάκτορα Α. Σκαράκη στο ΕΛΚΕΘΕ της Κρήτης για τη βοήθειά της στα μοριακά δεδομένα, δ) τη διδάκτορα κ. Ι. Λούβρου, ΙΔΑΧ του Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής ΕΚΠΑ, για θέματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης, ε) το ευχάριστο – συναδελφικό κλίμα στο Κεντρικό Εργαστήριο Δημόσιας Υγείας (ΚΕΔΥ-ΕΣΔΥ), στο εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας και Φυσιολογίας Ανθρώπου και Μικροοργανισμών του

Χαροκοπείου Πανεπιστημίου Αθηνών, στο ΕΛΚΕΘΕ Κρήτης καθώς και στον Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής. Επιπλέον θέλω να αναγνωρίσω τη συμβολή και βοήθεια σε θέματα που αφορούν στις μοριακές τεχνικές του Αναπλ. Καθηγητή στο Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος κ. Κ. Κορμά. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κ. Μ. Hernández-Mariné του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Βαρκελώνης και την διδάκτορα κ Α. Σιάκουλη-Γαλανοπούλου του Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης, για τη συμβολή τους σε θέματα που αφορούν σε μικροσκοπία διέλευσης. Επιπροσθέτως ευχαριστώ τον διδάκτορα Χ. Κανελλόπουλο, για την XRD ανάλυση του πετρώματος.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω την Εφορεία Παλαιοανθρωπολογίας και Σπηλαιολογίας Νοτίου Ελλάδος και ιδιαιτέρως την κ. Οικονόμου Αλεξάνδρα, για την χορήγηση αδειών επίσκεψης στα σπήλαια της παρούσας έρευνας.

Τέλος, θέλω να αναγνωρίσω την ατελείωτη συμπαράσταση, κατανόηση αλλά και πρακτική βοήθεια των φίλων μου καθώς και της οικογένειάς μου σε όλη την πορεία εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής. Ως ελάχιστο δείγμα ευγνωμοσύνης και αγάπης αφιερώνω την παρούσα διδακτορική διατριβή στους γονείς μου.

Αθήνα

Λαμπρινού Π. Βασιλική

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΣΠΗΛΑΙΑ – ΓΕΩΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Τα σπήλαια είναι υπόγεια έγκοιλα τα οποία επικοινωνούν με την επιφάνεια του εδάφους μέσω μικρών στομιών, συνήθως προσιτών στον άνθρωπο. Δημιουργούνται κυρίως σε ασβεστολιθικά πετρώματα και ενίοτε σε γύψους, ρεύματα λάβας και ψαμμίτες. Διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες με βάση τα περιβάλλοντα πετρώματα: τα **πρωτογενή** και τα **δευτερογενή**. Τα **πρωτογενή σπήλαια** δημιουργούνται κατά τη διάρκεια απόθεσης του περιβάλλοντος πετρώματος. Σε αυτά συγκαταλλέγονται τα ηφαιστειογενή, τα κοραλλιογενή και τα κοιλώματα τόφων. Τα **δευτερογενή σπήλαια** δημιουργούνται μετά τη στερεοποίηση του περιβάλλοντος πετρώματος και σε ορισμένες περιπτώσεις μετά την πάροδο αρκετών γεωλογικών ετών. Σε αυτή την κατηγορία συγκαταλλέγονται τα αιολικά, τα τεκτονικά και τα υδρικά ή καρστικά σπήλαια.

Το κατεξοχήν πέτρωμα μέσα στο οποίο δημιουργείται το 95% των σπηλαίων είναι το ανθρακικό. Με τον όρο «ανθρακικά πετρώματα» καλούνται εκείνα στα οποία τουλάχιστον η μισή μάζα του πετρώματος αποτελείται από ανθρακικά ορυκτά και θεωρούνται ως αμιγή όταν περιέχουν 90% από τα εν λόγω ορυκτά. Οι πλέον διαδεδομένες μορφές ανθρακικών πετρωμάτων είναι οι ασβεστόλιθοι με ποσοστό ανθρακικού ασβεστίου > 90%, και οι δολομίτες που συνήθως σχηματίζονται από την αντικατάσταση του ασβεστίου από μαγνήσιο και τη δημιουργία του διπλού άλατος $\text{CaCO}_3 \cdot \text{MgCO}_3$ ως τελικού προϊόντος. Η αναλογία μεταξύ ασβεστίτη και δολομίτη αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα στη διάκριση των ανθρακικών πετρωμάτων.

ΟΝΟΜΑΣΙΑ (Ανθρακικά Πετρώματα)	Δολομίτης %
Ασβεστόλιθοι	0-5
Ασβεστόλιθοι μαγνησίου	5-10
Ασβεστόλιθοι δολομίτη	10-50
Δολομίτης ασβεστολιθικός	50-90
Δολομίτης	90-100

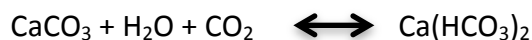
Πίνακας 1: Πίνακας ονομασίας ανθρακικού πετρώματος με βάση την εκατοστιαία σύστασή του σε δολομίτη (Collignon 1992).

Ο ασβεστόλιθος είναι πέτρωμα το οποίο σχηματίστηκε κυρίως σε θαλάσσιο περιβάλλον. Δημιουργήθηκε σε παλαιότερες γεωλογικές περιόδους από: α) καθίζηση κελυφών ανθρακικού ασβεστίου διαφόρων οργανισμών που ζούσαν σε μικρά κυρίως βάθη, β) κελύφη οργανισμών που αποτελούν το πλαγκτόν (Τρηματοφόρα, Ακτινόζωα) και γ) υπολείμματα οστρακοειδών και φυκών. Σε αυτά τα ιζήματα προστίθεται και η καθίζηση ανθρακικού ασβεστίου που περιέχεται στο νερό της θάλασσας (Γιαννόπουλος 2000). Ωστόσο, τοπικές χερσαίες και λιμναίες αποθέσεις ασβεστολίθου εμφανίζουν σημαντική εξάπλωση. Τα ανθρακικά αυτά πετρώματα έχουν την ικανότητα να διαλύονται από το νερό όταν περιέχει διαλυμένο διοξείδιο του άνθρακα. Το φαινόμενο αυτό της χημικής διάλυσης του ανθρακικού πετρώματος ονομάζεται «καρστικό φαινόμενο» (Cigna 1978, Palmer 1991, Γιαννόπουλος 2000).

Η προσπάθεια ταξινόμησης των ασβεστολίθων είναι αρκετά δύσκολη εξ αιτίας της μεγάλης πολυπλοκότητας αυτών. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι ταξινόμησης των ασβεστολίθων όπως η σχέση τους με τους οργανισμούς από τους οποίους προέρχονται (π.χ κοραλλιογενείς ασβεστόλιθοι), η χημική τους προέλευση (π.χ. τραβερτίνες), ή η κλαστική τους σύνθεση (π.χ. ασβεστορουδίτες) κ.α.

1.2. ΚΑΡΣΤΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ

Ο όρος «καρστ» (karst) προέρχεται από τη σλαβική λέξη «Krs» η οποία αποτελεί γεωγραφική περιοχή που εκτείνεται από τη Σλοβενία έως το Μαυροβούνιο (Blair 2003). Κατ'άλλους προέρχεται από την γερμανική λέξη «Karr» ή την ιταλική λέξη «Carso» και χρησιμοποιήθηκε για να χαρακτηρίσει τη φτωχή σε βλάστηση περιοχή των λευκών ασβεστολίθων στην ΒΑ Τεργέστη. Ως «καρστ» σήμερα αναφέρεται οποιοδήποτε τοπίο έχει σχηματιστεί όχι μόνο από τη μηχανική δράση του νερού αλλά ουσιαστικά από τη διαδικασία της διάλυσης του πετρώματος σύμφωνα με την απλουστευμένη εξίσωση:



Το «καρστ» παρατηρείται κυρίως σε λιθολογίες όπως ασβεστόλιθοι, δολομίτες ή γύψοι. Το καρστικό ανάγλυφο αποτελείται από ποικίλες γεωμορφές των οποίων η γένεση οφείλεται στην έντονη υδατοπερατότητα και στην υψηλή διαλυτότητα του μητρικού πετρώματος. Η αρχική διάλυση του πετρώματος ενισχύεται από τη μηχανική δράση του ρέοντος ύδατος και τον κατακερματισμό του υποστρώματος. Βεβαίως, στη γένεση του «καρστ» συμμετέχουν και άλλες διαδικασίες όπως μηχανική διάβρωση, καθίζηση, απόθεση κ.α.

Στις καρστικές περιοχές, το κλίμα είναι ένας βασικός αβιοτικός παράγοντας καθώς η διάλυση του πετρώματος εξαρτάται από την ποσότητα του νερού και επομένως από τις

βροχοπτώσεις. Το νερό για να μπορέσει να διαλύσει το ανθρακικό πέτρωμα χρειάζεται να περιέχει διαλυμένο CO₂ που λαμβάνει από την ατμόσφαιρα αλλά κυρίως από τους ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς. Ο ασβεστόλιθος εξ αιτίας των διακλάσεων (ανοιγμάτων) γίνεται διαπερατός από το νερό. Το νερό διαπερνά το πέτρωμα διαμέσου των διακλάσεων διαβρώνοντάς το και δημιουργώντας υπόγεια έγκοιλα, τα οποία εξελίσσονται σε σπήλαια.

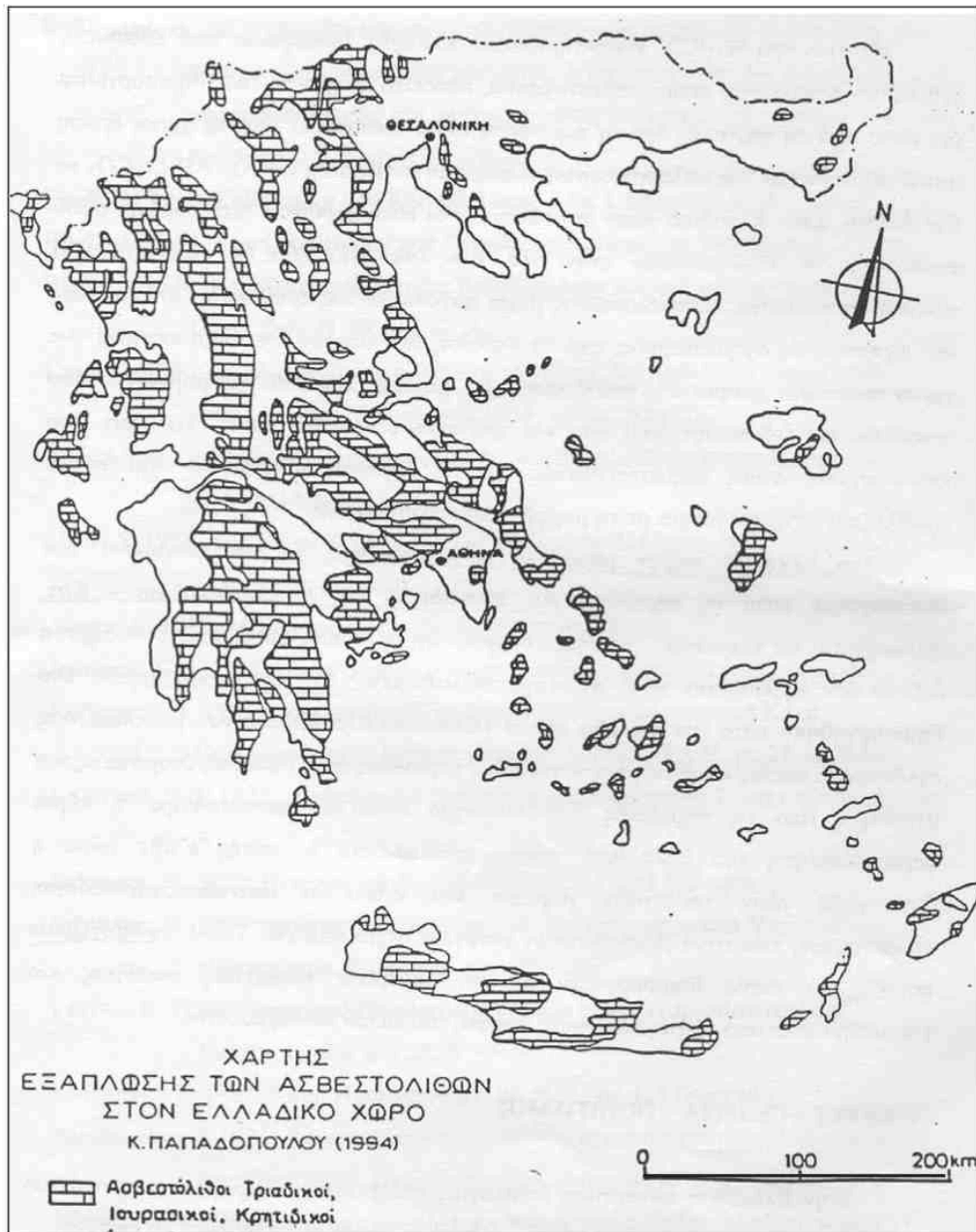
Η Ελλάδα κατά το μεγαλύτερο μέρος της καλύπτεται από ασβεστολιθικά πετρώματα που καλύπτουν > 30% της λιθολογίας της (Απεικόνιση 1.1). Στην Ελλάδα τα σπήλαια διανοίχθηκαν κατά την Τριτογενή και την Τεταρτογενή εποχή και μέχρι σήμερα έχουν υποστεί πολλές μεταβολές. Είναι διανοιγμένα σε συμπαγή ανώτερο Κρητιδικό ή Ηώκαινο ασβεστόλιθο, σε συμπαγή Ιουρασικό ή Τριαδικό ασβεστόλιθο, σε νεώτερο αργιλικό ασβεστόλιθο ή σε νεώτερα κροκαλοπαγή πετρώματα.

Το νερό εμπλουτισμένο με διοξείδιο του άνθρακα εισχωρεί στο ασβεστολιθικό υπόστρωμα και διαλύει το ανθρακικό ασβέστιο με αποτέλεσμα την παραγωγή διόξινου ανθρακικού ασβεστίου:



Στη συνέχεια, το εμπλουτισμένο νερό με διόξινο ανθρακικό ασβέστιο, εισχωρώντας στις ρωγμές του ασβεστολίθου καταλήγει στην οροφή του σπηλαίου. Εξ αιτίας της αλλαγής της κατάστασης ισορροπίας της παραπάνω αντίδρασης, είτε επειδή απελευθερώνεται το διοξείδιο του άνθρακα από το νερό, είτε λόγω της μείωσης της μερικής πίεσης, ή εξ αιτίας της εξάτμισης που μειώνει τον όγκο του νερού επαναδημιουργείται ανθρακικό ασβέστιο κατά την αντίδραση (Forti 2001, Baskar et al. 2005):





Απεικόνιση 1.1: Η κάλυψη του Ελλαδικού χώρου από ασβεστολίθους από τη διάλυση των οποίων έχει δημιουργηθεί ένα χαρακτηριστικό καρστικό ανάγλυφο με ποικιλία γεωμορφών τόσο επιφανειακών (εξωκαρστικών) όσο και υπόγειων (ενδοκαρστικών).

1.3. ΣΠΗΛΛΙΟΓΕΝΕΣΗ

Με τον όρο «σπηλαιογένεση» εννοούμε το σύνολο των φυσικοχημικών και βιολογικών διαδικασιών/φαινομένων που αποτελούν την αιτία δημιουργίας του πρώτου μικρού εγκοίλου μέσα στο πέτρωμα, το οποίο με την πάροδο του χρόνου θα εξελιχθεί σε σπήλαιο. Εργαστηριακά πειράματα, έδειξαν ότι ο ρυθμός της ασβεστολιθικής διάλυσης εξαρτάται από την ταχύτητα του όξινου νερού (Palmer 2007). Ο Howard (1964) εφάρμοσε χημικά και υδραυλικά φαινόμενα για να μελετήσει την προέλευση των σπηλαίων. Αξίζει να σημειωθεί ότι μέχρι τις αρχές του 20^{ου} αι. δεν υπήρχε κάποια ποιοτική μελέτη που να συσχετίζει τη διάνοιξη σπηλαίου με τα περιβάλλοντα πετρώματα και τη γεωλογία τους, εκτός από τοπικές και μη συστηματικές παρατηρήσεις (Palmer 2007). Κατά τα τέλη της δεκαετίας του '50 γεωλόγοι (Davies 1959,1960, Deike 1967, Howard 1964) άρχισαν να ερευνούν τη σχέση των σπηλαίων με τη γεωλογία των περιβαλλόντων πετρωμάτων και αυτό έγινε κυρίως στις ΗΠΑ.

Σημαντικό ρόλο στη διάνοιξη του εγκοίλου αλλά και στη μεταφορά φερτών υλικών διαδραματίζουν η τεκτονική, μηχανική και φυσικοχημική ενέργεια καθώς και οι βιολογικοί παράγοντες σε συνδυασμό με την υδρολογία της περιοχής (Γιαννόπουλος 2000, Mulek 2008).

Για την καλύτερη κατανόηση της διαδικασίας της σπηλαιογένεσης πολλοί επιστήμονες διακρίνουν δύο στάδια. Τη **διάνοιξη** του εγκοίλου (δημιουργία «κενού») και το στάδιο της **εξέλιξης** με τελικό σχηματισμό το σπήλαιο. Η διάνοιξη των σπηλαίων είναι κατά κύριο λόγο μηχανική, ενώ η εξέλιξη των πετρωμάτων γίνεται κατά κύριο λόγο με διάλυση του πετρώματος και επομένως η αιτία είναι φυσικοχημική (Γιαννόπουλος 2000). Γενικά, η διαδικασία της σπηλαιογένεσης είναι αρκετά πολύπλοκη, με συμβάλλοντα φαινόμενα διαφορετικής φύσεως που αλλάζουν κατά τη διάρκεια του χρόνου, με αποτέλεσμα να επηρεάζουν την καρστική μορφογένεση ποικιλοτρόπως.

Τα αίτια της σπηλαιογένεσης είναι ποικίλα και μπορούν να διαχωρισθούν σε κατηγορίες:

- Σπηλαιογένεση λόγω κατακρημνίσεων
- Σπηλαιογένεση λόγω αιολικών φαινομένων
- Σπηλαιογένεση λόγω τεκτονικών φαινομένων
- Σπηλαιογένεση λόγω μηχανικής διάβρωσης του ύδατος επί των πετρωμάτων
- Σπηλαιογένεση λόγω χημικής διάβρωσης του ύδατος επί των πετρωμάτων (καρστικά έγκοιλα)

1.4. ΜΟΡΦΕΣ ΣΠΗΛΑΙΩΝ - ΣΠΗΛΑΙΟΔΙΑΚΟΣΜΟΣ

Σύμφωνα με τον Palmer (1991) όλα τα σπήλαια περιέχουν διατάξεις από διασταυρούμενους διαδρόμους που σχηματίζουν διακεκριμένες μορφές.

Σε ένα σπήλαιο το δίκτυο των περασμάτων ανταποκρίνεται σε κάποια από τις παρακάτω θεμελιώδεις μορφές:

1. δενδριτική (branchwork)
2. δικτυοειδή (network)
3. αναστομωτική (anastomotic)
4. σπογγώδης (spongework)
5. διακλαδιζόμενη (ramiform)

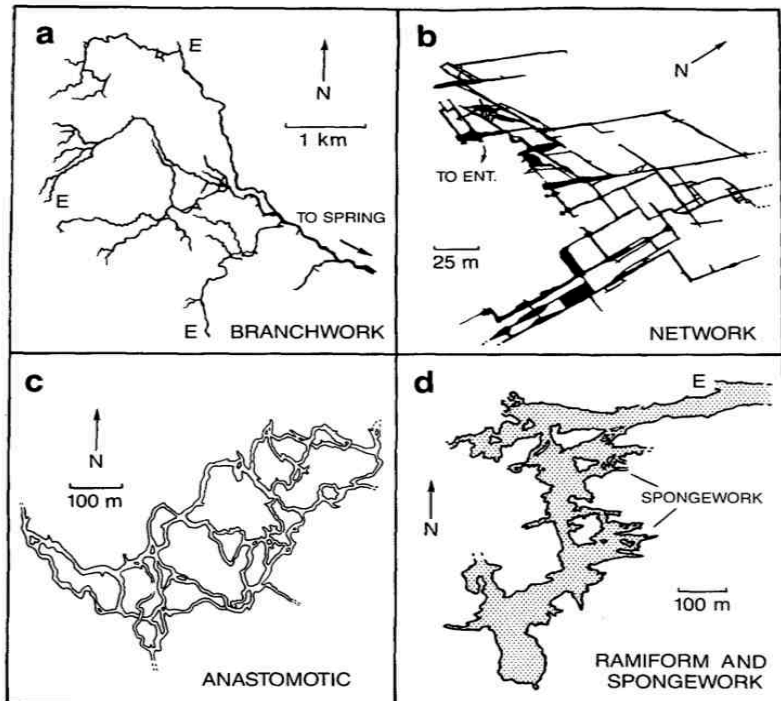
Τα δενδριτικά (α) είναι δίκτυα που διακλαδίζονται κατά την ανάντι κατεύθυνση, τυπικά συστημάτων που αναπτύσσονται κοντά ή στο επίπεδο που τροφοδοτούνται καταβόθρες.

Τα δικτυοειδή σπήλαια (β) είναι γωνιώδη δίκτυα με διασταυρούμενες διαρρήξεις και απαντώνται σε ασβεστολιθικά πετρώματα με μεγάλη απορροή.

Τα αναστομωτικά (γ) συνίστανται από διατάξεις καμπυλόγραμμων αγωγών που συνήθως διασταυρώνονται.

Τα σπογγώδη (δ) φέρουν μικρούς σφαιρικούς θαλάμους με τυχαία διασύνδεση, και τα διακλαδιζόμενα (ε) απαντώνται σε περιοχές όπου οξέα και συγκεκριμένες ποσότητες θείου με μορφή (H_2S) ανέρχονται από το εσωτερικό της γης και αποτελούνται από ακανόνιστες αίθουσες με δαιδαλώδη γεωμετρία σε τρεις διαστάσεις.

Ο **διάκοσμος** του σπηλαίου δημιουργείται κυρίως επί του ανθρακικού ασβεστίου. Το ορυκτό αυτό υφίσταται σε ποσοστό 90-95% μέσα στα σπήλαια υπό τις δύο κύριες μορφές, τον ασβεστίτη και τον αραγωνίτη. Ο Forti (1980) διαχωρίζει τον διάκοσμο σε τέσσερις μεγάλες κατηγορίες με υποδιαιρέσεις:



Απεικόνιση 1.2: Τα πιο συχνά πρότυπα σπηλαίων κατά Palmer (1991).

1. Διάκοσμος προερχόμενος από σταγονορροή
 - Διάκοσμος από την οροφή προς τα κάτω (σταλακτίτες, «κουρτίνες»)
 - Διάκοσμος δημιουργούμενος από πτώση σταγόνας (σταλαγμίτες, σταλαγματικό δάπεδο)
2. Διάκοσμος από ροή ύδατος (καταρράκτες, επίπαγος)
3. Διάκοσμος εξ αιτίας τριχοειδών φαινομένων (ελικτίτες, δίσκοι)
4. Διάκοσμος προερχόμενος από υποβρύχια ιζήματα («μαργαριτάρια»)

1.5. ΒΙΟΓΕΝΕΣΗ ΔΙΑΚΟΣΜΟΥ - ΣΠΗΛΑΙΟΘΕΜΑΤΩΝ

Η άποψη ότι οι οργανισμοί επηρεάζουν την ανάπτυξη και τη δημιουργία των δευτερογενών χημικών αποθέσεων (διάκοσμος) στα σπήλαια ήταν αρκετά παλαιά και χρονολογείται από τον 17^ο αιώνα. Στο δεύτερο μισό του 17^{ου} αι. ο Beaumont (1676) πρότεινε ότι τα σπηλαιοθέματα είναι πραγματικά «φυτά βράχων», η ανάπτυξη των οποίων είναι παρόμοια με την ανάπτυξη των δένδρων (Forti 2001). Ωστόσο, παρά την εξέλιξη και συνεξέλιξη της βιο- και γεώσφαιρας οι ερευνητές έτειναν να αγνοούν τη μικροβιακή ενεργότητα στα γεωλογικά περιβάλλοντα επειδή αφενός προσπαθούσαν να εξηγήσουν αυτά τα φαινόμενα με αμιγώς ανόργανο τρόπο και αφετέρου επειδή υπήρχε τεράστια δυσκολία να καλλιεργηθούν οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί από σπήλαια υπό εργαστηριακές συνθήκες (Barton & Northup 2007). Με την εξέλιξη της επιστήμης και την ανάπτυξη νέων μοριακών τεχνικών, οι περιορισμοί αυτοί αντιμετωπίστηκαν (Pace 1997, Barton & Northup 2007). Σήμερα, είναι πλέον αποδεκτό ότι οι ζώντες οργανισμοί δύνανται να επηρεάζουν και στην πραγματικότητα να ελέγχουν τον διάκοσμο ενός σπηλαίου.

1.6. ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΣΠΗΛΑΙΩΝ

1.6.1. ΑΒΙΟΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ

Το οικοσύστημα του σπηλαίου θεωρείται κατά το πλείστον σταθερό, κλειστό, με μικρή ροή ενέργειας και εισροή θρεπτικών. Ως προς την ενέργεια, τα σπήλαια κατατάσσονται σε τρεις τύπους: α) υψηλής ενέργειας (π.χ. όσα πλημμυρίζουν από υπόγειους ποταμούς), β) μεσαίας ενέργειας και γ) χαμηλής ενέργειας, άνευ άμεσης πρόσβασης με το εξωτερικό περιβάλλον (Cigna 1993, Hoffmann 2002). Τα «τυπικά σπήλαια» ιδιαίτερα στο εσωτερικό τους χαρακτηρίζονται από σταθερή θερμοκρασία ($T \approx 10-18^{\circ}\text{C}$) κατά τη διάρκεια του έτους, υψηλή σχετική υγρασία ($\text{RH} > 85\%$) και χαμηλή ενεργώς φωτοσυνθετική ακτινοβολία ($\text{PAR} = 0,0001-3,8 \mu\text{mols} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, με σημαντικά υψηλότερες τιμές στην είσοδο όπως $1.254 \mu\text{mols} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$) (Asencio & Aboal 1996, Groth et al. 1999, Roldán et al. 2004, Cuezva et al. 2009, Lamprinou et al. 2009). Ωστόσο, η μορφολογία του σπηλαίου, το γεωγραφικό πλάτος και μήκος καθώς και η υψομετρική απόσταση από το επίπεδο θάλασσης αποτελούν χαρακτηριστικά που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση των τιμών των περιβαλλοντικών παραμέτρων ενός σπηλαίου και κατ'επέκταση των βιοκοινοτήτων.

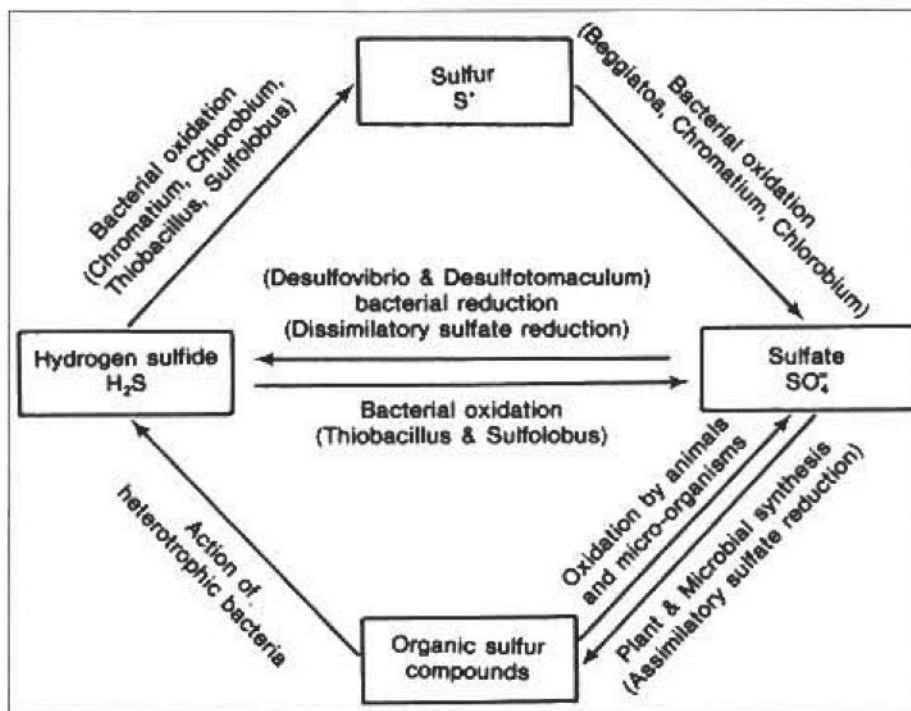
Ένα «τυπικό σπήλαιο» θα μπορούσε να διαχωρισθεί σε 3 ζώνες: α) **ζώνη εισόδου** όπου το μικροκλίμα επηρεάζεται από τις εξωτερικές συνθήκες και οι αβιοτικές παράμετροι κυμαίνονται κατά τη διάρκεια του έτους. Από οικολογική σκοπιά, η ζώνη εισόδου μπορεί να χαρακτηριστεί ως οικοτόνος μεταξύ του επίγειου και υπόγειου περιβάλλοντος (Hansen et al. 1988, Cuezva et al. 2009). Στον οικοτόνο της εισόδου η διαθεσιμότητα των θρεπτικών είναι μεγάλη και είδη από γεινιάζοντα περιβάλλοντα μπορούν να συνυπάρχουν με αυτά που είναι εξειδικευμένα σε αυτόν τον οικοτόνο (Cuezva et al. 2009). Ακολουθούν, η β) **ενδιάμεση ζώνη** που χαρακτηρίζεται από μεσαίες τιμές αβιοτικών παραμέτρων χωρίς όμως το φως να αγγίζει τα επίπεδα παράγοντος επιβάρυνσης, και τέλος η γ) **εσωτερική ζώνη** όπου η θερμοκρασία (T) και η σχετική υγρασία (RH) είναι σταθερές, ενώ η ενεργώς φωτοσυνθετική ακτινοβολία (PAR) αποτελεί τον περιοριστικό παράγοντα ανάπτυξης.

1.6.2. ΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΤΩΝ ΣΠΗΛΑΙΩΝ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑ

Στους μη φωτοσυνθετικούς οργανισμούς των σπηλαίων συγκαταλέγονται τα Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, οι ζύμες, και οι σαπροτροφικοί μύκητες όπως *Penicillium*, *Fusarium*. Μικροβιολογικές μελέτες από το σπήλαιο Altamira της Ισπανίας έχουν δείξει ότι πρωτεοβακτήρια και ακτινοβακτήρια (είδη του γένους *Streptomyces*) αποτελούν τις επικρατούσες ομάδες των ετερότροφων βακτηρίων (Cañaveras et al. 2001, Cuezva et al. 2009). Οι μικροοργανισμοί των σπηλαίων είναι μεταβολικώς ευπροσάρμοστοι λαμβάνοντας ενέργεια από συστατικά του σπηλαίου, από αέρια ή από την οξείδωση στοιχείων του πετρώματος

(Adetutu et al. 2012). Μέσω αυτών των διαδικασιών διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στους βιογεωχημικούς κύκλους του σπηλαίου καθώς και στη δημιουργία του διακόσμου. Προσφάτως έχει καλά τεκμηριωθεί ότι οι μικροοργανισμοί δύνανται με άμεσο τρόπο να προκαλέσουν λιθοποίηση (mineralization) με τη βοήθεια ενζύμων ή με την παραγωγή ουσιών που οδηγούν στην καθίζηση διαφόρων ορυκτών (π.χ. μεταβάλλοντας το pH του περιβάλλοντος), και να αποτελέσουν τους λεγόμενους «πυρήνες» στη διαδικασία της λιθοποίησης (Forti 2001, Cañaveras et al. 2001, Engel et al. 2004 a,b, Mulek 2008).

Οι μικροβιακές διαδικασίες στα σπήλαια συχνά περιλαμβάνουν αναγωγικές / οξειδωτικές αντιδράσεις (Forti 2001). Οι μικροοργανισμοί των σπηλαίων που συμμετέχουν στις παραπάνω διαδικασίες διακρίνονται σε α) **αερόβιους χημειολιθότροφους** που λαμβάνουν ενέργεια από την οξείδωση ανόργανων ενώσεων και β) **αναερόβιους χημειοτερότροφους** που λαμβάνουν ενέργεια από την οξείδωση οργανικών υλικών και από την αναγωγή ανόργανων συστατικών. Ένα παράδειγμα φαίνεται στον βιογεωχημικό «κύκλο του θείου» όπου συμμετέχουν τόσο βακτήρια αναγωγής όσο και βακτήρια οξείδωσης του θείου (Απεικόνιση 1.3).



Απεικόνιση 1.3: Ο κύκλος του θείου και ο ρόλος των μικροοργανισμών (Forti 2001).

Πολλές φορές το υψηλό ποσοστό θειούχων οργανικών συστατικών που παράγεται από τον παραπάνω κύκλο του θείου είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία ψευδο-σταλακτιτών που είναι γνωστοί με τον όρο «mucolites» (Forti 2001). Οι μικροοργανισμοί που διαβιούν στα σπήλαια δεν συμμετέχουν μόνο στον κύκλο του θείου, αλλά και σε διαδικασίες βιο-απολιθοποίησης (biomineralization = μετατροπή οργανικών συστατικών σε ανόργανα με τη βοήθεια οργανισμών), όπως η καθίζηση φωσφορικών και ανθρακικών.

Οι πηγές των φωσφορικών ιόντων (PO_4^{-3}) για τη δημιουργία ορυκτών στα σπήλαια υπάρχουν κυρίως στα οστά θηλαστικών και στις αποθέσεις «γουανό» (συσσωρεύσεις περιττωμάτων χειροπτέρων). Οι αντιδράσεις μεταξύ του φωσφορικού οξέος στα τοιχώματα του γύψου και του πηλού αποτελούν καθαρά ανόργανες διαδικασίες αλλά η μετατροπή του οργανικού φωσφόρου σε ιόντα (PO_4^{-3}) πολύ συχνά γίνεται από τους μικροοργανισμούς. Έτσι όλα τα φωσφορικά στα σπήλαια πιθανώς είναι σε κάποιο ποσοστό βιογενούς προέλευσης (Forti 2001).

Στην καθίζηση των ανθρακικών ιόντων μπορούν να συμβάλλουν προκαρυωτικοί και ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί, όπως μύκητες και κυανοβακτήρια, με δύο τρόπους: α) ενεργητικό (χημική διαδικασία) και / ή β) παθητικό (ως πυρήνες κρυστάλλωσης) τρόπο.

Γενικά, ορυκτά μπορούν να συντεθούν από προκαρυωτικούς οργανισμούς μέσω της επίδρασης των μεταβολικών διαδικασιών και των παραπροϊόντων στο τοπικό φυσικοχημικό περιβάλλον. Η βιολογικώς αυτή επαγόμενη λιθοποίηση ονομάζεται 'BIM': Biologically Induced Mineralization.

Οι προαναφερθέντες μικροοργανισμοί συμβάλλουν στην κατακράτηση του CaCO_3 εξωκυτταρικά μέσω διαφόρων διαδικασιών όπως: **φωτοσύνθεση, απονιτροποίηση, αμμωνιοποίηση, αναγωγή θεικών αλάτων και οξείδωση σουλφιδίων** (Baskar et al. 2005). Τα κυανοβακτήρια όπως αναλύεται και στο Κεφάλαιο (2.2.3), με τη δέσμευση του CO_2 , αυξάνουν τη συγκέντρωση των διττανθρακικών ιόντων τα οποία απελευθερώνονται στο περιβάλλον και μπορούν να προκαλέσουν καθίζηση CaCO_3 , εφόσον ιόντα ασβεστίου (Ca^{2+}) είναι παρόντα (Badger & Price 2003, Barton & Northup 2007). Είναι όμως εμφανές ότι εξ αιτίας της φωτοσυνθετικής τους φύσης τα κυανοβακτήρια και τα φύκη συμβάλλουν στην καθίζηση των ανθρακικών μόνο στην είσοδο ή όπου υπάρχουν ανοίγματα και το φυσικό φως είναι παρόν.

1.6.3. ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑ ΣΠΗΛΑΙΩΝ

1.6.3.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Γενικώς τα σπήλαια θεωρούνται ενδολιθήματα χαμηλού φωτός ή αφωτικά, στα οποία η εισροή θρεπτικών γίνεται από το υπερκείμενο περιβάλλον, ή παράγεται από τους χημειοσυνθετικούς οργανισμούς. Τα «τυπικά σπήλαια» θεωρούνται κλειστά, σταθερά περιβάλλοντα όσον αφορά στη ροή ενέργειας, με τις περιβαλλοντικές παραμέτρους (θερμοκρασία T, σχετική υγρασία RH, και ενεργώς φωτοσυνθετική ακτινοβολία PAR) να είναι σχεδόν σταθερές (Hoffmann 2002). Η παρουσία της φωτοσυνθετικής μικροχλωρίδας είναι αρκετά έως σχεδόν πάντα ορατή ως πράσινες, γαλαζοπράσινες ή σκοτεινόχρωμες καστανές, μαύρες αναπτύξεις επί των τοιχωμάτων των σπηλαίων, του εδάφους, και των σπηλαιοθεμάτων. Η φωτοσυνθετική μικροχλωρίδα αναπτύσσεται όπου υπάρχει διαθέσιμο φως, φυσικό ή τεχνητό, ικανό για την πραγματοποίηση της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης. Επομένως η διάρκεια, η ποιότητα και η ποσότητα της ακτινοβολίας διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξή της.

Με τον όρο «φωτοσυνθετική μικροχλωρίδα» εννοούμε (α) τα προκαρυωτικά κυανοβακτήρια που συνιστούν την επικρατούσα ομάδα (Hoffmann 2002, Smith & Olson 2007) και (β) τα ευκαρυωτικά μικροφύκη όπως χλωροφύκη, διάτομα (Pouličkova & Hašler 2007).

Η μελέτη του οικοσυστήματος του σπηλαίου άρχισε στα τέλη του 19^{ου} αι, στη Βόρεια Αμερική με την εργασία του Call (1897) να αποτελεί την απαρχή της φυτοσπηλαιολογίας στην Αμερικανική ήπειρο. Την ίδια περίπου εποχή (αρχές του 20ου αι.), στην Ευρώπη δημιουργήθηκε ο κλάδος της Βιοσπηλαιολογίας, η οποία ερευνά τη χλωρίδα και την πανίδα των σπηλαίων. Οι εργασίες του Lämmermayr (1912, 1914, 1916, 1918) αποτελούν τις πρώτες μελέτες που ασχολούνται με την σπηλαιοχλωρίδα στην Αυστρία. Ώθηση στη φυκολογική έρευνα των σπηλαίων δόθηκε στη δεκαετία 50-60 με τις εργασίες των Claus (1955, 1962a,b, 1964), Palik (1960a,b), Hajdu (1966) που ερεύνησαν σπήλαια της Ουγγαρίας. Αξιοσημείωτες είναι οι εργασίες των Lefèvre et al. (1964), Lefèvre & Laporte (1969) για τη μικροχλωρίδα του προϊστορικού σπηλαίου Lascaux στη Γαλλία. Μέχρι σήμερα τα σπήλαια και τα υπόγεια οικοσυστήματα έχουν μελετηθεί παγκοσμίως π.χ: Αμερική (Jones 1965, Smith & Olson 2007), Βραζιλία (Sant'Anna et al. 1991), Ισραήλ (Friedmann 1955,1961,1962, Vinogradova et al. 1998), Ουγγαρία (Claus 1964, Hajdu 1966, Komáromy et al. 1985), Γαλλία (Bourelly & Dupuy 1973, Leclerc et al. 1983), Γερμανία (Dobat 1966), Βέλγιο (Garbacki et al. 1999), Ιταλία (Borzi 1917, Skuja 1970, Abdelahad & Bazzichelli 1988), Ρουμανία (Șerbănescu & Decu 1962), Σλοβενία (Mulek & Kosi 2008, Mulek 2008), Κροατία – Σλοβενία (Golubic 1967), Ισπανία (Ariño et al. 1997, Ascencio & Aboal 2000a,b,2011, Martinez & Ascencio 2010, Hernández-Mariné et al. 2001, Roldán et al. 2004). Στην Ελλάδα, παρά τον μεγάλο αριθμό των σπηλαίων, οι έρευνες επί της μικροχλωρίδας των σπηλαίων παραμένουν σχετικά περιορισμένες (Anagnostidis et al. 1982,

Pantazidou 1996,1997, Iliopoulou-Gergoudaki et al. 1993, Pantazidou & Roussomoustakaki 2005, Lamprinou et al. 2009, 2011,2012, Pantazidou et al. 2012).

1.6.3.2. ΣΠΗΛΑΙΟΧΛΩΡΙΔΑ ΚΑΙ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΑ

Ο όρος «σπηλαιοχλωρίδα» (Höhlenflora) εισήχθη για πρώτη φορά από τον Knebel (1906). Μέχρι τότε οι επιστήμονες ακολουθούσαν τη διάρθρωση της σπηλαιοπανίδας σε τρωγλόξενη, τρωγλόφιλη και τρωγλόβια και κατέτασαν τη σπηλαιοχλωρίδα στην τρωγλόφιλη μορφή γιατί τα παρατηρούμενα βακτήρια και φύκη μπορούσαν να αναπτυχθούν και σε περιοχές εκτός των σπηλαίων, όπως σε σχισμές βράχων. Ωστόσο, ο Lämmermayer (1916), κατέταξε κάποια από τα περιδόφυτα και βρυόφυτα των σπηλαίων ως υποχρεωτικά σπηλαιόφυτα - τρωγλόβια. Αν και η διάρθρωση της σπηλαιοχλωρίδας δεν μπορεί να ακολουθήσει τις αρχές που διέπουν την κατηγοριοποίηση της σπηλαιοπανίδας, ο Hoffmann (2002) προτείνει κάποια είδη κυανοβακτηρίων όπως τα *Loriella osteophila* Borzi, *Scytonema julianum* (Meneghini ex Frank) ως σπηλαιόφιλα. Ως υποχρεωτικώς σπηλαιόβια/«τρωγλόβια» κατατάσσει τα εξής είδη: *Geitleria calcarea* Friedmann, *G. floridana* Friedmann, και *Hepryzonema pulverulentum* Hernández-Marine & Canals. Επιπροσθέτως, προτείνει ότι είδη όπως τα *Symphyonema cavernicolum* Asencio, Aboal & Hoffmann, *Spelaeopogon cavarae* Borzi, *Oscillatoria rupicola* var. *cavernarum* Skuja, *Synechococcus sciophilus* Skuja, θα μπορούσαν να καταταγούν στα «τρωγλόβια», αλλά με επιφυλάξεις επειδή τα μέχρι σήμερα δεδομένα είναι ανεπαρκή.

Γενικώς, η διάρθρωση αυτή είναι αμιγώς θεωρητική και οι περισσότερες μελέτες ακολουθούν τον διαχωρισμό της σπηλαιοχλωρίδας σε βλάστηση εισόδου, ενδιάμεσης και εσωτερικής ζώνης, όπου το φως αποτελεί τον περιοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξή της. Ιδιαίτερη μνεία γίνεται για τη λεγόμενη «χλωρίδα των λυχνιών» (lamprenflora), η οποία αναπτύσσεται γύρω απ τις λυχνίες φωτισμού στα τουριστικώς αξιοποιημένα σπήλαια, με πολυάριθμες εργασίες να περιγράφουν τρόπους αντιμετώπισης αυτής (Iliopoulou Gergoudaki et al. 1993, Pantazidou 1996, Mulek and Kosi 2009).

1.6.3.3. ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΑ ΑΝΘΡΑΚΙΚΑ ΠΕΤΡΩΜΑΤΑ

Τα κυανοβακτήρια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες δόμησης και αποδόμησης του κύκλου του άνθρακα.

Ο άνθρακας ως στοιχείο συμμετέχει: α) στον οργανικό κύκλο του άνθρακα μέσω των διαδικασιών της βιοσύνθεσης και της απολιθοποίησης οργανικού υλικού και β) στον κύκλο του ανόργανου άνθρακα γνωστό και ως κύκλο των ανθρακικών. Και οι δύο κύκλοι είναι άρρηκτα συνδεδεμένοι μεταξύ τους στη λιθόσφαιρα, στην ατμόσφαιρα και στην υδρόσφαιρα (Golubic et al. 1979,1981, Schneider & Le Campion-Alsumard 1999). Από γεωλογικής σκοπιάς, δύο μεγαλύτεροι κύκλοι (εξωγενής και ενδογενής) είναι αυτοί που διατηρούν

την ισορροπία των κύκλων του οργανικού και ανόργανου άνθρακα (Απεικόνιση 1.4). Ο εξωγενής κύκλος περιλαμβάνει διαδικασίες όπως διάβρωση, μεταφορά, ιζηματογένεση και αρχική διαγένεση με εξωτερική πηγή ενέργειας όπως τον ήλιο. Αντιθέτως, ο ενδογενής κύκλος περιλαμβάνει διαδικασίες όπως η διαγένεση, ορογένεση, ηπειρογένεση με εσωτερική πηγή ενέργειας τη ροή θερμότητας (Schneider & Le Campion- Alsumard 1999). Ο συνολικός κύκλος του άνθρακα επάγεται από τις φωτοαυτοτροφικές διαδικασίες εδώ και περίπου 3 δις έτη (Schopf & Walter 1982). Στον εξωγενή κύκλο τα κυανοβακτήρια διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο.

Η φωτοσύνθεση και η αναπνοή είναι διαδικασίες που επηρεάζουν τον κύκλο του άνθρακα. Συγκεκριμένα, η αναπνοή αυξάνει τα επίπεδα του CO_2 προκαλώντας μείωση του pH και τον ιόντων CO_3^{2-} προωθώντας την διάλυση των ανθρακικών. Αντιθέτως, η φωτοσύνθεση μειώνει τα επίπεδα του CO_2 και των HCO_3^- προκαλώντας αύξηση του pH και της συγκέντρωσης των ιόντων CO_3^{2-} συμβάλλοντας επομένως στην καθίζηση των ανθρακικών. Τα κυανοβακτήρια δύνανται να χρησιμοποιούν τα CO_2 , HCO_3^- και πιθανώς CO_3^{2-} .



Απεικόνιση 1.4: Άνθρακας και ανθρακικά ιόντα στον εξωγενή και ενδογενή κύκλο του άνθρακα (Golubic et al.1979).

1.6.3.3.1. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΩΝ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΙΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΔΟΜΗΣΗΣ

Η γεωλογική και οικολογική σημασία της αβεστοποίησης από τα κυανοβακτήρια είναι πολύ μεγάλη. Η δόμηση των ανθρακικών από τα κυανοβακτήρια πραγματοποιείται με διάφορους τρόπους.

1. Παγίδευση κόκκων ιζήματος
2. Φωτοσύνθεση
3. Εξωκυτταρική καθίζηση ανθρακικών αλάτων
4. Ενδογενής παραγωγή ανθρακικών ιόντων
5. Μηχανισμός συσσώρευσης άνθρακα (CCM)

1. Κόκκοι ιζήματος ενδέχεται να παγιδευθούν από τα νήματα και από τη βλέννη (Golubic 1973). Συγκεκριμένα παραδείγματα αποτελούν οι κυανοβακτηριακοί τάπητες (cyanobacterial mats), οι στρωματόλιθοι (stromatolites) και οι «λευκάνσεις υδάτων» (whitings). Ως κυανοβακτηριακοί τάπητες αναφέρονται οι στρωματοποιημένες μικροβιακές κοινότητες, οι οποίες αναπτύσσονται σε ιζήματα διαφόρων περιβαλλόντων (Stal 2000). Τα κυανοβακτήρια αποτελούν τους πιο επιτυχημένους οργανισμούς στον σχηματισμό των κυανοβακτηριακών ταπήτων. Αυτό συμβαίνει επειδή είναι οι μόνοι οξυγενείς φωτότροφοι οργανισμοί που χρησιμοποιούν το ατμοσφαιρικό άζωτο N_2 ως πηγή αζώτου και μπορούν να αναπτύσσονται υπό χαμηλή φωτοσυνθετική ακτινοβολία. Επίσης, ορισμένα είδη έχουν ικανότητα αναερόβιας φωτοσύνθεσης ενώ άλλα ικανότητα κίνησης με αποτέλεσμα να τοποθετούνται στις πιο κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης. Με τον όρο «στρωματόλιθοι» (stromatolites) ο Krumbein (1983) αναφέρει τους στρωματοποιημένους βράχους, η προέλευση των οποίων εξαρτάται από την ενεργότητα των μικροβιακών κοινοτήτων, των οποίων η μορφολογία, η φυσιολογία και η θέση τους στον χώρο και στον χρόνο αλληλεπιδρούν με το φυσικό και χημικό περιβάλλον, με αποτέλεσμα την παρατηρούμενη στρωμάτωση. Αυτός ο ορισμός περιλαμβάνει τόσο λιθοποιημένες μορφές όσο και πρόσφατους σχηματισμούς. Ωστόσο, αρτίγονοι στρωματόλιθοι που να ερμηνεύονται με τον συγκεκριμένο ορισμό είναι μάλλον σπάνιοι. Σύμφωνα με τον ορισμό των Awramik & Margulis (βλ. Stal 2000), οι στρωματόλιθοι είναι οργανο-ιζηματογενείς σχηματισμοί που παράγονται από την παγίδευση, δέσμευση ή καθίζηση ιζήματος, ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης και της μεταβολικής ενεργότητας των μικροοργανισμών και κυρίως των κυανοβακτηρίων. Οι μικροβιακοί τάπητες χαρακτηρίζονται από κάθετη στρωματοποίηση οργανισμών που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες. Η στρωμάτωση αυτή είναι αποτέλεσμα της φυσικοχημικής κλίσης που δημιουργείται από τη μεταβολική ενεργότητα των οργανισμών (Jørgensen et al. 1983). Τα κυανοβακτήρια αποτελούν το ανώτερο στρώμα των ταπήτων, οι οποίοι μπορεί να σχηματίζονται σε παράκτιες περιοχές, σε θερμοπηγές αλλά και στη χέρσο όπως στα σπήλαια.

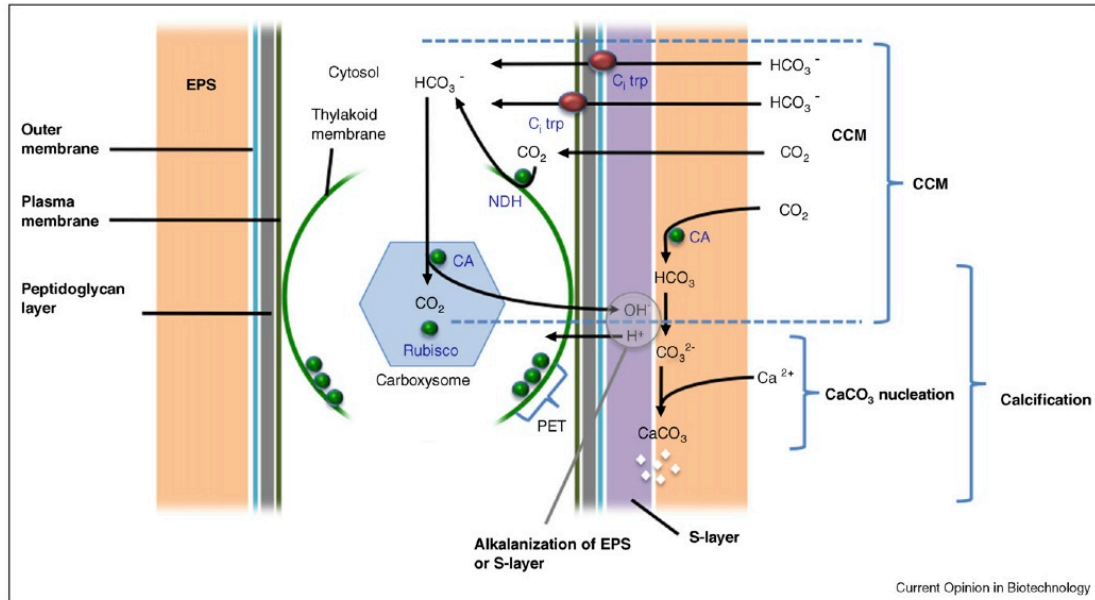
2. Η φωτοσύνθεση, όπως προαναφέρθηκε, αυξάνει το pH και τα επίπεδα του $CaCO_3$ στο πέριξ μικροπεριβάλλον.

3. Ανθρακικά άλατα ενδέχεται να καθιζάνουν εξωκυτταρικά των κυανοβακτηρίων κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης και να ενασβεστώσουν τη θήκη όπως για παράδειγμα σε είδη που απαντώνται συχνά σε σπήλαια π.χ. *Schizothrix* sp., *Geitleria calcarea* και *Scytonema julianum*.

4. Η ικανότητα να παράγουν τα ίδια τα κυανοβακτήρια ανθρακικά αποτελεί τρόπο ασβεστοποίησης όπως επί παραδείγματι στο αποικιακό νηματοειδές *Rivularia haematites*, όπου ανθρακικά σωματίδια εκκρίνονται εξωκυτταρικά και μέσα στην κοινή θήκη (Schneider & Le Campion-Alsumard 1999), ή στο αποικιακό κοκκοειδές είδος *Chlorogloea lithogenes*. Επίσης, ενδιαφέρον παρουσιάζει ο διπτός ρόλος δόμησης και αποδόμησης ανθρακικών που παρατηρείται σε είδη του γένους *Schizothrix*, όπου στο ίδιο άτομο παρατηρούνται ανθρακικές ενασβεστώσεις στο τμήμα του νήματος που αναπτύσσεται έξω από το υπόστρωμα (εξ αιτίας της φωτοσύνθεσης), ενώ το υπόλοιπο τμήμα του διατρυπά το πέτρωμα και διαβιόει ως ευενδολιθικό.

5. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και ο ιδιαίτερος μηχανισμός συσσώρευσης άνθρακα (CCM) (Carbon-Concentrating Mechanism) των κυανοβακτηρίων που συμβαίνει στη θέση του ενζύμου Rubisco και επιτρέπει τον εμπλουτισμό των κυττάρων με ποσό CO_2 1000 φορές περισσότερο από το περιβάλλον μέσο (Απεικόνιση 1.5). Προφανώς διαφορές στον μηχανισμό μεταξύ των ειδών των κυανοβακτηρίων υπάρχουν αλλά ο γενικός, μέχρι σήμερα ελάχιστα γνωστός, μηχανισμός είναι ο εξής: μεταφορά του HCO_3^- με τη βοήθεια συμμεταφορέων HCO_3^-/Na , ή ATP μεταφορασών καθώς και μέσω μέσου διάχυσης CO_2 στο κυτόπλασμα.

Μετατροπή του CO_2 του κυτοπλάσματος σε HCO_3^- μέσω συμπλεγμάτων (complexes) NDPH διϋδρογενάσης. Εν συνεχεία, τα ιόντα HCO_3^- εισέρχονται στο καρβοξύσωμα όπου μετατρέπονται σε CO_2 .

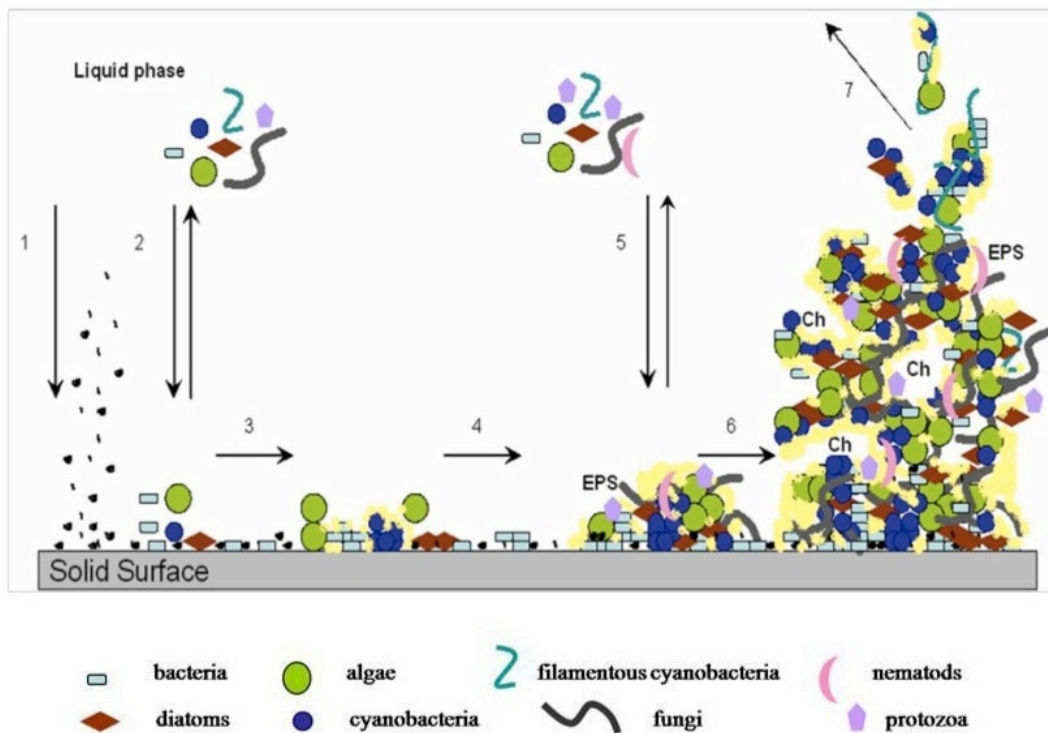


Απεικόνιση 1.5: Πρότυπο μηχανισμού συσσώρευσης άνθρακα και ασβεστοποίησης σε κύτταρο κυανοβακτηρίων (Jansson & Northern 2010).

1.6.3.3.2. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΩΝ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΗΝ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ – ΒΙΟΔΙΑΒΡΩΣΗ

Η φωτοσυνθετική μικροχλωρίδα εποικεί το περιβάλλον του σπηλαίου είτε με μεταφορά κυττάρων από τον αέρα και το νερό, είτε με τη βοήθεια της πανίδας, ή μέσω διασποράς εξ αιτίας της ανθρώπινης παρουσίας (στα τουριστικώς αξιοποιημένα σπήλαια).

Οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί αναπτύσσονται εύκολα στις επιφάνειες του σπηλαίου συνιστώντας του πρωτοπόρους οργανισμούς (pioneers) και εν συνεχεία επιτρέπουν την ανάπτυξη και άλλων πιο σύνθετων βακτηριακών συνεργατικών κοινοτήτων «bacterial consortia» που σχηματίζονται από ετερότροφους οργανισμούς. Η δημιουργούμενη σύνθετη βιοκοινότητα (Απεικόνιση 1.6) αποτελείται από νερό (70 -95%), από εξωκυτταρικά πολυμερή συστατικά (EPS = Exopolymetric Polyssacharide Substances) (Flemming 1993, Wahl 1998, Cuzman 2009) και από τους οργανισμούς α) φωτότροφους (κυανοβακτήρια, μικροφύκη) και β) ετερότροφους (βακτήρια, μύκητες, πρωτόζωα, νηματώδεις), οι οποίοι είναι βυθισμένοι σε αυτή την ένυδρη μήτρα. Τα εξωκυτταρικά πολυμερή συστατικά (γλυκοκάλυκας, θήκη, βλέννη) προστατεύουν τους οργανισμούς έναντι αλλαγών στην υγρασία, θερμοκρασία, οσμωτική πίεση και στο pH. Η ικανότητα των βακτηρίων και των κυανοβακτηρίων να παράγουν EPS εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών. Μάλιστα τα κυανοβακτήρια σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού και ένδειας θρεπτικών, παράγουν περισσότερους πολυσακχαρίτες (Albertano et al. 2003).



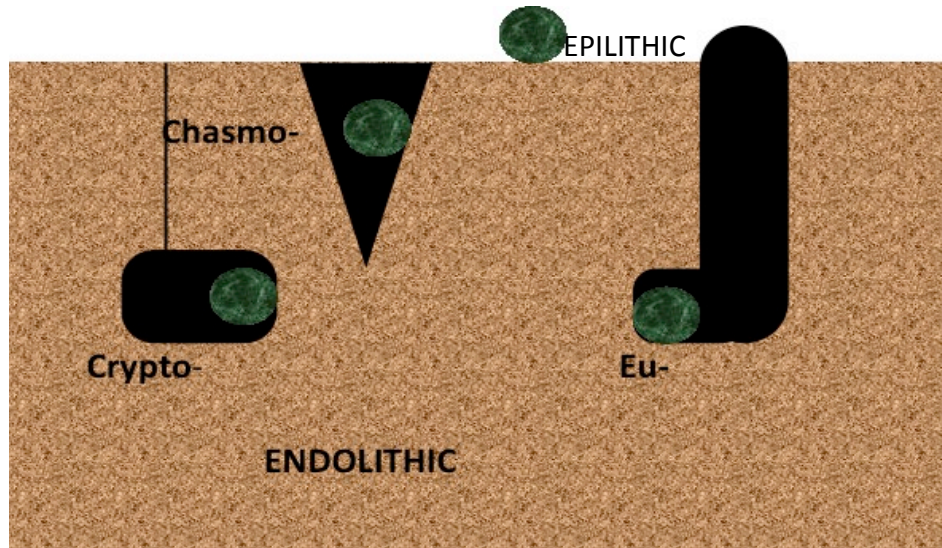
Απεικόνιση 1.6: Ανάπτυξη βιοϋμενίου (Cuzman 2009) (1): Μεταφορά και εγκαθίδρυση οργανικού υλικού (μαύρα στίγματα). (2): Αντιστρεπτή προσκόλληση πρώτων εποικιστών (κοκκοειδή κυανοβακτήρια, βακτήρια, χλωροφύκη, διάτομα). (3): Μετατροπή σε μη αντιστρεπτή προσκόλληση, πολλαπλασιασμός και παραγωγή EPS. (4): Μετατροπή σε βιοϋμένιο τριών διαστάσεων. (5): Δευτερογενείς οργανισμοί (νηματοειδή κυανοβακτήρια και μύκητες). (6): Ώριμο βιοϋμένιο. (7): Φάση της ομοιόστασης σε ισορροπία με την ανάπτυξη του βιοϋμενίου και την αποκόλληση τμήματος αυτού. Νηματώδεις σκώληκες και πρωτόζωα ενδέχεται να προσκολλώνται στο βιοϋμένιο.

Τα βιοϋμένια από τη δημιουργία τους συμμετέχουν στις διαδικασίες διάβρωσης του λίθινου υποστρώματος προκαλώντας όχι μόνο αισθητικό πρόβλημα αλλά και φυσικο-χημικές αλλοιώσεις (Tomaselì et al. 2000). Εκτός από τη χρωματική αλλοίωση που προκαλείται εξ αιτίας των βιογενών χρωστικών, η φωτοσυνθετική μικροχλωρίδα οδηγεί σε αλλαγές των χαρακτηριστικών του πετρώματος, π.χ. παραγωγή ανθρακικού οξέος κατά την αναπνοή (Smith & Olson 2007) με διαβρωτικό ρόλο ιδιαίτερος σε ασβεστολιθικό υπόστρωμα.

Εξέχοντα ρόλο στη βιοδιάβρωση του υποστρώματος διαδραματίζουν τα ενδολιθικά κυανοβακτήρια. Η παρουσία των ενδολιθικών και κυρίως των ευενδολιθικών οργανισμών που εισχωρούν ενεργητικά με μηχανισμούς χημικής διάλυσης σε βάθη λίγων χιλιοστών του

υποστρώματος ενισχύουν την υποβάθμιση και αποσάθρωση του υποστρώματος (Απεικόνιση 1.7).

Ο διαβρωτικός μηχανισμός των επιλιθικών και χασμολιθικών κυανοβακτηρίων καθώς και ο ακριβής μηχανισμός διάνοιξης μικροσηρών από τους ευενδολιθικούς οργανισμούς δεν είναι πλήρως κατανοητός. Το βέβαιο είναι ότι τα κυανοβακτήρια συνιστούν τους πρώτους εποικιστές που διατρύπουν και διεισδύουν στο υπόστρωμα. Τοιουτοτρόπως, προσβάλλουν τη συνοχή και συμβάλλουν στην αποδόμηση του υποστρώματος σε μικρούς κρυστάλλους, με αποτέλεσμα να γίνεται πιο επιδεκτικό στην ανόργανη διάλυση από τη βροχή, το χιόνι, είτε στη μηχανική-βιολογική προσβολή.



Απεικόνιση 1.7: Ανάπτυξη επιλιθικών και ενδολιθικών

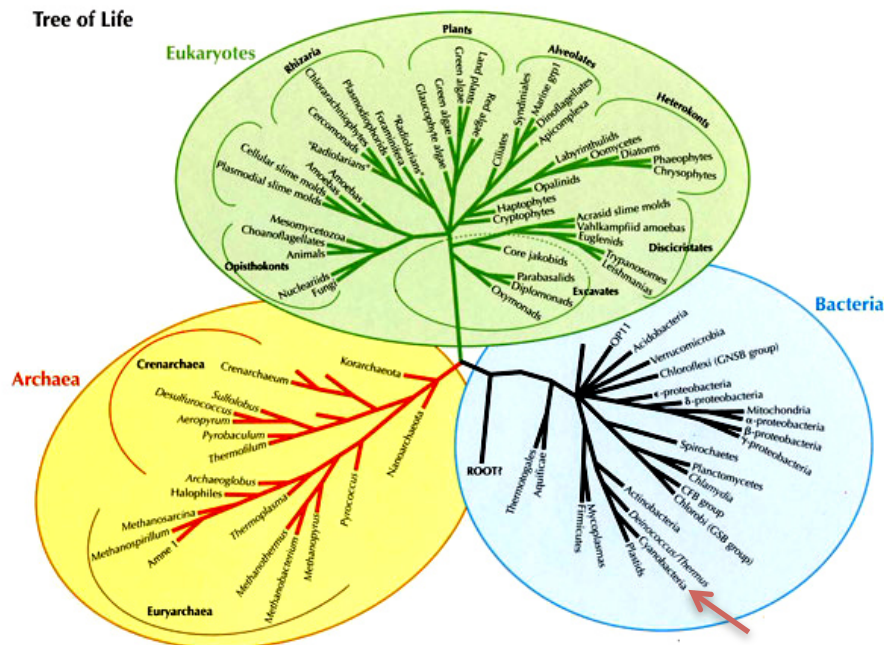
(κρυπτο- χασμο- και ευενδολιθικών) κυανοβακτηρίων (Golubic et al. 1981).

1.7. ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΑ

1.7.1. ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Τα κυανοβακτήρια (Cyanophytes, Cyanoprokaryota, Oxyphotobacteria, Chloroxybacteria, Cyanobacteria) αποτελούν προκαρυωτικούς, φωτοσυνθετικούς, οξυγονοπαραγωγούς οργανισμούς που ανήκουν στην επικράτεια των Βακτηρίων (Bacteria) (Woese et al. 1990) και διαθέτουν ικανότητα σύνθεσης χλωροφύλλης *a* (Απεικόνιση 1.8). Αποτελούν τους πρωτοπόρους φωτοαυτότροφους οργανισμούς στη γεωλογική ιστορία της Γης (Schopf & Walter 1982). Η αύξηση των επιπέδων του οξυγόνου της ατμόσφαιρας πριν από 2.32-2.45 δις έτη οφείλεται σε προγόνους του συγκεκριμένου Φύλου των κυανοβακτηρίων (Schirrmeister et al. 2011).

Ο όρος κυανοφύκη (Cyanophyta - Cyanophyceae) (Geitler 1925,1932) είχε δοθεί αρχικά επειδή υπογράμμιζε τα κοινά χαρακτηριστικά τους με τα φύκη, δηλαδή την ικανότητα για οξυγενή φωτοσύνθεση και την ομοιότητα των κυττάρων τους με τους χλωροπλάστες των ευκαρυωτικών φυκών. Συγκαταλέγονται στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, στους φωτοαυτότροφους προκαρυωτικούς οργανισμούς, ικανούς για οξυγενή φωτοσύνθεση και για δέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου (Κομάρεκ 2006). Αυτά τα βακτήρια έχουν αναφορές απολιθωμένων μορφών από την Προκάμβριο περίοδο και παραμένουν μέχρι και σήμερα μεταξύ των πλέον επιτυχημένων οργανισμών στον πλανήτη Γη.



Απεικόνιση 1.8: Η θέση των Κυανοβακτηρίων στο παγκόσμιο δένδρο ζωής κατά Barton et al. (2007).

1.7.2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΤΟΙΧΩΜΑ - ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ

Το τοίχωμα των κυανοβακτηρίων παρουσιάζει την τυπική δομή του τοιχώματος των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων.

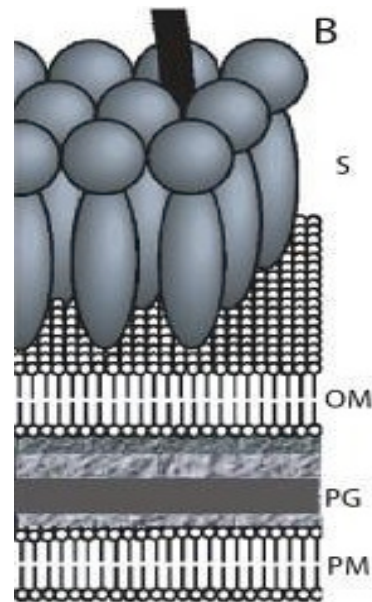
Άνωθεν της εξωτερικής μεμβράνης υπάρχει η λεγόμενη S-στιβάδα (S-layer). Οι S-στιβάδες αυτές στα Βακτήρια και στα Αρχαία είναι παρακρυσταλλικές δομές πρωτεϊνικών υλικών που συμβάλλουν στην προστασία, στη διατήρηση της ακεραιότητας του κυττάρου, στην επικοινωνία του με το περιβάλλον, καθώς και στην προσκόλληση (Liberton & Pakrasi 2008). Ωστόσο, οι S-στιβάδες δεν παρατηρούνται σε όλα τα κυανοβακτήρια (Šmarda et al. 2002).

Η εξωτερική μεμβράνη (OM) στα κυανοβακτήρια περιέχει λιποπολυσακχαρίτες και άλλους πολυσακχαρίτες, οι οποίοι προστατεύουν το κύτταρο, καθώς και πρωτεΐνες.

Η πλασματική μεμβράνη (PM) εκτός από κάποιες πρωτεΐνες του συμπλέγματος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά τη φωτοσύνθεση, περιέχει και άλλες όπως η συνθετάση του ATP, συστατικά της αναπνευστικής αλυσίδας καθώς και άλλους πρωτεϊνικούς μεταφορείς.

Εκτός από την τυπική δομή του κυτταρικού φακέλου των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (πλασματική μεμβράνη, περιπλασματικός χώρος και εξωτερική μεμβράνη), τα κυανοβακτήρια φέρουν ένα εσωτερικό σύστημα θυλακοειδών μεμβρανών στο οποίο λαμβάνουν χώρα οι αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά τη φωτοσύνθεση και κατά την αναπνοή (Liberton & Pakrasi 2008).

Οι θυλακοειδείς μεμβράνες στα κυανοβακτήρια είναι οι καλύτερα χαρακτηρισμένες μεμβράνες μέχρι σήμερα. Είναι διευθετημένες κατά στρώσεις, συνήθως 3-8 διπλοστιβάδων. Στην κυτοπλασματική πλευρά των θυλακοειδών μεμβρανών ανευρίσκονται τα φυκοβιλιώματα, δηλ. το σύμπλεγμα των φυκοβιλιπρωτεϊνών (Απεικόνιση 1.11) που συμμετέχουν στη συλλογή φωτός και σχετίζονται με το φωτοσύστημα II. Η διευθέτηση των θυλακοειδών μεμβρανών στα κυανοβακτήρια έχει εξετασθεί εκτενώς στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ταξινόμηση όπως θα φανεί και παρακάτω.



Απεικόνιση 1.9: Σχηματικό διάγραμμα κάθετης τομής της μεμβράνης των κυανοβακτηρίων. S: S-στιβάδα, OM: εξωτερική μεμβράνη, PG: στρώση πεπτιδογλυκάνης, PM: πλασματική μεμβράνη (Liberton & Pakrasi 2008).

1.7.3. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ

Οι δομές του κυτοπλάσματος των φωτοσυνθετικών κυανοβακτηρίων φαίνονται ευκολότερα με τη χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης (TEM). Τα προκαρυωτικά ριβοσώματα είναι αυτά που κατέχουν εξέχουσα θέση και είναι πολυάριθμα. Μεταξύ των πλέον ευδιάκριτων δομών είναι τα θυλακοειδή (thylakoids), τα καρβοξυσώματα (carboxysomes), και αρκετοί τύποι αποθησαυριστικών σωματιδίων. Τα θυλακοειδή αποτελούν τις φωτοσυνθετικές μεμβράνες, με τα φυκοβιλισώματα να περιέχουν επικουρικές φωτοσυνθετικές χρωστικές που αναλύονται στο Κεφάλαιο (1.7.5).

Τα καρβοξυσώματα είναι πολυγωνικές συναθροίσεις του ενζύμου rubisco, υπεύθυνα για τη δέσμευση άνθρακα. Εμφανίζονται ως πολυεδρικά σωματίδια διαμέτρου 200 – 300nm. Το ποσοστό του πρωτοπλάσματος που καταλαμβάνεται από τα καρβοξυσώματα αυξάνει όταν στο μέσο ανάπτυξης μειώνεται ο ανόργανος άνθρακας (Van Den Hoek et al. 1995).

Τα κοκκία κυανοφυκίνης είναι αποθησαυριστικά σωματίδια πολυμερών ασπαραγίνης και αργινίνης που χρησιμεύουν ως αποθήκες αζώτου. Αν και αρχικά υπήρχε η άποψη ότι είναι παρόντα σε όλα τα κύτταρα των κυανοβακτηρίων (Shively 1974) έχει αποδειχθεί ότι σε ορισμένα είδη απουσιάζουν (Allen 1984). Έχουν την τάση να συσσωρεύονται κοντά στα εγκάρσια τοιχώματα των αποικιακών ή νηματοειδών μορφών ή μεταξύ του κεντροπλάσματος και του χρωμοπλάσματος και έχουν διάμετρο μέχρι 0,5μm.

Τα σωματίδια του κυανοβακτηριακού αμύλου (cyanophycean starch) συνιστούν αποθήκες υδατανθράκων α-1,4- συνδεδεμένες πολυγλυκάνες παρόμοιες με την αμυλόζη των ανώτερων φυτών. Απαντώνται ως μικρά κοκκία, διαστάσεων 30nm × 65nm, μεταξύ των θυλακοειδών, μη ορατών στο φωτονικό μικροσκόπιο (Van Den Hoek et al. 1995).

Τα ανόργανα φωσφορικά ιόντα αποθηκεύονται ως πολυφωσφορικά, τα οποία παρατηρούμενα στο TEM εμφανίζονται ως μικρά σφαιρίδια διαμέτρου 0,5-2μm, ύστερα από χρώση με μπλέ της τολουϊδίνης.

Τέλος, τα κύτταρα των πλαγκτικών κυανοβακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων αυτών που συμμετέχουν στις λεγόμενες κυανοβακτηριακές ανθίσεις, περιλαμβάνουν έναν μεγάλο αριθμό δομών γνωστών υπό τον όρο «κυστίδια αερίων» (gas-vesicles). Αυτά έχουν ποικίλο σχήμα και μέγεθος και υπό το μικροσκόπιο παρουσιάζουν ποικίλο χρωματισμό, από άχρωμο έως μελανό ή ερυθρό. Η λεπτή δομή των κυστιδίων αερίων έχει μελετηθεί σε πολλά είδη διαφόρων γενών (Rippka et al. 1979, Walsby & Booker 1980, Gantt et al. 1979). Τα αεροκυστίδια προσδίδουν κάθετη κινητικότητα στην υδάτινη στήλη, βοηθώντας στην πλευστότητα και στην εκμετάλλευση του διαθέσιμου φωτός.

1.7.4. ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΑ - ΛΙΠΟΕΙΔΗ

Τα λιποειδή μαζί με τις πρωτεΐνες και τους υδατάνθρακες αποτελούν τα κύρια δομικά συστατικά των ζωντανών κυττάρων. Συνιστούν φυσικές ενώσεις και έχουν ως κύριο χαρακτηριστικό τη διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες (π.χ. χλωροφόρμιο, πετρελαϊκός αιθέρας, διαιθυλαιθέρας) ενώ στην πλειοψηφία τους είναι αδιάλυτα στο νερό. Σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες και τους υδατάνθρακες, συνιστούν μία πολύ ετερογενή ομάδα και δύσκολα ταξινομούνται. Ο πιο αποδεκτός και ικανοποιητικός σήμερα τρόπος ταξινόμησης είναι αυτός που τα διαχωρίζει με βάση τη δομή του σκελετού τους ('backbone') και διακρίνονται σε:

1) Απλά λιποειδή ή ουδέτερα

- Μη σαπωνοποιήσιμες ενώσεις (π.χ. υδρογονάνθρακες, αλκοόλες, λιπαρά οξέα)
- Απλοί εστέρες (τριγλυκερίδια, κηροί, εστέρες κτλ.)

2) Σύνθετα λιποειδή ή πολικά

- Φωσfolιποειδή
- Γλυκολιποειδή



Απεικόνιση 1.10: Κατάταξη των λιποειδών (Δημόπουλος & Αντωνοπούλου 2000).

Είναι γνωστόν ότι συγκεκριμένα λιποειδή αναστέλλουν την ανάπτυξη ή

θανατώνουν βακτήρια, μύκητες και ιούς. Μέχρι σήμερα έχει μελετηθεί ένα μεγάλο εύρος λιποειδών και έχει ανακαλυφθεί η τεράστια χημική τους ποικιλότητα καθώς και η μεγάλου εύρους αποδοτικότητα αυτών ως αντιμικροβιακών παραγόντων. Ο ακριβής τρόπος αντιμικροβιακής δράσης δεν έχει επί του παρόντος πλήρως αποσαφηνιστεί εξ αιτίας της έλλειψης μελετών συσχέτισης της χημικής δομής των λιπιδίων και της αντιβακτηριακής ιδιότητάς τους. Ωστόσο, δύο πιθανοί μοριακοί μηχανισμοί δράσης υπάρχουν: α) η εξειδικευμένη αντίδραση σε συγκεκριμένες περιοχές του μικροοργανισμού που επηρεάζουν τις βιοχημικές λειτουργίες και β) η γενική μη εξειδικευμένη αντίδραση που διαταράσσει τη δομή του μικροοργανισμού παρεμποδίζοντας φυσιολογικές λειτουργίες (Quinn 2010).

Τα λιποειδή των κυανοβακτηρίων είναι κυρίως εστέρες γλυκερόλης και εστέρες λιπαρών οξέων (κορεσμένων ή ακόρεστων) (Singh et al. 2002). Στα κυανοβακτήρια τα λιποειδή ανευρίσκονται στις μεμβράνες. Η πλασματική μεμβράνη και τα θυλακοειδή περιέχουν γλυκερογλυκολιποειδή και φωσφατιδυλογλυκερόλες ενώ η εξωτερική μεμβράνη περιέχει λιποπολυσακχαρίτες και υδατάνθρακες σε συνδυασμό με γλυκερολιποειδή (Murata & Nishida 1987). Τα τριγλυκερίδια είναι τα πιο κοινά αποθηκευτικά λιποειδή και μπορούν να συνιστούν έως και το 80% των ολικών λιποειδών στα κυανοβακτήρια (Singh et al. 2002). Οι Murata & Nishida (1987) ανέφεραν την ύπαρξη 4 κύριων κατηγοριών γλυκερολιπιδίων από κυανοβακτήρια: 1) μονογαλακτοζυλο-διακυλογλυκερόλη (MGDG), 2) διγαλακτοζυλο-διακυλογλυκερόλη (DGDG), 3) σουλφοανάλογα των δυγλυκεριδίων (SQDG) και 4) φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG) καθώς και μικρά ποσοστά μονογλυκοσιλ-διακυλογλυκερόλης (GlcDG). Ωστόσο, στη συνέχεια ανακαλύφθηκαν και άλλων τύπων πολικά λιποειδή από κυανοβακτήρια όπως μη φωσφορικά βεταϊνικά λιποειδή φωσφατιδυλοχολίνη (PC) στο είδος *Scytonema julianum* από σπήλαια (Antonopoulou et al. 2002) και N,N,N – trimethylomoserin-4O-yldiacylglycerol (DGTS) σε μορφότυπο του γένους *Chroococcidiopsis* (Rezanka et al. 2003). Επίσης, λυσογλυκερολιποειδή απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν από ολικά λιποειδή του στελέχους *Senecocystis* sp. PCC 6803 (Kim et al. 1999) και γλυκολιποειδή με σκελετό σφιγγοσίνης ή φωσφατιδυλογλυκερόλης βρέθηκαν στο είδος *Scytonema julianum* από σπήλαια (Antonopoulou et al. 2002, 2005a). Υπογραμμίζεται δε ότι ο σκελετός του κηραμιδίου είναι ιδιαίτερα διαδεδομένος στα λιποειδή των κυανοβακτηρίων (Antonopoulou et al. 2002). Οι κατηγορίες των λιποειδών μπορούν να ταυτοποιηθούν με τη βοήθεια των τιμών Rf στην χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (TLC) καθώς και με πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό ($^1\text{H-NMR}$, $^{14}\text{C-NMR}$) (Singh et al. 2002,2011).

Τα λιποειδή ορισμένων κυανοβακτηρίων είναι πλούσια σε βασικά λιπαρά οξέα (fatty acids) όπως C18 λινολεϊκό (18:2ω6), α-λινολενικό (18:3ω3), καθώς και C₂₀ παράγωγα εικοσαπεντανοειδή λιπαρά οξέα (20:5ω3) και αραχιδονικό οξύ (20:4ω6) (Othes & Pire 2001, Singh et al. 2002, Ramadan et al. 2008). Αυτά τα λιπαρά οξέα συνιστούν βασικά συστατικά του διαιτολογίου του ανθρώπου και των ζώων και χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα τροφίμων (Borowitzka 1988).

Η σύνθεση των λιπαρών οξέων έχει χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο ταξινόμησης των βακτηρίων σε επίπεδο οικογένειας, γένους και είδους (Gugger et al. 2002). Με βάση τη σύνθεση των λιπαρών οξέων των κυανοβακτηρίων οι Kenyon et al. (1972) πρότειναν τον διαχωρισμό των κυανοβακτηρίων σε 4 ομάδες, διάκριση που επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια από τους Murata et al. (1992). Αργότερα οι Cohen et al. (1995) εισήγαγαν μία πέμπτη ομάδα που τοποθετείται ανάμεσα στην 1-2 του προηγούμενου συστήματος Kenyon-Murata.

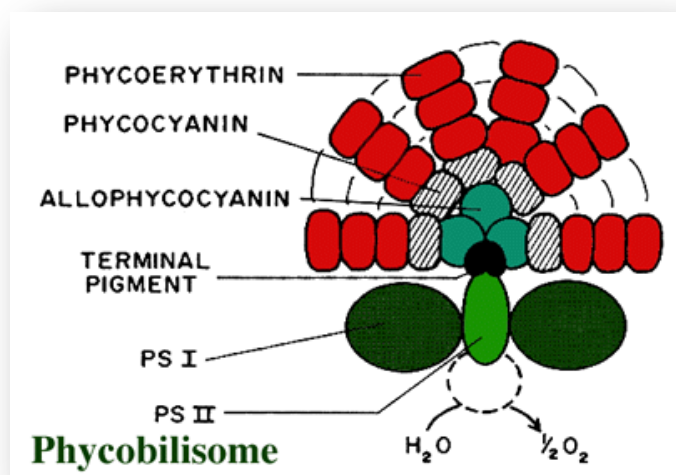
Η σύνθεση των λιπαρών οξέων κυανοβακτηριακών στελεχών, έχει προταθεί από πολλούς όπως από τους Gugger et al. (2002), ως μέθοδος ταξινόμησης - χημειοταξινομικής, πολύ

χρήσιμη σε συνδυασμό με τις υπόλοιπες μεθόδους ταξινόμησης (Κεφάλαιο 2), ακόμα και σε επίπεδο είδους (Li et al. 1998).

1.7.5. ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ ΣΤΑ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΑ

Κατά τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης τα κυανοβακτήρια οξειδώνουν το H_2O με τη χρήση αμφοτέρων των φωτοσυστημάτων (PSI, PSII), αλλά υπό αναερόβιες συνθήκες είναι ικανά να χρησιμοποιούν μόνο το φωτοσύστημα I όπως τα προφυρά βακτήρια (purple bacteria). Αν και η φωτοαυτοτροφία είναι ο κυριότερος και συνηθέστερος τρόπος διατροφής μερικά είδη παρουσιάζουν και φωτοετεροτροφία χρησιμοποιώντας τη γλυκόζη ως πηγή άνθρακα και ενέργειας σε συνθήκες σκότους (Fay 1965, Padan & Cohen 1982, Cohen et al. 1986, Garcia-Pichel & Castenholz 1991).

Η βασική τους φωτοσυνθετική χρωστική όπως προαναφέρθηκε είναι η χλωροφύλλη *a* καθώς και οι φυκοβιλιρωτεΐνες (υδατοδιαλυτές χρωμοπρωτεΐνες), οι οποίες ανευρίσκονται στα φυκοβιλισώματα, στην εξωτερική πλευρά των θυλακοειδών μεμβρανών. Η χλωροφύλλη *a* δεν απορροφά σε όλο το μήκος φάσματος αλλά στα 430-440nm και στα 670nm. Με τις πρωτεΐνες των φυκοβιλισωμάτων οι οργανισμοί επιτυγχάνουν να καλύψουν όλο το μήκος φάσματος (DeRuyter & Fromme 2008). Πέρα από τη χλωροφύλλη *a* έχει αναφερθεί και η χλωροφύλλη *d* ως κύρια χρωστική στο είδος *Acaryochloris marina*, ένα κυανοβακτήριο το οποίο διαθέτει πολύ λίγη χλωροφύλλη *a* και στερείται φυκοβιλισωμάτων και χρωστικών φυκοβιλίνης (Graham et al. 2009). Επίσης, χλωροφύλλη *b* απαντάται στα γένη *Prochloron*, *Prochlorococcus* και *Prochlorothrix* των κυανοβακτηρίων. Η χλωροφύλλη *b* διευρύνει την εμβέλεια φωτός που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη φωτοσύνθεση και μεταφέρει την απορροφηθείσα φωτεινή ενέργεια στο κέντρο της χλωροφύλλης *a*.

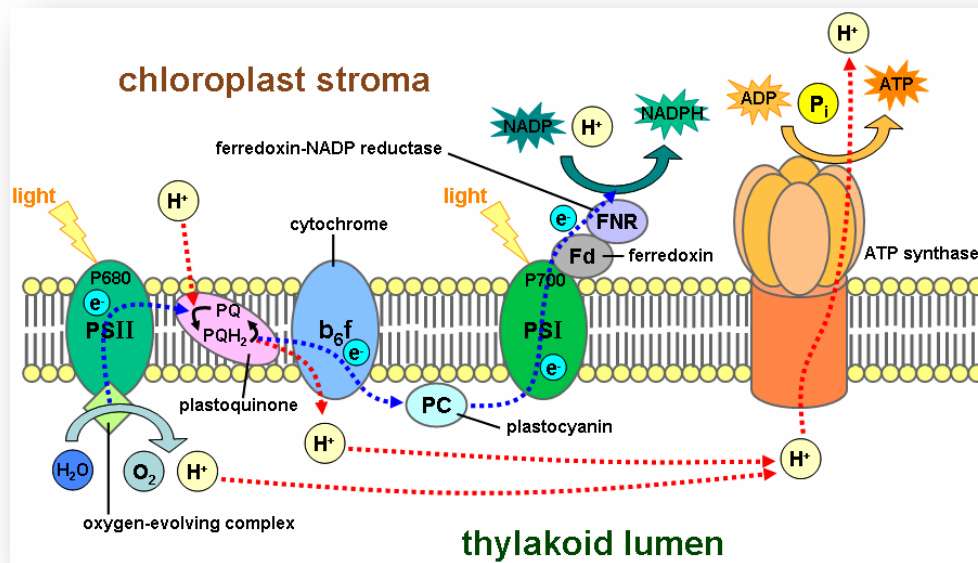


Απεικόνιση 1.11: Η δομή των φυκοβιλισωμάτων.

Τα προαναφερθέντα φυκοβιλισώματα φέρουν τις πρωτεΐνες φυκοερυθρίνη, φυκοκυανίνη, αλλοφυκοκυανίνη και φυκοερυθροκυανίνη και έχουν χαρακτηριστική δομή (Απεικόνιση 1. 11).

Η φυκοερυθρίνη και η φυκοερυθροκυανίνη απουσιάζουν από ορισμένα είδη. Είναι γνωστόν ότι οι φυκοβιλιπρωτεΐνες αλλάζουν συγκέντρωση σε συνάρτηση με την ποιότητα του φωτός και με τις συνθήκες ανάπτυξης (Lee 2008).

Σημειωτέον δε, ότι υπό αερόβιες συνθήκες, ηλεκτρόνια από το φωτοσύστημα II ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$) παρέχονται στο Φωτοσύστημα I, ενώ υπό αναερόβιες συνθήκες και παρουσία θείου τα ηλεκτρόνια προέρχονται από την αναγωγή του θείου ($\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{CH}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{S}$).



Απεικόνιση 1.12. Σχηματικά η διαδικασία της φωτοσύνθεσης στα κυανοβακτήρια (Bryant 1995).

1.7.6. ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΑΖΩΤΟΥ

Τα κυανοβακτήρια είναι από τους λίγους διαζωτροφικούς οργανισμούς, δηλαδή είναι ικανά να δεσμεύουν το μοριακό ατμοσφαιρικό άζωτο και να το μετατρέπουν σε αμμωνία. Η αμμωνία μπορεί εν συνεχεία να αφομοιωθεί προς σχηματισμό αμινοξέων, πρωτεϊνών και άλλων αζωτούχων συστατικών του κυττάρου. Η ικανότητα των κυανοβακτηρίων να δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο τα καθιστά ανταγωνιστικά σε ακραία ενδιαιτήματα (Houssman et al. 2006) και σε ενδιαιτήματα φτωχά σε άζωτο όπως τα σπήλαια (Asencio & Aboal 2011).

Η δέσμευση του αζώτου είναι μια επαγώγιμη διαδικασία, η οποία εξαρτάται από τα περιβαλλοντικά επίπεδα αμμωνίου (NH_4^+) ή νιτρικών αλάτων (NO_3^-). Η δέσμευση του αζώτου γίνεται με τη βοήθεια του ενζύμου της νιτρογενάσης (σιδηρούχου πρωτεΐνης, ευαίσθητης στο περιβαλλοντικό οξυγόνο). Τα κυανοβακτήρια που δημιουργούν ετερόκυτα θεωρούνται ικανά για αζωτοδέσμευση αφού τα παχειά τους τοιχώματα προστατεύουν την νιτρογενάση από τη διάχυση του περιβαλλοντικού οξυγόνου. Επίσης, τα ετερόκυτα έχουν χάσει την ικανότητα οξυγενοφωτοσύνθεσης και δέσμευσης του CO_2 αλλά διατηρούν το φωτοσύστημα I (Stal 2007) προστατεύοντας τοιχοτρόπως τη νιτρογενάση. Ετεροκυτώδη κυανοβακτήρια είναι γνωστά από υδατικά ενδιαιτήματα τόσο γλυκών όσο και θαλάσσιων υδάτων αλλά και από χερσαία ενδιαιτήματα. Ορισμένα μη ετεροκυτώδη κυανοβακτήρια εκφράζουν την νιτρογενάση υπό αναερόβιες συνθήκες όταν η οξυγενής φωτοσύνθεση παρεμποδίζεται ενώ υπάρχουν και ορισμένα κοκκοειδή κυανοβακτήρια τα οποία δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο κατά τη διάρκεια της νύχτας όταν δεν πραγματοποιείται φωτοσύνθεση (Bergman et al. 1997, Stal 2007).

1.7.7. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ – ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΤΩΝ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Τα κυανοβακτήρια έχουν την ικανότητα εποίκισης σχεδόν σε όλους τους τύπους ενδιαιτημάτων της βιόσφαιρας από την πρώιμη Προκάμβριο εποχή μέχρι και σήμερα (Schopf 1993, Komárek & Anagnostidis 2005). Απαντώνται ευρέως στη φύση, σε χερσαία, θαλάσσια και γλυκών υδάτων ενδιαιτήματα. Επίσης, επιβιώνουν και αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα με ακραίες τιμές θερμοκρασίας, σχετικής υγρασίας, ξηρασίας, αλατότητας καθώς και έντονης ακτινοβολίας (UV). Στις ερήμους όπου το έδαφος δέχεται υψηλή ηλιακή ακτινοβολία, τα κυανοβακτήρια δημιουργούν εκτεταμένους επιφανειακούς επιπάγους, παραμένοντας σε λήθαργο τους περισσότερους μήνες του έτους και αναπτυσσόμενα μόνο κατά τη διάρκεια των σύντομων χειμερινών ή εαρινών βροχοπτώσεων (Brock 1973). Πολλά είδη διαβιούν στην επιφάνεια των πετρωμάτων ενώ άλλα είδη, όπως αναφέρθηκε, έχουν την ικανότητα διαβίωσης μέσα στο πέτρωμα (ως ενδολιθικά).

Η διαφοροποίηση των κυανοβακτηρίων κατά τη διάρκεια της μακροχρόνιας ύπαρξής τους, από την Προκάμβριο περίοδο μέχρι σήμερα, οφείλεται στις πλούσιες στρατηγικές ειδογένεσης.

Διαδικασίες όπως ο εγκλιματισμός (acclimation) και η προσαρμογή (adaptation), οι οποίες οδηγούν στην ειδογένεση φαίνεται να είναι αρκετά ταχείες στα κυανοβακτήρια (Komárek & Kaštovský 2003). Η εξέλιξη των κυανοβακτηρίων είναι διαρκής και ταχεία ώστε να προσαρμόζονται στις εκάστοτε αλλαγές του περιβάλλοντος, με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται νέοι γονότυποι και μορφότυποι, οικολογικά οριοθετημένοι (Komárek & Anagnostidis 2005).

Σε μορφολογικώς διακριτά και ευκρινή taxa η οικολογική εξειδίκευση είναι εύκολο να αναγνωριστεί. Αντιθέτως, η οικολογική ταυτότητα είναι δύσκολη σε μορφές μορφολογικά «απλές» που δεν μπορούν εύκολα να προσδιοριστούν σε επίπεδο είδους, όπως οι περισσότεροι αντιπρόσωποι των απλών νηματοειδών κυανοβακτηρίων (Oscillatoriales). Η οικολογική ποικιλότητα καθώς και η εξειδίκευση δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστή αλλά και ούτε πλήρως αποδεκτή. Η οικολογία των κυανοβακτηριακών ειδών υποεκτιμήθηκε στις μεγαλύτερες μονογραφίες (Nägeli 1849, Thuret 1875, Bornet-Flauhault 1885, Gomont 1892, Lemmerman 1907-1910, Elenkin 1936,1949, Geitler 1932, Desikachary 1959 κ.α.) καθώς θεωρούσαν δεδομένη την κοσμοπολιτική φύση των κυανοβακτηρίων (Komárek & Anagnostidis 2005). Η ακολουθία γονοτύπων από οικολογικώς διακριτά ενδιαίτηματα καθώς και οι μοριακές διαφορές ειδών που είναι μορφολογικώς όμοια αλλά γεωγραφικώς απομονωμένα (Rudi et al. 1998), αποδεικνύει το μεγάλο εύρος των οικολογικώς οριοθετημένων οικοτύπων στη φύση. Στους μέχρι σήμερα αποδεδειγμένους και ταυτοποιημένους γονοτύπους υπάρχουν σταθεροί μορφότυποι και οικοτύποι που συνδέονται με συγκεκριμένες οικολογικές συνθήκες. Σύμφωνα με τους Komárek & Anagnostidis (2005), η οικολογική εξειδίκευση έχει αποδειχθεί για όλα τα είδη κυανοβακτηρίων και γενικά δεν υπάρχει κάποιο είδος κυριολεκτικά πανταχού παρόν αν και προφανώς υπάρχουν είδη με ευρείες οικολογικές απαιτήσεις καθώς και με ευρείες περιοχές εξάπλωσης. «Κοσμοπολιτικά» είδη υπάρχουν στις περιπτώσεις όπου το συγκεκριμένο ενδιαίτημα με τις ειδικές οικολογικές συνθήκες είναι ευρέως διαδεδομένο στον πλανήτη. Η γεωγραφική επομένως εξάπλωση των διαφόρων ταξινομικών μονάδων των κυανοβακτηρίων εξαρτάται από την εξάπλωση των οικολογικών συνθηκών στις οποίες η ταξινομική μονάδα είναι προσαρμοσμένη.

1.7.8. ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Μεταξύ των προκαρυωτικών φωτοσυνθετικών κυττάρων, τα κυανοβακτήρια αποτελούν το παλαιότερο και το πιο πολύπλοκο από άποψη μορφολογίας Φύλο στη Γη. Η ικανότητα των κυανοβακτηρίων να χρησιμοποιούν το νερό ως δότη ηλεκτρονίων στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης, απελευθέρωσε την πρωτογενή παραγωγή από την πρότερη εξάρτηση αφθονίας εναλλακτικών πηγών ηλεκτρονίων όπως το H_2S , H_2 και Fe^{+2} (Karecha et al. 2005, Knoll 2008). Επίσης, η ικανότητα να συνδυάζουν την πρωτογενή παραγωγή με τη δέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου αύξησε τη βιολογική ενεργότητα στους ωκεανούς. Αυτό σε συνδυασμό

με την παραγωγή οξυγόνου μετέτρεψε τα περιβάλλοντα, με αποτέλεσμα να δημιουργηθούν νέες φυσιολογικές και μορφολογικές στρατηγικές.

Η αύξηση των επιπέδων οξυγόνου στην ατμόσφαιρα του πλανήτη πριν από 2,32-2,45 δις έτη οφείλεται στη φωτοσυνθετική ενεργότητα προγόνων αυτού του Φύλου που αναφέρεται ως «Μεγάλο Οξυγονωτικό Συμβάν» (Great Oxygenation Event). Αναφορές απολιθωμένων μορφών κυανοβακτηρίων έχουν καλώς τεκμηριωθεί και αναφέρονται από στρωματόλιθους 2 δις ετών (Shirrmeister et al. 2011).

Η εξέλιξη των κυανοβακτηρίων είναι μια διαρκής και συνεχής διαδικασία. Βασίζεται κατά κύριο λόγο στην οριζόντια μεταφορά νουκλεϊκού οξέος (DNA) μεταξύ των κυανοβακτηριακών στελεχών καθώς και των κυανοβακτηριακών πληθυσμών (Komárek 2006), η οποία συνδυάζεται με την ταχεία ικανότητα προσαρμογής. Η ικανότητα των κυανοβακτηρίων για άμεση προσαρμογή στην εκάστοτε περιβαλλοντική πίεση έχει ως αποτέλεσμα έναν αυξημένο αριθμό οικολογικά εξειδικευμένων γονοτύπων και μορφοτύπων (Komárek 2006).

1.8. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

1.8.1. ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ ΣΤΑ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΑ

Για την κατανόηση και καταγραφή της βιοποικιλότητας είναι απαραίτητο να προσδιορισθεί η έννοια του κυανοβακτηριακού είδους, ένας όρος που ακόμα και σήμερα αποτελεί πεδίο διαμάχης και συζητήσεων. Η έννοια του «είδους» μπορεί να προσεγγιστεί είτε μορφολογικά είτε μοριακά, είτε οικολογικά, ή πολυφασικά (σύνολα χαρακτήρων).

Το «**βιολογικό**» είδος διατυπώθηκε από τον Mayr (1942) ως ακολούθως: «είδος είναι ομάδα πληθυσμών που διασταυρώνονται ή δύνανται να διασταυρωθούν και η οποία είναι βιολογικώς απομονωμένη από άλλες τέτοιες ομάδες». Είναι φανερό ότι αυτός ο ορισμός δεν μπορεί να εφαρμοσθεί για τα κυανοβακτήρια, τα οποία ως προκαρυωτικοί οργανισμοί αναπαράγονται αγενώς.

Το «**φαινοτυπικό**» είδος ορίζεται ως η μικρότερη ομάδα που είναι διαρκώς διακριτή με συνηθισμένα μέσα μικροσκοπικής παρατήρησης (Johansen & Casamatta 2005).

Οι Castenholz & Waterbury (1989) πρότειναν για τον χαρακτηρισμό του είδους στα κυανοβακτήρια, την **πολυφασική** προσέγγιση με τη χρήση πολλών χαρακτήρων (μορφολογία, DNA-DNA υβριδοποίηση, δεδομένα 16S rRNA, %GC, δεδομένα υπερδομής, φυσιολογικοί χαρακτήρες κ.α.).

Το «**προκαρυωτικό**» είδος κατά τους Colwell et al. (1995) συνιστά μία ομάδα στελεχών που παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ομοιότητας εν συγκρίσει με άλλες ομάδες στελεχών. Η ειδική Επιτροπή επί των Βακτηριακών Συστημάτων (Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systems, Wayne et al. 1987) πρότεινε δεδομένα DNA-DNA υβριδοποίησης για προσδιορισμό του προκαρυωτικού είδους. Συγκεκριμένα πρότειναν ότι: «η φυλογενετική έννοια του είδους περιλαμβάνει στελέχη που εμφανίζουν 70% ή μεγαλύτερη ομοιότητα DNA-DNA και $\leq 5^{\circ}\text{C}$ (θερμοκρασία αποδιάταξης DNA) ΔT_m . Αμφότερες οι τιμές θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη. Οι Stackerbandt & Goebel (1994) συνέκριναν την ομοιότητα DNA-DNA με την ομοιότητα που προκύπτει από την αλληλούχηση του 16S rRNA. Διαπίστωσαν ότι είδη που παρουσίαζαν >70% ομοιότητα DNA πάντα είχαν >97,5% ομοιότητα στην αλληλούχηση του 16S rRNA. Εάν η ομοιότητα κατά την αλληλούχηση του 16S rRNA είναι <97,5% υπάρχει σοβαρή ένδειξη ότι η συσχέτιση DNA-DNA είναι <70% , και επομένως τα συγκρινόμενα στελέχη αναγνωρίζονται ως διαφορετικά είδη. Ωστόσο αυτό δεν είναι πάντοτε απόλυτο αφού ένας αριθμός στελεχών έχουν 99% ομοιότητα στις 16S rRNA αλληλουχίες τους αλλά έχουν <50% συσχέτιση DNA-DNA. Είναι όμως κοινά παραδεκτό ότι η ομοιότητα στην αλληλουχία 16SrRNA <97,5% αποτελεί σχετικά επαρκή απόδειξη ξεχωριστής εξελικτικής ιστορίας (Johansen & Casamatta 2005).

Πρόσφατα προτάθηκε για τα βακτηριακά είδη η έννοια του «**οικοτυπικού**» είδους (Cohan 2001). Σύμφωνα με αυτή, οι οικολογικοί θώκοι καθορίζουν οικοτύπους οι οποίοι δέχονται περιοδικά σημαντική επιλογή δρώντας ως συνεκτική δύναμη παρόμοια με αυτή της εγγενούς αναπαραγωγής των ευκαρυωτικών οργανισμών. Το οικοτυπικό είδος συνάδει με την ταξινομική σπουδαιότητα των οικολογικών χαρακτήρων που προτείνουν οι Komárek & Anagnostidis (1998). Επίσης, συνδέεται με την εξελικτική διαδικασία καθώς αναφέρεται σε συνεκτικές δυνάμεις και σε περιοδική επιλογή (Johansen & Casamatta 2005).

Η έννοια του «**φυλογενετικού**» είδους παρουσιάστηκε για πρώτη φορά από τους Eldredge & Cracraft (1980). Οι Wheeler & Platnick (2000) ορίζουν το φυλογενετικό είδος ως εξής: «η μικρότερη ομάδα εξελικτικών γραμμών που είναι ευδιάκριτη από ένα σύνολο καθορισμένων χαρακτήρων» (Flechtner et al. 2002, Johansen & Casamatta 2005). Υπό αυτή τη θεώρηση του φυλογενετικού είδους, όλοι οι ορισμοί πραγματεύονται το είδος ως εξελικτική γραμμή και προσπαθούν να συγκροτήσουν ένα ταξινομικό σύστημα κατάταξης που να αντανακλά την εξελικτική ιστορία.

Η έννοια του «**εξελικτικού**» είδους συνιστά μία οντότητα οργανισμών που διατηρεί την ταυτότητά της σε σχέση με άλλες οντότητες στον χρόνο και στον χώρο και έχει το δικό της εξελικτικό μονοπάτι και τις δικές της εξελικτικές τάσεις (Johansen & Casamatta 2005).

Είναι φανερόν ότι η έννοια και ο καθορισμός του είδους στα κυανοβακτήρια είναι ένα πεδίο αρκετά δύσκολο. Σύμφωνα με τον Komárek (2006), μια σύγχρονη προσέγγιση του είδους στα κυανοβακτήρια θα πρέπει να περιλαμβάνει κάποιες βασικές αρχές. Αρχικά, ομάδες πληθυσμών και στελέχη που ανήκουν σε έναν και τον ίδιο γονότυπο (γέννη) θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από σταθερά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, τα οποία είναι προσδιορίσιμα, έχουν ευδιάκριτα όρια στις αποκλίσεις και έχουν τις ίδιες οικολογικές απαιτήσεις. Μια εκτενής μελέτη για την έννοια του είδους στα κυανοβακτήρια παρουσιάζεται από τους Johansen & Casamatta (2005). Συζητούν τις έννοιες του φυλογενετικού είδους και εκφράζουν την άποψη ότι «μόνον με είδη που έχουν περιγραφεί λεπτομερώς είναι δυνατή η αξιολόγηση της ταξινομικής υπόθεσης» (Komárek 2006).

Οι Johansen & Casamatta (2005) καταλήγουν στη διαπίστωση ότι για να οριστεί το είδος στα κυανοβακτήρια πρέπει:

1. Η έννοια του είδους να λαμβάνει υπόψη της τη μεγάλη βιολογική ποικιλότητα των κυανοβακτηρίων.
2. Τα είδη να είναι μονοφυλετικά. Τα πολυφυλετικά είδη πρέπει να χωρισθούν σε μονοφυλετικά ακόμα και αν οι μεταξύ τους διαφορές είναι μορφολογικά δυσδιάκριτες.
3. Η έννοια του είδους θα πρέπει να εφαρμόζεται τόσο σε στελέχη αμιγών καλλιεργειών όσο και σε πληθυσμούς που παρατηρούνται στο πεδίο.

Επομένως τα δύο ερωτήματα που τίθενται για την εδραίωση ενός ταχον ως νέου για την επιστήμη είδους είναι:

- Υπάρχει απόδειξη διαφοροποίησης από τα ήδη υπάρχοντα και περιγραφέντα είδη με μορφολογικά, γενετικά, βιοχημικά και οικοφυσιολογικά κριτήρια;
- Υπάρχει απόδειξη ότι ο νέος παρατηρούμενος πληθυσμός είναι μέλος ενός διαφορετικού κλάδου (μονοφυλετική ομάδα) σε σύγκριση με τα πιο συγγενή φαινοτυπικά είδη;

1.8.2. ΚΛΑΣΙΚΗ ΚΑΙ ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Η Ταξινόμηση αποτελεί τη μέθοδο καταγραφής της βιοποικιλότητας της Γης με βάση τις εξελικτικές και οικολογικές σχέσεις, καθώς και τις φαινοτυπικές αποκλίσεις (Hoffmann et al. 2005). Η χρήση ονομάτων για την περιγραφή των ταξινομικών μονάδων, δηλαδή των εξελικτικών βημάτων, αποτελεί μέχρι σήμερα τον μόνο τρόπο οργάνωσης ενός ταξινομικού συστήματος κατάταξης. Ωστόσο, ένα ταξινομικό σύστημα δεν πρέπει να είναι στατικό αλλά να εμπλουτίζεται συνεχώς και να επανεξετάζεται με την πρόοδο της επιστήμης.

Η ταξινόμηση και ο προσδιορισμός των κυανοβακτηρίων με την κλασική προσέγγιση βασίζεται κυρίως σε μορφολογικά, κυτταρολογικά και οικοφυσιολογικά γνωρίσματα. Το σύστημα ταξινόμησης έχει αναθεωρηθεί πολλές φορές μέχρι σήμερα. Τα βασικά μορφολογικά κριτήρια, -όπως ορίστηκαν από τους Nägeli (1849), Thuret (1875), Bornet-Flauhault (1889), Gomont (1892), Lemmerman (1907-1910), Geitler (1925, 1932), Elenkin 1936,1949, Kossinskaja (1948), Hollerbach et al. (1953), Desikachary (1959), Starmach 1966, Bourrelly (1970), Kontratjeva (1968, 1982)- ισχύουν μέχρι σήμερα. Ωστόσο, διαφορετική προσέγγιση ακολούθησε ο Drouet (1968, 1978), ο οποίος υποστήριζε ότι η μορφολογική ποικιλότητα των κυανοβακτηρίων είναι το αποτέλεσμα της επίδρασης των διαφορετικών περιβαλλοντικών συνθηκών στον περιορισμένο αριθμό των γονοτύπων. Αποτέλεσμα αυτής της θεώρησης ήταν να μειώσει δραματικά τον αριθμό των γενών. Σε αυτό συνέβαλε και η υποεκτίμηση της υπάρχουσας γενετικής ποικιλότητας (Anagnostidis & Komárek 1985, Castenholz 1992, Lokmer 2007).

Στη συνέχεια, η βακτηριακή φύση των κυανοβακτηρίων οδήγησε στην προσπάθεια ταξινόμησης αυτών υπό τις παραδοχές του βακτηριολογικού κώδικα (Rippka et al. 1979, Rippka 1988, Castenholz 2001), ο οποίος βασίζεται σε φαινοτυπικούς και γενετικούς χαρακτήρες στελεχών που αναπτύσσονται υπό εργαστηριακές συνθήκες και όχι φυσικού υλικού. Το μειονέκτημα αυτού του συστήματος συνίσταται στο ότι αγνοεί την υφιστάμενη ποικιλότητα των κυανοβακτηρίων στη φύση.

Από τις πιο πρόσφατες αναδιαρθρώσεις του ταξινομικού συστήματος που βασίστηκε σε όλους τους διαθέσιμους τύπους πληροφοριών (μορφολογικές, οικολογικές, και πληροφορίες υπερδομής) από καλλιεργημένο και φυσικό υλικό ήταν αυτή των Anagnostidis & Komárek 1985, 1988, 1990 και Komárek & Anagnostidis 1986, 1989. Σύμφωνα με αυτούς η τάξη Chroococcales διαχωρίστηκε σε 7 διακριτές οικογένειες (Microcystaceae, Chroococcaceae, Entophysalidaceae, Chamaesiphoniaceae, Dermocarpellaceae, Xenococcaceae, και Hydrococcaceae). Στη συνέχεια, οι Komárek & Anagnostidis 1998, λαμβάνοντας υπόψη πρόσθετα δεδομένα, προτείνουν τον διαχωρισμό της τάξης Chroococcales σε 10 οικογένειες (Synecococcaceae, Merismopediaceae, Entophysalidaceae, Hydrococcaceae, Chamaesiphoniaceae, Dermocarpellaceae, Xenococcaceae, Hyellaceae). Το σύστημα προσδιορισμού των μονοκύτταρων και αποικιακών κυανοβακτηρίων βασίζεται σε συνδυασμό διαφόρων χαρακτήρων που είναι σταθεροί.

Οι οικογένειες διαχωρίζονται με βάση τα ακόλουθα γνωρίσματα:

- Σχήμα κυττάρων σε σχέση με την κυτταρική διαίρεση
- Πολικότητα κυττάρων και αποικιών
- Τύπος κυτταρικής διαίρεσης

Οι τάξη των Oscillatoriales σύμφωνα με τους Anagnostidis & Komárek 1988, διαχωρίζεται σε 6 οικογένειες (Borziaceae, Pseudanabaenaceae, Schizotrichaceae, Phormidiaceae, Oscillatoriaceae, Homoeotrichaceae). Οι Komárek & Anagnostidis (2005) στο δεύτερο κατά σειρά εγχειρίδιο ταξινόμησης των κυανοβακτηρίων (Oscillatoriales) για την αναθεώρηση των κυανοβακτηρίων με τη κλασική προσέγγιση με βάση τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά προτείνουν τον διαχωρισμό των Oscillatoriales στις εξής 6 οικογένειες: Pseudanabaenaceae, Schizotrichaceae, Borziaceae, Phormidiaceae, Gomontiellaceae, Oscillatoriaceae. Οι συγγραφείς θεωρούν ότι η αναθεώρηση αυτή θα σηματοδοτήσει το τέλος της φαινοτυπικής προσέγγισης και θα αποτελέσει τη βάση για σύγχρονες προσεγγίσεις. Για την τάξη Oscillatoriales, γνωρίσματα όπως κυτταρική διαίρεση, μορφή του νήματος και του τριχώματος, σύσφιξη εγκαρσίων τοιχωμάτων, παρουσία ή απουσία ορμογονίων και ορμοκύστεων, κινητικότητα τριχωμάτων και ορμογονίων, μορφολογία επάκριων κυττάρων, κολεός, ψευδείς διακλαδώσεις, και μορφή θαλλού αποτελούν βασικούς μορφολογικούς χαρακτήρες. Επιπροσθέτως, χρησιμοποιούνται διαγνωστικά κριτήρια υπερδομής όπως η διάταξη των θυλακοειδών, η θέση των ποικίλων κοκκίων του κυτοπλάσματος και η παρουσία κυστιδίων αερίου ('gas vesicles').

Η τάξη Nostocales σύμφωνα με τους Komárek & Anagnostidis 1989 περιλαμβάνει νηματοειδή κυανοβακτήρια με ετερόκυτο και ψευδή διακλάδωση και διαχωρίζεται σε 4 οικογένειες (Scytonemataceae, Microchaetaceae, Rivulariaceae, Nostocaceae). Για την τάξη Nostocales, ταξινομικά κριτήρια αποτελούν η δομή του νήματος και του τριχώματος, η

πολικότητα, η μορφολογία του θαλλού, η κυτταρική διαίρεση, τα ετερόκυτα, τα ακίνητα, καθώς και χαρακτηριστικά της λεπτούς δομής των κυττάρων.

Η τάξη Stigonmetales, η οποία περιλαμβάνει νηματοειδή κυανοβακτήρια με ετερόκυτο και αληθή διακλάδωση, σύμφωνα με τους Anagnostidis & Komárek (1990) αποτελείται από 8 οικογένειες (Chlorogloeopsaceae, Capsosiraceae, Stigonemataceae, Fischerellaceae, Borzinemataceae, Loriellaceae, Nostochopsaceae, Mastigocladaceae). Για την τάξη Stigonematales, ταξινομικά κριτήρια αποτελούν η μορφή των νημάτων, ο τρόπος διακλάδωσης, τα ετερόκυτα, τα ακίνητα, η κινητικότητα των νημάτων, τα ορμογόνια, καθώς και μορφολογικοί χαρακτήρες λεπτούς δομής των κυττάρων.

Ωστόσο, από την αναθεώρηση του ταξινομικού συστήματος (Anagnostidis & Komárek 1985, 1988, 1990, Komárek & Anagnostidis 1986, 1989) μέχρι σήμερα, πολλές πληροφορίες τόσο μοριακές όσο και υπερδομής έχουν συγκεντρωθεί, βάσει των οποίων το ήδη υπάρχον ταξινομικό σύστημα πρέπει να τροποποιηθεί. Αρχικά δύο εξελικτικές γραμμές ήταν διακριτές :







































1. Κοκκοειδή κυανοβακτήρια που είχαν ενταχθεί στην τάξη Chroococcales (Komárek & Anagnostidis 1986) ή σε διάφορες τάξεις με βάση την κυτταρική διαίρεση (Geitler 1932, 1942)
2. Νηματοειδή κυανοβακτήρια που είχαν ενταχθεί σε μία ομάδα Hormogonales (Geitler 1932, 1942) ή σε διάφορες τάξεις (Anagnostidis & Komárek 1988, 1990).

Με βάση τα μοριακά δεδομένα (Wilmotte & Golubic 1991, Turner et al. 1999, Castenholz 2001, Hoffmann et al. 2005, Komárek 2006, 2010) οι κοκκοειδείς και οι νηματοειδείς μορφές είναι διάσπαρτες, και ανήκουν σε πολλές εξελικτικές γραμμές. Αντιθέτως, οι νηματοειδείς ταξινομικές μονάδες που φέρουν ετερόκυτα (Nostocales, Stigonematales) φαίνεται να συνιστούν μονοφυλετική ομάδα. Για τα κοκκοειδή και νηματοειδή κυανοβακτήρια χωρίς ετερόκυτα τουλάχιστον τρεις εξελικτικές γραμμές προκύπτουν από συνδυασμό μοριακών δεδομένων και πληροφοριών υπερδομής.

Η εξελικτική γραμμή του *Gloeobacter-Gloeobacteriophycidae*, δηλ. κοκκοειδή με απουσία θυλακοειδών, η εξελικτική γραμμή των κοκκοειδών και λεπτών νηματοειδών με παράλληλη διάταξη των θυλακοειδών (*Synechococcorhycidae*), και αυτή των κοκκοειδών και νηματοειδών μορφών με ακτινωτή διάταξη θυλακοειδών (*Oscillatoriorhycidae*).

Δεδομένα φυλογενετικής ανάλυσης διαφόρων γονιδίων (Giovanonni et al. 1988, Turner 1997, Castenholz 2001, Zehr et al. 1997) συνηγορούν υπέρ της μονοφυλετικότητας των κυανοβακτηρίων που φέρουν ετερόκυτο, γεγονός που δηλώνει την καταγωγή από έναν κοινό πρόγονο, ενώ τόσο η τάξη Nostocales όσο και η τάξη των Stigonematales φαίνεται να είναι πολυφυλετικές. Το ταξινομικό σύστημα, επομένως, που προτάθηκε από τους Hoffmann et al. (2005) και βασίστηκε σε μοριακά, μορφολογικά, κυτολογικά δεδομένα καθώς και σε δεδομένα από τη διάταξη των θυλακοειδών (Απεικόνιση 1.13) διαφέρει από το κλασικό σύστημα

κατάταξης στο ότι δεν υπάρχει σαφής διαχωρισμός κοκκοειδών και νηματοειδών οργανισμών εξ αιτίας πολλαπλής εξελικτικής καταγωγής αμφοτέρων, είτε πολλαπλής εξέλιξης της κάθε ομάδας ξεχωριστά. Σε αντίθεση με τις διαφορετικές εξελικτικές γραμμές των κοκκοειδών και νηματοειδών μορφών υπάρχει ομοιογένεια σε όλα τα κυανοβακτήρια που εμφανίζουν ετερόκυτα.

Synecococcineae	Gl. [Gloeobacterales]	Gloeobacteraceae	Gloeobacter
	[Synechococcales]	Synechococcaceae	Aphanothece (small-celled), Cyanobium, Cyanodictyon, Cyanonephron, Prochlorococcus, (Rhabdoderma), Synechococcus
	coccoid 	coccoid	
		Merismopediaceae	Aphanocapsa (small-celled), Chroococcus subg. Limnococcus?, Merismopedia (small-celled), Synechocystis (small-celled)
	coccoid 	Chamaesiphonaceae	(Chamaesiphon subg. Euchamaesiphon), (Clastidium), Cyanophanon, Geitleribactron
coccoid, heteropolar 	coccoid, heteropolar		
[Pseudanabaenales]	Pseudanabaenaceae	Arthronema, Geitlerinema, Halomicronema, (Heteroleibleinia), Leptolyngbya, Limnothrix, Planktolyngbya, Pseudanabaena, Romeria, (Tapinothrix)	
trichal 	trichal		
	Schizotrichaceae	Schizotrix	
trichal 	trichal		
Oscillatorineae	Chroococcales	[Cyanobacteriaceae]	Aphanothece (large), Cyanobacterium, Cyanothece, "Euhalothece", Microcrocis, Myxobaktron
	coccoid 	coccoid	
		Microcystaceae	Aphanocapsa (large), (Gloeocapsa), Microcystis, Prochloron, Synechocystis (large)
		Gomphosphaeriaceae	(Gomphosphaeria), Snowella, Woronichinia
		Chroococcaceae	(Asterocapsa), Chroococcus, (Cyanosarcina), (Gloeocapsopsis), Merismopedia (large)
		Entophysalidaceae	(Chlorogloea), Cyanoarbor, (Entophysalis)
	polarized 	bin. fission	
		Stichosiphonaceae	Chamaecalyx, Chamaesiphon subg. Godlewskia, Stichosiphon
	polarized 	exocytes	
		Dermocarpellaceae	(Cyanocystis), Dermocarpella, Stanieria
	polarized 	baeocytes	
		Xenococcaceae	Chroococcidiopsis, (Myxosarcina), (Xenococcus)
	polarized 	baeocytes x bin. fission	
		Hydrococcaceae	(Hydrococcus), Hyella, (Pleurocapsa)
	polarized 	bin. fission x baeocytes	
Oscillatoriales	Spirulinaceae	Spirulina	
trichal 	neccrids -		
	Borziaceae	(Borzia), Komvophoron	
	neccrids -		
	Phormidiaceae	Arthrospira, Microcoleus, Phormidium, Planktothrix, Symploca, Trichodesmium, Tychonema	
	neccrids +		
	Ammatoideaceae	(Ammatoidea)	
	heteropolar		
	Oscillatoriaceae	Blennothrix, Lyngbya, Oscillatoria, (Plectonema)	
	neccrids +		
	Gomontiellaceae	(Crinalium), (Gomontiella), Starria	
neccrids +			
Nostocineae	Nostocales	Scytonemataceae	Scytonema
	heterocytous, akinetes 	isopolar, false branching	
		Symphyonemataceae	(Mastigocladopsis), (Symphyonemopsis), Y-Stigonematales-Symphyonema
		true branching (Y)	
		Rivulariaceae	Calothrix, (Gloeotrichia), (Rivularia)
		heteropolar, hairs	
		Microchaetaceae	(Microchaete), Spirirestis, (Tolypothrix)
		heteropolar	
	Nostocaceae	Anabaena (pl.), Anabaena (benth.), Anabaenopsis, Aphanizomenon, Cylindrospermopsis, Cylindrospermum, Nodularia, Nostoc, Trichormus	
	isopolar, without branching		
	Chlorogloeopsidaceae	Chlorogloeopsis	
	Hapalosiphonaceae	Hapalosiphon, Mastigocladus, Nostochopsis, T-Stigonematales-Fischerella, Westiellopsis	
	true branching (T)		
	Stigonemataceae	Stigonema	
	true branching, multiserial		

Απεικόνιση 1.13: Ταξινομικό σύστημα κατά Hoffmann et al. (2005) με μορφολογικά φαινοτυπικά, οικοφυσιολογικά, βιοχημικά δεδομένα και πληροφορίες λεπτούς δομής, τροποποιημένο από Komárek (2006).

Επομένως, το πλέον πρόσφατο και επί του παρόντος το πιο ολοκληρωμένο σύστημα ταξινόμησης βασίζεται σε όλες τις διαθέσιμες πληροφορίες (μορφολογικές, οικολογικές, γενετικές, πληροφορίες λεπτούς δομής κτλ.) από φυσικό και καλλιεργημένο υλικό. Η αλληλούχηση νουκλεϊκού οξέος στελεχών και πληθυσμών αποτελεί χωρίς αμφιβολία σύγχρονη προσέγγιση. Ωστόσο, τα κριτήρια της κλασικής ταξινομικής δεν θα πρέπει να παραβλέπονται. Αν και οι μοριακές πληροφορίες προσφέρουν βαθιά γνώση για τον γονότυπο καθώς και για τη διασπορά στα διάφορα οικοσυστήματα χωρίς τη βασική-συμπληρωματική γνώση των μορφολογικών γνωρισμάτων, τα μοριακά από μόνα τους έχουν περιορισμένη ικανότητα να αναγνωρίσουν:

- α) την οικολογική σημασία των διαφορετικών γονοτύπων
- β) τη μορφολογική ποικιλότητα *in situ*
- γ) τις προσαρμοστικές διαδικασίες
- δ) τη διαρκή δημιουργία νέων οικοτύπων και μορφοτύπων

Για μια ολοκληρωμένη θεώρηση της βιοποικιλότητας των κυανοβακτηρίων θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη: 1) μοριακές αναλύσεις (φυλογενετικές συγγένειες, ποικιλότητα γονοτύπων, διαδικασίες ειδογένεσης), 2) μορφολογική ποικιλότητα τόσο στο φυσικό όσο και στο καλλιεργημένο υλικό, 3) οικολογικά, οικοφυσιολογικά και βιογεωγραφικά όρια, 4) δεδομένα λεπτούς δομής, 5) βιοχημικοί χαρακτήρες και πληροφορίες μεταβολικών διαδικασιών (παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών και 6) εδραίωση των ταξινομικών μονάδων σύμφωνα με τους κανόνες του Βακτηριολογικού και/ή Βοτανικού Κώδικα (Kováček 2006).

1.8.3. ΧΡΗΣΗ ΣΥΓΧΡΟΝΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Μεγάλος αριθμός γονιδίων ιχνηθετών (*gene markers*) έχουν χρησιμοποιηθεί στις μελέτες κυανοβακτηρίων. Τα γονίδια αυτά ποικίλλουν από γενικά έως πολύ εξειδικευμένα και από δομικά έως λειτουργικά.

Η «αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης» (*polymerase chain reaction* ή *PCR*) με τη χρήση επιλεγμένων ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών, θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης (Taq πολυμεράση), εναλλαγής θερμοκρασίας, μετουσίωσης και επέκτασης μπορούν να συνθέσουν περισσότερο από 1 εκατομμύριο αντίγραφα της συγκεκριμένης στοχευμένης αλληλουχίας (Saiki et al. 1988). Η PCR είναι μια τεχνική με τεράστιες εφαρμογές που συνίσταται από τα εξής 4 βήματα (Απεικόνιση 1.14):

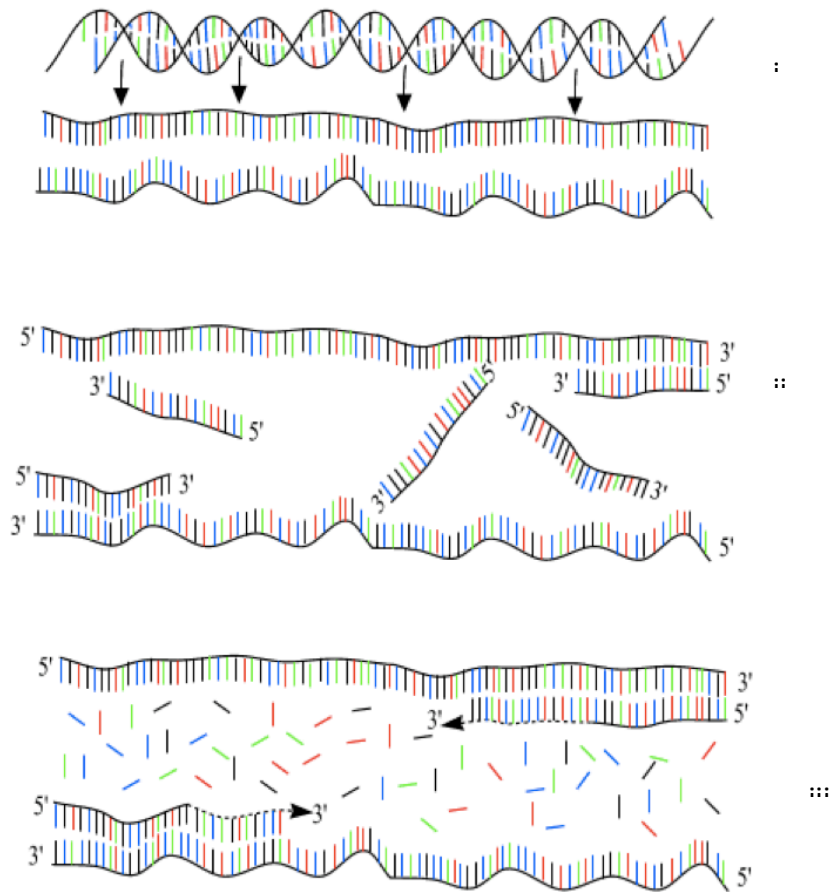
- I. σε υψηλή θερμοκρασία τα ζεύγη των βάσεων του DNA αποδιατάσσονται και χωρίζονται (denaturation) σε δύο σειρές αλληλουχιών που λειτουργούν πλέον ως πρότυπα της εκκίνησης
- II. σε χαμηλότερη θερμοκρασία οι ολιγονουκλεοτιδικοί δεσμοί εκκινητές προσδένονται σε αντίστοιχη ακολουθία των προς πολλαπλασιασμό γονιδίων ('annealing')
- III. η θερμοκρασία εκ νέου ανέρχεται για σύνθεση νέων συμπληρωματικών αλληλουχιών μέσω προέκτασης των εκκινητών
- IV. το νέο ζεύγος αλληλουχιών DNA (μία παλιά και μία καινούρια αλληλουχία) θα υποβληθεί στα βήματα 1-3.

Η PCR επηρεάζεται από παραμέτρους όπως η ποιότητα και η ποσότητα του DNA, οι εκκινητές, η πολυμεράση, τα τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκλεοτίδια (deoxyribonucleotide triphosphates ή dNTPs), η ποσότητα του χλωριούχου μαγνησίου καθώς και οι κύκλοι και θερμοκρασίες πρόσδεσης (Saiki et al. 1988). Η PCR έχει χρησιμοποιηθεί σε διαδικασίες όπως στην ενίσχυση του DNA, στη λήψη αποτυπωμάτων DNA, στην ανίχνευση μικρού αριθμού μικροοργανισμών κτλ. Ποικιλία τροποποιημένων PCR εφαρμόζονται σε περιβαλλοντικές μελέτες όπως η Q-PCR, RT-PCR και nested PCR.

Η μέθοδος της «ένθετης» (nested) PCR χρησιμοποιείται για αύξηση της εξειδίκευσης στο σύνολο της ενίσχυσης και στη βελτίωση της ελάχιστης πυκνότητας του προτύπου που χρειάζεται για την επιτυχή ενίσχυση (Garcia-Pichel 2008).

Η μέθοδος RT-PCR χρησιμοποιείται για ενίσχυση του RNA μετατρέποντάς το σε cDNA χρησιμοποιώντας μια ιική αντίστροφη μεταγραφάση. Χρησιμοποιείται κυρίως για ενίσχυση του mRNA και επομένως για μελέτη γονιδιακής έκφρασης στη φύση (Garcia-Pichel 2008).

Στη μέθοδο Q-PCR η πρόοδος της ενίσχυσης μπορεί να παρακολουθείται άμεσα με φθορίζοντες ιχνηθέτες που δεικνύουν την πυκνότητα του δίκλωνου DNA που είναι παρόν στην αντίδραση της PCR. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί στην οικολογία των κυανοβακτηρίων για ποσοτικοποίηση των δομικών και λειτουργικών ιδιοτήτων των μικροβιακών κοινωνιών (Garcia-Pichel 2008).



Απεικόνιση 1.14: Τα κύρια βήματα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), i) αποδιάταξη DNA, ii) πρόσδεση εκκινητών, iii) σύνθεση νέων συμπληρωματικών αλληλουχιών.

1.8.4. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ – ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η προσπάθεια εκτίμησης της ποικιλότητας των κυανοβακτηρίων από διάφορα οικοσυστήματα υπήρξε ανέκαθεν ερευνητικό αντικείμενο σε φυτογεωγραφικές, χλωριδικές μελέτες. Οι διαφορετικοί πληθυσμοί και τα είδη εξαρτώνται από τις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες, με αποτέλεσμα να υπάρχουν αρκετοί οικότυποι και μορφότυποι και ως εκ τούτου, η εκτίμηση του συνόλου των κοινωνιών των κυανοβακτηρίων στα διάφορα ενδιαίτηματα με τη χρήση συνδυασμού σύγχρονων μεθόδων όπως μοριακές, οικολογικές και μορφολογικές τεχνικές είναι αρκετά δύσκολη (Komárek 2006).

Δεδομένα μοριακής αλληλούχησης συνήθως παρουσιάζουν μεγαλύτερη γενετική ποικιλότητα εν συγκρίσει με τις κλασικές μεθόδους που βασίζονται σε καθαρά μορφολογικά κριτήρια (Komárek 2006, 2005, 2010). Πολλές φορές γενετικές διαφορές μεταξύ ειδών είναι έκδηλες και μερικές φορές σε ποσοστό ομοιότητας αλληλουχίας 16S rRNA >95% που αποτελεί όριο διάκρισης γενών, ενώ μορφολογικές διαφορές μπορεί να μην είναι εμφανείς. Τέτοια είδη πρέπει να διαχωρισθούν και αυτό γίνεται μόνο με τη χρήση μοριακών τεχνικών. Ο όρος «κρυπτικά είδη» ('cryptic species') (Johansen & Casamata 2005, Komárek 2006) είναι κατάλληλος για να περιγράψει αυτές τις ταξινομικές μονάδες. Επομένως, για την κατανόηση και την εκτίμηση της πραγματικής βιοποικιλότητας χρειάζεται ένας συνδυασμός μοριακών και μορφολογικών δεδομένων.

Μέθοδοι όπως οι RFLP/ARDRA, T-RFLP, DGGE, TGGE, FISH χρησιμοποιούνται στη μοριακή οικολογία για εκτίμηση της εποχικότητας της σχετικής αφθονίας διαφόρων τύπων στο οικοσύστημα και της δομής της κοινωνίας. Η RFLP/ARDRA χρησιμοποιείται για εκτίμηση των αλλαγών της μικροβιακής κοινότητας σε διάφορα περιβάλλοντα. Απαιτεί την ενίσχυση με PCR ενός γονιδίου και στη συνέχεια περιοριστικά ένζυμα κόβουν το ενισχυμένο γονίδιο. Τα κλάσματα περιορισμού που δημιουργούνται αναλύονται σε πήκτωμα αγαρόζης. Ο αριθμός και η διάταξη των αλληλουχιών είναι χαρακτηριστική για κάθε άτομο, έτσι δημιουργείται δακτυλικό αποτύπωμα το οποίο μπορεί εν συνεχεία να αναλυθεί. Η T-RFLP (Liu et al. 1997) αποτελεί μία παραλλαγή της RFLP κατά την οποία τα προϊόντα της PCR σημαίνονται με φθορίζουσες ουσίες κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης πριν από την ενζυματική πέψη. Η DGGE καθώς και η T-RFLP είναι πλέον μία από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές (Garcia-Pichel 2008).

1.8.5. ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΑ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΑ

Το γονίδιο της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας χρησιμοποιείται κατά κόρον και αποτέλεσε την κορωνίδα της φυλογενετικής έρευνας για διάφορους λόγους. Το προκαρυωτικό ριβοσωμικό RNA αποτελείται από δύο υπομονάδες: α) τη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα ('small subunit' ή 'SSU') και β) τη μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα ('large subunit' ή 'LSU'). Τα

προκαρυωτικά κύτταρα έχουν 3 τύπους ριβοσωμικού RNA, 5S, 23S, 16S. Όπως φαίνεται και στην Απεικόνιση 1.15, υπάρχουν γονιδιακές συστοιχίες που έχουν ένα γονίδιο για κάθε έναν από τους τύπους rRNA, και τα γονίδια μιας τέτοιας συστοιχίας συμμεταγράφονται. Τα SSU rRNAs αποτελούν παγκόσμια μόρια που φέρουν συντηρημένες καθώς και ταχέως μεταβαλλόμενες περιοχές (Lokmer 2007). Αυτό καθιστά δυνατή τη σύγκριση δύο στενά συγγενικών ταξινομικών μονάδων, καθώς και μελών μεταξύ διαφορετικών επικρατειών (domains). Επιπροσθέτως, τα γονίδια SSU rRNAs είναι αρκετά μεγάλα, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η στατιστική αξιολόγηση.

Ωστόσο, η χρήση του γονιδίου 16S rRNA δεν είναι πάντοτε κατάλληλη για να καταδείξει τις διαφορές μεταξύ των διαφορετικών στελεχών ενός συγκεκριμένου είδους εξ αιτίας της αργής εξέλιξης αυτού (Fox et al. 1992, Seo & Yokota 2003). Προσφάτως έχουν αναφερθεί γονίδια 16 S rRNA σε οριζόντια μεταφορά (Wang et al. 1997, Seo & Yokota 2003).

Επίσης, δεν υπάρχει σαφής τιμή του ποσοστού της ομοιότητας του 16S rDNA για την αναγνώριση των ειδών στα Βακτήρια (Copenye et al. 2005), αν και ομοιότητα < 97% κατά πάσα πιθανότητα αναφέρεται σε διαφορετικά είδη (Lokmer 2007). Τέλος, τα κυανοβακτήρια όπως και ένας μεγάλος αριθμός οργανισμών έχουν περισσότερα του ενός ριβοσωμικά οπερόνια (rrn operons) και εγείρεται το ερώτημα του πολυμορφισμού του γονιδίου μέσα στο γονιδίωμα (Lokmer 2007). Ωστόσο, φαίνεται ότι τα πολλαπλά rrn οπερόνια είναι σχεδόν ταυτόσημα στην αλληλουχία και επομένως, το πρόβλημα προκύπτει μόνο στην περίπτωση των πολύ στενά συγγενικών ειδών (Acinas et al 2004).

Εξ αιτίας αυτού έχει προταθεί προς διερεύνηση η ITS (Internal Transcribed Spacer regions) περιοχή, δηλ. αυτή που διαχωρίζει τις αλληλουχίες 16S και 23S στο οπερόνιο του rRNA, ως χρήσιμη για λεπτομερέστερο διαχωρισμό των ειδών ενός γένους ή διαφορετικών στελεχών ενός είδους (Boyer et al. 2001, Swingley et al. 2008). Αυτή η περιοχή είναι μεταβλητή τόσο στην αλληλουχία όσο και στο μέγεθος. Περιέχει πληροφορίες για τον «αντιτερματισμό» (antitermination) και την ελίκωση του rRNA και κωδικοποιεί για περισσότερα από δύο γονίδια μεταφορικού RNA ('tRNA'). Αν και η περιοχή ITS είναι χρήσιμη για τη διαφοροποίηση στενά συγγενικών ειδών θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα πολλαπλά ριβοσωμικά οπερόνια.

Gene or locus	Type of study	Target group	References
rRNA 16S	Diversity fingerprinting	Cyanobacteria/plastids	(Nübel <i>et al.</i> , 1999)
rRNA 166–236 ITS	Diversity fingerprinting	Planktonic cyanos	(Laamanen <i>et al.</i> , 2002)
STTS (Tandem repeats)	Diversity fingerprinting	Cycad symbionts (<i>Nostoc</i>)	(Zheng <i>et al.</i> , 2002)
<i>rpoC1</i> RNA Polymerase (γ subunit)	Diversity survey	Cyanobacteria (marine plankton)	(Palenik, 1994)
tRNA <i>leu</i> intron	Genetic diversity	Lichen symbionts (<i>Nostoc</i>)	(Paulsrud and Lindblad, 1998)
<i>psbA</i> PSII D1 protein	Diversity survey	Oxygenic phototrophs	(Zeidner <i>et al.</i> , 2003)
<i>mcyA</i> Microcystin synthetase A	Secondary metabolite detection	Toxin (Microcystin) producers	(Tillett <i>et al.</i> , 2001)
<i>ggpS</i> Glucosylglycerol-P synthase	Ecophysiological inference (salinity tolerance)	Plankton	(Geiß <i>et al.</i> , 2004)
<i>isiA</i> Chlorophyll <i>a</i> -binding protein	Ecophysiological inference (Fe starvation stress)	Plankton	(Geiß <i>et al.</i> , 2004)
<i>hetR</i> Heterocyst development	Diversity fingerprinting	Heterocystous cyanobacteria	(Janson <i>et al.</i> , 1999)
<i>petB/D</i> Cytochrome <i>b₆f</i> complex components	Diversity/ population genetics	<i>Microcoleus chthonoplastes</i>	(Lodders <i>et al.</i> , 2005)
<i>kaiC</i> Circadian oscillator regulator	Diversity/ population genetics	<i>Microcoleus chthonoplastes</i>	(Lodders <i>et al.</i> , 2005)
<i>cpeB</i> β -subunit of Phycoerythrin	Microevolution	<i>Prochlorococcus</i>	(Steglich <i>et al.</i> , 2003)
<i>ftsZ</i> Cell division initiation protein	Ecophysiological inference (cell division)	<i>Prochlorococcus</i>	(Holtzendorff <i>et al.</i> , 2002)
<i>ntcA</i> NH ₃ -repressed transcriptional activator	Ecophysiological inference (nutrient status)	Marine <i>Synechococcus</i>	(Lindell and Post, 2001)
<i>nifH</i> Nitrogenase iron protein	Ecophysiological inference (nitrogen fixation)	Bacteria	(Omoregie <i>et al.</i> , 2004)
<i>nifHDK</i> Nitrogenase (various proteins)	Ecophysiological inference (nitrogen fixation)	Thermophilic <i>Synechococcus</i>	(Steunou <i>et al.</i> , 2006)
<i>cpcB-cpcA</i> IGS Intergenetic spacer of the phycocyanin operon	Diversity survey	Cyanobacteria (potentially some plastids)	(Neilan <i>et al.</i> , 1995)
<i>cpcE, cpcF</i> Phycocyanobilin lyase β subunit	Ecophysiological inference (photosynthesis)	Thermophilic <i>Synechococcus</i>	(Steunou <i>et al.</i> , 2006)
<i>psbB</i> PSII chlorophyll-binding protein	Ecophysiological inference (photosynthesis)	Thermophilic <i>Synechococcus</i>	(Steunou <i>et al.</i> , 2006)
<i>psaB</i> PSI reaction center protein	Ecophysiological inference (photosynthesis)	Thermophilic <i>Synechococcus</i>	(Steunou <i>et al.</i> , 2006)
<i>coxA</i> Cytochrome <i>c</i> oxidase subunit I	Ecophysiological inference (respiration)	Thermophilic <i>Synechococcus</i>	(Steunou <i>et al.</i> , 2006)
<i>ldh</i> L-lactate dehydrogenase	Ecophysiological inference (fermentation)	Thermophilic <i>Synechococcus</i>	(Steunou <i>et al.</i> , 2006)
<i>cydA</i> Cytochrome <i>d</i> oxidase subunit I	Ecophysiological inference (respiration)	Thermophilic <i>Synechococcus</i>	(Steunou <i>et al.</i> , 2006)
<i>acs</i> Acetyl-coA synthase	Ecophysiological inference (fermentation)	Thermophilic <i>Synechococcus</i>	(Steunou <i>et al.</i> , 2006)
<i>adhE</i> coA-linked acetaldehyde dehydrogenase/ alcohol dehydrogenase	Ecophysiological inference (fermentation)	Thermophilic <i>Synechococcus</i>	(Steunou <i>et al.</i> , 2006)

Απεικόνιση 1.15: Γενετικοί δείκτες χρησιμοποιούμενοι στην έρευνα των κυανοβακτηρίων (Garcia-Pichel 2008).

1.9. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΑΙ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ

1.9.1. ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ

Η βιοτεχνολογία βασίζεται στην εφαρμοσμένη βιολογία δηλ. στη μελέτη και στην ανακάλυψη μεθόδων που έχουν εφαρμογή και είναι εν δυνάμει εκμεταλλεύσιμες. Αυτό το πεδίο της βιοτεχνολογίας τις τελευταίες δεκαετίες έχει εμπλουτιστεί αν ληφθούν υπόψη τα μεγάλα επιστημονικά και τεχνολογικά επιτεύγματα. Η Βιοτεχνολογία, χάρη στις καινοτόμες γενετικές αναλύσεις έχει αποκαλύψει μια βιοποικιλότητα οργανισμών πολύ μεγαλύτερη από τη μέχρι πρότινος θεωρούμενη. Ένα μεγάλο μέρος της Βιοτεχνολογίας σήμερα ασχολείται με τον τομέα της εύρεσης και παραγωγής φαρμάκων. Με την πρόοδο στην χαρτογράφηση του γονιδιώματος των οργανισμών είναι δυνατή η παραγωγή φαρμάκων από λειτουργικά γονίδια. Για την εύρεση όμως νέων βιοενεργών συστατικών που θα συμβάλουν στην καλύτερη ζωή του ανθρώπου, είναι απαραίτητη η ταυτοποίηση των οργανισμών. Είναι επομένως φανερό η σχέση της Ταξινομικής και της Βιοποικιλότητας με την Βιοτεχνολογία.

Η γνώση της μικροβιακής ποικιλότητας σε επίπεδο είδους, της αφθονίας, της διασποράς (τοπικής και παγκόσμιας) και των οικολογικών απαιτήσεων των ειδών, αποτελούν τη βασική έρευνα πάνω στην οποία θα βασιστεί η βιοτεχνολογία για την εύρεση νέων βιοενεργών συστατικών με ποικίλες εφαρμογές.

Ωστόσο, το σύνολο της μικροβιακής ποικιλότητας παραμένει ακόμη άγνωστο και οι λόγοι είναι πολλοί. Επί παραδείγματι, ο παρόμοιος φαινότυπος που εκφράζεται από διαφορετικό γονότυπο ενδέχεται να έχει οδηγήσει σε εσφαλμένη ταυτοποίηση ειδών υπό το ίδιο είδος (περίπτωση κρυπτικών ειδών). Επίσης είναι γνωστόν ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό των συλλεγμένων οργανισμών στο πεδίο μπορεί να αναπτυχθεί υπό εργαστηριακές συνθήκες εξ αιτίας μη εξειδικευμένων καλλιεργητικών μέσων, είτε περιορισμένης γνώσης της βιοχημείας και φυσιολογίας τους. Επιπροσθέτως, ένας άλλος παράγοντας που είναι σημαντικός και πολλές φορές δεν λαμβάνεται υπόψη στις αμιγείς καλλιέργειες είναι το φαινόμενο 'quorum sensing', η επικοινωνία δηλ. των οργανισμών μεταξύ τους. Ορισμένα είδη είναι δυνατόν να υφίστανται σε λήθαργο μέχρι να παρουσιασθεί το κατάλληλο μόριο σήμα που θα λειτουργήσει ως έναυσμα για την ανάπτυξή τους. Είναι φανερόν ότι τα προαναφερθέντα μπορούν να εξηγήσουν τις δυσκολίες στην καλλιέργεια ορισμένων ειδών.

Η καλύτερη κατανόηση της Βιογεωγραφίας των οργανισμών θα βοηθήσει στη διευκρίνηση της έκτασης της ποικιλότητας, στην ταυτοποίηση ειδών που απειλούνται προς εξαφάνιση, και στην κατανόηση της οικολογικής λειτουργίας ενός οργανισμού. Συμπερασματικά, η βιοποικιλότητα και η ταυτοποίηση των οργανισμών αποτελεί τη βάση για οποιαδήποτε βιοτεχνολογική εφαρμογή και, επομένως, οι μικροβιακή δεξαμενή γονιδίων είναι υψίστης σημασίας.

1.9.2. ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΑ- ΝΕΑ ΠΗΓΗ ΒΙΟΕΝΕΡΓΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

Η μακρά εξελικτική ιστορία των κυανοβακτηρίων αποτελεί μία από τις αιτίες της επιτυχούς εγκατάστασης σε πάρα πολλά οικοσυστήματα και ενδιαιτήματα αυτών καθώς και της οικολογικής τους αντοχής (Whitton 2000). Επιπροσθέτως, έχουν αναπτύξει ένα τεράστιο εύρος οικολογικής αντοχής στη θερμοκρασία, στο φως, στην αλατότητα, στο pH, στην ακτινοβολία (UV), στην υγρασία με αποτέλεσμα να έχουν μηχανισμούς προσαρμογής σε αντίξοες συνθήκες. Τα παραπάνω εξηγούν την παγκόσμια και κοσμοπολιτική εξάπλωση των κυανοβακτηρίων στα διάφορα οικοσυστήματα. Εκτός από τη μορφολογική ποικιλότητα, τα κυανοβακτήρια έχουν την ικανότητα να παράγουν και ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών φυσικών μεταβολικών προϊόντων. Παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες που τα βοηθούν να είναι ανταγωνιστικά στις εκάστοτε συνθήκες και στα εκάστοτε ενδιαιτήματα.

Τα φυσικά προϊόντα (δευτερογενείς μεταβολίτες) αποτελούν ίσως την πιο δραστική πηγή νέων φαρμακευτικών συστατικών, καθώς και πρότυπα για παραγωγή συνθετικών αναλόγων (Gademann & Kobylinska 2009). Πολλές ανασκοπήσεις και άρθρα περιγράφουν την σημασία των συστατικών αυτών από τα φυτά, από τους μικροοργανισμούς και από τα ζώα. Στο πεδίο του καρκίνου και μολυσματικών ασθενειών, 60% - 70% των φαρμάκων προέρχονται από φυσικά προϊόντα και ανακαλύφθηκαν μεταξύ 1981-2002 (Tiwaray et al. 2011). Κατά το διάστημα 2001-2005, 23 νέα φάρμακα προήλθαν από φυσικά προϊόντα. Ωστόσο, από τα τέλη του 1980 και τις αρχές του 1990 ο ανταγωνισμός των φαρμακευτικών εταιριών ήταν τεράστιος και η πίεση για συνεχή και ταχεία ανακάλυψη νέων φαρμάκων ήταν μεγάλη. Ως αποτέλεσμα, η έρευνα στράφηκε στα συνθετικά φάρμακα με δραματική μείωση των παραγωμένων φυσικών προϊόντων. Στη συνέχεια με την τεχνολογική πρόοδο και την ανάπτυξη νέων επαναστατικών μεθόδων για τον έλεγχο της βιοενεργούς δράσης, τα φυσικά προϊόντα επανήλθαν στο προσκήνιο της έρευνας και αποκαταστάθηκαν ως κύρια πηγή φαρμάκων. Τα φυσικά προϊόντα έχουν απομονωθεί από ένα μεγάλο εύρος οργανισμών.

Ο μεγάλος αριθμός καινοτόμων και βιολογικώς ενεργών συστατικών που έχουν απομονωθεί συγκεκριμένα από τα κυανοβακτήρια αποδεικνύει ότι οι οργανισμοί αυτοί αποτελούν πλούσια πηγή φυσικών προϊόντων (Burja et al. 2001, Tan 2007, Jaiswal et al. 2008, Gademann & Portmann 2008). Περισσότερα από 40 διαφορετικά είδη Nostocales, παράγουν περισσότερα από 120 φυσικά προϊόντα (δευτερογενείς μεταβολίτες) με αντι-HIV, αντικαρκινική, αντιμυκητιακή και αντιμικροβιακή δράση (Singh et al. 2002).

Τα καινοτόμα αυτά βιοενεργά συστατικά των κυανοβακτηρίων μπορεί να είναι πεπτίδια, λιπαρά οξέα, πολυκετίδια, αλκαλοειδή, αμίδια, τερπένια, υδρογονάνθρακες και άλλες οργανικές ουσίες (Patterson et al. 1994, Kretlow et al. 1999, Burja et al. 2001, Tan 2007, Abed et al. 2009).

Το εύρος δράσης των δευτερογενών αυτών μεταβολιτών των κυανοβακτηρίων περιλαμβάνει αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή, αντικαρκινική, αντική δράση καθώς και ανταγωνιστική δράση έναντι άλλων φυκών και πρωτοζώων (Απεικόνιση 1.16). Υπάρχουν λίγα στελέχη κυανοβακτηρίων που διαθέτουν βιονεργές ουσίες με μεγάλο εύρος δράσης. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι το *Phormidium* sp. αναστέλλει τη δράση διαφορετικών θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, ζυμών και μυκήτων (Bloor & Englang 1989). Ένα άλλο διακριτό παράδειγμα αποτελεί το είδος *Lyngbya majuscula*, από το οποίο έχουν απομονωθεί λιποπεπτίδια (κυκλικά ή γραμμικά), αμινοξέα, λακτόνες, λιπαρά οξέα, αμίδια, αλκαλοειδή, πυρόλες κ.α. (Burja et al. 2001, Shimizu 2003, Abed et al. 2009).

Ο έλεγχος αντιβακτηριακής δράσης συστατικών από κυανοβακτήρια έχει δώσει αρκετά θετικά αποτελέσματα (Kreitlow et al. 1999, Biondi et al. 2008, Singh et al. 2011). Ωστόσο, μόνον ένας πολύ μικρός αριθμός από αυτά έχουν προσδιορισθεί από άποψη χημικής ουσίας, π.χ. η Noscomin 57 από το *Nostoc commune*, με αντιβακτηριακή ικανότητα έναντι των *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* (Bhateja et al. 2006) κ.α.

Ως αντιμυκητιακά συστατικά από τα κυανοβακτήρια αναφέρονται οι ουσίες fisherellin A, harpalindole, carazostatin, phytoalexin, tolytoxin, nostocyclamide, scytophycin, nostodione, οι οποίες παράγονται από κυανοβακτήρια που ανήκουν στις τάξεις Stigonematales, Nostocales και Oscillatoriales. Έχουν επίσης αναφερθεί αρκετά συστατικά με δράση έναντι άλλων φυκών που προφανώς μπορούν να χρησιμεύσουν ως έλεγχος των ευτροφικών ανθίσεων (blooms).

Ωστόσο, παρά τον μεγάλο αριθμό ουσιών με δράση έναντι των βακτηρίων, μυκήτων και φυκών, ελάχιστα έχουν μέχρι σήμερα αναφερθεί να έχουν αντιική δράση. Για παράδειγμα, υπάρχουν συστατικά που έχουν απομονωθεί από τα στελέχη *Lyngbya lagerhemanii* και *Phormidium tenue* και εμφανίζουν δράση έναντι του ιού HIV (Rajeev & Xu 2004). Επίσης, η κυανοβιρίνη, μία πρωτεΐνη που έχει απομονωθεί από το είδος *Nostoc ellipsosporum* έχει βρεθεί να έχει πιθανή δράση έναντι όλων των ιών ανοσοανεπάρκειας (Singh et al. 2002).

Το είδος *Spirulina platensis* έχει αναφερθεί μεταξύ άλλων ως πλούσια πηγή γ-λινολενικού οξέος (GLA), συστατικού που μετατρέπεται στο ανθρώπινο σώμα σε αραχιδονικό οξύ και προσταγλανδίνη E2. Η τελευταία φαίνεται να μειώνει την αρτηριακή πίεση και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των λιπιδίων. Επίσης, από κυανοβακτήρια ελληνικών σπηλαίων *Scytonema juliaoum* και *Chroococciopsis* sp. έχουν απομονωθεί λιποειδή με δράση ανάλογη του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF) ή με ανασταλτική δράση έναντι του PAF (Antonopoulou et al. 2002, 2005a,b).

Μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτελεί η πιθανή εύρεση αντιβακτηριακής δράσης λιποειδών δύο επιλεγμένων στελεχών από διαφορετικές τάξεις. Η αντιβακτηριακή τους δράση ελέγχεται με τη χρήση βιοδοκιμών χρησιμοποιώντας κατάλληλα παθογόνα βακτήρια.

Species of cyanobacteria	Bioactive compounds	Biological activity	References
<u>Family oscillatoriaceae</u>			
<i>Lyngbya majuscula</i>	Malyngolide Lyngbyatoxins Debromoaplysiatoxin Curacin A Kalkitoxin Cyclic polypeptide	Antibacterial PKC activator Inflammatory Microtubulin assembly inhibitors Sodium channel blocker Anti-HIV activity	Burja <i>et al.</i> (2001) (Shimizu 2003) Rajeev and Xu (2004)
<i>L. lagerheimii</i>	Sulpholipid	Anti-HIV activity	Rajeev and Xu (2004)
<i>Oscillatoria raoi</i>	Acetylated sulfoglyco-lipids	Antiviral	Reshef <i>et al.</i> (1997)
<i>Phormidium tenue</i>	Galactosyldiacylglycerols	Antialgal Anti-HIV	Murakami <i>et al.</i> (1991) Rajeev and Xu (2004)
<i>Phormidium</i> spp.	Thermostable enzymes	Catalysis of reactions	Piechula <i>et al.</i> (2001)
<i>Spirulina platensis</i>	Spirulan Gamma linolenic acid Vitamin B and E	Antiviral Predecessor of arachidonic acid Antioxidants and co-enzymes	Hayashi <i>et al.</i> (1991) Cohen (1999) Plavsic <i>et al.</i> (2004)
<u>Family hyellaceae</u>			
<i>Hyella caespitose</i>	Carazostatin	Antifungal	Burja <i>et al.</i> (2001)
<u>Family nostocaceae</u>			
<i>Nostoc spongiaeforme</i>	Nostocine A	Antialgal	Hirata <i>et al.</i> (1996)
<i>N. commune</i>	Nostodione	Antifungal	Bhadury and Wright (2004)
<i>Nostoc</i> sp.	Nostocyclamide	Antifungal	Moore <i>et al.</i> (1988)
<i>N. linckia</i>	Cyanobacterin LU-1	Antialgal	Gromov <i>et al.</i> (1991)
<i>N. insulare</i>	Norharmame	Antibacterial	Volk and Furkert (2006)
<i>N.sphaericum</i>	Indolocarbazoles	Antiviral	Cohen (1999)
<i>Anabaena circinalis</i>	Anatoxin-a	Inflammatory	Rajeev and Xu (2004)
<u>Family Scytonemaceae</u>			
<i>Scytonema hofmanni</i>	Cyanobactericin	Antialgal	Abarzua <i>et al.</i> (1999)
<i>S. ocellatum</i>	Tolytoxin Phytoalexin	Antifungal	Patterson and Carmeli (1992); Patterson and Bolis (1997)
<i>S. pseudohofmanni</i>	Scytopycins	Antifungal	Burja <i>et al.</i> (2001)
<u>Family microchaetaeaceae</u>			
<i>Tolypothrix tenuis</i>	Toyocamycin	Antifungal	Banker and Carmeli (1998)
<i>T. tjipanansensis</i>	Tjipanazoles	Antifungal	Bonjouklian <i>et al.</i> (1991)
<u>Family stigonemataceae</u>			
<i>Fischerella muscicola</i>	Fisherellin	Antialgal, antifungal	Dahms <i>et al.</i> (2006)
<i>Hapalosiphon fontinalis</i>	Hapalindole	Antifungal	Burja <i>et al.</i> (2001)
<u>Family merismopediaceae</u>			
<i>Gomphosphaeria aponina</i>	Aponin	Antialgal	Bhadury and Wright (2004)
<u>Family chroococcaceae</u>			
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Kawaguchipeptin B	Antibacterial	Dahms <i>et al.</i> (2006)
<i>Synechocystis</i> sp.	Naienones A-C	Antitumoural	Nagle and Gerwick (1995)
<i>Synechococcus elongates</i>	Thermostable enzyme	Catalysis of reactions	Ohto <i>et al.</i> (1999)
<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	Thermostable polyphosphate kinase	Production of dipeptides	Sato <i>et al.</i> (2007)

Απεικόνιση 1.16: Ενδεικτικός πίνακας με τα δραστικά βιολογικά συστατικά προερχόμενα από κυανοβακτήρια (Abed *et al.* 2008).

1.10. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή έχει ως αντικείμενο μελέτης την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό κυανοβακτηρίων από τρία (3) επιλεγμένα σπήλαια της Πελοποννήσου («Καστριά», «Φράγγθι» και «Σεληνίτσα») με παραδοσιακές και πιο σύγχρονες μεθόδους μικροσκοπίας αλλά, και όπου ήταν αναγκαίο, με σύγχρονες μοριακές μεθόδους (ανάλυση αλληλουχιών ριβοσωμικού DNA).

Η έρευνα εστιάζεται σε κυανοβακτήρια από το ιδιαίτερο ενδιαίτημα των σπηλαίων, ένα περιβάλλον ελάχιστα μελετημένο στην Ελλάδα παρά την πληθώρα σπηλαίων που διαθέτει. Ένας μεγάλος αριθμός καλλιιεργειών καθώς και απομονωμένα στελέχη από τα σπήλαια με ιδιαίτερο ταξινομικό ενδιαφέρον διατίθεται στο εργαστήριο του Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής του ΕΚΠΑ. Οι ολιγάριθμες ταξινομικές έρευνες από κυανοβακτήρια σπηλαίων του ελλαδικού χώρου έχουν ως αποτέλεσμα την περιορισμένη γνώση σημαντικών οργανισμών. Ως εκ τούτου, η απομόνωση, καλλιέργεια και διερεύνηση στελεχών από σπήλαια με συνδυασμό παραδοσιακών και σύγχρονων μεθόδων είναι αναγκαία.

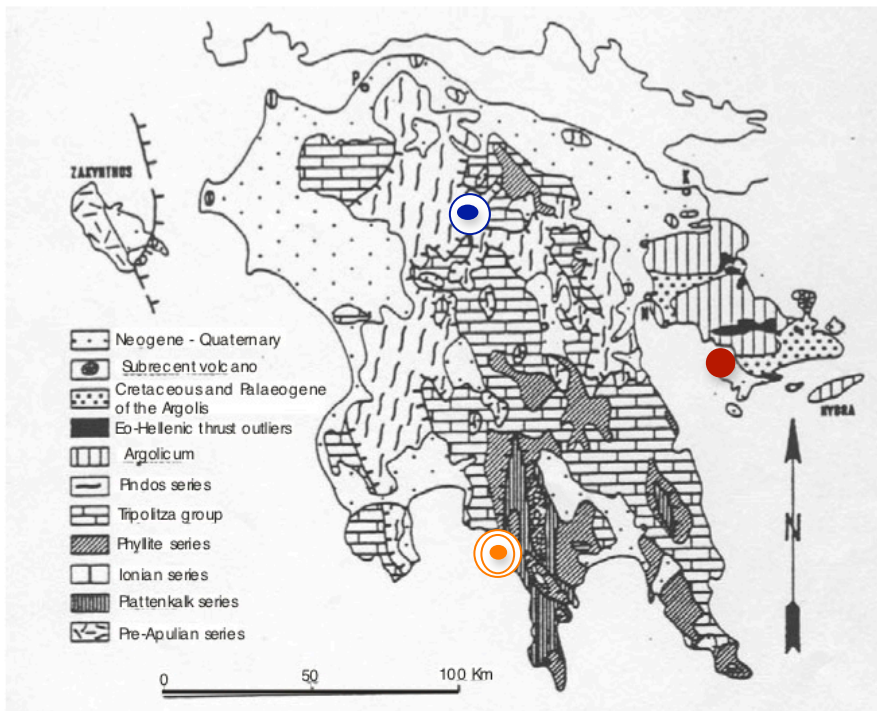
Επίσης έγινε περιοδική καταγραφή περιβαλλοντικών παραμέτρων (θερμοκρασία T, σχετική υγρασία RH, και ενεργώς φωτοσυνθετική ακτινοβολία PAR) με προσπάθεια συσχέτισης αυτών με τις κοινότητες κυανοβακτηρίων, μια έρευνα αρκετά περιορισμένη και σε παγκόσμιο επίπεδο.

Τα κυανοβακτήρια όπως προαναφέρθηκε, αποτελούν οργανισμούς πλούσιους σε βιοενεργές ουσίες με ποικίλο εύρος δράσης. Από επιλεγμένα στελέχη, τα οποία αποτέλεσαν νέες ταξινομικές μονάδες για την επιστήμη, απομονώθηκαν τα λιποειδή και αφού διαχωρίστηκαν στα συστατικά τους έγινε έλεγχος της αντιβακτηριακής τους δράσης έναντι προτύπων και κλινικών βακτηριακών στελεχών τόσο θετικών όσο και αρνητικών κατά Gram.

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

2.1. ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Τα σπήλαια που μελετήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή, σπήλαιο «Κασριά», «Φράγχθι» και «Σεληνίτσα» βρίσκονται στην Πελοπόννησο και η ακριβής τους θέση σημειώνεται επί του χάρτη της Πελοποννήσου (Απεικόνιση 2.1).



Απεικόνιση 2.1: Τεκτονικός χάρτης της Πελοποννήσου κατά Jacobshagen et al. (1978), στον οποίο σημειώνονται οι περιοχές μελέτης.

- «Φράγχθι» = ●
 «Κασριά» = ●
 «Σεληνίτσα» = ●

2.2. ΣΠΗΛΑΙΟ «ΚΑΣΤΡΙΑ» - ΘΕΣΗ / ΓΕΩΛΟΓΙΑ

Το σπήλαιο «Καστριά» εντοπίζεται πλησίον του χωριού Καστριά, στον Δήμο Κλειτορίας, του νομού Αχαΐας, στην Πελοπόννησο (37°57'37.54"Β, 22°08'26.91"Ε). Η φυσική είσοδος είναι διανοιγμένη σε υψόμετρο 827m, σε απόσταση περίπου 1,5χλμ βόρεια της κοινότητας Καστριών.

Σύμφωνα με το γεωλογικό χάρτη Ι.Γ.Μ.Ε., φύλλο Δάφνη (1983), στη γεωλογική δομή της ευρύτερης περιοχής Καστριών-Καλαβρύτων εντοπίζονται τρεις λιθολογικοί σχηματισμοί (Απεικόνιση 2.2): (α) ο λιθολογικός σχηματισμός της σειράς της Πίνδου, (β) ο λιθολογικός σχηματισμός της σειράς της Τρίπολης και (γ) ο λιθολογικός σχηματισμός των νεότερων αποθέσεων.

Ο Λιθολογικός σχηματισμός σειράς Πίνδου αποτελείται από:

1. Ηωκαινικό Φλύσχη με εναλλαγές ψαμμιτών και ψαμμιτικών ιλυολίθων και χαρακτηρίζεται από έντονη επιφανειακή αποσάθρωση
2. Ασβετόλιθους λεπτοπλακώδεις, βιομικριτικούς, Ανωκρητιδικής ηλικίας
3. Ραδιολαρίτες με ιλιλίθους Ανώτερου Ιουρασικού

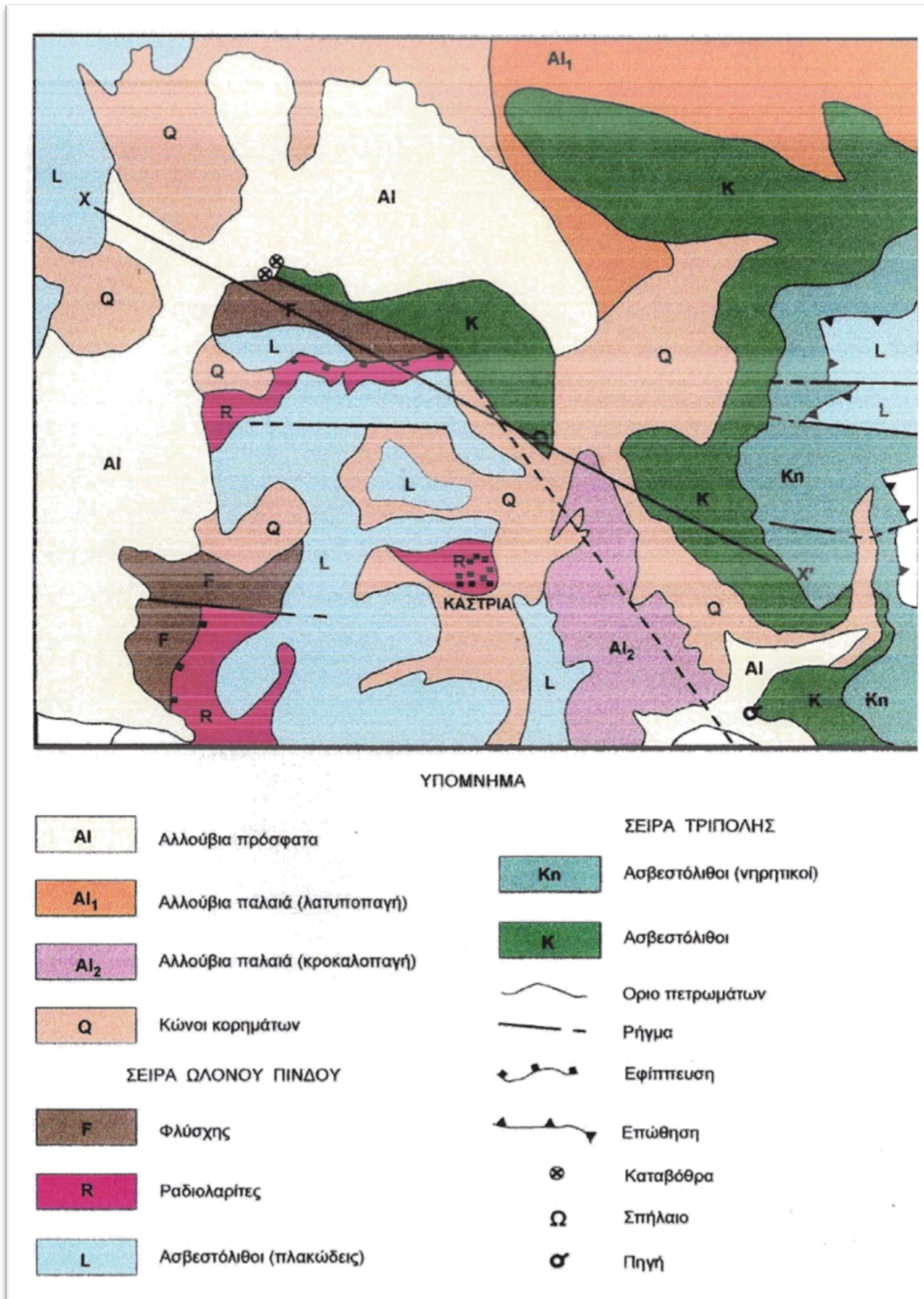
Ο Λιθολογικός σχηματισμός σειράς Τριπόλεως αποτελείται από:

1. Νηριτικούς ασβεστολίθους Παλαιοκαινικής, μεσο-Ηωκαινικής ηλικίας
2. Παχυστρωματώδεις ασβεστολίθους Ανωκρητιδικής ηλικίας

Οι νεώτερες αποθέσεις αποτελούνται από:

1. Αλλούβια πρόσφατα (αργιλώδης άμμος)
2. Παλαιά αλλούβια λατυποπαγή και κροκαλοπαγή
3. Κώνους κορημάτων, η σύσταση των οποίων εξαρτάται όπως και τα αλλούβια από τα προερχόμενα πετρώματα. Καλύπτουν όλο το χώρο ανατολικά και νοτιο-ανατολικά του σπηλαίου

Το σπήλαιο «Καστριά» έχει διανοιχθεί εν μέρει μέσα στους Κρητιδικούς ασβεστόλιθους της Τρίπολης και εν μέρει μέσα στους Ανωκρητιδικούς ασβεστόλιθους της Πίνδου. Η γενική μορφολογία του ανταποκρίνεται πλήρως σε αυτή των σπηλαίων που αναπτύσσονται κατά μήκος ρηγμάτων με πολύ μεγάλο ύψος οροφής και μικρό πλάτος (Γιαννόπουλος 2000).



Απεικόνιση 2.2: Γεωλογικός χάρτης περιοχής Καστριών-Καλαβρύτων, Φύλλο Δάφνη (IGME, 1983)

Με βάση την υδρολογία του μπορεί να χωριστεί σε τέσσερα τμήματα. Το **πρώτο** τμήμα αρχίζοντας από την φυσική είσοδο έχει μήκος 80m και είναι ξηρό. Κοντά στην είσοδο έχει σχηματιστεί κώνος με φερτά υλικά από το εξωτερικό περιβάλλον. Το πρώτο αυτό τμήμα διακόπτεται τεκτονικά από μικρό ρήγμα διευθύνσεως ΒΑ.

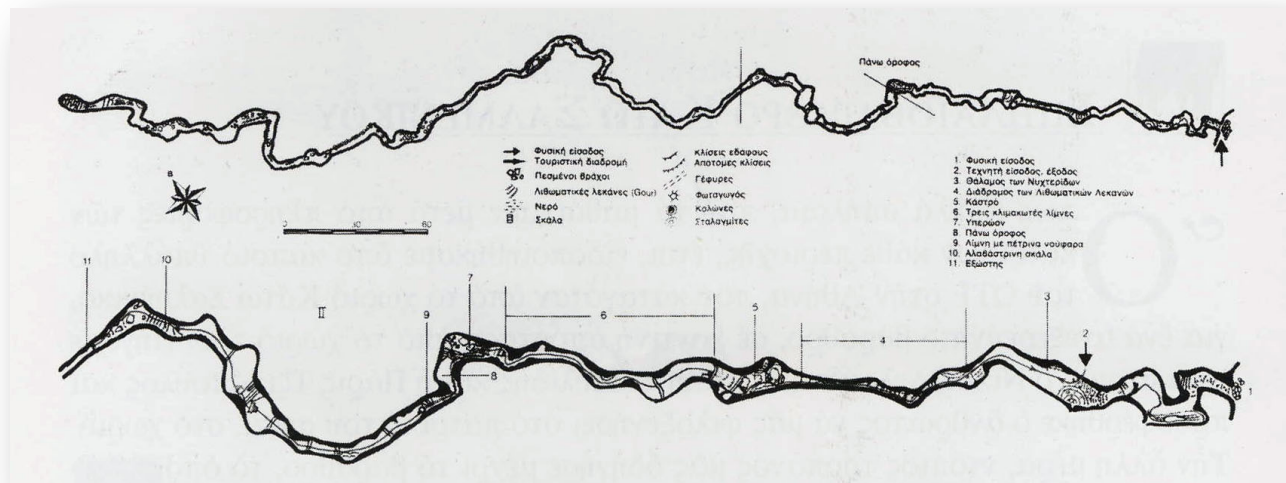
Στο **δεύτερο** τμήμα σχηματίζονται 13 λίμνες το νερό των οποίων προέρχεται από την έντονη σταγονορροή.

Το **τρίτο** τμήμα το οποίο είναι και το μεγαλύτερο είναι διανοιγμένο σε κρητιδικούς λεπτοπλακώδεις ασβεστόλιθους της σειράς της Πίνδου και σήμερα είναι στεγνό με πολλές κατακρημνίσεις.

Το **τέταρτο** τμήμα δεν υπερβαίνει τα 50m και η παρουσία των υδάτων είναι έντονη.

Από το συνολικό σπήλαιο ένα τμήμα 500m έχει αξιοποιηθεί τουριστικά, ενώ η λήψη δειγμάτων και η καταμέτρηση των αβιοτικών παραμέτρων πραγματοποιήθηκε στο αδιατάρακτο τμήμα του σπηλαιίου κοντά στην φυσική είσοδο.

Αρχαιολογική ανασκαφή έδωσε στοιχεία για κατοίκηση του σπηλαιίου από την Αρχαιότερη Νεολιθική (5697 π.Χ) έως την Ύστερη ελλαδική III (1200-1100 π.Χ.), (Σαμψών 1997). Επιπροσθέτως, η αρχαιολογική ανασκαφή έφερε στο φως απολιθωμένα οστά ανθρώπου και διαφόρων ζώων, μεταξύ των οποίων και ιπποπόταμου.



Απεικόνιση 2.3: Κάτοψη του σπηλαιίου «Καστριά» (Πετροχείλου, Αρχείο Ελληνικής Σπηλαιολογικής Εταιρείας), Λελούδας (2005).

2.3. ΣΠΗΛΑΙΟ «ΦΡΑΓΧΘΙ» - ΘΕΣΗ / ΓΕΩΛΟΓΙΑ

Το σπήλαιο Φράγχθι βρίσκεται πλησίον του χωριού της Κοιλιάδος, στον Δήμο Κρανιδίου του νομού Αργολίδας στην Πελοπόννησο ($37^{\circ}25'21.01''\text{B}$, $23^{\circ}07'51.81''\text{E}$).

Η περιοχή νότια του Κρανιδίου αποτελείται από μετατεκτονικά και βραδυτεκτονικά ιζήματα πλειστοκαινικής ηλικίας όπως :

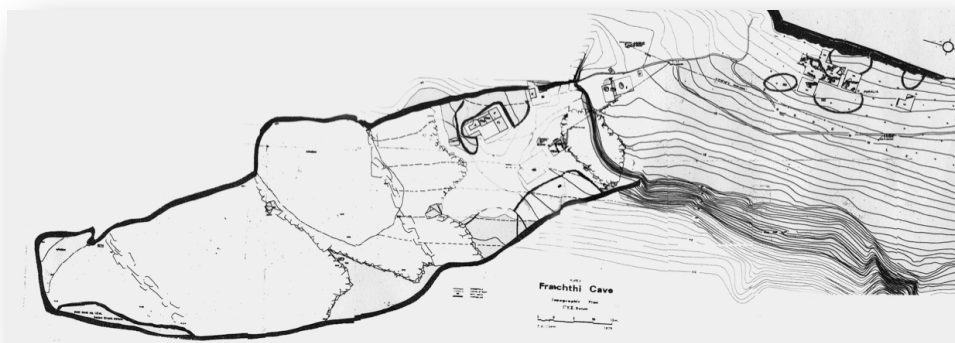
1. Λιμναίες αποθέσεις (άμμοι, άργιλοι, στρώματα τύρφης ή λιγνίτη, κοκκινοχώματα)
2. Θαλάσσιες αποθέσεις (άμμοι, άργιλοι, κροκαλοπαγή)

Τα κροκαλοπαγή είναι συνεκτικά με μηχανική συμπεριφορά βράχου. Συνίστανται κυρίως από ασβεστολιθικές κροκάλες με ασβεστιτικό συνδετικό υλικό.

Η ευρύτερη περιοχή καλύπτεται από ψαμμιτομαργαϊκούς σχηματισμούς λιμναίας φάσης και πηλούς καθώς και από κροκαλοπαγή με αργιλομαργαϊκό συνδετικό υλικό.

Το σπήλαιο εντοπίζεται περίπου 12,50m άνωθεν του σημερινού επιπέδου της θάλασσας. Εξωτερικά της εισόδου η επιφάνεια είναι βραχώδης και βρίσκεται σε απόσταση 50m περίπου από τη θάλασσα. Το σπήλαιο έχει υποστεί κατολισθήσεις στην είσοδο και στο εσωτερικό του, με αποτέλεσμα 30m από την είσοδο να έχει δημιουργηθεί άνοιγμα της οροφής, διαμέτρου 20m.

Μέχρι σήμερα έχουν διερευνηθεί μέσω των ανασκαφών ευρήματα 25.000 ετών και υπάρχουν ενδείξεις ότι το σπήλαιο είχε συνεχή ανθρώπινη παρουσία από το 20.000 μέχρι το 3.000 π.Χ. οπότε και κατέρρευσε. Η χρήση του σπηλαίου φτάνει στην ακμή του στη Μέση Νεολιθική περίοδο (5000-4500 π.Χ.) και στην Ύστερη Νεολιθική περίοδο. Αυτή την περίοδο βρέθηκαν εργαλεία από οψιδιανό, ένα πέτρωμα που υπάρχει μόνο στη Μήλο, υποδεικνύοντας την ύπαρξη ναυσιπλοΐας. Επιπροσθέτως, στο σπήλαιο αυτό έχει ανευρεθεί ο αρχαιότερος πλήρης σκελετός στην Ελλάδα ο οποίος χρονολογείται πριν από 10.000 – 8.000 έτη (Jacobsen & Rarrand 1988).



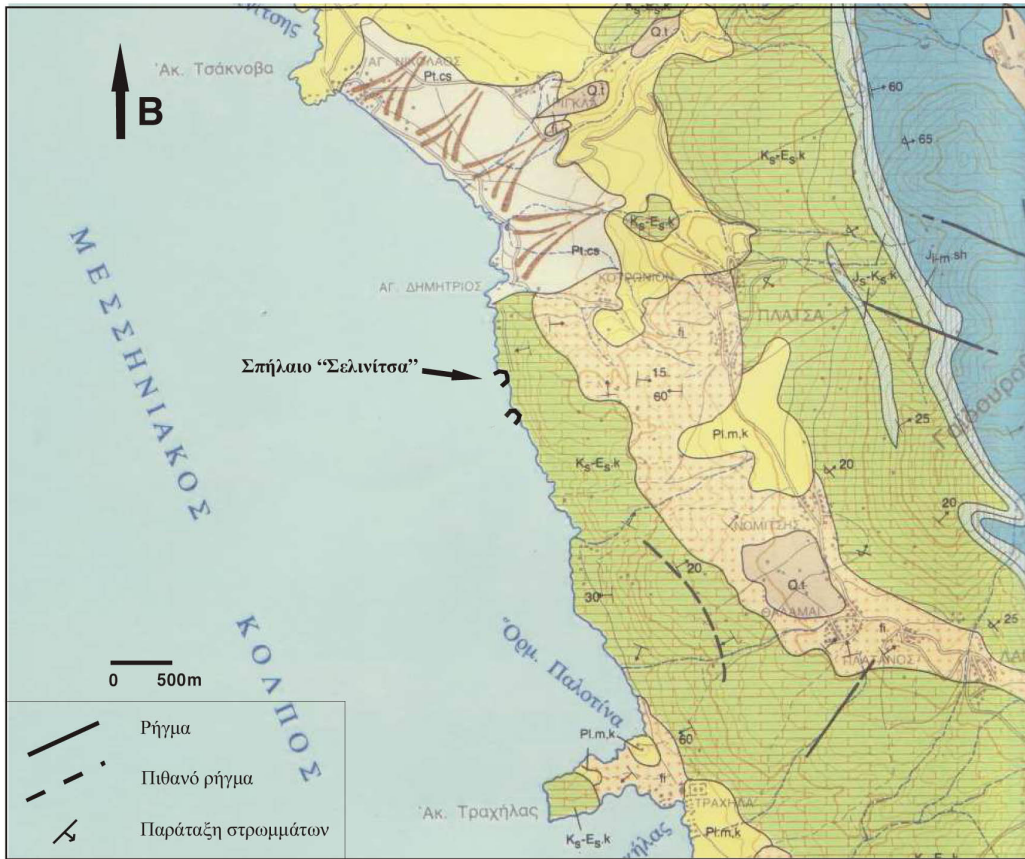
Απεικόνιση 2.4:
Κάτοψη του σπηλαίου
«Φράγχθι» (Jacobsen
& Rarrand 1988).

2.4. ΣΠΗΛΑΙΟ «ΣΕΛΗΝΙΤΣΑ» - ΘΕΣΗ / ΓΕΩΛΟΓΙΑ


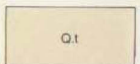
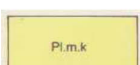


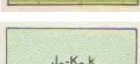
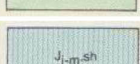
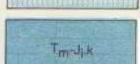
Το σπήλαιο «Σεληνίτσα» εντοπίζεται περίπου 1,5χλμ νότια του χωριού του Αγίου Δημητρίου, του Δήμου Λεύκτρου, της Μεσσηνιακής Μάνης (36°48'10.54"Β, 22°17'50.82"Ε). Η είσοδος του βρίσκεται σε απόλυτο υψόμετρο 2m και είναι προσβάσιμο από τη χέρσο. Αναπτύσσεται κατά μήκος νεοτεκτονικών ασυνεχειών σε διευθύνσεις ΒΒΔ με ΝΝΑ σε ασβεστόλιθους του Ανώτερου Σενωνίου - Ανώτερου Ηώκαινου της γεωτεκτονικής ενότητας της «Μάνης», η οποία χαρακτηρίζεται από μικρό βαθμό μεταμόρφωσης, έντονη κρυσταλλικότητα στους ασβεστολίθους και έντονη τεκτονική δομή (Καμπόλης 2007).

Σύμφωνα με το γεωλογικό χάρτη Ι.Γ.Μ.Ε. (κλίμακα 1:50000), φύλλο Ξηροκάμπιον (1983) η στρωματογραφική κολώνα έχει ως εξής:

1. Φλύσξης ελαφρά μεταμορφωμένος από αργιλικούς, μαργαϊκούς, πηλιτικούς ψαμμιτικούς σχιστολίθους και ψαμμίτες (Ανώτερο Ηώκαινο-Ολιγόκαινο)
2. Ασβεστόλιθους τεφρόλευκους κυρίως πλακώδεις ή μεσοστρωματώδεις (Ανώτερο Σενώνιο-Ανώτερο Ηώκαινο)
3. Ασβεστόλιθους κρυσταλλικούς, πλακώδεις με ενστρώσεις τεφρόφαιων πυριτόλιθων, Σειράς Βίγλας (Ανώτερο Ιουρασικό-Κρητιδικό)
4. Πυριτικοί σχιστόλιθοι με παρεμβολές ασβεστολιθικών στρώσεων (Κατώτερο-Ανώτερο Ιουρασικό)
5. Ασβεστόλιθοι Παντοκράτορα (Μέσο Τριαδικό και Κατώτερο Ιουρασικό)

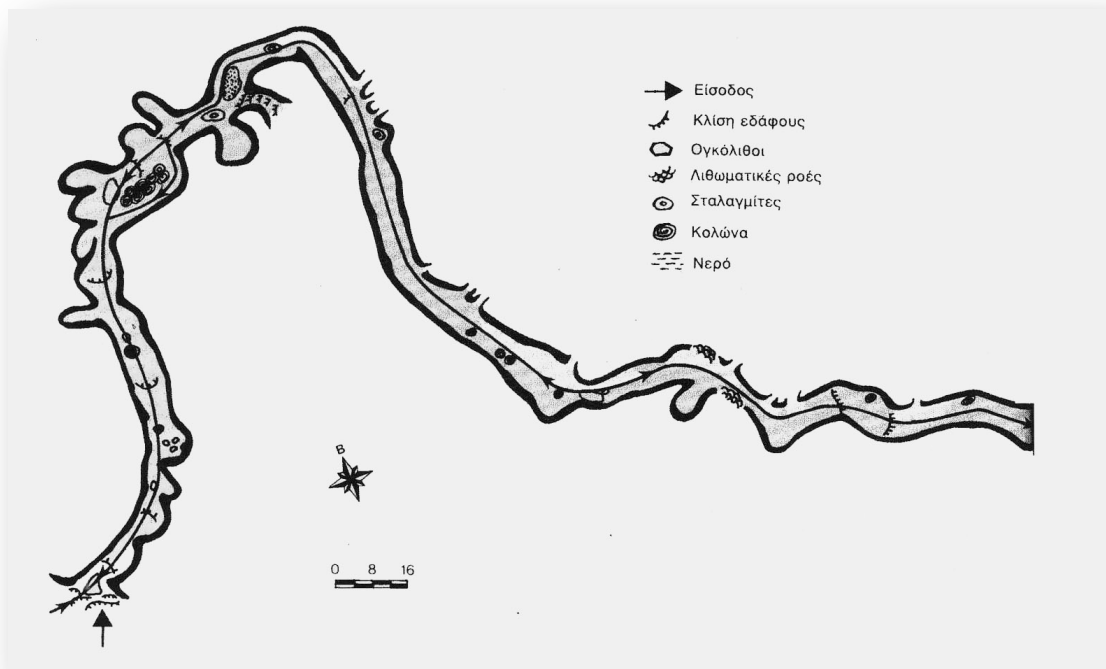


Υπόμνημα

	Παλαιοί & νέοι κώνοι κορημάτων (Ολόκαινο)	
	Αναβαθμίδες από ερυθρούς αργίλους, αργιούχες άμμους με διάσπαρτες λατύπες και με εναλλαγές από κροκαλολατυποπαγή (Πλειστόκαινο)	
	Θαλάσσιοι σχηματισμοί (Πλειόκαινο)	
	Φλύσσης	
	Ασβεστόλιθοι αν Σενονίου-αν. Ηοκάινου	Ενότητα Μάνης (Plattenkalk)
	Ασβεστόλιθοι σειράς Βίγλας (αν. Ιουρασικό-Κρητιδικό)	
	Πυριτικοί σχιστόλιθοι (κατ.-μέσο Ιουρασικό)	
	Ασβεστόλιθοι Παντοκράτορα (μέσο Τριαδικό-κατ. Ιουρασικό)	

Απεικόνιση 2.5: Γεωλογικός χάρτης της περιοχής του υπό μελέτη σπηλαίου «Σελινίτσα», φύλλο Ξηροκάμπιον (IGME).

Το σπήλαιο την περίοδο που η είσοδός του ήταν στο επίπεδο της θάλασσας, εκφόρτιζε τα νερά που συγκεντρώνονταν στην ευρύτερη περιοχή και λειτουργούσε ως υπόγειος ποταμός. Αυτό ενισχύεται και από τη λεία επιφάνεια των πετρωμάτων που υπάρχουν στον χώρο της εισόδου.



Απεικόνιση 2.6: Κάτοψη του σπηλαίου «Σεληνίτσα» (Πετροχείλου, Αρχείο Ελληνικής Σπηλαιολογικής Εταιρείας), Λελούδας (2005).

2.5. ΣΥΛΛΟΓΗ ΥΛΙΚΟΥ – ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ

Όργανα-Αναλώσιμα:

- LICOR LI1400
- Αποστειρωμένα νυστέρια, λαβίδες, βελόνες
- Μπουκάλια με βιδωτό πώμα, με αποστειρωμένο θρεπτικό διάλυμα BG11
- Σωληνάκια με βιδωτό πώμα με υδατικό διάλυμα φορμόλης

Αναλυτική περιγραφή διαδικασίας

Από κάθε σπήλαιο επιλέχθηκαν 7 δειγματοληπτικές θέσεις από την είσοδο προς το εσωτερικό, οι οποίες φέρουν αναπτύξεις κυανοβακτηρίων δια γυμνού οφθαλμού. Οι δειγματοληψίες ήταν εποχικές στη διάρκεια ενός έτους για κάθε σπήλαιο.

Επιχρίσματα από αναπτύξεις κυανοβακτηρίων (οροφή, διάκοσμος, δάπεδο) καθώς και δείγματα πέτρας (5-10gr) λαμβάνονται με τη βοήθεια αποστειρωμένων εργαλείων (νυστέρια, λαβίδες και βελόνες). Μέρος του δείγματος τοποθετείται σε αποστειρωμένα δοχεία με υγρό θρεπτικό διάλυμα BG11 (Stanier et al. 1971) και μέρος σε δοχεία με υδατικό διάλυμα φορμόλης 2,5% για τη διατήρηση και παρατήρηση φυσικού υλικού.

Η καταγραφή των περιβαλλοντικών παραμέτρων της Ενεργού Ακτινοβολίας Φωτοσύνθεσης (PAR, $\mu\text{moles} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$), της Θερμοκρασίας (T, °C) και της Σχετικής Υγρασίας (RH, %) πραγματοποιήθηκε με το όργανο LICOR LI1400. Το όργανο παρέμεινε σε κάθε δειγματοληπτική θέση για χρονικό διάστημα 10min όπου κατέγραψε τις μέσες τιμές του κάθε δευτερολέπτου για ένα λεπτό.

2.6. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ *IN VITRO*

Όργανα-Αναλώσιμα:

- Επωαστικός θάλαμος (Galenkamp, Sanyo)
- Αυτόκαυστο
- Κλίβανος
- Ζυγός
- Λύχνος Bunsen
- Κωνικές φιάλες των 100ml, 500ml, 1l
- Τρυβλία petri
- Αποστειρωμένες πιπέτες και λαβίδες

Θρεπτικά μέσα (Πίνακας 2.1):

- BG11 (Stanier et al. 1971)
- BG₀11 (χωρίς NaNO₃)

Σκοπός - Αναλυτική διαδικασία

Σκοπός των καλλιεργειών είναι η σύγκριση των μορφών που αναπτύσσονται σε εργαστηριακές συνθήκες με αυτές που προσδιορίζονται στο φυσικό υλικό, καθώς και η μελέτη του βιολογικού κύκλου όλων των παρατηρούμενων μορφών.

Ο εμβολιασμός έγινε τόσο *in situ*, όσο και στο εργαστήριο υπό αποστειρωμένες συνθήκες σε κωνικές φιάλες και τρυβλία με υγρό θρεπτικό διάλυμα. Η αναλυτική διαδικασία συνίσταται στα εξής βήματα:

- Κατασκευή του υγρού θρεπτικού μέσου σε φιάλες του 1L με βιδωτό πώμα
- Αποστείρωση σε αυτόκαυστο ή ξηρή αποστείρωση σε κλίβανο, καθαρών κωνικών φιαλών (100ml) πωματισμένων με υδρόφοβο βαμβάκι και αλουμινόχαρτο
- Αναγράφονται οι απαραίτητες πληροφορίες στις κωνικές φιάλες ή στα τρυβλία αντιστοίχως
- Αποστειρώνεται το στόμιο της φιάλης που περιέχει το θρεπτικό μέσο στη φλόγα για 2-3s και το μέσο μεταφέρεται στις αποστειρωμένες κωνικές φιάλες και στα τρυβλία
- Υπό αποστειρωμένες συνθήκες πραγματοποιείται εμβολιασμός με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur ή αποστειρωμένων λαβίδων.
- Οι καλλιέργειες αναπτύσσονται σε επωαστικό θάλαμο (Galenkamp, Sanyo) υπό σταθερές συνθήκες και σε δωμάτιο καλλιεργειών υπό φυσική ακτινοβολία και σταθερή θερμοκρασία T=24-25°C.

Στα χρησιμοποιηθέντα θρεπτικά διαλύματα το pH ρυθμίστηκε κατά περίπτωση με διάλυμα NaOH και HCl.

Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, πραγματοποιούνται ανακαλλιέργειες με στόχο τη συντήρηση πληθυσμών αλλά και την απομόνωση στελεχών (με ταξινομικό ενδιαφέρον) σε αμιγείς μονοκαλλιέργειες.

Ορισμένα είδη αναπτύσσονται ταχύτερα σε σχέση με άλλα και έχουν διαφορετική ανθεκτικότητα, καθώς και κύκλο ζωής. Η συντήρηση των καλλιεργειών στο εργαστήριο επετεύχθη με εμβολιασμούς ανακαλλιέργειας ανά 15-30 ημέρες, ανάλογα με το καλλιεργούμενο είδος. Η διαδικασία της ανανέωσης μπορεί ταυτόχρονα να γίνεται σε 2-4 κωνικές φιάλες ανάλογα με την ποσότητα του καλλιεργήματος. Η καθαρότητα των καλλιεργειών πρέπει να ελέγχεται διαρκώς και σε περίπτωση μόλυνσης η διαδικασία επαναλαμβάνεται εξ αρχής.

Πίνακας 2.1: Σύσταση του θρεπτικού μέσου καλλιεργειών BG11. Σημειωτέον πως το BG110 που χρησιμοποιήθηκε είναι παρομοιας σύστασης χωρίς όμως την προσθήκη NaNO_3

	Stock solution (g/100ml)	Nutrient solution (ml)
NaNO_3	15	10
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0,4	10
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,75	10
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,36	10
Citric acid	0,06	10
Ferric ammonium citrate	0,06	10
EDTA	0,01	10
Na_2CO_3	0,2	10
Mironutrient solution (Ιχνοστοιχεία)		1
Distilled water		919

ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ

Σε 1000ml distilled water	g
H_3BO_3	2,86
$\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,81
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,222
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,39
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,079
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0494

2.7. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

Όργανα - Αναλώσιμα:

- Στερεομικροσκόπιο Stemi Zeiss, 2000C
- Φωτονικό μικροσκόπιο Photomicroscope III Zeiss Axiolab
- Φωτογραφικός εξοπλισμός μικροσκοπιών SONYDSC-F717
- Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης JEOL JSM 35
- Συσκευή κρίσιμου σημείου Balzers, CPD 010, NO11120 C/422
- Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης TEM JEOL 1010
- Αντικειμενοφόροι, καλυπτρίδες

Αντιδραστήρια:

LM, SEM, TEM

- Γλυκερίνη, διάλυμα οξέων Pereny (Bornet & Flahaut 1889)
- Υδατικά διαλύματα αιθανόλης (10% - 100%), ακετόνη (100%), χρυσό/παλλάδιο
- Γλουταρική αλδεΐδη, διάλυμα κακοδυλικού νατρίου, τετροξείδιο του οσμίου, υδατικά διαλύματα ακετόνης, προπυλενοξείδιο, μίγμα ρητίνης, 2% οξικό ουρανύλιο, οξικός μόλυβδος

Αναλυτική διαδικασία

Ο ταξινομικός προσδιορισμός έγινε μετά από παρατήρηση φυσικού υλικού αλλά και υλικού καλλιεργειών με τη βοήθεια του φωτονικού μικροσκοπίου. Για την παρατήρηση των ενδολιθικών κυανοβακτηρίων, το ασβεστολιθικό υπόστρωμα προηγουμένως διαλύθηκε με διάλυμα Pereny (10% HNO₃, 0.5% Cr₂O₃, 95% C₂H₅OH - 4:3:3). Δείγματα ημιμονιμοποιήθηκαν με έγκλειση των δειγμάτων σε αντικειμενοφόρο πλάκα με γλυκερίνη.

Επιπροσθέτως, έγιναν παρατηρήσεις σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (**SEM**) και σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (**TEM**).

SEM-TEM

Για την παρατήρηση στο **SEM**, δείγματα φυσικού και καλλιεργημένου υλικού αφυδατώθηκαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις διαλύματος αιθυλικής αλκοόλης και τελικά εμβαπτίσθηκαν σε 100% αιθανόλη. Σε κάθε διάλυμα, το υλικό παρέμεινε 30min ενώ στο τελευταίο 3 φορές x 30min. Κατόπιν τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε διάλυμα ακετόνης 100% για 30min. Η αφυδάτωση του υλικού ολοκληρώθηκε σε συσκευή κρίσιμου σημείου. Ακολούθησε επικάλυψη με χρυσό/παλλάδιο και παρατήρηση στο SEM.

Για την παρατήρηση στο **TEM**, τα δείγματα αρχικά μονιμοποιήθηκαν με γλουταρική αλδεΰδη συγκέντρωσης 2,5% σε 0,1M διάλυμα κακοδυλικού νατρίου. Ακολουθεί έκπλυση με το διάλυμα κακοδυλικού νατρίου και στη συνέχεια δεύτερη μονιμοποίηση με τετροξείδιο του οσμίου συγκέντρωσης 1%. Ο χρόνος που απαιτείται για τη μονιμοποίηση είναι 1-2h. Μετά τη δεύτερη μονιμοποίηση, ακολουθεί αφυδάτωση για να αφαιρεθεί ο αδέσμευτος μονιμοποιητής. Η αφυδάτωση επιτυγχάνεται με διαδοχικά διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης ακετόνης (30%, 50%, 60%, 70%, 90%, 95%, και 100%) όπου το δείγμα παραμένει 15-20min.

Ακολουθεί η διαδικασία της εμπότισης-έγκλεισης. Ως μέσο μετάβασης χρησιμοποιείται το προπυλενοξείδιο σε δύο αλλαγές των 15min. Ακολουθεί σταδιακή ανάμειξη του προπυλενοξειδίου με μίγμα ρητίνης σε αναλογία 1/0,5, 1/1, και 0,5/1 και τελικά προστίθεται μίγμα ρητίνης.

Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται στο ψυγείο και τέλος σε κατάλληλες θήκες με καθαρή ρητίνη όπου και πολυμερίζονται σε 60°C για 48h-72h.

Τα δείγματα τεμαχίστηκαν με τη βοήθεια υπερμικροτόμου και μετά από κατάλληλη χρώση κατά Reynolds (1963), παρατηρήθηκαν σε TEM του Εργαστηρίου της Βοτανικής, του Τμήματος Φαρμακευτικής, Πανεπιστημίου της Ισπανίας καθώς και του Τμήματος Βιολογίας, Πανεπιστημίου Κρήτης (βλ. Lamprinou et al. 2011,2012, 2013 in press).

2.8. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ – ΜΕΘΟΔΟΣ BGLISH DYER

Όργανα-Αναλώσιμα:

- Περιστρεφόμενη συσκευή απόσταξης υπό κενό (flash evaporator)
- Συσκευή Buchner υπό κενό
- Φίλτρα Whatman GF/C 9,0 cm
- Κωνική φιάλη (1L)
- Διαχωριστική χοάνη
- Σιφώνιο
- Πιπέτες Pasteur
- Εσμυρισμένες κωνικές
- Ρεύμα Αζώτου

Αντιδραστήρια:

- Οργανικοί διαλύτες: χλωροφόρμιο, μεθανόλη

Αναλυτική διαδικασία

Η εκχύλιση των λιποειδών πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Διαιτολογίας και Διατροφής στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο. Για την εκχύλιση των ολικών λιποειδών ακολουθήθηκε η μέθοδος Bligh Dyer (Bligh et al. 1959). Από 15 μονοκαλλιέργειες, διαχωρίστηκαν τα κυανοβακτήρια από το θρεπτικό διάλυμα με φίλτρα Whatman GF/C 9,0cm σε συσκευή Buchner υπό κενό. Δημιουργείται μονοφασικό σύστημα διαλυτών με χλωροφόρμιο (CHCl_3), μεθανόλη (CH_3OH) και νερό (H_2O) σε αναλογίες 1:2:0,8 v/v/v. Γίνεται ανάδευση της κωνικής φιάλης, η οποία περιέχει το σύνολο των διαλυτών του μονοφασικού συστήματος, για 50 – 60 min, ώστε να επιτευχθεί η εκχύλιση από όλη τη μάζα του. Το μείγμα αφήνεται να ηρεμήσει για 15 min. Για τη δημιουργία του διφασικού συστήματος πρέπει η αναλογία των οργανικών διαλυτών να μετατραπεί σε CHCl_3 : CH_3OH : $\text{H}_2\text{O} \Rightarrow 1$: 1: 0,9 v/v/v.

Το όλον αναδεύεται, μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη και παραμένει σε ηρεμία για 15 min, ώστε να διαχωριστούν οι φάσεις (χλωροφορμική που περιέχει το σύνολο των λιποειδών και υδατομεθανολική που περιέχει πρωτεΐνες και υδατάνθρακες).

Αφού ο διαχωρισμός των φάσεων έχει ολοκληρωθεί, παραλαμβάνεται σε εσμυρισμένη κωνική η χλωροφορμική φάση (κάτω φάση), η οποία μας ενδιαφέρει γιατί περιέχει το σύνολο των λιποειδών. Η χλωροφορμική φάση παραλαμβάνεται με προσοχή, ώστε να μην παρασυρθεί μαζί της μέρος της στιβάδας που υφίσταται ανάμεσα στις δύο φάσεις.

Η εσμυρισμένη κωνική τοποθετείται σε περιστρεφόμενη συσκευή απόσταξης υπό κενό, για την εξάτμιση μέχρι ξηρού του διαλυτικού μέσου. Στη συνέχεια, γίνονται διαδοχικές

αναδιαλύσεις σε διάλυμα CHCl_3 : CH_3OH , 1:1 (v/v) με μικρές ποσότητες κάθε φορά. Η ποσότητα του διαλύματος καθορίζεται από την ποσότητα των λαμβανόμενων λιποειδών. Μετά την αναδιάλυση το περιεχόμενο φυλάσσεται σε ένα μεγάλο εσφυρισμένο προζυγισμένο σωλήνα.

Από τα ολικά λιποειδή (TL), που υπάρχουν σε σωλήνα με βιδωτό πώμα φυλάσσονται τα 2/10 σε άλλο σωλήνα με βιδωτό πώμα και εν συνεχεία οι διαλύτες εξατμίζονται μέχρι ξηρού με ρεύμα αζώτου, οπότε στον σωλήνα περιέχεται συγκεντρωμένη η συνολική ποσότητα των εκχυλισμένων λιποειδών.

2.9. ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΤΑ ΑΝΤΙΡΡΟΗ – ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ

Όργανα-Αναλώσιμα:

- Περιστρεφόμενη συσκευή απόσταξης υπό κενό (flash evaporator)
- Σιφώνιο
- Πιπέτες Pasteur
- Εσφυρισμένες κωνικές
- Ρεύμα Αζώτου

Αντιδραστήρια:

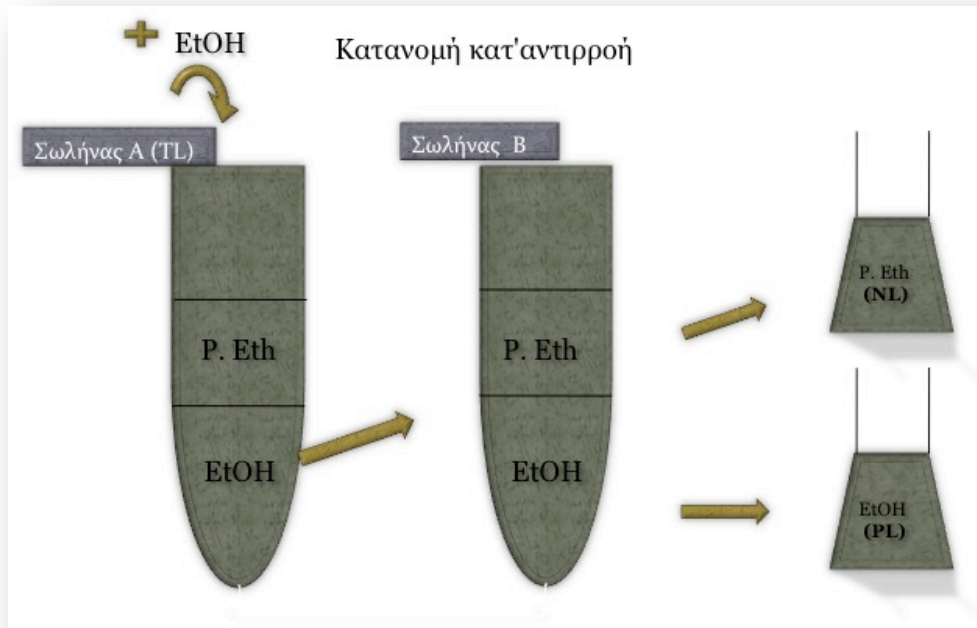
- Οργανικοί διαλύτες: αιθανόλη 87% προεξισσοροπημένη σε πετρελαϊκό αιθέρα (EtOH), πετρελαϊκός αιθέρας (P. Eth)

Αναλυτική Διαδικασία

Τα ολικά λιποειδή (TL) εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε άζωτο, για την απομάκρυνση των διαλυτών (CHCl_3 : CH_3OH). Για την κατανομή κατά αντιρροή χρειάζεται αιθανόλη 87%. Η EtOH 87% προεξισσοροπήθηκε με πετρελαϊκό αιθέρα (P. Eth) για την αποφυγή λανθασμένου διαχωρισμού σε ουδέτερα (NL) και πολικά (PL) λιποειδή.

Σε σωλήνα (A) τα TL αναδιαλύονται σε 18ml P.Eth προεξισσοροπημένου με 87% EtOH για την ποσοτική παραλαβή των λιποειδών και εν συνεχεία προστίθενται 6ml EtOH προεξισσοροπημένης με P.Eth. Ο σωλήνας ανακινείται και αφήνεται σε ηρεμία για τον σχηματισμό δύο φάσεων (P. Eth – EtOH). Μετά τον διαχωρισμό παραλαμβάνεται η κάτω φάση (EtOH) με πιπέτα Pasteur και μεταφέρεται σε δεύτερο δοκιμαστικό σωλήνα (B), ο οποίος περιέχει 18ml P.Eth. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και παραλαβή της αιθανολικής φάσης σε εσφυρισμένη κωνική. Στη συνέχεια προστίθενται στον πρώτο σωλήνα 6ml 87% EtOH και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία 8 φορές (Απεικόνιση 2.7).

Μετά τον διαχωρισμό παραλαμβάνουμε την κάτω αιθανολική φάση σε εσφυρισμένη κωνική, η οποία εντέλει περιέχει τα PL. Στον σωλήνα Β συγκεντρώνονται ο P.Eth, ο οποίος πλέον περιέχει τα NL.



Απεικόνιση 2.7: Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου κατανομή κατά αντιρροή.

Σε περιστρεφόμενη συσκευή απόσταξης υπό κενό αφού φυλλαχθούν τα 2/10 γίνεται εξάτμιση μέχρι ξηρού της εσφυρισμένης κωνικής φιάλης με την αιθανόλη και τα PL, καθώς και του P.Eth με τα NL.

Στη συνέχεια γίνονται διαδοχικές αναδιαλύσεις σε διάλυμα CHCl_3 : CH_3OH (1 : 1) v/v, με διαδοχικές ποσότητες και το διάλυμα που παραλαμβάνεται μεταφέρεται σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα τόσο για τα PL όσο και για τα NL και φυλάσσεται στο ψυγείο.

2.10. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΟΣ (TLC)

Όργανα-Αναλώσιμα:

- Σύστημα επίστρωσης πλακών TLC: Desaga
- Φυγόκεντρος Hermle
- Κλίβανος
- Γυάλινες πλάκες 20x20 cm
- Γυάλινοι θάλαμοι ανάπτυξης 25x25x10 cm
- Σύριγγα HPLC

Αντιδραστήρια:

- Οργανικοί διαλύτες: χλωροφόρμιο, μεθανόλη, ακετόνη, οξικό οξύ
- Πυριτικό οξύ (Silica gel G60, SiO₂)
- Πρότυπα λιποειδή
- Απεσταγμένο νερό
- Ατμοί I₂

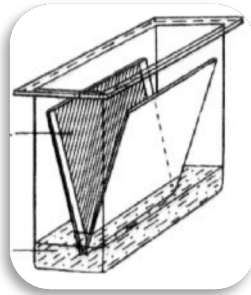
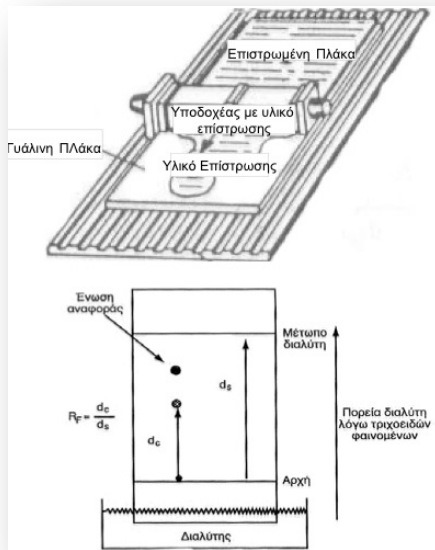
Αναλυτική διαδικασία

Μετά την εκχύλιση των ολικών λιποειδών με τη μέθοδο Bligh Dyer και τον διαχωρισμό τους σε πολικά και ουδέτερα με κατανομή κατ'αντιρροή, ακολούθησε χρωματογραφία λεπτής στιβάδος για διαχωρισμό των πολικών λιποειδών σε επιμέρους συστατικά, όπου χρησιμοποιούνται γυάλινες πλάκες επιστρωμένες με μία λεπτή στιβάδα στατικής φάσης που στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι πήκτωμα πυριτίου (Silica Gel).

Το πυριτικό οξύ αναμειγνύεται με νερό σε αναλογία 1:2 (w/v), ακολουθεί έντονη ανάδευση για 2min και το διάλυμα επιστρώνεται σε πλάκες διαστάσεων 20x20 cm με τη συσκευή Desaga. Οι πλάκες παραμένουν για 24h σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια τοποθετούνται σε κλίβανο στους 120 °C για 1h.

Εν συνεχεία, τοποθετείται το δείγμα και η πρότυπη ουσία στις πλάκες με τη βοήθεια σύριγγας HPLC, σε ύψος 2,5cm και οι πλάκες αναπτύσσονται σε προεξισορροπημένο σύστημα ανάπτυξης (χλωροφόρμιο C: ακετόνη ACOH: μεθανόλη M: οξικό οξύ C₂H₄O₂: απεσταγμένο νερό W) σε αναλογία (100:40:34:10:10).

Μετά το πέρας της ανάπτυξης, ο διαλύτης εξατμίζεται και εμφανίζεται η πλάκα σε ατμούς I₂. Οι σχηματιζόμενες ζώνες αποκόπτονται από την πλάκα και το ξύσμα φέρεται σε γυάλινα σωληνάκια με βιδωτό πώμα και εκχυλίζεται με C:M:W (1:2:0,8). Το πυριτικό οξύ απομακρύνεται, με φυγοκέντρηση.



2.10.1. ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΓΛΥΚΟΛΙΠΟΕΙΔΩΝ ΣΤΗΝ TLC

Όργανα:

- Κλίβανος
- Ζυγός

Αντιδραστήρια:

- Αιθανόλη
- α-ναφθόλη
- H_2SO_4

Αναλυτική διαδικασία

Αρχικά ετοιμάζεται το αλκοολικό διάλυμα (0,5%) της α-ναφθόλης ζυγίζοντας 0,5g α-ναφθόλη σε 100ml μεθανόλης:νερού (1:1).

Ψεκάζονται οι πλάκες TLC και αφού στεγνώσουν ψεκάζονται με $H_2SO_4-H_2O$ (95:5, v/v) και στη συνέχεια τοποθετούνται σε κλίβανο $120^\circ C$. Όλα τα γλυκολιποειδή εμφανίζονται ως ιώδεις κηλίδες.

2.11. ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ, ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΧΥΣΗΣ ΔΙΣΚΙΩΝ ΣΕ ΑΓΑΡ - KIRBY-BAUER

Όργανα-Αναλώσιμα:

- Επωαστικός θάλαμος
- Τρυβλία Petri
- Μικροβιολογικός κρίκος
- Βαμβακοφόρος στειλεός
- Δισκία (6mm)
- Αποστειρωμένες λαβίδες
- Φυσιολογικός ορός (NaCl)

Αντιδραστήρια:

- Θρεπτικό διάλυμα άγαρ Mueller-Hinton (MHB)
- Μεθανόλη
- Γενταμικίνη (GEN), Αμπικιλίνη (AMP), Κεφοξιτίνη (FOX), Τετρακυκλίνη (TET), Κιπροφλοξασίνη (CIP), Σουλφαμεθοξαζόλη-Τριμεθοπρίμη (SXT)

Βακτηριακά Στελέχη

1. πρότυπο στέλεχος *Staphylococcus aureus* (NCTC 6571), Gram⁺
2. κλινικό στέλεχος *Staphylococcus aureus* (MRSA 1629), Gram⁺
3. κλινικό στέλεχος *Staphylococcus* (MSSA 1646), Gram⁺
4. πρότυπο στέλεχος *Escherichia coli* (ATCC 25922), Gram⁻
5. πρότυπο στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), Gram⁻
6. πρότυπο στέλεχος *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), Gram⁺
7. κλινικό στέλεχος *Enterococcus faecalis* (VRE 880), Gram⁺
8. κλινικό στέλεχος *Enterococcus faecium* (VRE 1291), Gram⁺

Αναλυτική διαδικασία

Από καθαρό καλλιέργημα του μικροοργανισμού σε στερεό υλικό παρασκευάζεται σε φυσιολογικό ορό το μικροβιακό εναιώρημα, διαλυτοποιώντας το εμβόλιο σε 0,85% NaCl ώστε η θολερότητα να φθάσει την τιμή 10^8 cfu/ml δηλ. 0,5 της κλίμακας MacFarland.

Με βαμβακοφόρο στειλεό επιστρώνεται το μικροβιακό εναιώρημα (προτύπων και κλινικών) στελεχών σε τρυβλία με στερεοποιημένο θρεπτικό μέσο (Mueller-Hinton agar). Στη συνέχεια με αποστειρωμένες λαβίδες τοποθετούνται αποστειρωμένα διηθητικά δισκία διαμέτρου 6mm τα

οποία εμποτίζονται με την κατάλληλη ποσότητα της εξετασθείσας ουσίας (διαλυμένη σε μεθανόλη).

Τα τρυβλία επώστηκαν στους 37°C για 16-18h και πραγματοποιήθηκε ανάγνωση των ζωνών αναστολής, με υποδεκάμετρο. Οι ζώνες αναστολής συγκρίνονται με τον αντίστοιχο αρνητικό μάρτυρα (μεθανόλη) αλλά και με τους θετικούς μάρτυρες (GEN, AMP, FOX, TET, CIP, SXT).

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο μελέτης μικροβιακής αντοχής, Κεντρικό Εργαστήριο Δημόσιας Υγείας (ΚΕΔΥ-ΕΣΔΥ), Βάρη.

2.12. ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ, ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΡΑΙΩΣΗΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΥΓΡΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ – BROTH MICRORDILUTION METHOD (MIC)

Για τη «μικρομέθοδο» ακολουθήθηκε ακριβώς η διαδικασία όπως προβλέπεται από τη διεθνώς αποδεκτή οδηγία CLSI. Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει μικρούς όγκους θρεπτικού μέσου διαμοιρασμένους σε αποστειρωμένες πλάκες μικροτιτλοδότησης (96 θέσεων). Κάθε θέση έχει τελικό όγκο $V = 100\mu\text{l}$ ή $0,1\text{ml}$.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην έκθεση του μικροβιακού εναιωρήματος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της προς εξέταση ουσίας (αντιβιοτικό). Ως MIC ορίζεται η μικρότερη συγκέντρωση της ουσίας- αντιβιοτικό που δεν επιτρέπει την ανάπτυξη του μικροβίου *in vitro*.

2.12.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΔΙΑΛΥΜΕΝΗΣ ΥΠΟ ΕΞΕΤΑΣΗ ΟΥΣΙΑΣ (ΛΙΠΙΔΙΟΥ)

Όργανα-Αναλώσιμα:

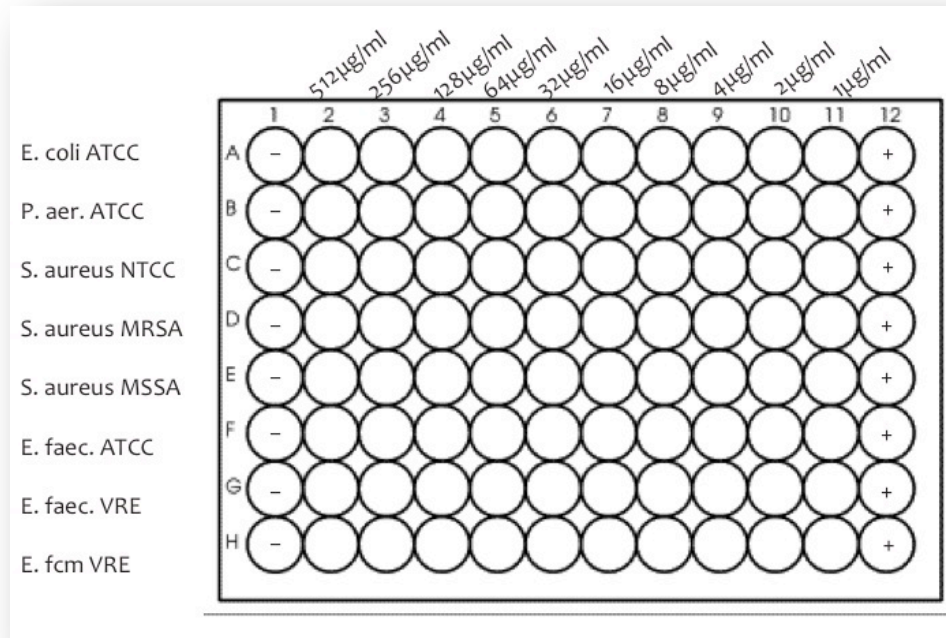
- Σωληνάκια με βιδωτό πώμα (10 για κάθε λιπίδιο)
- Mueller Hinton Broth (MHB)
- Πιπέτες
- Πλάκες μικροτιτλοδότησης 96 θέσεων

Αναλυτική Διαδικασία

Για κάθε ζώνη (λιπίδιο) παρασκευάστηκε το διάλυμα στη διπλάσια συγκέντρωση από την τελική που θα περιέχεται στις πλάκες μικροτιτλοδότησης, γιατί ελήφθησαν με πιπέτα 0.05ml και στη συνέχεια προστέθηκαν 0,05ml του μικροβιακού εναιωρήματος. Σε κάθε βιδωτό σωληνάκι τοποθετήθηκε κατάλληλος όγκος θρεπτικού μέσου (MHB) και προστέθηκε

κατάλληλος όγκος της ουσίας – αντιβιοτικό ώστε να γίνουν οι διαδοχικές αραιώσεις και να επιτευχθεί ή κατάλληλη συγκέντρωση.

Ενδεικτική πλάκα μικροτιτλοδότησης με τις συγκεντρώσεις της υπό εξέταση ουσίας - όπως διαφαίνεται στην παρακάτω απεικόνιση 2.8.



Απεικόνιση 2.8: Πλάκα μικροτιτλοδότησης. Στην πρώτη κάθετη σειρά τοποθετήθηκε ο αρνητικός μάρτυρας (control) δηλ. θρεπτικό μέσο χωρίς εμβόλιο, ενώ στην τελευταία το θρεπτικό μέσο με το εμβόλιο.

2.12.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ ΕΜΒΟΛΙΟΥ– ΕΠΩΑΣΗ

Όργανα-Αναλώσιμα:

- Σωληνάκια με βιδωτό πώμα
- Επωαστικός θάλαμος
- Παραφίλμ

Αναλυτική διαδικασία

Από απομονωμένες αποικίες που έχουν αναπτυχθεί (18 με 24 ώρες) σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό διάλυμα παρασκευάζεται μικροβιακό εναιώρημα τέτοιο ώστε η τελική συγκέντρωση των βακτηρίων να είναι 5×10^5 CFU/ml ή 5×10^4 CFU/θέση .

Αναλυτικότερα:

- Στάδιο 1: 1ml (1×10^8 CFU/ml) + 9ml (saline=φυσιολογικός ορός) $\rightarrow 10^7$ CFU/ml
- Στάδιο 2: 1ml_{στάδιο1} +9ml (saline=φυσιολογικός ορός) $\rightarrow 10^6$ CFU/ml

Μετά το πέρας των 15 min από την προετοιμασία του μικροβιακού εναιωρήματος, εμβολιάζεται το κάθε θέση της πλάκας μιτροτιλοδότησης με 0,05ml_{στάδιο2} $\rightarrow 5 \times 10^5$ CFU/ml. Μετά τον εμβολιασμό οι πλάκες καλύπτονται με παραφίλμ και επωάζονται στους $32 \pm 2^\circ$ C για 20 με 24 ώρες.

2.12.3. ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΑΠΟΙΚΙΩΝ (COLONY COUNT)

Όργανα-Αναλώσιμα:

- Πιπέτες
- Τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο, εκλεκτικό και μη
- Βαμβακοφόρος στείλεός

Αναλυτική διαδικασία

Για την επιβεβαίωση ότι η τελική συγκέντρωση του εμβολίου είναι πλησίον της τιμής 5×10^5 CFU/ml χρειάζεται η διαδικασία της μέτρησης των αποικιών. Από το εμβόλιο λαμβάνονται 0,1ml και επιστρώνονται με τη βοήθεια βαμβακοφόρου στείλεού σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο. Μετά την επώαση καταμετρώνται οι αποικίες οι οποίες θα πρέπει να ανέρχονται στις 50.

2.12.4 ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων συνίσταται στην παρατήρηση δια γυμνού οφθαλμού, στην πλάκα μικροτιτλοδότησης την αναστολή ανάπτυξης του οργανισμού.

MIC = η μικρότερη συγκέντρωση της αντιβακτηριακής ουσίας που αναστέλει απολύτως την ανάπτυξη του οργανισμού όπως ανιχνεύεται δια γυμνού οφθαλμού.

2.13. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η ταυτοποίηση απομονωμένων στελεχών κυανοβακτηρίων πραγματοποιήθηκε σε μοριακό επίπεδο με την ανάγνωση αλληλουχιών της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας SSU (16S rRNA)~1500 βάσεις.

Τα βασικά στάδια που ακολουθήθηκαν ήταν τα κάτωθι:

1. Απομόνωση DNA από αξενικές καλλιέργειες
2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για το γονίδιο 16S rRNA
3. Κλωνοποίηση και μετασχηματισμός των καθαρισμένων προϊόντων της PCR με τη χρήση TOPO TA Cloning kit, Invitrogen

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκαν 2 μέθοδοι: α) έτοιμα χημικά (UltraClean Soil DNA kit, MoBio Laboratories Inc. USA) και β) αντιδραστήρια σύμφωνα με τη πρωτόκολλο κατά Fiore et al. (2000).

2.13.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Όργανα-Αναλώσιμα:

- Φυγόκεντρος
- Ζυγός
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης DNA
- Συσκευή PCR
- Συσκευή ακμιομπής υπεριώδους (UV)
- Σιφώνια
- Σωληνάκια erpendorf
- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Κωνικές φιάλες
- Γάντια

Αντιδραστήρια:**α. Έτοιμα χημικά kit (UltraClean Soil DNA kit, MoBio Laboratories Inc. USA)****β. Αντιδραστήρια σύμφωνα με τη πρωτόκολλο κατά Fiore et al. (2000)**

Tris-HCl: 50mM, 0,1M, 10M

- EDTA: 2,5mM, 5mM, 20mM
- NaCl: 50mM, 1,4M, 4M
- Ρυθμιστικό διάλυμα CTAB: 3 % w/v
- Sarkosyl: 1%
- 2-mercaptoethanol: 1%
- Chloroform:isoamylacyl (24:1)
- Silica: 1g
- PBS: 50ml
- Αιθανόλη: 50% v/v

Αναλυτική Διαδικασία

Λαμβάνονται 1,5-5ml από τα καλλιεργημένα κύτταρα και φυγοκεντρώνται στις 12000 rpm για 15min (25°C). Παρασκευάζεται διάλυμα 1ml (50mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 50mM NaCl) στο οποίο γίνεται απόπλυση των συσσωματωμάτων των κυττάρων ύστερα από την παραπάνω φυγοκέντρηση. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 200μl διαλύματος (50mM Tris-HCl, 50mM EDTA).

Στη συνέχεια τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται σε προθερμασμένο διάλυμα 600μl (3% CTAB, 1% v/v Sarkosyl, 20mM EDTA, 1.4 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 1% v / v, 2-mercaptoethanol) (55 °C για 30min). Το διάλυμα αφήνεται να κρυσώσει για 30s πριν την προσθήκη 800μl (chloroform:isoamyl alcohol, 24:1 v/v).

Ακολουθεί φυγοκέντρηση (12000rpm για 5min, 25°C) και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωληνάκι φυγοκέντρου. Προστίθενται 50μl πυριτικού αιωρήματος (100mg/ml silica) και επωάζεται στους 55 °C σε υδατόλουτρο για 10min.

Αποβάλλεται το υπερκείμενο διάλυμα, προστίθενται 50ml PBS και επαναλαμβάνεται η παραπάνω διαδικασία. Μετά τη φυγοκέντρηση (2000 rpm για 2min) το συσσωμάτωμα επαναδιαλυτοποιείται σε 10ml (4M NaCl).

Αφαιρείται το πυρίτιο με φυκέντρηση (12000 rpm για 30 sec) και το συσσωμάτωμα ξεπλένεται δύο φορές σε 250μl διαλύματος (50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 2,5mM EDTA, 50% v/v ethanol).

Ακολουθεί έκπλυση του DNA σε 30μl ultrapure dH₂O, σε 45 °C, για 10min. Τέλος μετά από φυγοκέντρηση (12000 rpm για 1min) το υπερκείμενο διάλυμα που έχει το DNA μεταφέρεται σε αποστειρωμένους σωληνίσκους μικροφυγοκέντρησης (0,5ml).

2.13.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ (1%)

Όργανα - Αντιδραστήρια:

- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Αγαρόζη:2g
- Ρυθμιστικό διάλυμα (Tris Acetate EDTA), TAE: 200ml
- Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr): 6μl
- Χρωστική, orange dye

Αναλυτική διαδικασία

Ποσό DNA 4-5μl, χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της επιτυχούς απομόνωσης και ποιότητας του DNA με ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης.

Συγκεκριμένα, ζυγίζονται 2g αγαρόζης, τοποθετούνται σε κωνική φιάλη και προστίθενται 200ml TAE. Η φιάλη τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων για \approx 4min ώστε να διαλυθεί το υλικό. Ετοιμάζεται η μήτρα συσκευής και αφού κρυώσει το διάλυμα προστίθεται 6μl βρωμιούχου αιθιδίου. Μεταφέρεται το διάλυμα αγαρόζης στη συσκευή και αμέσως τοποθετούνται τα «κτενάκια». Απομακρύνονται οι φυσαλίδες με πιπέτα Pasteur και αφήνεται το διάλυμα μέχρι να πήξει.

Για 4-5μl DNA, προστίθεται 3μl H₂O και 3 μl χρωστική orange dye. Στη συνέχεια τοποθετούνται τα δείγματα στις κατάλληλες υποδοχές που έχουν σχηματιστεί από «κτενάκια» και γίνεται ηλεκτροφόρηση για μία ώρα σε 80V. Τέλος, παρατηρείται το πήκτωμα σε U.V. και φωτογραφίζεται.

2.13.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ PCR – ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 16S rRNA

Όργανα – Αντιδραστήρια

- Συσκευή PCR
- DNA
- Αποστειρωμένο, απιονισμένο νερό (dH₂O)
- Ρυθμιστικό διάλυμα PCR
- MgCl₂
- Μείγμα δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs)
- Εναρκτήρια νουκλεοτίδια (primers)
- Taq πολυμεράση
- Πάγος

Αναλυτική διαδικασία

Σε σωληνάκι erpendorf 1,5ml ετοιμάζεται το βασικό μίγμα (master mix) για το σύνολο των αντιδράσεων PCR. Η κάθε αντίδραση περιείχε: 1x ρυθμιστικό διάλυμα Taq (10 mM Tris–HCl (pH 9), 50 mM KCl και 0.1 % Triton X-100), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,3 μM από κάθε εναρκτήριο νουκλεοτίδιο (primer), 0,25 Units Taq πολυμεράση και dH₂O μέχρι τον όγκο των 19μl. Τα χρησιμοποιηθέντα εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια ήταν τα κάτωθι: CYA359F και CYA781R (Nübel et al. 1997) σε συνδυασμό με τα γενικά βακτηριολογικά εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια 27f και 1492r (Lane 1991).

Στη συνέχεια, τοποθετούνται σε σωληνάκια erpendorfs των 0,2ml, 19μl από το βασικό μίγμα (master mix) και 1μl DNA (5-10ng). Τέλος προγραμματίζεται η συσκευή PCR με τις συνθήκες που περιγράφονται αναλυτικά στον πίνακα 2.3. Στη συνέχεια οι αντιδράσεις αναλύονται σε πήκτωμα αγαρόζης (1%) στα 90V για 30min για τον έλεγχο επιτυχούς αντιγραφής των απαιτούμενων αλληλουχιών και την παραγωγή προϊόντος PCR.

2.13.4. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR

Όργανα - Αντιδραστήρια: (για μία αντίδραση)

- Φυγόκεντρος
- NaOAc 3M, pH 4,6: 1μl
- αιθανόλη (EtOH) 99%: 23μl
- αιθανόλη (EtOH) 70%: 70μl
- ddH₂

Αναλυτική διαδικασία

Σε κάθε θέση της πλάκας, που περιέχει 10μl προϊόντος PCR, τοποθετούνται 24μl από το διάλυμα (1μl NaOAc 3M, pH 4,6 και 23μl 99% αιθανόλης). Σφραγίζεται η πλάκα και αφού ανακινηθεί (vortex), αφήνεται στον πάγο για 20-30min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση με τις ακόλουθες συνθήκες, 3700 rpm, 30 min, +4°C. Αμέσως μετά τη φυγοκέντρηση και προσεκτικά αφαιρείται το κάλυμμα. Εν συνεχεία, καλύπτεται εκ νέου η πλάκα και τοποθετείται ανάστροφα σε φυγόκεντρο για 1min σε 1000 rpm ώστε να απομακρυνθεί η αιθανόλη. Το DNA παραμένει ως ίζημα στον πυθμένα.

Προστίθενται 70μl 70% αιθανόλης, καλύπτεται η πλάκα και φυγοκεντρείται σε 3700 rpm, 15 min, +4°C. Αμέσως καλύπτεται η πλάκα με διηθητικό χαρτί, αναποδογυρίζεται και φυγοκεντρείται για 1 min σε 1000rpm. Τα δείγματα αφήνονται να στεγνώσουν έως ότου η αιθανόλη εξατμιστεί πλήρως. Τέλος, διαλύονται τα ιζήματα DNA με ddH₂O.

2.13. 5. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR - ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ

Αντιδραστήρια

- πλασμίδιο PCR II-TOPO (TOPO TA Cloning kit, Invitrogen): 1μl
- T4 DNA ligase : 1μl 2,5u/μl
- ρυθμιστικό διάλυμα: 5μl
- προϊόν PCR
- X-gal (5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranoside): 40μl
- θρεπτικό υλικό Luria-Bertani (LB)
- αντιβιοτικό καναμυκίνη: 50 μg/ml

Αναλυτική διαδικασία

Για την κλωνοποίηση των καθαρισμένων προϊόντων PCR χρησιμοποιήθηκε το πακέτο TOPO TA Cloning® Kit (Version R) και εφαρμόστηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή (Invitrogen Ltd, Carlsbad, CA).

Τα καθαρισμένα προϊόντα PCR κλωνοποιήθηκαν στο πλασμίδιο-δέκτη (vector) pCR-II TOPO και εισήχθησαν σε κύτταρα Mach-T1 *E.coli*. Έπειτα έγινε επιστροφή των μετασχηματισμένων κυττάρων σε τρυβλία που περιείχαν θρεπτικό υλικό LB άγαρ, 50μg/ml αντιβιοτικό καναμυκίνη και 40μl X-gal (5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranoside) και τα επιστρωμένα πιάτα επώαστηκαν στους 37°C για 14-16 ώρες.

Η διαδικασία απομόνωσης των κλώνων έγινε με βάση το χρώμα των αποικιών. Στις αποικίες που αναπτύσσονται και έχουν μπλε χρώμα δεν έχει γίνει κλωνοποίηση (δηλαδή δεν έχει γίνει εισαγωγή του προϊόντος PCR στο πλασμίδιο-δέκτη), οπότε δεν έχει διακοπεί το γονίδιο που

παράγει τη β-γαλακτοσιδάση, αντιδρώντας με την X-gal και παράγοντας μπλέ χρωματισμού αποικίες. Αντιθέτως, στις αποικίες που αναπτύσσονται και έχουν λευκό χρώμα έχει γίνει η κλωνοποίηση.

Οι λευκές αποικίες που απομονώθηκαν μεταφέρθηκαν σε πλάκες με 96 θέσεις (96-well plates) που περιείχαν θρεπτικό υλικό Luria-Bertani (LB) με αντιβιοτικό καναμυκίνη συγκέντρωσης 50 µg/ml και επώαστηκαν για 12-14 ώρες στους 37 °C.

Όσοι κλώνοι ήταν θετικοί φυλάχτηκαν στους -80 °C σε 20 % γλυκερόλη. Εν συνεχεία ακολουθήσε ο έλεγχος των θετικών κλώνων δηλ αυτών που περιέχουν το επιθυμητό κομμάτι PCR, ~1500bp.

Ποσότητα 1 µl από τους αποικίες που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό LB, διαλύθηκε σε 20 µl απιονισμένου νερού (Merck) και έγινε θερμική λύση (heat sock) των κυττάρων με θέρμανση στους 98 °C για 10min και άμεση μεταφορά σε πάγο. Ποσότητα 1µl από τα λυμένα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε ως βάση DNA για να γίνει αντίδραση PCR.

Η αντίδραση PCR περιέχει: 1x PCR buffer [10 mM Tris-HCl (pH 9), 50 mM KCl και 0.1 % Triton X-100,], 1,5 mM MgCl₂, 500 nM από τους εκκινητές M13F και M13R, 200 µM dNTPs και 0,05 Units Taq πολυμεράση. Οι εκκινητές προσδένονται στο πλασμίδιο-δέκτη και χρησιμοποιούνται για να αποφευχθεί τυχόν ενίσχυση γενομικού 16s rDNA γονιδίου των κυττάρων *E.coli*. που φιλοξενούν το πλασμίδιο-δέκτη.

Οι συνθήκες της PCR περιγράφονται στον πίνακα 2.3. Τα προϊόντα της PCR ελέγχθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης

*Η ανάγνωση των καθαρισμένων αλληλουχιών των στελεχών *Toxopsis calypsus* και *Phormidium melanochroun*, έγινε στο Πανεπιστήμιο Yale της Αμερικής με το σύστημα ABI 3730xl 96 capillary sequencer (DNA Analysis facility on Science Hill, Yale University). Στη συνέχεια ο έλεγχος για χιμαιρικές αλληλουχίες με το πρόγραμμα Chimera Check software καθώς και η σύγκριση και η ευθυγράμμιση των αναγνωσμένων αλληλουχιών με τα προγράμματα CodonCode Aligner v 3.7.1 και Clustal X v 2 σύμφωνα με τις καταχωρημένες αλληλουχίες στην τράπεζα αλληλοχιών GenBank καθώς και η φυλογενετική προσέγγιση ταξινόμησης πραγματοποιήθηκε από την υποψήφια διαδάκτορα Σκαράκη Αικατερίνη στο ΕΛΚΕΘΕ της Κρήτης (οι διαδικασίες περιγράφονται αναλυτικά στις δημοσιεύσεις Lamprinou et al. 2012, 2013 in press)

Για το στέλεχος *Irhinoe spelaeobios* (και το συγκριτικό υλικό *Irhinoe cf. spelaeobios*) το σύνολο της μοριακής ανάλυσης έγινε στο Εργαστήριο Ιχθυολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του αναπληρωτή καθηγητή Κορμά Κ. και περιγράφεται αναλυτικά στις εργασίες Lamprinou et al. 2011,2013.

Πίνακας 2.2.: Κατάλογος εκκινητών (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό και την ανάγνωση αλληλουχιών (PCR)

Εκκινητές (primers)		Βιβλιογραφία
CYA359F	5'-GGGGAAT(C/T)TTCCGCAATGGG-3	Nübel et al. 1997
CYA781R	5'- GACTAC(A/T)GGGGTATCTAATCCC(A/T)TT-3'	Nübel et al. 1997
25F	5'- AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG -3'	Lane 1991
1492R	5'-TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT -3'	Lane 1991
M13F	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	
M13R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3';	

Πίνακας 2.3.: Λεπτομέρειες των κύκλων της PCR και της PCR κλωνοποίησης

PCR	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	94°C	5min	1
Αποδιάταξη	94°C	45s	
Αντιγραφή	56°C	45s	35
Επιμήκυνση	72 °C	1min	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	7min	1
PCR κλωνοποίησης	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	94°C	3min	1
Αποδιάταξη	94°C	45s	
Αντιγραφή	50 °C	45s	25
Επιμήκυνση	72 °C	2min	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	5min	1

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

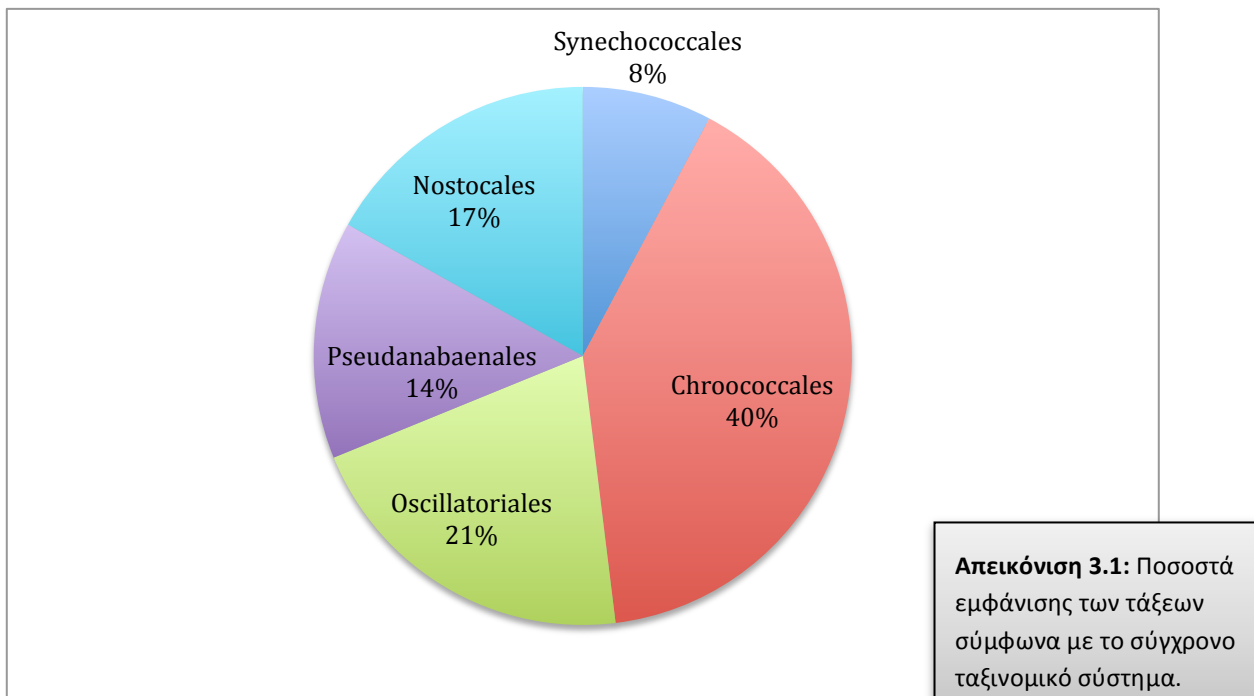
3.1. ΧΛΩΡΙΔΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

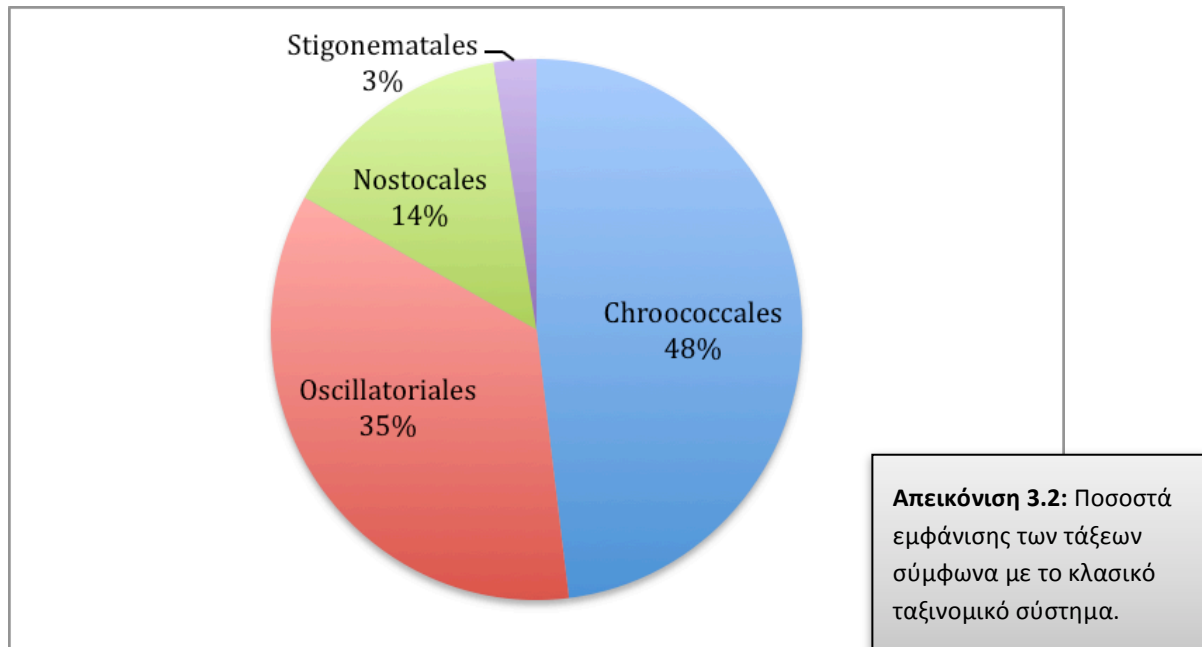
Για την αποτύπωση των χλωριδικών αποτελεσμάτων ελήφθησαν υπόψη και τα δύο ταξινομικά συστήματα, σύγχρονο και κλασικό, που αναλύθηκαν στην Εισαγωγή (Κεφάλαιο 1.8.2.). Η κύρια διαφορά τους έγκειται στον αριθμό των τάξεων. Στο κλασικό σύστημα ταξινόμησης (Geitler 1932, Anagnostidis & Komárek 1985, 1988, 1990, 1998 και Komárek & Anagnostidis 1986, 1989) οι τάξεις των κυανοβακτηρίων είναι (4) Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales, Stigonematales ενώ με βάση το σύγχρονο σύστημα ταξινόμησης οι τάξεις είναι (6) Gloeobacterales, Synechococcales, Pseudanabaenales, Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales (Komárek 2006).

3.1.1. ΣΠΗΛΑΙΟ «ΚΑΣΤΡΙΑ»

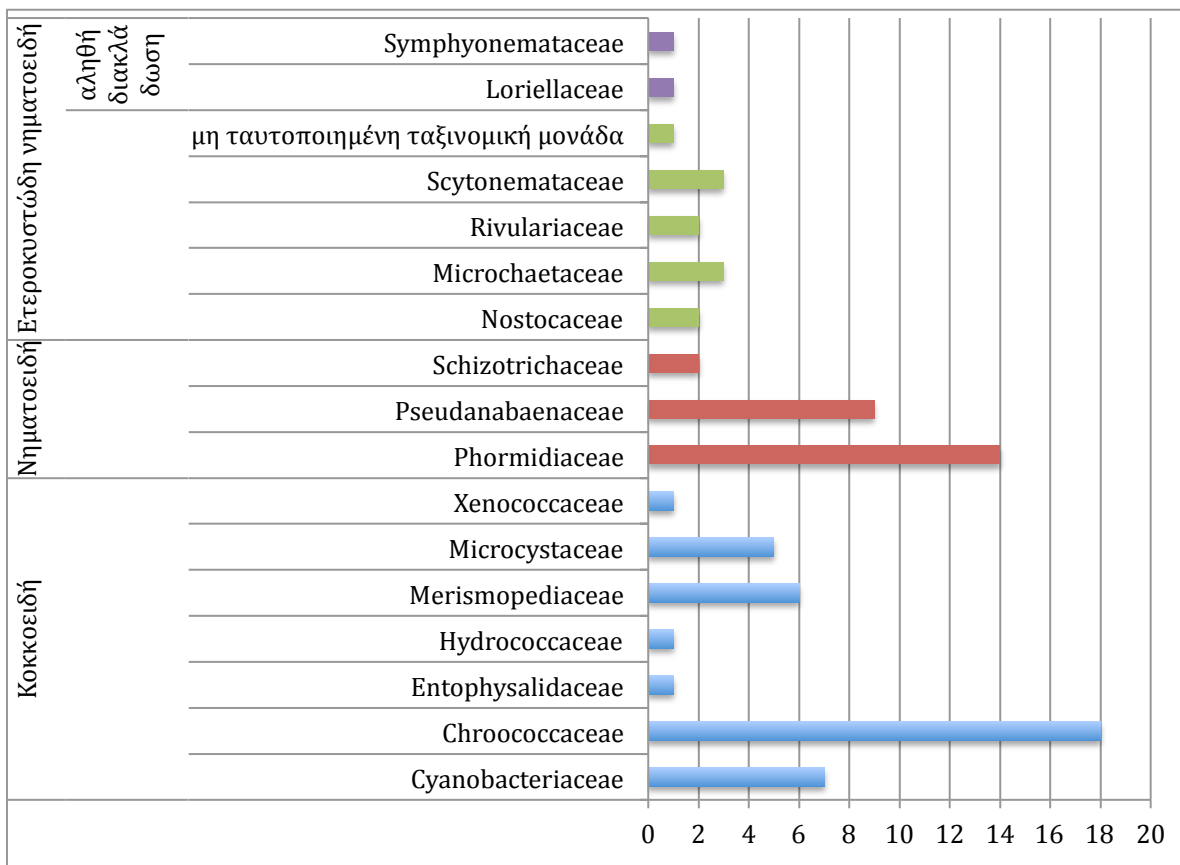
Στο σπήλαιο «Κασριά» πραγματοποιήθηκαν 4 εποχικές δειγματοληψίες στο χρονικό διάστημα (17/01/09 – 8/11/09) και επελέγησαν 7 δειγματοληπτικές θέσεις με αναπτύξεις κυανοβακτηρίων ορατές δια γυμνού οφθαλμού. Από ένα σύνολο 60 δειγμάτων, αναγνωρίστηκαν 76 ταξινομικές μονάδες εκ των οποίων 60 ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους.

Η κατανομή των ταξινομικών μονάδων σε οικογένειες, με βάση το σύγχρονο ταξινομικό σύστημα - που συμπεριλαμβάνει και μοριακά δεδομένα όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο της εισαγωγής (Hoffmann et al. 2005, Komárek 2006) - καθώς και με το κλασικό (Geitler 1932, Anagnostidis & Komárek 1998), φαίνονται στις παρακάτω απεικονίσεις.





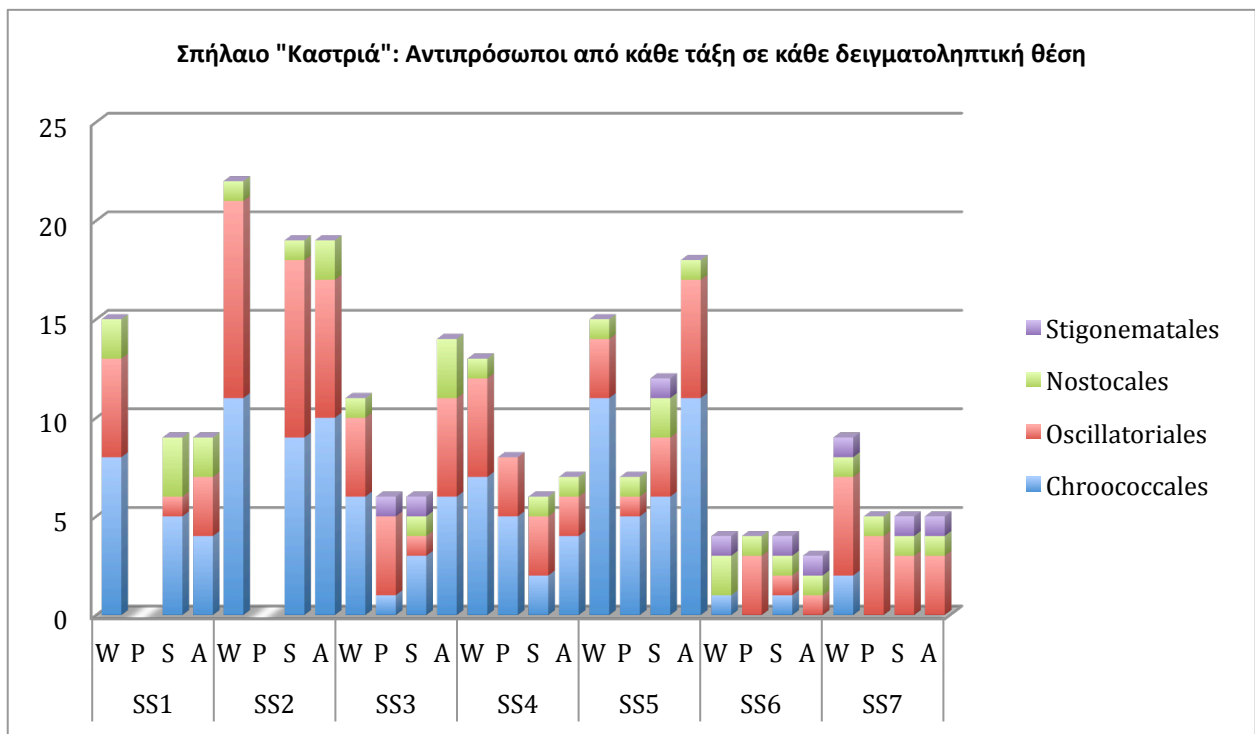
Απεικόνιση 3.3: Κατανομή των αναγνωρισμένων ταξινομικών μονάδων σε οικογένηες σύμφωνα με το σύγχρονο ταξινομικό σύστημα.



Για την εξαγωγή χλωριδικών συμπερασμάτων και για τη σύγκριση του λόγου *Chroococcales/Oscillatoriales* (ο οποίος μειώνεται καθώς μειώνεται το PAR με τελική επικράτηση των *Oscillatoriales*, Vinogradova et al. 1998, Roldán & Hernández-Mariné 2009), κατασκευάστηκε το διάγραμμα (Απεικόνιση 3.4) με το κλασικό ταξινομικό σύστημα, στο οποίο φαίνονται οι προσδιορισθείσες ταξινομικές μονάδες (αριθμητικά) σε κάθε δειγματοληπτική θέση, ανά δειγματοληπτική εποχή.

* Με SS (1-7) εμφανίζονται οι δειγματοληπτικές θέσεις (Sampling Sites) ενώ οι δειγματοληπτικές εποχές φαίνονται με τα παρακάτω σύμβολα:

- W= χειμώνας (Winter), P = άνοιξη (Spring), S = θέρος (Summer), A = φθινόπωρο (Autumn)



Απεικόνιση 3.4: Κατανομή των αντιπροσώπων σε κάθε τάξη, σε κάθε δειγματοληπτική θέση με βάση το κλασικό ταξινομικό σύστημα.

Είναι φανερόν, ότι στις εσωτερικές δειγματοληπτικές θέσεις (SS 6,7 – χαμηλότερες τιμές PAR) επικρατούν τα απλά νηματοειδή είδη της τάξης *Oscillatoriales* έναντι των κοκκοειδών της τάξης *Chroococcales*.

Εν συνεχεία, μελετώντας την κατανομή των ειδών στα γένη προκύπτουν τα εξής αποτελέσματα:

Από την τάξη *Chroococcales*: *Aphanocapsa* (3 είδη), *Aphanothece* (3 είδη και 2 ταξινομικές μονάδες με αποκλίσεις από τους τύπους των ειδών, προσδιορισμένες ως cf. ‘confer = compares with’), *Asterocapsa* (3 είδη, 1 *Asterocapsa* sp.), *Chlorogloea* (1 είδος), *Chroococcus* (7 είδη, 1 ταξινομική μονάδα με αποκλίσεις από τον τύπο του είδους και 1 *Chroococcus* sp.), *Cyanosarcina* (2 ταξινομικές μονάδες με αποκλίσεις από τους τύπους των ειδών), *Eucapsis* (2 είδη, 1 *Eucapsis* sp.), *Gloeocapsa* (5 είδη), *Gloeocapsopsis* (1 είδος, 1 *Gloeocapsopsis* sp.), *Gloeothece* (2 είδη), *Pleurocapsa* (1 ταξινομική μονάδα με αποκλίσεις από τον τύπο του είδους), *Pseudocapsa* (1 είδος) *Xenococcus* (1 ταξινομική μονάδα με αποκλίσεις από τον τύπο του είδους).

Από την τάξη *Oscillatoriales*: *Hydrocoleum* (2 είδη), *Leptolyngbya* (9 είδη), *Microcoleus* (1 ταξινομική μονάδα με μικρές αποκλίσεις από τον τύπο του είδους), *Phormidium* (8 είδη, 1 ταξινομική μονάδα με αποκλίσεις από τον τύπο του είδους), *Pseudophormidium* (2 είδη), *Schizothrix* (2 είδη).

Από την τάξη *Nostocales*: *Calothrix* (1 είδος), *Hassalia* (1 είδος), *Nostoc* (1 είδος, 1 *Nostoc* sp.), *Scytonema* (2 είδη, 1 *Scytonema* sp.), *Tolypothrix* (2 είδη), 1 ταξινομική μονάδα που ανήκει στην τάξη των *Nostocales* και απί του παρόντος με τα υπάρχοντα δεδομένα δεν κατέστη δυνατή η ταυτοποίησή του σε κάποιο από τα υπάρχοντα γένη των ετεροκυστωδών νηματοειδών κυανοβακτηρίων.

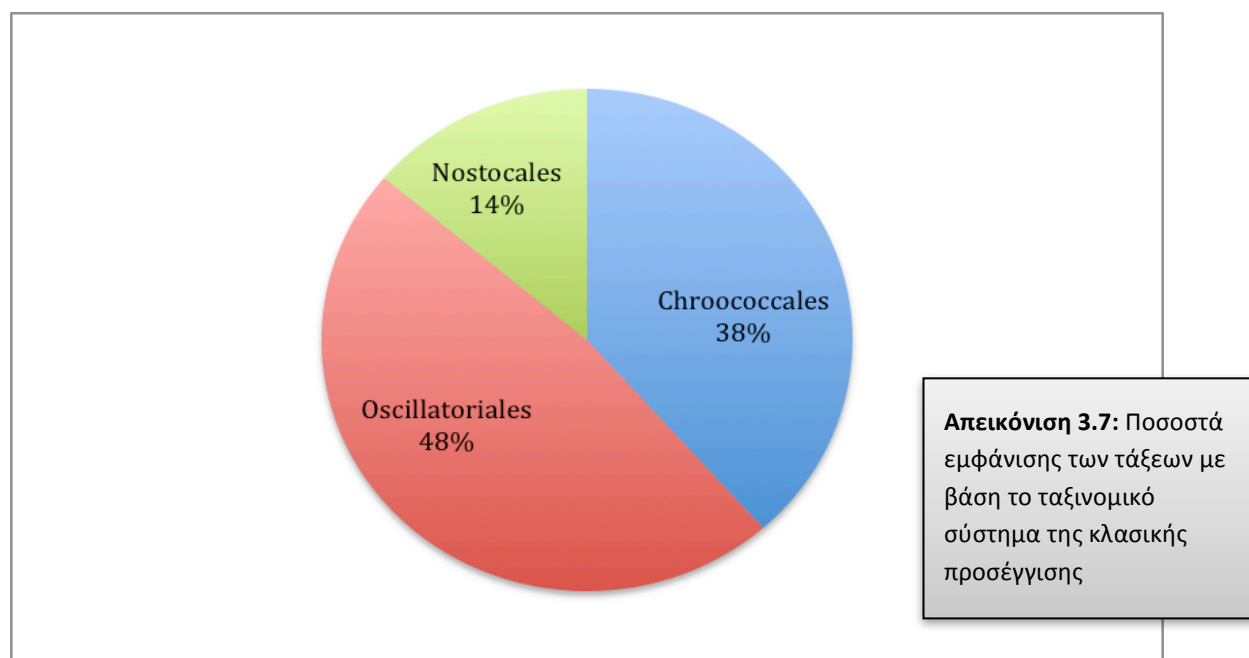
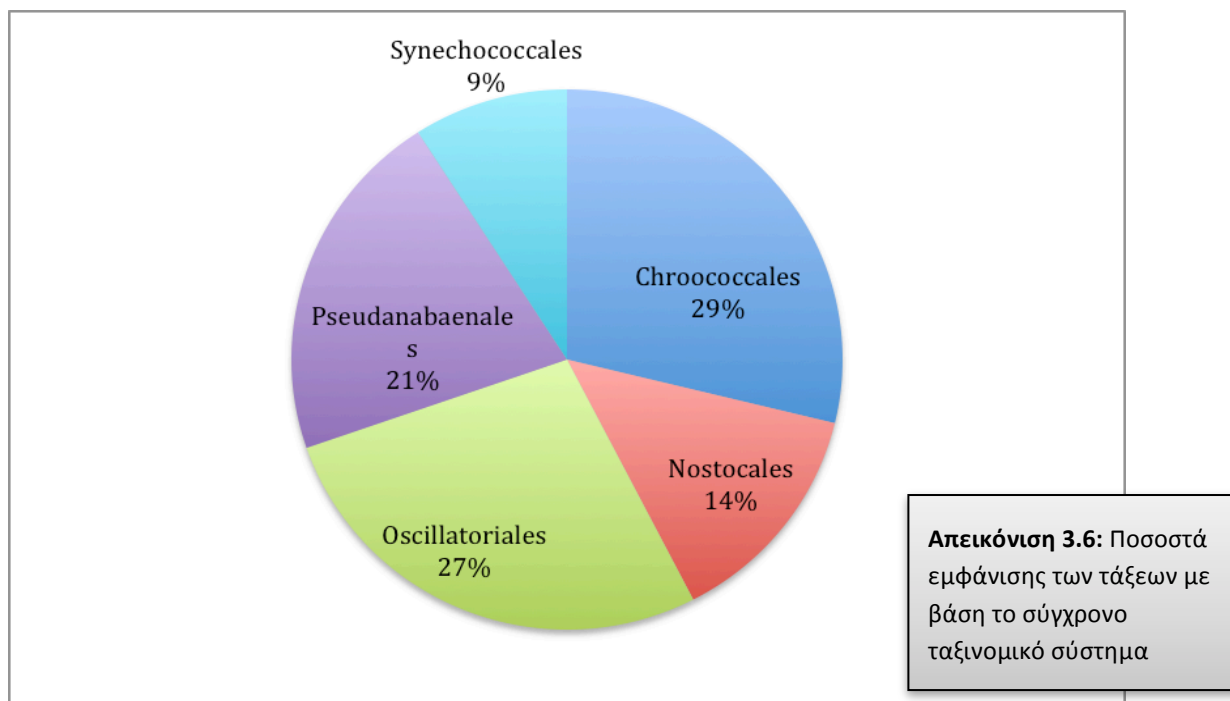
Από την τάξη *Stigonematales*: *Herpyzonema* (1 είδος) και ένα νέο γένος και είδος για την επιστήμη: *Irhinoe splaeobios* gen. nov. sp. nov. (Lamprinou & Pantazidou 2011). Ακολουθεί ο πίνακας με τα είδη των κυανοβακτηρίων που ανευρέθησαν σε κάθε δειγματοληπτική θέση και σε κάθε δειγματοληπτική περίοδο (Απεικόνιση 3.5).

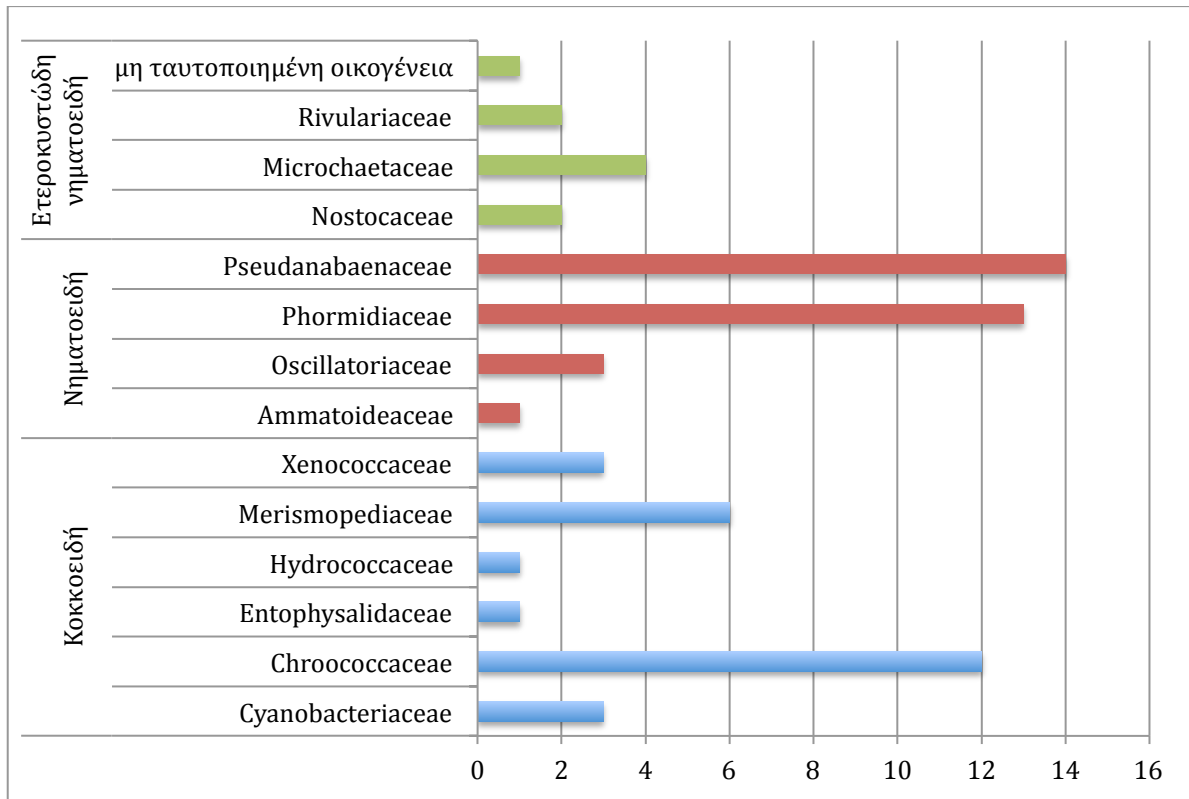
Species	K1W	K1P	K1S	K1A	K2W	K2P	K2S	K2A	K3W	K3P	K3S	K3A	K4W	K4P	K4S	K4A	K5W	K5P	K5S	K5A	K6W	K6P	K6S	K6A	K7W	K7P	K7S	K7A	
<i>Aphanocapsa fusco-lutea</i> Hansgîrg 1893				+																									
<i>Aphanocapsa muscicola</i> (Meneghini) Wille 1919				+																									
<i>Aphanocapsa parietina</i> Nâgeli 1849				+																									
<i>Aphanothece castagnei</i> (Brébisson) Rabenhorst 1865																													
<i>Aphanothece cf. rubra</i> Liebetanz 1925																													
<i>Aphanothece cf. rufescens</i> Hansgîrg 1892																													
<i>Aphanothece microscopica</i> Nâgeli 1849																													
<i>Aphanothece saxicola</i> Nâgeli 1849																													
<i>Asterocapsa aerophytica</i> Lederer 2000																													
<i>Asterocapsa jilnica</i> Xiao 2000																													
<i>Asterocapsa sinica</i> Liang & Chen 1985																													
<i>Asterocapsa</i> sp. Chu 1952																													
<i>Calothrix parietina</i> Huret ex Bornet & Flahault 1886																													
<i>Chlorogloea microcystoides</i> Geitler 1925																													
<i>Chroococcus cf. aphanocapsoides</i> Skuja ex Joosten 2006																													
<i>Chroococcus cohaerens</i> (Brébisson) Nâgeli 1849																													
<i>Chroococcus lithophilus</i> Ercegovic 1925																													
<i>Chroococcus minor</i> (Kützing) Nâgeli 1849																													
<i>Chroococcus</i> sp.2 Nâgeli 1849																													
<i>Chroococcus spelaeus</i> Ercegovic 1925																													
<i>Chroococcus subnudus</i> (Hansgîrg) Cronberg & Komárek 1994																													
<i>Chroococcus turgidus</i> (Kützing) Nâgeli 1849																													
<i>Chroococcus westii</i> Boye-Petersen 1923																													
<i>Cyanosarcina cf. burmensis</i> (Skuja) Kováčik 1988																													
<i>Cyanosarcina cf. spectabilis</i> (Geitler) Kováčik 1988																													
<i>Eucapsis minor</i> (Skuja) Elenkin 1933																													
<i>Eucapsis parralelepipeton</i> (Schmidle) Komárek et Hindák 1989																													
<i>Eucapsis</i> sp. 2 Clements & Shantz 1909																													
<i>Gloeocapsa bifformis</i> Ercegovic 1925																													
<i>Gloeocapsa bituminosa</i> (Bory) Kützing 1849																													
<i>Gloeocapsa caldarium</i> Rabenhorst 1865																													
<i>Gloeocapsa decorticans</i> (A. Braun) Richter 1925																													
<i>Gloeocapsa kuetzingiana</i> Nâgeli 1849																													
<i>Gloeocapsopsis pleurocapsoides</i> (Nováček) Komárek & Anagnostidis 1986																													
<i>Gloeocapsopsis</i> sp.2 Geitler 1925																													
<i>Gloeothece fusco-lutea</i> Nâgeli 1849																													
<i>Gloeothece rupestris</i> (Lybbye) Bornet in Wittrock & Nordstedt 1880																													
<i>Hassalia byssoidea</i> Hassall ex Bornet & Flahault 1888																													
<i>Herpizonema pulverulentum</i> Hernández-Maríné & Canals 1994																													
<i>Hydrocoleum homeotrichus</i> Kützing ex Gomont 1892																													
<i>Hydrocoleum stankovicii</i> Čado 1958																													
<i>Iphinoe spelaeobios</i> Lamprinou & Pantazidou 2011																													
<i>Leptolyngbya boryana</i> (Gomont) Anagnostidis & Komárek 1988																													
<i>Leptolyngbya cebennensis</i> (Gomont) Umezaki & Watanabe 1994																													
<i>Leptolyngbya ercegovicii</i> (Čado) Anagnostidis & Komárek 1988																													
<i>Leptolyngbya foveolarum</i> (Rabenhorst ex Gomont) Anagnostidis & Komárek 1988																													
<i>Leptolyngbya gracillima</i> (Zopf ex Hansgîrg) Anagnostidis & Komárek 1988																													
<i>Leptolyngbya lagerheimii</i> (Gomont) Anagnostidis & Komárek 1988																													
<i>Leptolyngbya palikiana</i> Claus 1955																													
<i>Leptolyngbya perelegans</i> (Lemmermann) Anagnostidis & Komárek 1988																													
<i>Leptolyngbya tenuis</i> (Gomont) Anagnostidis & Komárek 1988																													
<i>Microcoleus cf. chthonoplastes</i> (Mertens) Zanardini 1840																													
<i>Nostoc punctiforme</i> (Kützing ex Hariot) Hariot 1891																													
<i>Nostoc</i> sp. 3 Vaucher ex Bornet & Flahault 1888																													
<i>Nostocales</i> 2																													
<i>Phormidium animale</i> (Agardh ex Gomont) Anagnostidis & Komárek 1988																													
<i>Phormidium autumnale</i> (Agardh) Trevisan ex Gomont 1892																													
<i>Phormidium cf. ambiguum</i> Gomont ex Gomont 1892																													
<i>Phormidium corium</i> Gomont 1892																													
<i>Phormidium macedonicum</i> Čado 1959																													
<i>Phormidium melanochroun</i> Lamprinou & Pantazidou																													
<i>Phormidium molle</i> Gomont 1892																													
<i>Phormidium priestleyi</i> Fritsch 1917																													
<i>Phormidium setchellianum</i> Gomont 1892																													
<i>Pleurocapsa cf. fuliginosa</i> Hauck 1885																													
<i>Pseudocapsa dubia</i> Ercegovic 1925																													
<i>Pseudophormidium hollerbachianum</i> (Elenkin) Anagnostidis 2001																													
<i>Pseudophormidium spelaeoides</i> (Čado) Anagnostidis 2001																													
<i>Schizothrix lacustris</i> Braun ex Gomont 1892																													
<i>Schizothrix lardacea</i> Gomont 1892																													
<i>Scytonema hofmannii</i> var. calcic Agardh ex Bornet & Flahault 1887																													
<i>Scytonema julianum</i> (Kützing) Meneghini 1849																													
<i>Scytonema</i> sp. Agardh ex Bornet & Flahault 1887																													
<i>Tolypothrix cavernicola</i> Weber van Bosse 1913																													
<i>Tolypothrix distorta</i> Kützing ex Bornet & Flahault 1888																													
<i>Xenococcus cf. kernerii</i> Hansgîrg 1887																													

Απεικόνιση 3.5: Το σύνολο των ταξινομικών μονάδων στο σπήλαιο «Καστριά»

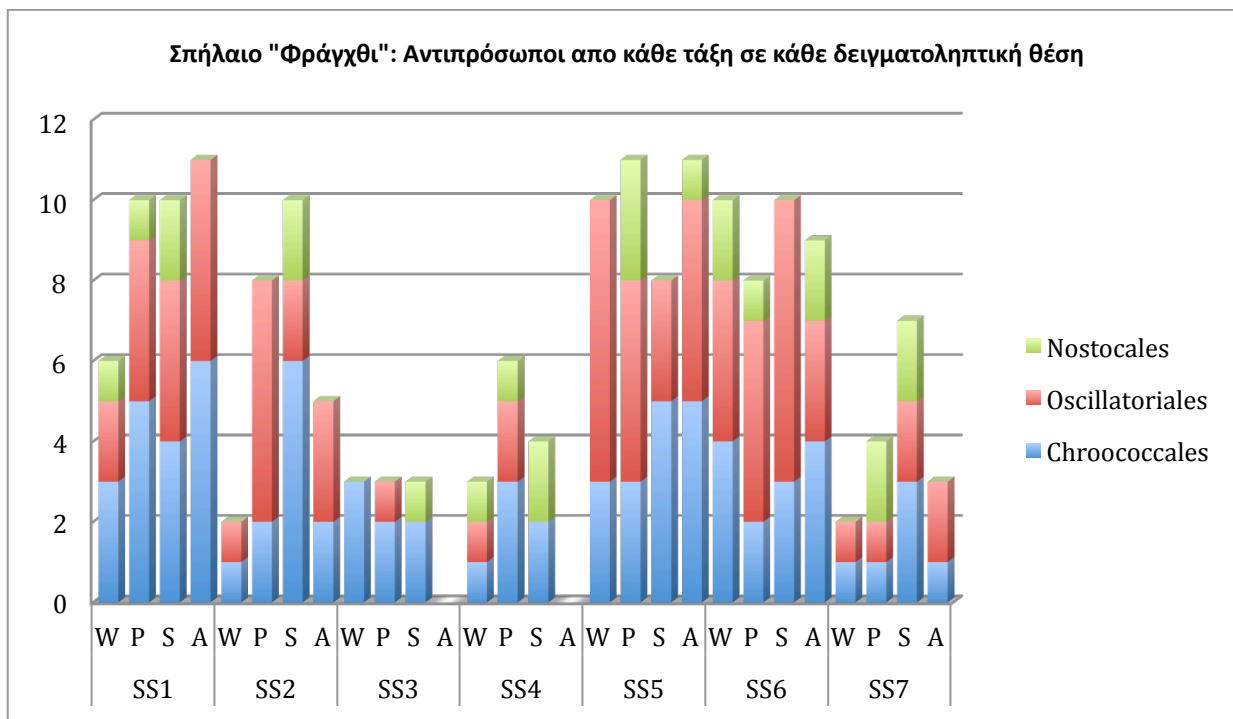
3.1.2. ΣΠΗΛΑΙΟ «ΦΡΑΓΧΘΙ»

Στο σπήλαιο «Φράγγθι» πραγματοποιήθηκαν 4 εποχικές δειγματοληψίες (7/12/08 – 7/11/09) και επελέγησαν 7 δειγματοληπτικές θέσεις με αναπτύξεις κυανοβακτηρίων ορατές δια γυμνού οφθαλμού. Από ένα σύνολο 56 δειγμάτων ταυτοποιήθηκαν 66 ταξινομικές μονάδες, 50 εκ των οποίων ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους.





Απεικόνιση 3.8: Κατανομή των αναγνωρισμένων ταξινομικών μονάδων σε οικογένειες σύμφωνα με το σύγχρονο ταξινομικό σύστημα.



Απεικόνιση 3.9: Κατανομή των αντιπροσώπων σε κάθε τάξη, σε κάθε δειγματοληπτική θέση με βάση το κλασικό ταξινομικό σύστημα.

Είναι φανερόν ότι στο συγκεκριμένο σπήλαιο με την ιδιομορφία ως προς τη μορφολογία (πτώση μέρους της οροφής), δεν παρατηρείται κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο στον λόγο *Oscillatoriales/Chroococcales*.

Από την τάξη *Chroococcales*: *Aphanocapsa* (2 είδη), *Aphanothece* (2 είδη), *Asterocapsa* (1 είδος), *Chlorogloea* (1 είδος), *Chroococcidiopsis* (2 είδη), *Chroococcus* (3 είδη, 2 ταξινομικές μονάδες με αποκλίσεις τους τύπους των ειδών, 1 *Chroococcus* sp.), *Cyanosarcina* (1 είδος, 1 *Cyanosarcina* sp.), *Eucapsis* (1 είδος, 1 ταξινομική μονάδα προσδιορισμένη ως cf. με αποκλίσεις από τον τύπο του είδους, 1 *Eucapsis* sp.), *Gloeocapsopsis* (3 είδη, 1 *Gloeocapsopsis* sp.), *Gloeothece* (1 είδος), *Myxosarcina* (1 *Myxosarcina* sp.), *Pleurocapsa* (1 είδος), *Synechocystis* (1 είδος).

Από την τάξη *Oscillatoriales*: *Homoeothrix* (1 είδος), *Leptolyngbya* (12 είδη, 2 ταξινομικές μονάδες με μικρές αποκλίσεις από τους τύπους των ειδών), *Oscillatoria* (1 είδος), *Phormidium* (7 είδη, 1 ταξινομική μονάδα προσδιορισμένη ως cf. με αποκλίσεις από τον τύπο του είδους, 1 *Phormidium* sp.), *Plectonema* (1 είδος), *Pseudophormidium* (2 είδη), *Symploca* (2 είδη).

Από την τάξη *Nostocales*: *Coleodesmium* (1 *Coleodesmium* sp.), *Calothrix* (2 *Calothrix* sp.1, *Calothrix* sp.2), *Nostoc* (1 είδος, 1 *Nostoc* sp.), *Tolypothrix* (2 είδη), 1 ταξινομική μονάδα που δεν κατέστη δυνατή η ταυτοποίηση της και ένα νέο γένος και είδος για την επιστήμη: *Toxopsis calypsus* gen. nov. sp. nov. Lamprinou & Pantazidou 2011

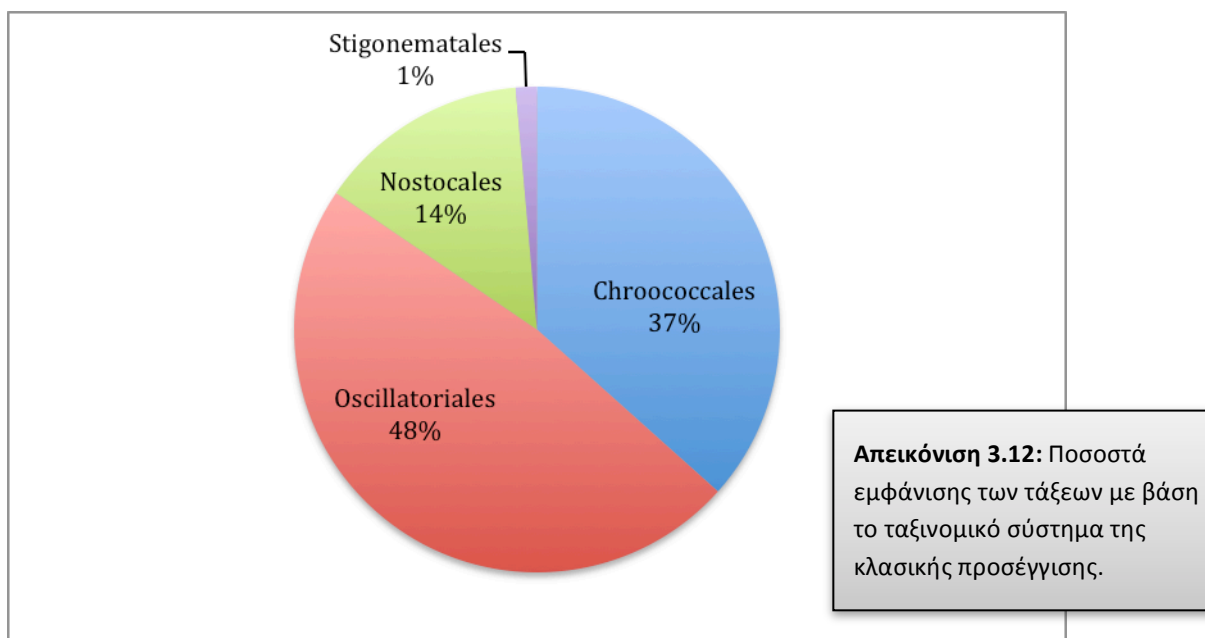
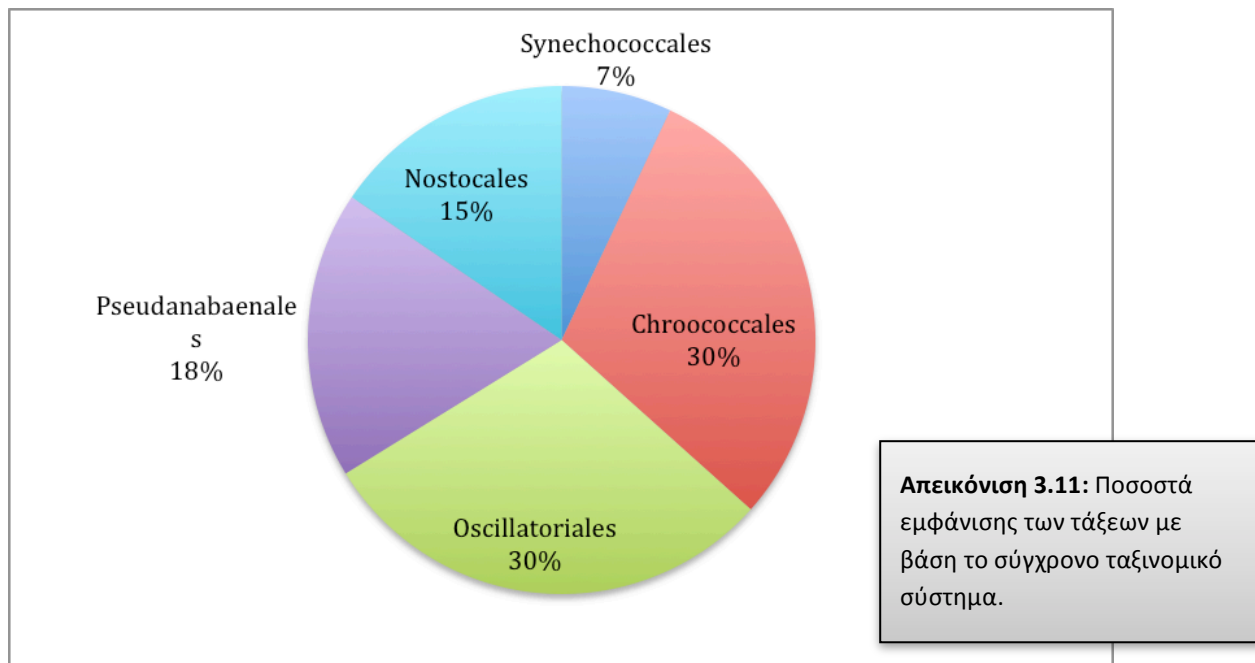
Ακολουθεί ο πίνακας με τα είδη των κυανοβακτηρίων που ανευρέθησαν σε κάθε δειγματοληπτική θέση και σε κάθε δειγματοληπτική περίοδο.

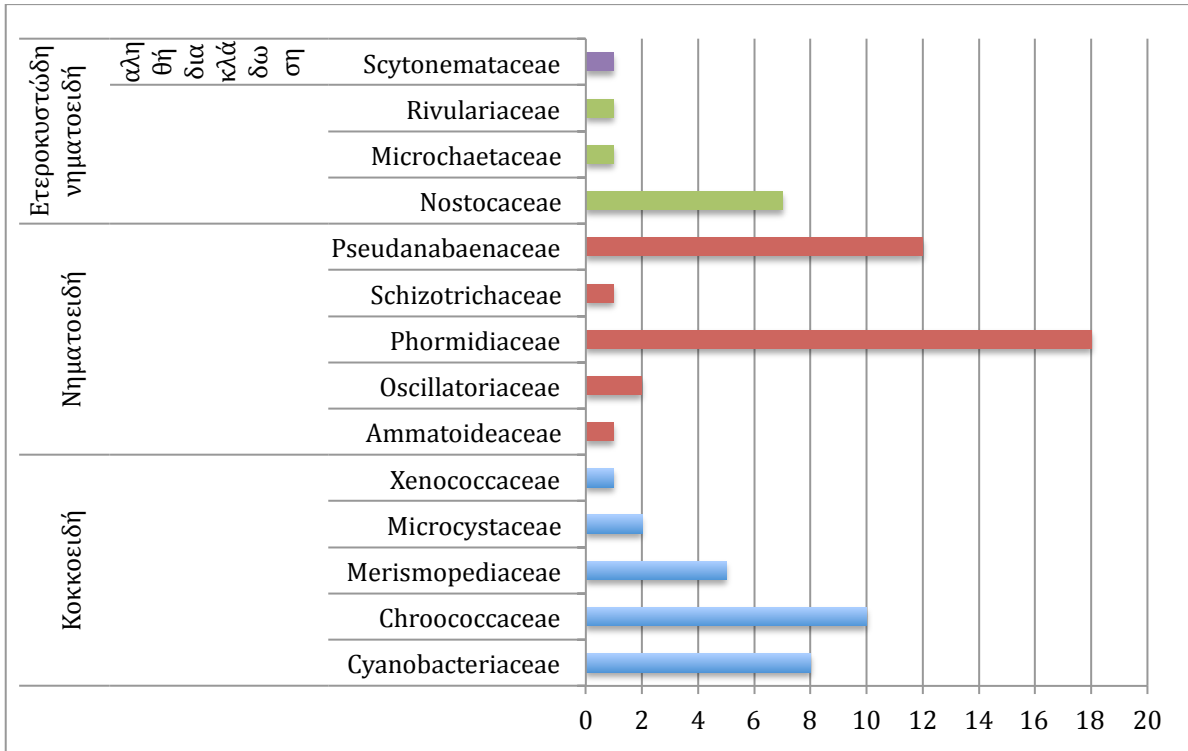
Species	F1W	F1P	F1S	F1A	F2W	F2P	F2S	F2A	F3W	F3P	F3S	F3A	F4W	F4P	F4S	F4A	F5W	F5P	F5S	F5A	F6W	F6P	F6S	F6A	F7W	F7P	F7S	F7A	
<i>Aphanocapsa grevillei</i> (Berkeley) Rabenhorst 1865																													
<i>Aphanocapsa muscicola</i> (Meneghini) Wille 1919				+	+			+	+										+	+	+					+			
<i>Aphanothece castagnei</i> (Brébisson) Rabenhorst 1865																													
<i>Aphanothece saxicola</i> Nägeli 1849				+																									
<i>Asterocapsa aerophytica</i> Lederer 2000									+			+								+	+								
<i>Calothrix</i> sp.1. Agardh ex Bornet & Flahault 1886																						+							+
<i>Calothrix</i> sp.2. Agardh ex Bornet & Flahault 1886																										+			+
<i>Chlorogloea novacekii</i> Komárek & Montejano 1994																+													
<i>Chroococciopsis doonensis</i> Singh 1968																													
<i>Chroococciopsis kashali</i> Friedmann 1961																													
<i>Chroococcus</i> cf. <i>lithophilus</i> Ercegović 1925																													
<i>Chroococcus</i> sp.1. Nägeli 1849																													
<i>Chroococcus spelaeus</i> Ercegović 1925																													
<i>Chroococcus subnudus</i> (Hansgirg) Cronberg & Komárek 1994																													
<i>Chroococcus subsphaericus</i> Gardner 1927																													
<i>Chroococcus turgidus</i> (Kützing) Nägeli 1849																													
<i>Coleodesmium</i> sp. Borzi ex Geitler 1942																													
<i>Cyanosarcina parthenonensis</i> Anagnostidis in Anagnostidis & Pantazidou 1991																													
<i>Cyanosarcina</i> sp. 1. Kováčik 1988																													
<i>Eucapsis</i> cf. <i>terrestris</i> Akiyama 1965																													
<i>Eucapsis minor</i> (Skuja) Elenkin 1933																													
<i>Eucapsis</i> sp. 1. Clements & Shantz 1909																													
<i>Gloeocapsopsis crepidinum</i> (Thuret) Geitler ex Komárek 1993																													
<i>Gloeocapsopsis cyanea</i> (Krieger) Komárek & Anagnostidis 1994																													
<i>Gloeocapsopsis pleurocapsoides</i> (Nováček) Komárek & Anagnostidis 1986																													
<i>Gloeocapsopsis</i> sp.1. Geitler 1925																													
<i>Gloeothece palea</i> (Kützing) Rabenhorst 1865																													
<i>Homeothrix varians</i> Geitler 1927																													
<i>Leptolyngbya cebennensis</i> (Gomont) Umezaki & Watanabe 1994																													
<i>Leptolyngbya</i> cf. <i>carnea</i> (Kützing ex Lemmermann) Anagnostidis & Komárek 1988																													
<i>Leptolyngbya</i> cf. <i>compacta</i> (Kützing ex Hansgirg) Komárek 2001																													
<i>Leptolyngbya ercegovicii</i> (Čado) Anagnostidis & Komárek 1988																													
<i>Leptolyngbya foveolarum</i> (Rabenhorst ex Gomont) Anagnostidis & Komárek 1988																													
<i>Leptolyngbya gracillima</i> (Zopf ex Hansgirg) Anagnostidis & Komárek 1988																													
<i>Leptolyngbya henningsii</i> (Lemmermann) Anagnostidis 2001																													
<i>Leptolyngbya lagerheimii</i> (Gomont) Anagnostidis & Komárek 1988																													
<i>Leptolyngbya lurida</i> (Gomont) Anagnostidis & Komárek 1988																													
<i>Leptolyngbya nana</i> (Tilden) Anagnostidis & Komárek 1988																													
<i>Leptolyngbya palikiana</i> Claus 1955																													
<i>Leptolyngbya perelegans</i> (Lemmermann) Anagnostidis & Komárek 1988																													
<i>Leptolyngbya purpurascens</i> (Gomont ex Gomont) Anagnostidis & Komárek 1988																													
<i>Leptolyngbya truncata</i> (Lemmermann) Anagnostidis & Komárek 1988																													
<i>Myosarcina</i> sp. Printz 1921																													
<i>Nostoc punctiforme</i> (Kützing ex Hariot) Hariot 1891																													
<i>Nostoc</i> sp. 1. Vaucher ex Bornet & Flahault 1888																													
<i>Nostocales</i> 1																													
<i>Oscillatoria rupicola</i> Hansgirg 1890																													
<i>Phormidium kuetzingianum</i> (Kirchner) Anagnostidis & Komárek 1988																													
<i>Phormidium ambiguum</i> Gomont ex Gomont 1892																													
<i>Phormidium autumnale</i> (Agardh) Trevisan ex Gomont 1892																													
<i>Phormidium</i> cf. <i>griseo violaceum</i> (Skuja) Anagnostidis 2001																													
<i>Phormidium corium</i> Gomont 1892																													
<i>Phormidium macedonicum</i> Čado 1959																													
<i>Phormidium melanochroun</i> Lamprinou & Pantazidou																													
<i>Phormidium priestleyi</i> Fritsch 1917																													
<i>Phormidium</i> sp. Kützing ex Gomont 1892																													
<i>Plectonema araucanum</i> Schwabe 1960																													
<i>Pleurocapsa fuliginosa</i> Hauck 1885																													
<i>Pseudophormidium hollerbachianum</i> (Elenkin) Anagnostidis 2001																													
<i>Pseudophormidium spelaoides</i> (Čado) Anagnostidis 2001																													
<i>Symplocia lacrimans</i> Claus 1962																													
<i>Symplocia muralis</i> Kützing ex Gomont 1892																													
<i>Synechocystis pevalekii</i> Ercegović 1925																													
<i>Tolypothrix fragilissima</i> Ercegović 1925																													
<i>Tolypothrix rivularis</i> Hansgirg 1891																													
<i>Toxopsis calypsus</i> Lamprinou & Pantazidou 2012																													

Απεικόνιση 3.10: Το σύνολο των ταξινομικών μονάδων στο σπήλαιο «Φράγγχι».

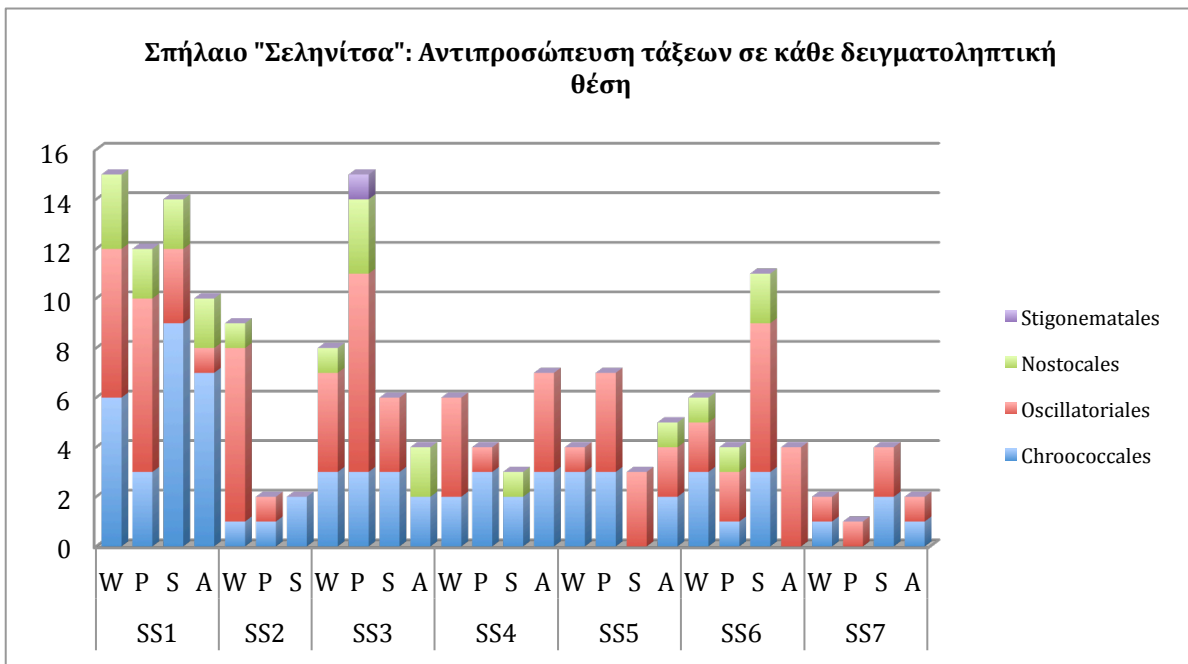
3.1.3. ΣΠΗΛΑΙΟ «ΣΕΛΗΝΙΤΣΑ»

Στο σπήλαιο «Σεληνίτσα» πραγματοποιήθηκαν 4 εποχικές δειγματοληψίες στο χρονικό διάστημα (7/04/10 – 23/02/11) και επελέγησαν 7 δειγματοληπτικές θέσεις με αναπτύξεις κυανοβακτηρίων ορατές δια γυμνού οφθαλμού. Από ένα σύνολο 56 δειγμάτων ταυτοποιήθηκαν 71 ταξινομικές μονάδες, εκ των οποίων οι 62 ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους





Απεικόνιση 3.13: Κατανομή των αναγνωρισμένων ταξινομικών μονάδων σε οικογένειες σύμφωνα με το σύγχρονο ταξινομικό σύστημα.



Απεικόνιση 3.14: Κατανομή των αντιπροσώπων σε κάθε τάξη, σε κάθε δειγματοληπτική θέση με βάση το κλασικό ταξινομικό σύστημα.

Στο συγκεκριμένο σπήλαιο ο λόγος *Oscillatoriales/Chroococcales* εμφανίζει το αναμενόμενο πρότυπο της επικράτησης των απλών νηματοειδών taxa, στις θέσεις με χαμηλότερη φωτοσυνθετική ακτινοβολία.

Ακολουθεί η κατανομή των ειδών σε γένη:

Από την τάξη *Chroococcales*: *Aphanocapsa* (1 είδος και 1 ταξινομική μονάδα προσδιορισμένη ως cf. με αποκλίσεις από τον τύπο του είδους), *Aphanothece* (5 είδη), *Asterocapsa* (1 είδος), *Chroococciopsis* (1 είδος), *Chroococcus* (6 είδη), *Cyanosarcina* (1 είδος, 1 *Cyanosarcina* sp.), *Cyanothece* (1 είδος), *Eucapsis* (2 είδη), *Gloeocapsa* (2 είδη), *Gloeocapsopsis* (1 είδος), *Gloeothece* (2 είδη), *Synechocystis* (1 είδος).

Από την τάξη *Oscillatoriales*: *Leptolyngbya* (10 είδη), *Microcoleus* (1 είδος), *Oscillatoria* (1 είδος, 1 ταξινομική μονάδα προσδιορισμένη με επιφύλαξη (ως cf.) με αποκλίσεις από τον τύπο του είδους), *Phormidicohaete* (1 είδος), *Phormidium* (12 είδη, 1 ταξινομική μονάδα προσδιορισμένη ως cf. με αποκλίσεις από τον τύπο του είδους), *Pseudanabaena* (2 είδη), *Pseudophormidium* (2 είδη), *Schizothrix* (1 είδος), *Symploca* (2 είδη).

Από την τάξη *Nostocales*: *Calothrix* (1 ταξινομική μονάδα προσδιορισμένη ως cf. με αποκλίσεις από το τυπικό είδος), *Microchaete* (1 ταξινομική μονάδα με μικρές αποκλίσεις από τον τύπο του είδους), *Nostoc* (5 είδη, 2 μορφότυποι *Nostoc* sp.1, *Nostoc* sp.2), *Scytonema* (1 είδος).

Από την τάξη *Stigonematales*: 1 ταξινομική μονάδα μη ταυτοποιημένη σε επίπεδο γένους, η οποία εμφανίζει μεγάλο ταξινομικό ενδιαφέρον.

Species	S1W	S1P	S1S	S1A	S2W	S2P	S2S	S2A	S3W	S3P	S3S	S3A	S4W	S4P	S4S	S4A	S5W	S5P	S5S	S5A	S6W	S6P	S6S	S6A	S7W	S7P	S7S	S7A
<i>Aphanocapsa</i> cf. <i>elachista</i> W. & G.S. West 1894	+		+	+																								
<i>Aphanocapsa muscicola</i> (Meneghini) Wille 1919			+	+																								
<i>Aphanothece caldarium</i> Richter 1880									+		+	+																
<i>Aphanothece castagnei</i> (Brébisson) Rabenhorst 1865			+	+							+	+																
<i>Aphanothece pallida</i> (Kützing) Rabenhorst 1863									+		+	+																
<i>Aphanothece saxicola</i> Nägeli 1849																	+	+										
<i>Aphanothece stagnina</i> (Sprengel) A. Braun 1863																	+	+										
<i>Asterocapsa divina</i> Komárek 1993				+	+																							
<i>Calothrix</i> cf. <i>fusca</i> Bornet & Flahault 1886			+			+																						
<i>Chroococcidiopsis kashaii</i> Friedmann 1961													+	+			+	+	+									
<i>Chroococcus minor</i> (Kützing) Nägeli 1849	+	+																										+
<i>Chroococcus minutus</i> (Kützing) Nägeli 1849															+	+		+										
<i>Chroococcus spelaeus</i> Ercegović 1925			+																									
<i>Chroococcus tenax</i> (Kirchner) Hieronymus 1892									+																			
<i>Chroococcus turgidus</i> (Kützing) Nägeli 1849	+		+	+																								
<i>Chroococcus turicensis</i> (Nägeli) Hansgirg 1892	+																											
<i>Cyanosarcina parthenanensis</i> Anagnostidis in Anagnostidis & Pantazidou 1991																+		+										+
<i>Cyanosarcina</i> sp.2 Kováčik 1988				+		+		+									+											
<i>Cyanothece aeruginosa</i> (Nägeli) Komárek 1976	+																											
<i>Eucapsis minor</i> (Skuja) Elenkin 1933			+				+	+																				
<i>Eucapsis parallelepipedon</i> (Schmidle) Komárek et hindák 1989																	+											
<i>Gloeoecapsa atrata</i> Kützing 1945	+																											
<i>Gloeoecapsa punctata</i> Nägeli 1849				+	+																							
<i>Gloeoecapsosis cyanea</i> (Krieger) Komárek & Anagnostidis 1994																												
<i>Gloeothece palea</i> (Kützing) Rabenhorst 1865					+				+																			
<i>Gloeothece rupestris</i> (Lybbye) Bornet in Wittrock & Nordstedt 1880			+																									
<i>Leptolyngbya cebennensis</i> (Gomont) Umezaki & Watanabe 1994						+			+																			
<i>Leptolyngbya boryana</i> (Gomont) Anagnostidis & Komárek 1988														+				+	+									
<i>Leptolyngbya compacta</i> (Kützing ex Hansgirg) Komárek in Anagnostidis 2001			+	+							+																	
<i>Leptolyngbya ercegovicii</i> (Čado) Anagnostidis & Komárek 1988			+								+																	
<i>Leptolyngbya foveolarum</i> (Rabenhorst ex Gomont) Anagnostidis & Komárek 1988																												
<i>Leptolyngbya gracillima</i> (Zopf ex Hansgirg) Anagnostidis & Komárek 1988											+																	
<i>Leptolyngbya palikiana</i> Claus 1955																												
<i>Leptolyngbya perelegans</i> (Lemmermann) Anagnostidis & Komárek 1988				+					+																			
<i>Leptolyngbya tenuis</i> (Gomont) Anagnostidis & Komárek 1988	+				+					+								+										
<i>Leptolyngbya undosa</i> (Čado) Anagnostidis & Komárek 1988																												
<i>Microchaete</i> cf. <i>tenera</i> Thuret ex Bornet & Flahault 1887				+																								
<i>Microcoleus steenstrupii</i> Petersen 1928	+																											
<i>Nostoc commune</i> Vaucher ex Bornet & Flahault 1888	+																											
<i>Nostoc letestui</i> Frémy 1930													+															
<i>Nostoc linckia</i> Bornet ex Bornet & Flahault 1888																												
<i>Nostoc macrosporum</i> Meneghini ex Bornet & Flahault 1886				+	+				+	+																		
<i>Nostoc punctiforme</i> (Kützing ex Hariot) Hariot 1891																												
<i>Nostoc</i> sp. 2 Vaucher ex Bornet & Flahault 1888	+										+																	
<i>Nostoc</i> sp. 4 Vaucher ex Bornet & Flahault 1888	+	+																										
<i>Oscillatoria</i> cf. <i>mauchiana</i> Claus 1962																												
<i>Oscillatoria rupicola</i> Hansgirg 1890																												
<i>Phormidiochaete nordstedtii</i> (Bornet et Flahault) Komárek in Anagnostidis 2001																												
<i>Phormidium ambiguum</i> Gomont ex Gomont 1892											+	+	+															
<i>Phormidium articulatum</i> (Gardner) Anagnostidis et Komárek 1988				+																								
<i>Phormidium autumnale</i> (Agardh) Trevisan ex Gomont 1892			+	+		+										+												
<i>Phormidium</i> cf. <i>retzii</i> (Agardh) Gomont ex Gomont 1892							+																					
<i>Phormidium corium</i> Gomont 1892	+	+									+	+																
<i>Phormidium interruptum</i> Kützing ex Gomont 1892																												
<i>Phormidium inundatum</i> Kützing ex Gomont 1892	+																											
<i>Phormidium lacustre</i> (Čado) Anagnostidis 2001							+																					
<i>Phormidium melanochroum</i> Lamprinou & Pantazidou			+								+	+					+											
<i>Phormidium molle</i> var. <i>tenuior</i> West & G.S. West ex Geitler 1925								+																				
<i>Phormidium priestleyi</i> Fritsch 1917								+																				
<i>Phormidium tergestinum</i> Kützing ex Anagnostidis & Komárek 1988																												
<i>Phormidium vulgare</i> (Kützing) ex Anagnostidis 2001	+	+																										
<i>Pseudanabaena catenata</i> Lauterborn 1915	+																											
<i>Pseudanabaena galeata</i> Böcher 1949																												
<i>Pseudophormidium hollerbachianum</i> (Elenkin) Anagnostidis 2001																												
<i>Pseudophormidium spelaoides</i> (Čado) Anagnostidis 2001							+			+																		
<i>Schizothrix lardacea</i> Gomont 1892			+							+																		
<i>Scytonema julianum</i> (Kützing) Meneghini 1849				+																								
<i>Stigonematalean</i>											+																	
<i>Symploca lacrimans</i> Claus 1962																											+	+
<i>Symploca radians</i> (Kützing) Rabenhorst ex Gomont 1892															+	+		+										+
<i>Synechocystis pevalekii</i> Ercegović 1925			+																									

Απεικόνιση 3.15: Το σύνολο των ταξινομικών μονάδων στο σπήλαιο «Σεληνίτσα».

Από το σύνολο των 156 ταξινομικών μονάδων, τόσο φυσικού όσο και καλλιεργημένου υλικού, οι 49 αναφέρονται για πρώτη φορά στην Ελλάδα, ενώ οι ταξινομικές μονάδες *Asterocapsa jilinica*, *Asterocapsa sinica*, *Chroococcus subsphaericus*, *Hydrocoleum stankovicij*, *Leptolyngbya undosa*, *Phormidium lacustre*, *Phormidium macedonicum* και *Pseudophormidium spelaoides* (σύμβολο *) αναφέρονται δεύτερη φορά παγκοσμίως επιβεβαιώνοντας την υπόσταση του γένους.

1^η Ανεύρεση στην Ελλάδα

1	<i>Aphanocapsa fusco-lutea</i>
2	<i>Aphanocapsa parietina</i>
3	<i>Aphanothece caldariorum</i>
4	<i>Aphanothece pallida</i>
5	<i>Asterocapsa aerophytica</i>
6	<i>Asterocapsa divina</i>
7	* <i>Asterocapsa jilinica</i>
8	* <i>Asterocapsa sinica</i>
9	<i>Chlorogloea novacekii</i>
10	<i>Chroococcus lithophilus</i>
11	* <i>Chroococcus subsphaericus</i>
12	<i>Chroococcus subnudus</i>
13	<i>Chroococcus westii</i>
14	<i>Cyanothece aeruginosa</i>
15	<i>Eucapsis parallelepipedon</i>
16	<i>Gloeocapsa atrata</i>
17	<i>Gloeocapsa bituminosa</i>
18	<i>Gloeocapsa caldariorum</i>
19	<i>Gloeocapsa decorticans</i>
20	<i>Gloeocapsa punctata</i>
21	<i>Gloeocapsopsis crepidinum</i>
22	<i>Gloeocapsopsis pleurocapsoides</i>
23	<i>Gloeothece fusco-lutea</i>
24	<i>Herpyzonema pulverulentum</i>
25	* <i>Hydrocoleum stankovicii</i>
26	<i>Leptolyngbya compacta</i>
27	<i>Leptolyngbya ercegovicii</i>

28	<i>Leptolyngbya henningsii</i>
29	<i>Leptolyngbya nana</i>
30	<i>Leptolyngbya palikiana</i>
31	* <i>Leptolyngbya undosa</i>
32	<i>Nostoc letestui</i>
33	<i>Oscillatoria rupicola</i>
34	<i>Phormidium articulatum</i>
35	<i>Phormidium interruptum</i>
36	<i>Phormidium inundatum</i>
37	<i>Phormidium lacustre</i>
38	* <i>Phormidium macedonicum</i>
39	<i>Phormidium priestleyi</i>
40	<i>Phormidium setchellianum</i>
41	<i>Phormidium vulgare</i>
42	* <i>Plectonema araucanum</i>
43	<i>Pleurocapsa fuliginosa</i>
44	* <i>Pseudophormidium spelaeoides</i>
45	<i>Scytonema hofmanii</i> var. <i>calcicolum</i>
46	<i>Symploca lacrimans</i>
47	<i>Symploca muralis</i>
48	<i>Symploca radians</i>
49	<i>Synechocystis pevalekii</i>

Συνολικά προσδιορίστηκαν 156 ταξινομικές μονάδες, οι οποίες κατανέμονται σε 39 γένη. Σε επίπεδο είδους προσδιορίστηκαν 115 ταξινομικές μονάδες, ενώ 19 παρουσιάζουν αποκλίσεις από τους τύπους των ειδών και ταυτοποιήθηκαν ως cf. ('confer = compare with').

3.2. ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Όπως έχει προαναφερθεί στην εισαγωγή, η Ταξινομική αποτελεί μέθοδο καταγραφής της Βιοποικιλότητας της Γης. Η χρήση ονομάτων για την ταυτοποίηση των διαφόρων εξελικτικών ταξινομικών μονάδων είναι η μόνη μέχρι σήμερα μέθοδος για την οργάνωση ενός συστήματος ταξινόμησης και σύγκρισης των διαφορετικών μονάδων τόσο του φυσικού όσο και του καλλιεργημένου υλικού. Το σύστημα ταξινόμησης δεν είναι κάτι στατικό αλλά ένα δυναμικό μοντέλο που συνεχώς εξελίσσεται και αλλάζει ανάλογα με τις γνώσεις και την τεχνολογική πρόοδο.

Στη συγκεκριμένη μελέτη η ταυτοποίηση των κυανοβακτηρίων βασίστηκε κατά το πλείστον σε μορφολογικούς χαρακτήρες που έχουν διατεθεί στη 'βοτανική' επιστήμη σύμφωνα με τα κλασικά βιβλία ταξινόμησης (Κεφάλαιο 1.8.2). Οι μορφολογικοί χαρακτήρες παρατηρήθηκαν υπό το φωτονικό μικροσκόπιο (LM), ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) καθώς και με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης (TEM), τόσο σε φυσικό όσο και σε καλλιεργημένο υλικό.

Ένας αρκετά μεγάλος αριθμός ταξινομικών μονάδων παρουσίασε αποκλίσεις στα μορφολογικά γνωρίσματα από τις τυπικές μορφές. Σε όσες δεν κατέστη δυνατή η ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους εξ αιτίας ανεπαρκούς υλικού, δεν συμπεριελήφθησαν στα αποτελέσματα. Εξαιρεση αποτελούν τρεις ταξινομικές μονάδες, οι οποίες ανήκουν στα ετεροκυστώδη νηματοειδή κυανοβακτήρια, διατηρούνται σε καλλιέργειες με υγρό θρεπτικό μέσο χωρίς νιτρικά και εμφανίζουν ιδιαίτερο ταξινομικό ενδιαφέρον.

Ορισμένες από τις αποκλίσεις θεωρείται ότι εμπίπτουν στα όρια ποικιλότητας των οργανισμών, διευρύνοντας τις περιγραφές των τύπων. Ωστόσο, άλλες δημιουργούν προβλήματα στην κατάταξη των οργανισμών και είναι απαραίτητη η χρήση πολυφασικής προσέγγισης για την ταυτοποίησή τους.

Επιλεγμένα κυανοβακτήρια που παρουσίασαν ενδιαφέρον, εξετάσθηκαν εφαρμόζοντας την πολυφασική προσέγγιση και ακολούθησε η κατάταξή τους σύμφωνα με το σύγχρονο σύστημα ταξινόμησης. Υπό το συγκεκριμένο σκεπτικό χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα μοριακής ανάλυσης (16S rRNA), μορφολογικοί χαρακτήρες ύστερα από παρατήρηση σε φωτονικό μικροσκόπιο και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, δεδομένα υπερδομής (ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης) και οικολογικά δεδομένα.

Σύμφωνα με αυτή την προσέγγιση εδραιώθηκαν τρεις (3) ταξινομικές μονάδες, νέες για την επιστήμη: *Ipfinoe spelaebios* Lamprinou & Pantazidou 2011, *Toxopsis calypsus* Lamprinou & Pantazidou 2012, *Phormidium melanochron* Lamprinou & Pantazidou (in press).

Θεωρήθηκε σκόπιμο να περιγραφούν λεπτομερώς οι ταξινομικές μονάδες που διαπιστώθηκαν για πρώτη φορά στην Ελλάδα μεταξύ των οποίων και αυτές που αποτελούν

δεύτερες αναφορές παγκοσμίως, καθώς συνιστούν ανευρέσεις οι οποίες εμπολουτίζουν τη βιοποικιλότητα της μικροχλωρίδος των σπηλαίων της Ελλάδος. Ακολουθούν οι περιγραφές των ειδών που προσδιορίστηκαν είτε ως cf. είτε ως sp. δηλ. δεν κατέστη δυνατός ο ακριβής προσδιορισμός τους.

3.2.1. ΝΕΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΓΕΝΗ ΚΑΙ ΕΙΔΗ

- *Iphinoe spelaeobios* gen nov. sp. nov. Lamprinou & Pantazidou 2011

Ετυμολογία: I. phi.no .e femin. N.L. fem. n. Iphinoe =όνομα νύμφης από την ελληνική μυθολογία που κατοικούσε στο σπήλαιο «Καστριά», spe.lae.o .bi.os masc., femin. adj. spelaeobios (Gr. N. spelaion, cave, cavern, grotto; Gr.N. bios, life; dweller N.L. n. spelaeobios, αυτός που κατοικεί στα σπήλαια.

Στελέχη του νέου γένους και είδους έχουν κατατεθεί στα κάτωθι ερμπάρια:

- Ερμπάριο Πανεπιστημίου Αθηνών: ATHU-CY3313M
- Ερμπάριο Φιλαδέλφειας (PH), ΗΠΑ, Academy of Natural Sciences: PH1088600
- GenBank: (HM 748317)

ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗ ΘΕΣΗ:

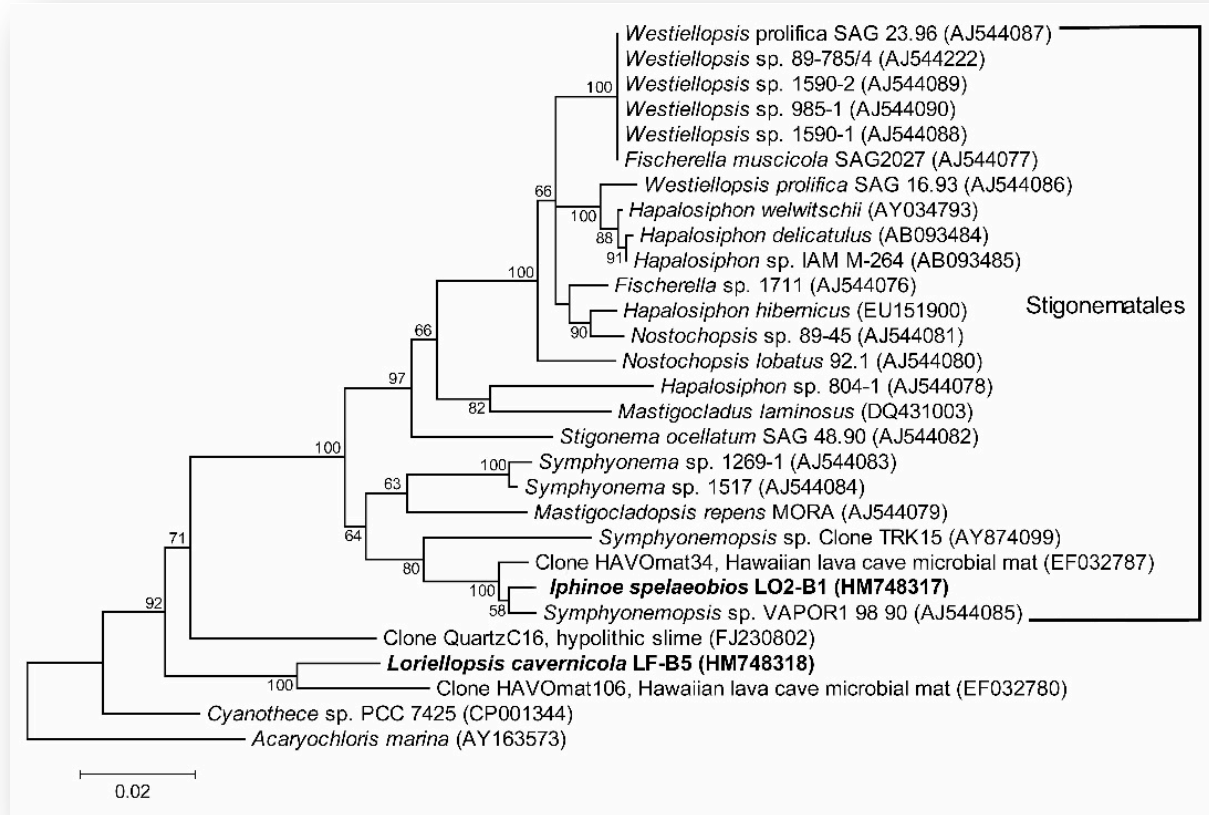
	ΣΥΓΧΡΟΝΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	ΚΛΑΣΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ
DOMAIN	Bacteria	Bacteria
PHYLUM	Cyanobacteria	Cyanobacteria
CLASS	Cyanophyceae	Cyanophyceae
SUBCLASS	Nostocophycideae	-
ORDER	Nostocales	Stigonematales
FAMILY	Loriellaceae	Loriellaceae
GENUS	<i>Iphinoe</i>	<i>Iphinoe</i>
SPECIES	<i>Iphinoe spelaeobios</i>	<i>Iphinoe spelaeobios</i>

Θαλλός έρπων στο υπόστρωμα σχηματίζοντας άσπρες-ασημί επικαλύψεις. Νήματα ελαφρώς ή σπανιότερα ισχυρώς ενασβεστωμένα και περιπεπλεγμένα (Απεικόνιση 3.17/εικ.1, Απεικόνιση 3.18/εικ.15-17). Πλάτος νημάτων, 7-10 (15)μm (μέσος όρος ± τυπική απόκλιση) [7,77 ± 0,935, n=35]. Θήκες άχρωμες, ζελατινώδεις, χωρίς στρώσεις. Τριχώματα κυρίως κυλινδρικά, ελαφρώς συνεσφιγμένα στα εγκάρσια τοιχώματα. Χρωματισμός κυτοπλάσματος ιώδης-καστανός και κυτταρικό περιεχόμενο κοκκιώδες. Κύτταρα κατά το πλείστον κυλινδρικά ή πιθοειδή, πλάτους 5-7 [5.87 ± 0.68, n=35] και μήκους 6-10μm [8.43 ± 1.194, n=35]. Ετερόκυτα κυρίως παρεμβόλιμα και μεμονωμένα στον κύριο άξονα (Απεικόνιση 3.7/εικ.1,7), σπανίως επάκρια ή στη βάση των διακλάδωσεων. Ετερόκυτα πλάτους, 5-8μm [6.32 ± 0.97 n=35] και μήκους 5-10μm [7.47 ± 1.38, n=35]. Κύριος τύπος διακλάδωσης T-μορφής (Απεικόνιση 3.17/εικ.2,4, Απεικόνιση 3.18/εικ.10,11,16) σπανιότερα V-τύπος διακλάδωσης, καθώς και ψευδοδιακλάδωση. Αναπαραγωγή με μη ενασβεστωμένες ορμοκύστες (Απεικόνιση 3.17/εικ.5) και με ακινήτες. Οι ορμοκύστες, μήκους 20-75μm, δημιουργούνται κυρίως στο άκρον των κλάδων και αποτελούνται από 3-8 κύτταρα. Φέρουν ακραία ετερόκυτα, πλάτους 5μm και μήκους 5-6μm. Τα ακίνητα είναι σφαιρικά, διαμέτρου έως 14μm και μέχρι 3 στη σειρά.

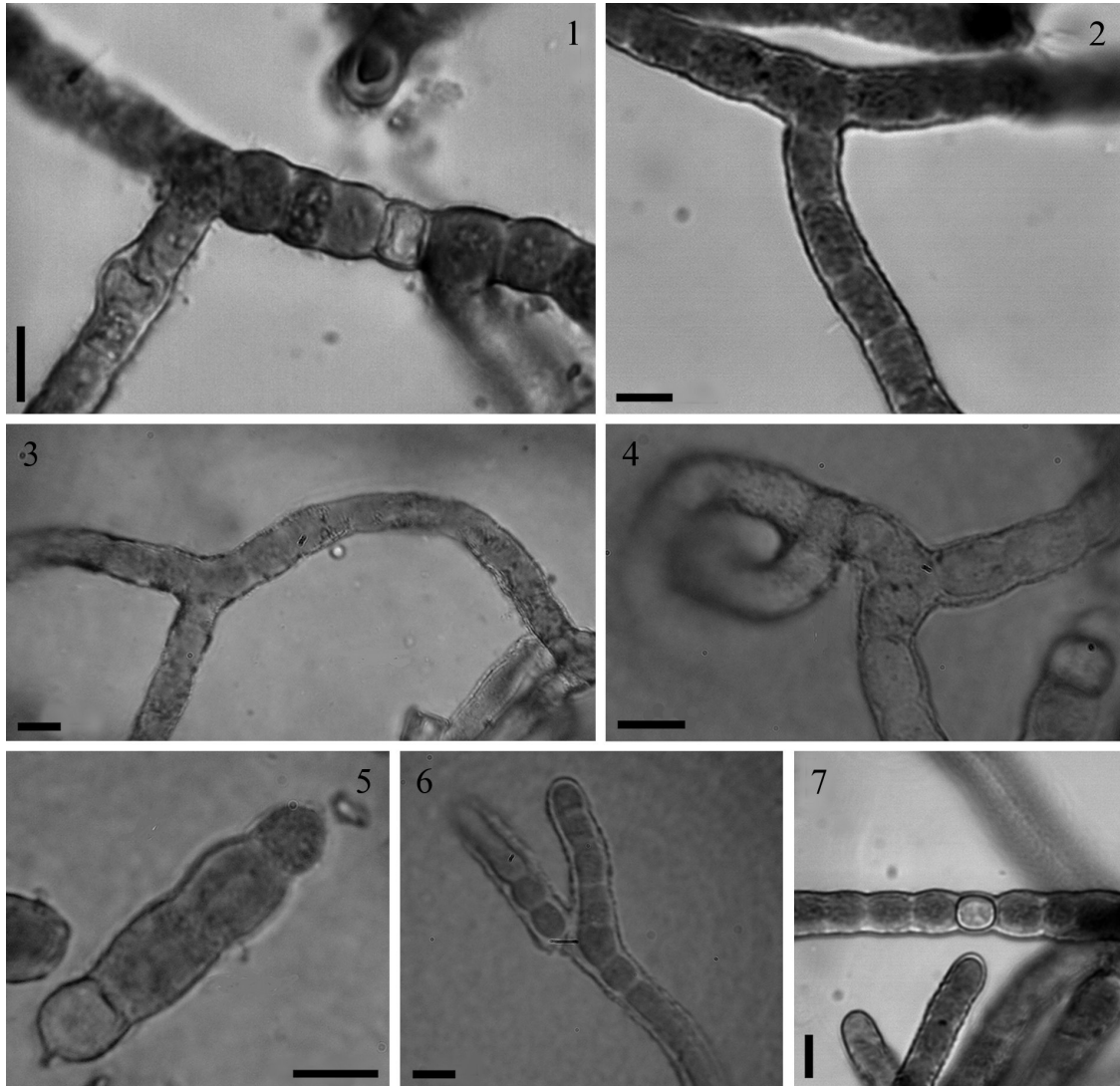
Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ο τύπος της διακλάδωσης (κυρίως T, σπανιότερα V καθώς και η ψευδής διακλάδωση), ο τρόπος αναπαραγωγής (ορμοκύστες και ακινήτες), η απουσία επάκριας διχοτομικής διακλάδωσης καθώς και η απουσία των βοηθιακών συνδέσεων διαφοροποιούν τη συγκεκριμένη ταξινομική μονάδα από το γένος *Loriella* Borzi 1892, το οποίο είναι μορφολογικά το πλέον συγγενές. Η ανάλυση της αλληλουχίας συνόλου 16S rRNA ανέδειξε ομοιότητα (98,8%) με ένα περιβαλλοντικό κλώνο (HAVO mat34) και με ένα στέλεχος (Vapor-1) των Stigonematales (Hoffmann et al. 2003), το οποίο αργότερα ονομάστηκε *Symphyonemopsis* sp. (Gugger & Hoffmann 2004). Το γένος *Symphyonemopsis* Tiwary & Mitra 1968 είναι ένα γένος με δύο περιγραφέντα είδη, *S. katniensis* Tiwari & Mitra 1968 και το *S. rantii* Chadha & Padney 1978, αμφότερα απομονωθέντα από υλικό του εδάφους. Το *Symphyonemopsis* είναι ένα γένος που χαρακτηρίζεται από διακλάδωση τύπου Y, πολύσειρα νήματα σε όλα τα στάδια, διαφοροποίηση του κύριου άξονα από τους πλευρικούς κλάδους και αναπαραγωγή με ορμοκύστες και ακινήτες. Το *Symphyonemopsis* αποτελεί ένα επαρκώς τεκμηριωμένο γένος, το οποίο δεν παρουσιάζει τα γνωρίσματα της συγκεκριμένης ταξινομικής μονάδας του σπηλαίου. Τα παρατηρηθέντα μορφολογικά γνωρίσματα σε συνδυασμό με τα μοριακά δεδομένα καθιστούν τον υπό μελέτη οργανισμό ως νέο για την επιστήμη.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

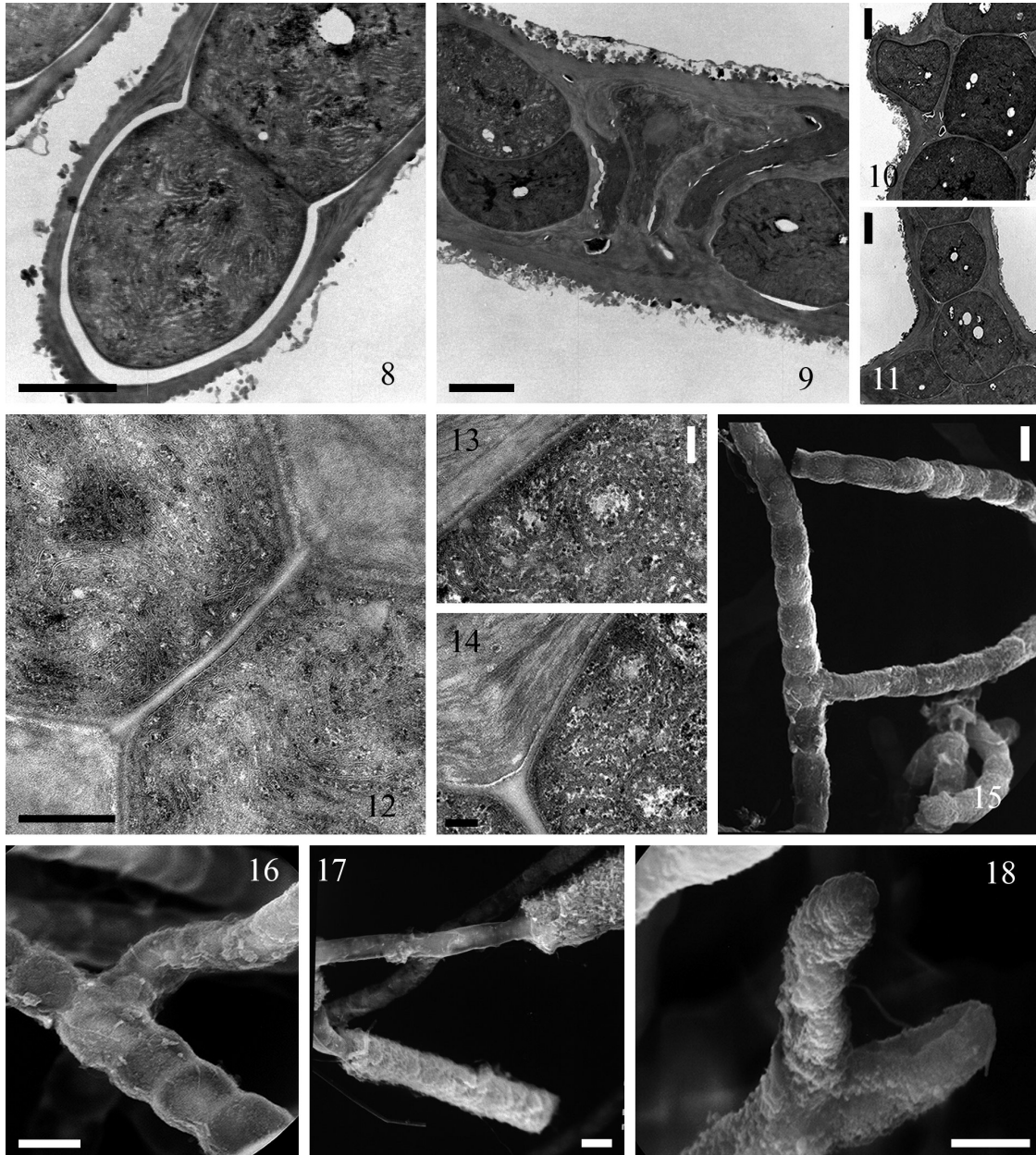
Δειγματοληπτικές θέσεις: (K3P, K3S, K6W, K6S, K6A, K7W, K7S, K7A)



Απεικόνιση 3.16: Φυλογενετικό δένδρο τύπου Σύνδεσης Ομόρων (Neighbor Joining –NJ). Οι αριθμοί απεικονίζουν την ποσοστιαία δομική ακεραιότητα με ανάλυση (NJ). Η κλίμακα αντιπροσωπεύει 2% νουκλεοτιδική υποκατάσταση ανά θέση.



Απεικόνιση 3.17: Φωτογραφίες *Irihoë spelaebios* gen. nov., sp. nov. υπό το φωτονικό μικροσκόπιο. Νήματα με την χαρακτηριστική διακλάδωση T-τύπου (1-4), Ορμοκύστη με βασικό ετεροκύτο (5), Νήμα με παρουσία ψευδοδιακλάδωσης (6), Νήμα με παρεμβόλιμο ετερόκύτο (7). Κλίμακες= 10μm.



Απεικόνιση 3.18: Μικροφωτογραφίες *Iphinoe spelaebios* gen. nov. sp. nov. υπό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης TEM (8-14) και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης SEM (15-18). Κατά μήκος τομή στην οποία διαφαίνονται τα θυλακοειδή τα οποία καταλαμβάνουν το σύνολο του κυτταρικού περιεχομένου (8), Τομή νήματος στην οποία διαφαίνεται η αποσύνθεση του τριχώματος με τη βοήθεια νεκριδίου (NC) και με σχηματισμό εκατέρωθεν βλενωδών διαφραγμάτων (BL) (9), Τομές του νήματος στις οποίες διαφαίνεται η έναρξη του Τ-τύπου διακλάδωσης (10-11), Διάφραγμα χωρίς ενδοκυτταρική σύνδεση μεταξύ των βλαστητικών κυττάρων (12-14), Ενασβεστωμένες θήκες των κυλινδρικών νημάτων και ο τύπος διακλάδωσης (16-18). Κλίμακες (8-11): 2μm, (12):0,5μm, (13,14): 0,2μm, (15-18): 10μm.

• ***Toxopsis calypsus*** gen. nov. sp. nov.

Ετυμολογία: Τοx.ο΄psis Gr. toxo- = τόξο και Gr. -opsis,-opsis = όψις

ca.ly΄psus femin. adj. calypsus = νύμφη ελληνικής μυθολογίας, από το ελληνικό ρήμα ‘καλύπτειν’

Στελέχη του νέου γένους και είδους έχουν κατατεθεί στα κάτωθι ερμπάρια:

- Ερμπάριο Πανεπιστημίου Αθηνών: ATHU-CY 3314
- Ερμπάριο Φιладельφειας (PH) ΗΠΑ, Academy of Natural Sciences: PH1095565
- GenBank: (JN695681 - JN695685)

ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗ ΘΕΣΗ:

	ΣΥΓΧΡΟΝΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	ΚΛΑΣΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ
DOMAIN	Bacteria	Bacteria
PHYLUM	Cyanobacteria	Cyanobacteria
CLASS	Cyanophyceae	Cyanophyceae
SUBCLASS	Nostocophycideae	-
ORDER	Nostocales	Nostocales
FAMILY	Microchaetaceae	Microchaetaceae
SUBFAMILY	-	Microchaetoideae
GENUS	<i>Toxopsis</i>	<i>Toxopsis</i>
SPECIES	<i>Toxopsis calypsus</i>	<i>Toxopsis calypsus</i>

Θαλλός κιτρινοπράσινος έως σκοτεινοπράσινος κατά συσσωματώματα. Τα νεαρά τριχώματα είναι ισοπολικά και ελαφρώς λεπτυνόμενα στα δύο άκρα με ευρεία τηλεσκοπική θήκη (Απεικόνιση 3.20/εικ.α-β, Απεικόνιση 3.21/εικ. α-σ), παρόμοια με εκείνη του γένους *Ammatoidea*. Τα ώριμα τριχώματα είναι ευθέα, ψευδοδιακλαδιζόμενα και αργότερα συστρέφονται μέσα στην ίδια θήκη σχηματίζοντας νήματα παρόμοια με αυτά του γένους *Tolyrothrix*. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα του γένους είναι οι δύο τύποι νημάτων, ισοπολικά και ετεροπολικά. Τα ισοπολικά νήματα έχουν πλάτος 10-14μm (10.6±1.26μm, n=30) ενώ τα

ετεροπολικά έχουν πλάτος (10) 12-18 μm (12.27 \pm 1.19 μm , n=30). Το τρίχωμα είναι συνεσφιγμένο στα εγκάρσια κυτταρικά τοιχώματα, πλάτους (4) 6-10 μm . Τα κύτταρα είναι βραχύτερα του πλάτους, και μήκους 2-5 μm . Ετερόκυτα υπάρχουν μόνο στα ετεροπολικά νήματα και είναι συνήθως μονόπορα (Απεικόνιση 3.20/εικ.ε) και σπανιότερα δίπορα, κατά κανόνα παρεμβόλιμα και σπανιότερα επάκρια, πλάτους 5-10 μm και μήκους 5-9 μm . Παρατηρήθηκαν νεκρίδια, με σκοτεινό πράσινο χρωματισμό. Η αναπαραγωγή γίνεται με ορμογόνια και με ακινήτες. Πιο συγκεκριμένα έχουν παρατηρηθεί δύο τύπων κύκλοι ζωής: ο ισοπολικός και ο ετεροπολικός. Ο ισοπολικός κύκλος ζωής παρατηρήθηκε αρχικά στο φυσικό υλικό και σε νεαρές καλλιέργειες (θρεπτικό μέσο BG11) για τουλάχιστον ένα έτος. Ο ετεροπολικός κύκλος ζωής παρατηρήθηκε σε γηραιότερες καλλιέργειες ηλικίας μεγαλύτερης των δύο ετών (θρεπτικό μέσο BG11 και BG11₀).

Ο ισοπολικός κύκλος ζωής χαρακτηρίζεται από ισοπολικά νήματα με λεπυνόμενα τριχώματα σε τηλεσκοπική θήκη όπως αυτά του γένους *Ammatoidea*. Το τριχώματα στο κεντρικό τμήμα προσάπτονται στο υπόστρωμα και παράγουν ορμογόνια δίπλα στα νεκρίδια, τα οποία εν συνεχεία, όπως και τα νήματα εκβλαστάνουν δημιουργώντας νεαρά νήματα σταδιακά λεπυνόμενα σε αμφότερα τα άκρα, φέροντας τηλεσκοπική θήκη.

Ο ετεροπολικός κύκλος ζωής χαρακτηρίζεται από ετεροπολικά νήματα με βλαστητικά κύτταρα τα οποία διαφοροποιούνται σε ετερόκυτα και ακινήτες. Τα νήματα παράγουν ορμογόνια με βασικό ετερόκυτο, τα οποία αναπτύσσονται ετεροπολικά (Απεικόνιση 3.20/εικ.ε). Οι ακινήτες παρατηρούνται αποκλειστικά στα ώριμα νήματα, είναι σφαιρικοί ή ελλειψοειδείς με «διαμερισματοποιημένο/χυμοτοπιασμένο» vacuolized περιεχόμενο, και διαιρούνται σε δύο ημίση σχηματίζοντας σειρές 3-5 κυττάρων (Απεικόνιση 3.20/εικ.ε, Απεικόνιση 3.21/εικ.ε).

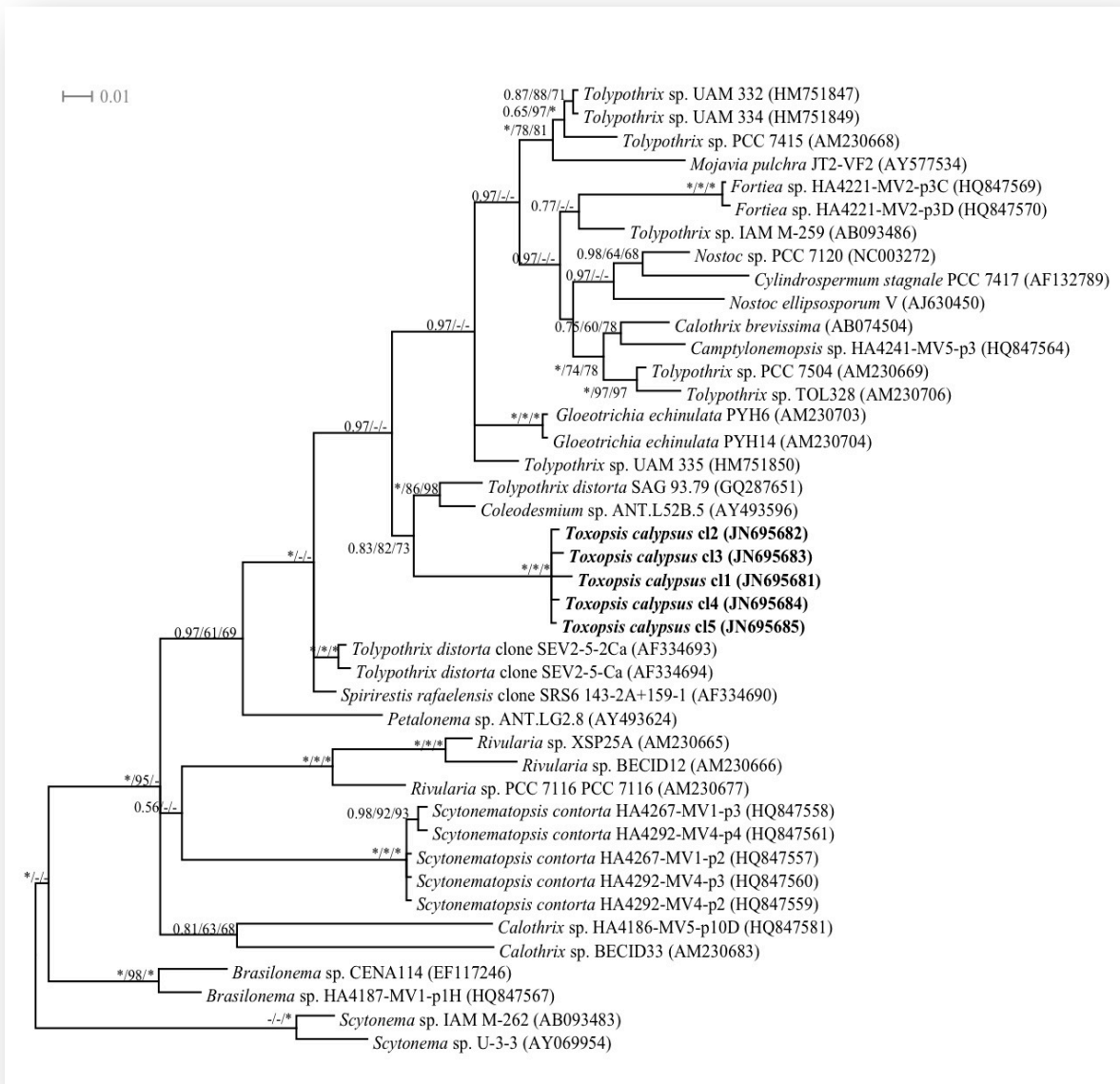
Ταξινομικές παρατηρήσεις: Η ταυτόχρονη παρουσία ισοπολικού και ετεροπολικού κύκλου ζωής καθώς και η παρουσία «διαμερισματοποιημένων» ακινητών είναι χαρακτηριστικά που παραπέμπουν στο είδος *Scytonematopsis contorta* (Vaccarino & Johanssen 2011), ωστόσο, η ανάλυση του 16S rRNA έδειξε μεγάλη φυλογενετική απόσταση (<90% ομοιότητα). Το μονοειδικό γένος *Toxopsis* gen. nov. διακρίνεται από όλα τα άλλα γένη της οικογένειας Microchateaceae από το αυταπομορφικό γνώρισμα της ταυτόχρονης παρουσίας ισοπολικών και ετεροπολικών νημάτων. Όπως προαναφέρθηκε, ένα αυταπομορφικό γνώρισμα είναι απαραίτητο κριτήριο για την εγκαθίδρυση ενός νέου είδους σύμφωνα με τη φυλογενετική θεώρηση του είδους (Flechtner et al. 2002, Johansen & Casamatta 2005) καθώς και με τη μονοφυλετική θεώρηση σύμφωνα με τους Mishler & Theriot (2000). Οι φυλότυποι (JN695681 - JN695685) στη μοριακή ανάλυση έδειξαν ομοιότητα 95-96% με τα στελέχη *Tolypothrix distorta* (SAG 93.79 GQ287651) και *Coleodesmium* sp. ANT.L52B.5 (AY493596). Σύμφωνα με τους Stackebrandt & Goebel (1994) αν η ομοιότητα σε αλληλουχίες 16S rRNA είναι >97.5%, υπάρχει βεβαιότητα ότι η συγγένεια DNA-DNA είναι $\geq 70\%$ (καθορισμός προκαρυωτικού είδους

σύμφωνα με την Ad Hoc Committee Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics). Είναι επομένως φανερόν ότι η ομοιότητα 95-96% είναι αρκετά μικρή, και επομένως η ταξινομική μονάδα δεν ανήκει σε κανένα από τα προαναφερθέντα είδη. Για τη διαφοροποίηση σε επίπεδο γένους οι Wayne et al. (1987) και Komárek (2006) πρότειναν μια ομοιότητα 95% στην αλληλουχία του 16S rRNA. Αν η ομοιότητα είναι πλησίον του 95% τότε τα μορφολογικά γνωρίσματα είναι καθοριστικά. Ο πολύπλοκος κύκλος ζωής, η ταυτόχρονη παρουσία ισοπολικότητας και ετεροπολικότητας καθώς και η παρουσία ακινητών είναι βασικά χαρακτηριστικά που δεν επιτρέπουν η συγκεκριμένη ταξινομική μονάδα να ταυτοποιηθεί στα γένος *Tolypothrix* ή *Coleodesmium*. Επομένως, η συγκεκριμένη ταξινομική μονάδα προσδιορίστηκε ως νέο γένος και είδος υπό το όνομα *Toxopsis calypsus* gen. nov. sp. nov. Lamprinou & Pantazidou.

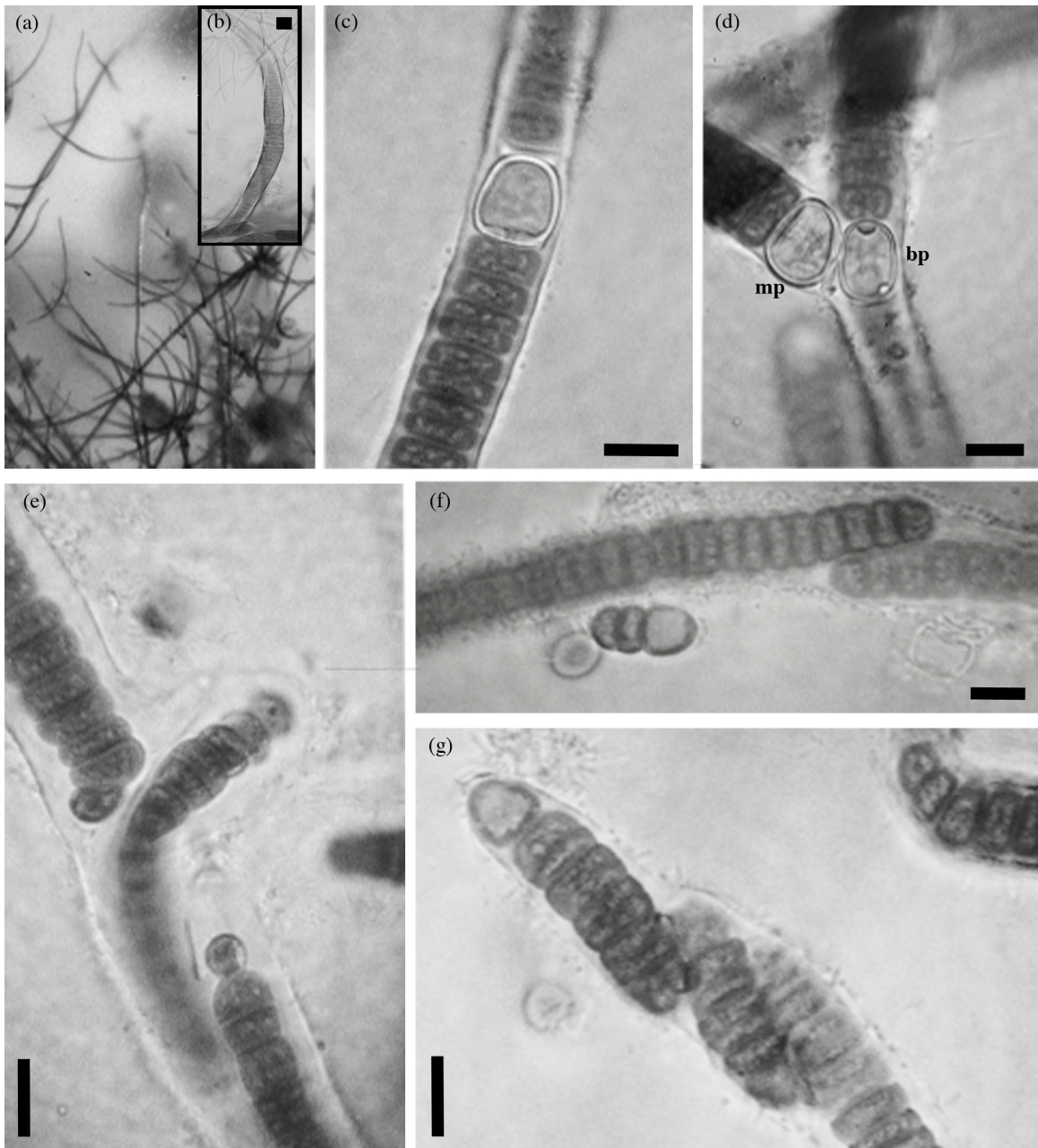
Οικολογία: Ασβεστολιθικό υπόστρωμα

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγχθι

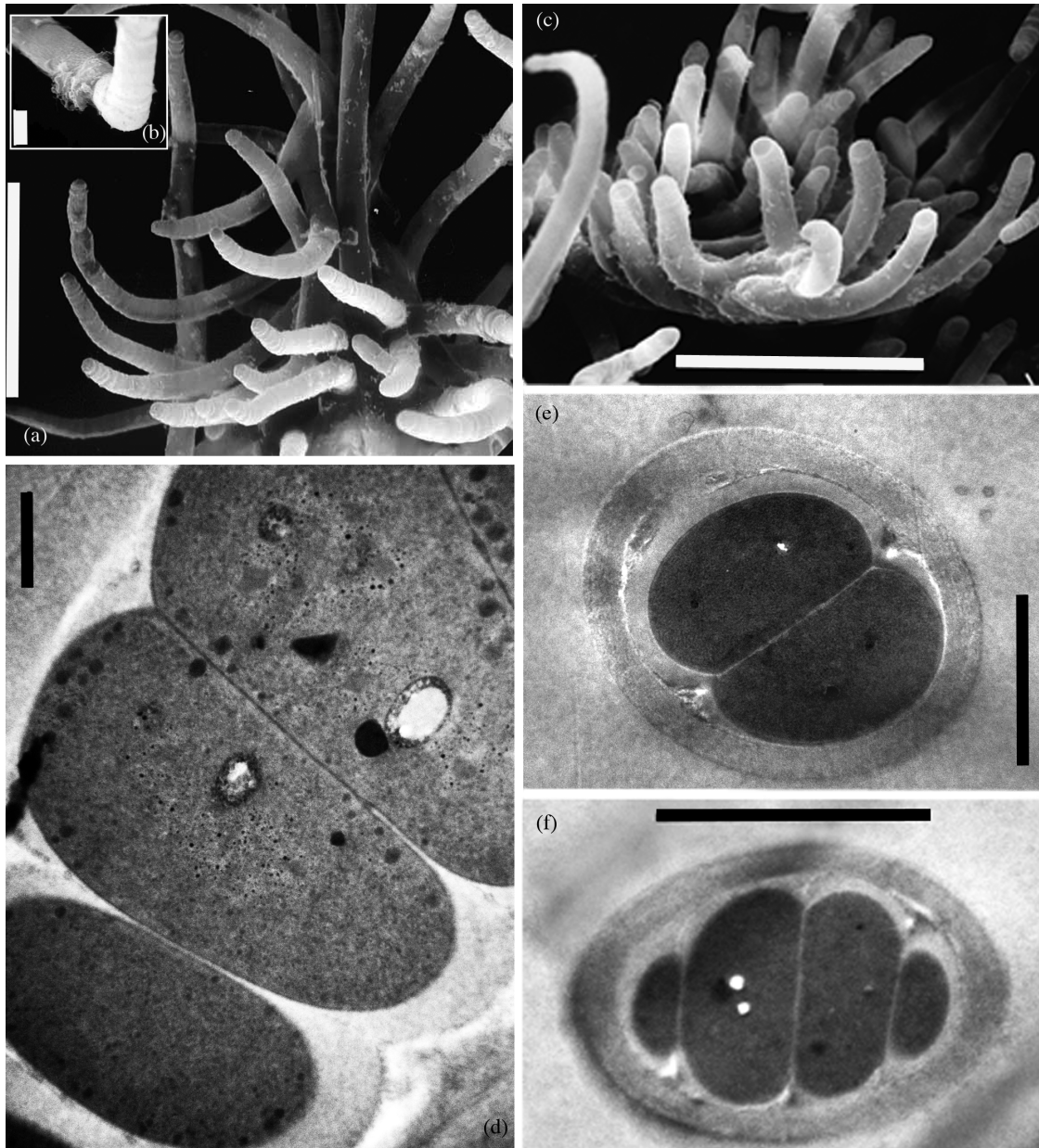
Δειγματοληπτικές θέσεις: (F1W, F4W, F5P)



Απεικόνιση 3.19: Φυλογενετικό δένδρο Μπεϋσιανής Συνεπαγωγής που βασίζεται στο γονίδιο 16S rRNA (1117 bp) αναπαριστώντας την απόσταση των 5 φυλοτύπων του *Toxopsis calypsus*. Οι αριθμοί στους κόμβους αντιπροσωπεύουν τιμές Μπεϋσιανής Πιθανότητας καθώς και ποσοστιαία (%) δομική ακεραιότητα με ανάλυση (Μέγιστη Πιθανοφάνεια – Maximum Likelihood ML) και (Σύνδεσης Ομόρων – Neighbor Joining NJ). Ο αστερίσκος (*) υποδεικνύει 1.0 ή 100% δομική ακεραιότητα, ενώ η παύλα (-) = δομική ακεραιότητα < 0.50 ή 50%. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει 1% νουκλεοτιδική υποκατάσταση ανά θέση.



Απεικόνιση 3.20: LM φωτογραφίες του *Toxopsis calypsus* gen. nov., sp. nov. Βλασθητικά κύτταρα υπό το στερεοσκόπιο(a), νήμα κεκκαμένο στη μέση με τη χαρακτηριστική τηλεσκοπική θήκη (b), νήμα με μονόπορο ετερόκυτο (c), ετεροπολική ανάπτυξη με μονόπορο ετερόκυτο στη βάση (mp) και με ενδιάμεσο δίπορο ετερόκυτο (bp) στο κεντρικό νήμα (d), ψευδοδιακλαδιζόμενα νήματα με ευρείες θήκες (e), αύξηση διαμερισματοποιημένου ακινήτη (f), παραγωγή ορμονογίων με βασικά ετεροκυτα (g). Κλίμακες = 8μm.



Απεικόνιση 3.21: Μικροφωτογραφίες του *Toxopsis calypsus* gen nov., sp. nov. (a), Ισοπολικά νήματα υπό το SEM (c), κεκαμένα στο μέσο και ελαφριά λέπτυνση και στα δύο άκρα, η χαρακτηριστική τηλεσκοπική θήκη υπό το SEM (b), κατά μήκος τομή νημάτων υπό το TEM με τυπικά κοκκία κυανοφυκίνης (d), ακινήτης διαιρούμενος σε δύο ήμισυ υπό το TEM (e), κατά μήκος τομή στο μέσο κεκκαμένου νήματος υπό το TEM (f). Κλίμακες = 100μm (a, c), 10μm (b, f), 1μm (d), 5μm (e).

• ***Phormidium melanochrour*** sp. nov. Lamprinou & Pantazidou

Ετυμολογία: m. & f. melanochrour, n. melanochrour: Greek adjective, αναφέρεται στο σκοτεινό χρώμα (χρωστική) της θήκης, 'μέλας' (γεν. 'μέλανος') = ερυθρομελανό, χρώς (γεν. χροός) = επιφάνεια ιδίως αναφερόμενη στην απόχρωση του δέρματος.

Στελέχη του νέου γένους και είδους έχουν κατατεθεί στα κάτωθι ερμπάρια:

- Ερμπάριο Πανεπιστημίου Αθηνών: ATHU-CY 3315 147
- Ερμπάριο Φιαλδέλφειας (PH), ΗΠΑ, Academy of Natural Sciences: PH1095563
- GenBank: (HM 748317)

ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗ ΘΕΣΗ:

	ΣΥΓΧΡΟΝΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	ΚΛΑΣΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ
DOMAIN	Bacteria	Bacteria
PHYLUM	Cyanobacteria	Cyanobacteria
CLASS	Cyanophyceae	Cyanophyceae
SUBCLASS	Oscillatoriophyceae	-
ORDER	Oscillatoriales	Oscillatoriales
FAMILY	Phormidiaceae	Phormidiaceae
SUBFAMILY	-	Phormidioideae
GENUS	<i>Phormidium</i>	<i>Phormidium</i>
SPECIES	<i>Phormidium melanochrour</i>	<i>Phormidium melanochrour</i>

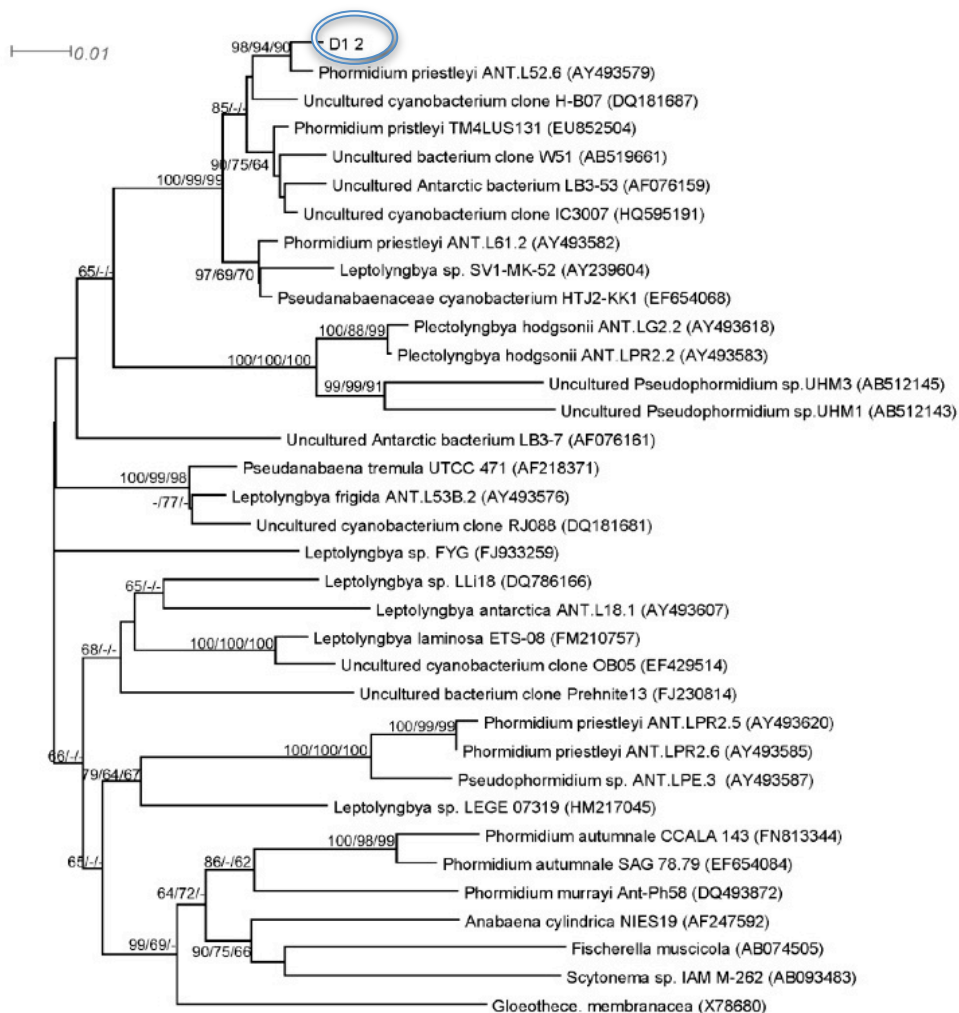
Στο φυσικό υλικό εμφανίζει χασμοενδολιθικό τρόπο ανάπτυξης. Στην καλλιέργεια ο θαλλός απαρτίζεται από μαύρα θυσσανώδη συσσωματώματα (Απεικόνιση 3.23/εικ. a). Τα νήματα είναι περιπεπλεγμένα, ενίοτε ψευδοδιακλαδιζόμενα (Απεικόνιση 3.23/εικ. d), πλάτους (4) 5-6 (7) μm , (μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση) ($5 \pm 0.83 \mu\text{m}$, $n=30$). Ο κολεός είναι έντονος, παχύς, βλενώδης, μελανόχρους (Απεικόνιση 3.23/εικ. b-g). Ο χαρακτηριστικός μελανός χρωματισμός (gloeocapsin) διατηρείται ακόμη και μετά την ανάπτυξη του οργανισμού σε ελάχιστο φως. Τα τριχώματα είναι συνεσφιγμένα στα εγκάρσια τοιχώματα, ακίνητα, πλάτους (2,5) 3-4 (4,5) μm ($4 \pm 0.62 \mu\text{m}$, $n=30$). Τα κύτταρα είναι κυανοπράσινα, πιθοειδή, βραχύτερα του πλάτους, με μήκος

1-1,8μm. Επάκριο κύτταρο αποστρογγυλεμένο (Απεικόνιση 3.23/εικ. c). Νεκρίδια παρόντα αλλά όχι συχνά. Η διάταξη των θυλακοειδών όπως αποδείχθηκε από την ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης είναι περιφερειακή (Απεικόνιση 3.23/εικ. k). Η κυτταρική διαίρεση γίνεται εγκάρσια στον κάθετο άξονα του τριχώματος με τα θυγατρικά κύτταρα να διαιρούνται αφού φθάσουν το μέγεθος των μητρικών κυττάρων (Απεικόνιση 3.23/εικ. l). Επίσης, παρατηρήθηκαν στο άκρον του τριχώματος ταχείες κυτταρικές διαιρέσεις με ταυτόχρονη παρουσία περισσότερων του ενός αναπτυσσόμενων διαφραγμάτων (septa) (Απεικόνιση 3.23/εικ. h). Δεδομένα μοριακής ανάλυσης (16S rRNA) ανέδειξαν ως τον πιο κοντινό συγγενή το στέλεχος *Phormidium priestleyi* ANTL 52.6, με 97% - 98% ομοιότητα (ζεύγη βάεων 1437bp).

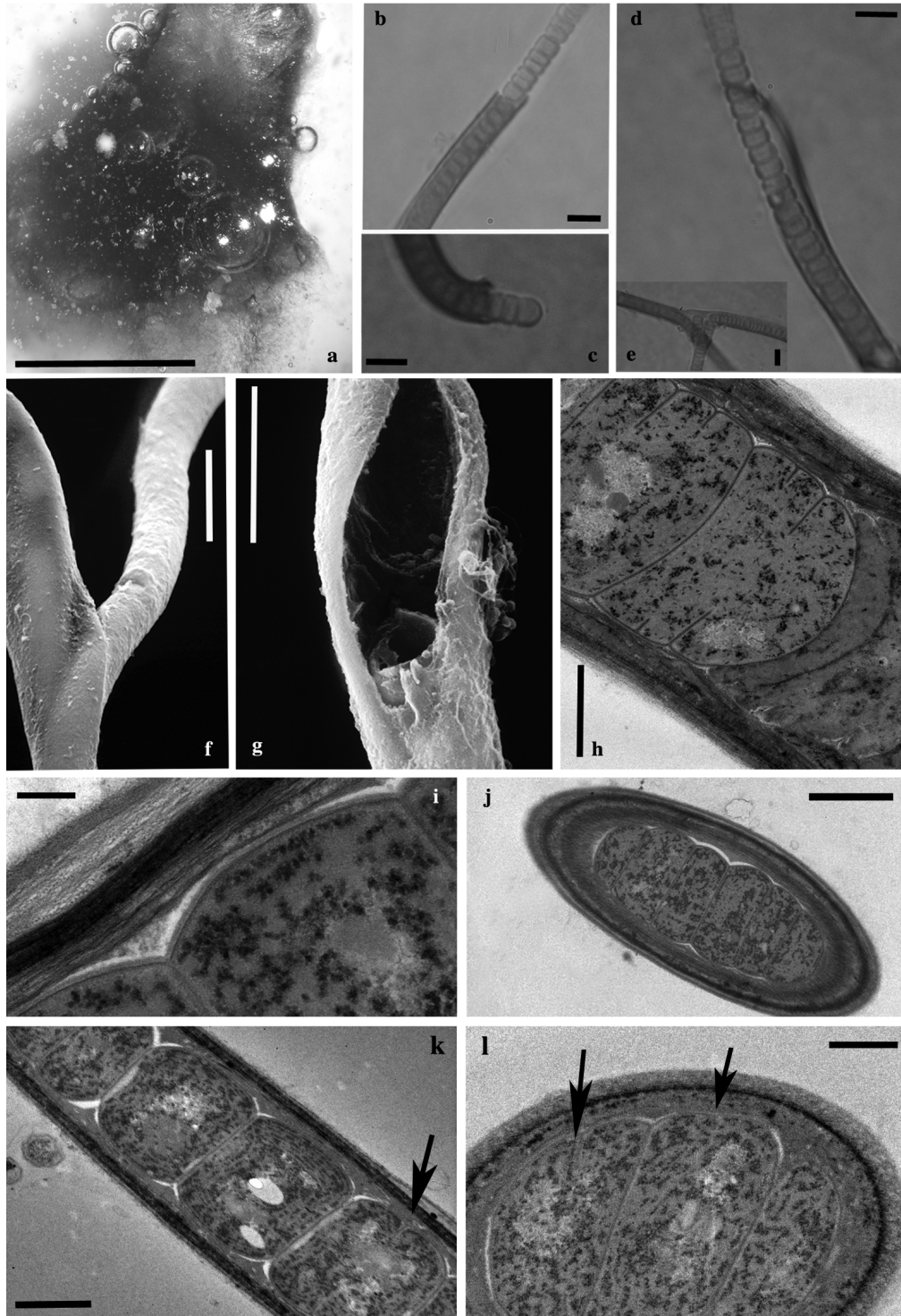
Ταξινομικές παρατηρήσεις: Τα μορφολογικά – φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της εξεταζόμενης ταξινομικής μονάδος καθώς και τα μοριακά δεδομένα έδειξαν ομοιότητα με είδη του γένους *Phormidium*. Η περιφερειακή διάταξη των θυλακοειδών θεωρείται επίσης ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα του γένους σύμφωνα με τους Marquardt & Palinska (2007), παρά την πρότερη θεώρηση μιας αποκλειστικά ακτινωτής διάταξης θυλακοειδών από τους Komárek & Anagnostidis (2005). Η εξετασθείσα ταξινομική μονάδα διαφέρει από όλα τα είδη του γένους *Phormidium* στο αυταπομορφικό γνώρισμα της αυστηρώς μελανής θήκης. Ένα αυταπομορφικό γνώρισμα είναι απαραίτητο κριτήριο για τον ορισμό νέου είδους σύμφωνα με τη θεώρηση του «φυλογενετικού» είδους (Flechtner 2002, Johansen & Casamata 2005), αλλά και σύμφωνα με τη θεώρηση του «μονοφυλετικού» είδους κατά τους Mishler & Theriot (2000). Ο εγγύτερος συγγενής σύμφωνα με τα μοριακά δεδομένα (16S rRNA) είναι το *Phormidium priestleyi* ANTL 52.6, (97-98% ομοιότητα) (Απεικόνιση 3.22). Το είδος *Phormidium priestleyi* Fritsch έχει αναθεωρηθεί και μετονομασθεί υπό το γένος *Phormidesmis* Turicchia et al. 2009 ως *Phormidesmis priestleyi* (Fritsch) Komárek et al. 2009. Το γένος *Phormidesmis* περιλαμβάνει επίσης το είδος *Phormidesmis molle* (Gomont) Turicchia et al. 2009. Το στέλεχος *Phormidium priestleyi* ANTL 52.6 από την Ανταρκτική θεωρείται κατά τους Komárek et al. (2009) ότι πιθανώς ανήκει στο γένος *Phormidesmis*. Ο υπό μελέτη οργανισμός σαφέστατα διαφέρει από το παραπάνω στέλεχος της Ανταρκτικής ως προς το αυταπομορφικό γνώρισμα του μελανού κολεού και ως προς την ευκαιριακή ψευδοδιακλάδωση των νημάτων. Η παρατηρηθείσα ομοιότητα (97-98%) είναι στο όριο της διάκρισης του είδους, επομένως η παρουσία μια σαφέστατης φαινοτυπικής διαφοράς είναι καθοριστική για την εδραίωση του μελετηθέντος στελέχους ως νέου για την επιστήμη είδους υπό το όνομα *Phormidium melanochroun* Lamprinou & Pantazidou.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά, Σπήλαιο Φράγγθι, Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K1W, K2W, K2S, F1P, F1S, F1A, F2P, F2A, F5W, F5S, F5A, F6S, F7S, S1P, S3P, S3S, S4A)



Απεικόνιση 3.22: Φυλογενετικό δένδρο μεγίστης πιθανόφάνειας (Maximum Likelihood) το οποίο βασίζεται στο γονίδιο 16S rRNA (D1). Οι αριθμοί στους κόμβους αντιπροσωπεύουν την ποσοστιαία (%) δομική ακεραιότητα (bootstrap values > 60%), με ανάλυση (Μεγίστης Πιθανοφάνειας – Maximum Likelihood ML), (Σύνδεσης Ομόρων – Neighbor Joining NJ) και (Μεγίστης Φειδωλότητας – Maximum Parsimony MP). Η κλίμακα αντιπροσωπεύει 1% νουκλεοτιδική υποκατάσταση ανά θέση.



Απεικόνιση 3.23: Ο θαλλός του *Phormidium melanochroun* στο στερεοσκόπιο(a) , Φωτονικό μικροσκόπιο (b,c,d,e), Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM) (f,g) και Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (TEM) (i,j,k,l). Πιθοειδή κύτταρα του τριχώματος μέσα στην ευρεία μελανοχρη θήκη (b,c,d), Νήμα με ψευδοδιακλάδωση (e), Η χαρακτηριστική ευρεία θήκη (f,g,i,j). Περιφεριακή διάταξη των

θυλακοειδών (k), Γρήγορες αλληπάληλες διαιρέσεις με αναπτυσσόμενα διαφράγματα στο τέλος των νημάτων (l), Διαιρέσεις στις οποίες τα θυγατρικά κύτταρα διαιρούνται αφού φθάσουν το μέγεθος των μητρικών (k,l). Κλίμακες = (a):1 cm, (b,c,d,e):5μm, (f,g):10μm, (h):1μm, (i): 0.2μm, (j)0.5μm.

3.2.2. ΕΙΔΗ ΠΟΥ ΑΝΑΦΕΡΟΝΤΑΙ ΓΙΑ ΠΡΩΤΗ ΦΟΡΑ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

- ***Aphanocapsa fusco-lutea*** Hansgirg 1892

Αποικίες βλενώδους υφής, άμορφες, κιτρινόχροες. Κύτταρα σφαιρικά, διαμέτρου 1-1,5μm, ενίοτε περιβαλλόμενα από ατομική ζελατινώδη θήκη.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Σποραδική εξάπλωση στην ευρασιακή ζώνη. Ισραήλ (Vinogradova et al. 2000).

Οικολογία: Σε υγρό έδαφος και υγρούς βράχους, σε τοίχους θερμοκηπίων, συχνά κοντά σε θερμοπηγές. Από σπήλαια έχει ανευρεθεί από τους Mulek & Kosi (2008) στο σπήλαιο Račiške (Σλοβενία) και από τους Dor & Dor (1999) στο σπήλαιο Soreq (Ισραήλ).

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K1S, K2S, K4W, K4A, K5A)

- ***Aphanocapsa parietina*** Nägeli 1849

Αποικίες μεγάλες, απαρτιζόμενες από κύτταρα χαλαρά διατεταγμένα. Αποικίες διαμέτρου 25-100μm . Κύτταρα σφαιρικά, διαμέτρου (3) 4-6μm, ελαιοπράσινου χρωματισμού.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Σποραδική εξάπλωση στην Ευρώπη, π.χ. Ρουμανία (Caraus 2002) αλλά και στο Ισραήλ (Vinogradova et al. 2000).

Οικολογία: Σε υγρούς ασβεστολιθικούς βράχους και σε υγρά αλκαλικά εδάφη. Από σπήλαια έχει ανευρεθεί στο σπήλαιο Škocjanske Jame (Σλοβενία) (Mulek et al. 2007) και από σπήλαια της Πολωνίας (Czerwik-Marcinkowska & Mrozińska 2011).

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K1W, K2W, K4P, K5W, K5S)

- ***Arahnotherce caldariorum*** Richter 1880

Αποικίες άμορφες σαν μια φαιοπράσινη έως και ιώδη μάζα στο υπόστρωμα. Κύτταρα κυλινδρικά έως ελλειψοειδή, διαστάσεων 4-7 x 1,5-2μm. Η απόχρωση των κυττάρων είναι πρασινο-ιώδης. Παρατηρήθηκαν νανοκύτταρα διαμέτρου 0,5-1,5μm.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Οι διαστάσεις, ο χρωματισμός καθώς και η ύπαρξη των νανοκυττάρων επιτρέπουν την ταυτοποίηση του συγκεκριμένου οργανισμού υπό το είδος *Arahnotherce caldariorum* παρά την μη σαφή παρατήρηση των πολικών κυτταρικών κοκκίων που χαρακτηρίζουν το συγκεκριμένο είδος.

Εξάπλωση: Κοσμοπολιτικό είδος, π.χ. στην Ευρώπη: Ισπανία (Alvarez-Cobelas & Gallardo 1988), στην Ασία: Κίνα (Hu & Wei 2006).

Οικολογία: Αεροφυτικό σε υγρούς βράχους και τοίχους. Έχει ανευρεθεί στο σπήλαιο Škocjanske Jame της Σλοβενίας (Mulek et al. 2007).

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (S3P, S3S)

- ***Arahnotherce pallida*** (Kützing) Rabenhorst 1863

Αποικίες βλεννώδεις, άχρωμες έως καστανόχρωμες. Κύτταρα πυκνώς διευθετημένα, ελλειψοειδή, πλάτους 5-6μm και μήκους 8-10μm. Τα κύτταρα έχουν σκοτεινό πράσινο ή φαιοπράσινο χρωματισμό. Στην περιφέρεια του θαλλού τα κύτταρα συχνά περιβάλλονται από ατομικές θήκες, οι οποίες συχνά φέρουν στρώσεις.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Κοσμοπολιτικό είδος. Ευρώπη: Μεγάλη Βρετανία (Batters 1902), Ιρλανδία (Adams 1908), Ισπανία (Alvarez-Cobelas & Gallardo 1988), Αφρική: Djibouti (Silva et al. 1996), Ασία: Bangladesh (Silva et al. 1996), Κίνα (Hu & Wei 2006).

Οικολογία: Στο έδαφος και σε ευκαιριακά υγρούς τοίχους. Δεν έχει αναφερθεί σε σπήλαια.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (S3W, S3S, S3A)

- ***Asterocapsa aerophytica*** Lederer 2000 (Απεικόνιση 3.24/εικ. 1-2)

Κύτταρα ελλειψοειδή, ωοειδή, πλάτους 3-4μm ($3,5 \pm 0,5, n = 30$), μήκους 4-5μm ($4,5 \pm 0,3, n = 30$) χωρίς τη θήκη. Τα κύτταρα εμφανίζονται μεμονωμένα ή ανά 2-32 σε μικρές σφαιρικές ή ωοειδείς αποικίες, διαστάσεων συνήθως 35 x 40μm. Θήκες ευρείες, με έντονη κοκκίωση στην

επιφάνεια, χωρίς ορατές στρώσεις, άχρωμες έως ερυθροκαστανές. Αρθροσπόρια 4 x 5μm χωρίς τη θήκη και 6,5 x 7μm με τη θήκη, ελλειψοειδή, ωοειδή έως γωνιώδη. Τα αρθροσπόρια φέρουν εξωτερικό φάκελο ('θήκη') με χαρακτηριστικές ακτινωτές ακίδες στην επιφάνεια. Τα αρθροσπόρια είναι εγκλεισμένα σε κοινή βλενώδη θήκη. Η κυτταρική διαίρεση είναι ακανόνιστη σε διάφορα επίπεδα.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ο υπό μελέτη οργανισμός ανταποκρίνεται στα διακριτικά γνωρίσματα του γένους *Asterocapsa* Chu (1952). Παρατηρήθηκαν τα στάδια των κύκλων ζωής: α) στάδιο αρθροσπορίου (status 'arthrocytosus') και β) νεαρές φάσεις από το στάδιο των νανοκυττάρων (status 'nanocyctosus') κατά Lederer (2000). Ο τρίτος κύκλος ζωής (κύτταρα ακανόνιστου σχήματος με «ακιδωτές» θήκες, εγκλεισμένα σε άμορφη ζελατινώδη μάζα κατά Komárek & Anagnostidis 1998, ή 'status familiaris' κατά Lederer 2000) δεν παρατηρήθηκε.

Εξάπλωση: Το είδος *Asterocapsa aerophytica* (Lederer 2000) είναι το πρώτο είδος *Asterocapsa* που έχει εδραιωθεί από την Ευρώπη (Σλοβενία).

Οικολογία: Το είδος *Asterocapsa aerophytica* (Lederer 2000) ανευρέθη σε αεροφυτικό ενδιαίτημα ως επιφυτικό στο χλωροφύκος *Trentepohlia* cf. *uncinata*.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά, Φράγγχι

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K1A, F2A, F3S, F5S, F5A)

- ***Asterocapsa divina*** Komárek 1993 (Απεικόνιση 3.24/ εικ. 3-7)

Κύτταρα ελλειψοειδή, ωοειδή, διαμέτρου 6-13 μm χωρίς τη θήκη, σπανίως μεμονωμένα, κυρίως ανά 2-48 σε αποικία. Θήκες παχιές, με έντονη κοκκίωση στην επιφάνεια, με ορατές στρώσεις, άχρωμες έως καστανοκίτρινες. Αρθροσπόρια 4 X 5μm χωρίς τη θήκη και 6,5 x 7μm με τη θήκη, ελλειψοειδή, ωοειδή έως γωνιώδη. Τα αρθροσπόρια φέρουν ισχυρό εξωτερικό φάκελο ('θήκη') με χαρακτηριστικές ακτινωτές ακίδες στην επιφάνεια. Τα αρθροσπόρια είναι εγκλεισμένα σε κοινή βλενώδη θήκη. Η κυτταρική διαίρεση είναι ακανόνιστη σε διάφορα επίπεδα.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Παρατηρήθηκαν τα στάδια των κύκλων ζωής: α) στάδιο αρθροσπορίου (status 'arthrocytosus'), β) νεαρές φάσεις από το στάδιο των νανοκυττάρων (status 'nanocyctosus') καθώς και γ) ο τρίτος κύκλος ζωής (ακανόνιστου σχήματος κύτταρα εγκλεισμένα σε ακιδωτές θήκες σε μια άμορφη ζελατινώδη μάζα κατά Komárek & Anagnostidis 1998. Ο υπό μελέτη οργανισμός ανταποκρίνεται πλήρως στον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Ευρώπη: Ισπανία (Aboal et al. 2003), Αμερική: Μεξικό (Komárek & Anagnostidis 1999, Ramirez et al. 2009), Βραζιλία (Werner 2010).

Οικολογία: Ασβεστολιθικοί βράχοι. Έχει αναφερθεί από σπήλαια της Ισπανίας (Aboal et al. 2003, Martinez & Asencio 2010)

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (S1S, S1A)

- ****Asterocapsa jilinica*** Xiao 2000 (Απεικόνιση 3.24/ εικ. 8)

Κύτταρα ελλειψοειδή, ωοειδή, (2,5) 4 x 4,5μm χωρίς τη θήκη. Η θήκη είναι παχειά με σαφείς στρώσεις, άχρωμη έως ιώδης με αδρή κοκκίωση στην επιφάνεια. Κύτταρα μεμονωμένα ή ανά 2-16-32 προς σχηματισμό μικρών αποικιών, σφαιρόμορφων ή ωοειδών, διαστάσεων 16-35 x 25-40 μm. Οι μικρές αποικίες αποτελούνται από 2-4 κύτταρα τα οποία συσσωματώνονται σε μεγαλύτερες μεγέθους έως 55μm. Παρατηρήθηκαν αρθροσπόρια διαστάσεων, 5 x 6 μm χωρίς τη θήκη και 7 x 8μm με τη θήκη, ελλειψοειδή, ωοειδή έως γωνιώδη, ιώδη-μελανά με έντονα κοκκιωμένη θήκη. Η κυτταρική διαίρεση είναι ακανόνιστη και λαμβάνει χώρα σε διάφορα επίπεδα. Η αναπαραγωγή γίνεται με α) 'διάλυση' των αποικιών και απελευθέρωση μεμονωμένων κυττάρων ή μικρών αποικιών και β) άνοιγμα του φακέλου των αρθροσπορίων και απελευθέρωση των νέων κυττάρων.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ο υπό μελέτη οργανισμός ανταποκρίνεται πλήρως στον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Είναι γνωστό μόνο από τον τόπο της πρώτης ανεύρεσης: Κίνα, επαρχία Jilin, Xiao 2000.

Οικολογία: Υγροί βράχοι.

Τόπος ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K1W, K1A, K2W, K2S, K2A)

- ****Asterocapsa sinica*** Liang & Chen 1985 (Απεικόνιση 3.24/ εικ. 9-10)

Κύτταρα ελλειψοειδή, ωοειδή έως γωνιώδη, πλάτους 3-4μm και μήκους 4,5-5,5μm χωρίς τη θήκη, ενώ με τη θήκη είναι πλάτους 8-12μm. Η θήκη είναι παχειά, άχρωμη έως χρυσοκίτρινη χωρίς στρώσεις αλλά φέρει επιφανειακές προεκβολές. Τα κύτταρα είναι μεμονωμένα ή κατά σφαιρικές ή ωοειδείς αποικίες των 2-16 κυττάρων, διαμέτρου 15-35μm. Παρατηρήθηκαν μεγάλες αποικίες, διαστάσεων 200-300 μm, αποτελούμενες από υποαποικίες. Τα αρθροσπόρια είναι ελλειψοειδή, ωοειδή έως γωνιώδη, με χρυσοκίτρινη απόχρωση. Τα αρθροσπόρια φέρουν έναν ευρύ φάκελο, πάχους 2μm, με χαρακτηριστικές ακίδες στην επιφάνεια. Τα αρθροσπόρια είναι εγκλεισμένα σε κοινή βλεννώδη θήκη. Η κυτταρική διαίρεση γίνεται ακανόνιστα σε

διάφορα επίπεδα με α) αποσύνθεση των αποικιών και απελευθέρωση μεμονωμένων κυττάρων ή μικρών ομάδων κυττάρων και β) ρήξη του φακέλου των αρθροσπορίων και απελευθέρωση νέων κυττάρων. Νανοκύτταρα δεν παρατηρήθηκαν.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ο υπό μελέτη οργανισμός ανταποκρίνεται πλήρως στον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Είναι γνωστό μόνον από τον τόπο της πρώτης του ανεύρεσης στην Κίνα (Liang & Chen 1985).

Οικολογία: Υγροί βράχοι.

Τόπος ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K5P, K5A)

- ***Chlorogloea novacekii*** Komárek & Montejano 1994

Αποικίες κυρίως ακανόνιστες, κίτρινης απόχρωσης με κύτταρα πυκνώς τοποθετημένα και περιβαλλόμενα από δυσδιάκριτη θήκη. Κύτταρα σφαιρικά, υποσφαιρικά, διαμέτρου (1,5) 2-3 μm.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ο υπό μελέτη οργανισμός ανταποκρίνεται πλήρως στον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Έχει αναφερθεί από την Κεντρική Βοημία (Τσεχία).

Οικολογία: Απαντάται σε υγρούς βράχους κυρίως σε σκιερά μέρη. Έχει αναφερθεί από σπήλαιο της Πολωνίας (Czerwik-Marcinkowska & Mrozinska 2011).

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγχθι

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F3W)

- ***Cyanothece aeruginosa*** (Nägeli) Komárek 1976

Κύτταρα μονήρη, ή ανά δύο μετά την κυτταρική διαίρεση, ελλειψοειδή με αποστρογγυλεμένα άκρα, πλάτους 13-19 μm και μήκους 19-22 μm. Ο χρωματισμός των κυττάρων είναι έντονα κυανοπράσινος, το δε κυτταρικό περιεχόμενο φέρει αδρή κοκκίωση.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ο υπό μελέτη οργανισμός ανταποκρίνεται πλήρως στον τύπο του είδους. Έχει καθιερωθεί αρχικά ως *Synechococcus aeruginosus* Nägeli και στη συνέχεια αναθεωρήθηκε υπό το όνομα *Cyanothece aeruginosa* (Nägeli) Komárek.

Εξάπλωση: Έχει αναφερθεί από την Ευρώπη (ως *Synechococcus aeruginosus* Nägeli): Μεγάλη Βρετανία (Whitton et al. 1998), Ρουμανία (Caraus 2002), Ισπανία (Alvarez-Cobelas 1982), Σουηδία (Skuja 1948). Ασία: Πακιστάν (Leghari et al. 2005), Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία: (Cassie 1984), (Day et al. 1995). Ως *Cyanothece aeruginosa* (Nägeli) Komárek από την Ευρώπη : Ισπανία (Alvarez-Cobelas & Gallardo 1988, Ascencio & Aboal 1996), Τουρκία (Ersanli & Gönülol 2006), Ασία: China (Hu & Wei 2006), Σιγκαπούρη (Pham et al. 2011), Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία: (Bostock & Holland 2010), Αμερική (Smith & Olson 2007).

Οικολογία: Απαντάται σε γλυκά ύδατα και υγρούς βράχους. Από σπήλαια έχει ανευρεθεί στην Ισπανία, σπήλαιο 'Andragulla' (Ascencio & Aboal 1996) και από την Αμερική, σπήλαιο 'Mammoth', Kentucky (Smith & Olson 2007).

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (S1W)

- ***Chroococcus lithophilus*** Ercegonić 1925

Αποικίες μικροσκοπικά και μακροσκοπικά άμορφες. Κύτταρα σφαιρικά, με κοκκίωση ελαιοπράσινου χρωματισμού, διαμέτρου 7-11μm, περιβαλλόμενα από άχρωμη και δυσδιάκριτη θήκη. Κύτταρα με τη θήκη, διαμέτρου 8-12μm. Αποικία με 2-4 κύτταρα, διαστάσεων 15×15μm, περιβαλλόμενα από άχρωμη, άνευ στρώσεων, λεπτή θήκη.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται προς τον τύπο του είδους. Τα μελετηθέντα δείγματα είχαν ευκρινή ελαιοπράσινο χρωματισμό, σε συμφωνία με την αρχική περιγραφή του Ercegonic, ενώ οι Komárek & Anagnostidis (1998) αναφέρουν κυανοπράσινη απόχρωση κυττάρων.

Εξάπλωση: Το *Chroococcus lithophilus* είναι ένα είδος που έχει ανευρεθεί στην Κροατία, στη Σλοβενία (Mulek & Kosi 2008), στην Ισπανία (Alvarez-Cobelas & Gallardo 1988) αλλά και στην Ασία (Hu & Wei 2006).

Οικολογία: Είναι αεροφυτικό, επιλιθικό ή ενδολιθικό είδος απαντώμενο σε υγρούς ασβεστολιθικούς βράχους. Έχει ανευρεθεί στο σπήλαιο Račiške της Σλοβενίας (Mulek & Kosi 2008).

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K4W, K4A, K5A)

- ***Chroococcus subsphaericus*** Gardner 1927 (Απεικόνιση 3.25/ εικ. 2)

Κύτταρα μεμονωμένα, σφαιρικά, διαμέτρου (7) 10-11 (12)μm, κιτρινοκαστανού έως ρόδιου χρωματισμού. Το κυτταρικό περιεχόμενο φέρει κοκκίωση, οι δε αποικίες αποτελούνται από 2-4 κύτταρα. Οι θήκες όταν υπάρχουν είναι πολύ λεπτές, άχρωμες, εφαπτόμενες του κυττάρου και πολύ δυσδιάκριτες.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται προς τον τύπο του είδους .

Εξάπλωση: Το τυπικό είδος έχει περιγραφεί από ασβεστολιθικό βράχο δίπλα σε θερμές πηγές στο Πόρτο Ρίκο, στην Κεντρική Αμερική (Gardner 1927). Αποτελεί δεύτερη ανεύρεση παγκοσμίως.

Οικολογία: Σε ασβεστολιθικούς βράχους πλησίον θερμών πηγών. Δεν έχει αναφερθεί από σπήλαια.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγχθι

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F6A)

- ***Chroococcus subnudus*** (Hansgirg) Croneberg & Komárek 1944 (Απεικόνιση 3.25/ εικ. 1)

Κύτταρα σφαιρικά, διαμέτρου 9-15μm, κυανοπράσινου έως έντονου κυανοπράσινου χρωματισμού. Θήκη εφαπτόμενη στο κύτταρο, υαλώδης, άνευ στρώσεων. Αποικίες αποτελούμενες από 2-8 κύτταρα, διαστάσεων 21×19μm.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Κυρίως στις τροπικές περιοχές του νοτίου ημισφαιρίου μέχρι τις περιοχές της τούνδρας.

Οικολογία: Συναντάται σε έλη και σε υγρούς βράχους, σε παραλίμνιες καθώς και σε ορεινά ενδιαιτήματα. Δεν έχει ανευρεθεί σε σπήλαια.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγχθι

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F6A)

- ***Chroococcus westii*** Boye-Petersen 1923 (Απεικόνιση 3.25/ εικ. 3-4)

Κύτταρα συνήθως ανά 2-4, ελλειψοειδή έως σφαιρικά ελαιοπράσινα, ιώδη με αδρή, αραιή ή πυκνή κοκκίωση, διαμέτρου 14-16 (22)μm χωρίς τη θήκη, 15-27μm με τη θήκη. Θήκες άχρωμες, ζελατινώδεις, με σαφείς συγκεντρικές στρώσεις (έως 8). Η εξωτερική στρώση ενίοτε αποσπάται (σαν να σχίζεται).

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Κυρίως σε εύκρατες (Αυστρία, Αγγλία, Γερμανία κ.α) πιθανώς και σε υποτροπικές και τροπικές περιοχές.

Οικολογία: Υπεναέριο σε υγρούς βράχους, συνήθως σε ορεινά ενδιαιτήματα. Έχει ανευρεθεί σε σπήλαια της περιοχής Swäbische Γερμανίας (Dobat 1977), Škocjanske Jame Σλοβενίας (Golubic 1967, Mulek et al. 2007), καθώς και στο σπήλαιο Gelada Ισπανίας (Martinez & Asencio 2010).

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K5W)

- ***Eucapsis parallelepipedon*** (Schmidle) Komárek & Hindak 1989 (Απεικόνιση 3.26/ εικ. 1-3)

Αποικίες σχετικά μικρές, κυβοειδείς, κυρίως με 4-64 κύτταρα πυκνώς τοποθετημένα και εγκλεισμένα σε άχρωμη, υαλώδη θήκη. Κύτταρα σφαιρικά έως ελαφρώς επιμηκυνόμενα, διαμέτρου 2-4μm. Ο χρωματισμός των κυττάρων είναι κυανοπράσινος και το κυτταρικό περιεχόμενο είναι ομοιογενές.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Στους τροπικούς και πιθανώς σε θερμές περιοχές της εύκρατης ζώνης. Σύμφωνα με τους Komárek & Anagnostidis (1998), οι αναφορές από την κεντρική και νότια Ευρώπη αν και δεν είναι καλώς τεκμηριωμένες.

Οικολογία: Σε γλυκά ύδατα, βυθισμένο σε ελαφρώς αλκαλικά έλη. Δεν έχει αναφερθεί από σπήλαια.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά, Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K2A, S4S, S6W)

- ***Gloeocapsa atrata*** (Kützing) 1845 (Απεικόνιση 3.26/ εικ. 4)

Αποικίες φαιοπράσινες, αποτελούμενες από θυγατρικές αποικίες εντός των μητρικών, 2-4 κυττάρων που περιβάλλονται από ατομική θήκη. Θήκες άχρωμες, με στρώσεις. Κύτταρα σφαιρικά ή ελλειψοειδή, διαμέτρου 4-6 μm, κυανοπράσινης απόχρωσης.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Κεντρική και Βόρεια Ευρώπη. Ευρώπη: Ρουμανία (Caraus 2002), Ισπανία (Alvarez-Cobelas & Gallardo 1988), Σλοβενία (Mulek & Kosi 2008), Ουγγαρία (Claus 1955), Ασία: Ισραήλ (Vinogradova et al. 2000), Κίνα (Hu & Wei 2006).

Οικολογία: Υπεναέριο, σε υγρούς βράχους και σε υγρό έδαφος. Έχει ανευρεθεί σε σπήλαια της περιοχής Scwäbische Γερμανίας (Dobat 1977), καθώς και σε σπήλαια της Σλοβενίας, σπήλαιο Žkočjanske Jame (Mulek et al. 2007) και σπήλαιο Račiške (Mulek & Kosi 2008)

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (S1W)

- ***Gloeocapsa bituminosa*** (Bory) Kützing 1849 (Απεικόνιση 3.26/ εικ. 5-6)

Αποικίες αποτελούμενες από 2-8 κύτταρα, βλεννώδεις, με δυσδιάκριτη κοκκίωση. Διαστάσεις δικύτταρης αποικίας 10μm, τρικύτταρης 15μm, οκτακύτταρης 25×24μm. Κύτταρα σφαιρικά, διαμέτρου (2) 3-4μm, φαιές, με ρόδινες αποχρώσεις.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Ευρώπη.

Οικολογία: Υπεναέριο, σε υγρούς ασβεστολιθικούς βράχους. Δεν έχει αναφερθεί από σπήλαια.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K5A)

- ***Gloeocapsa caldariorum*** Rabenhorst 1865

Αποικίες βλεννώδεις, αποτελούμενες από 2-6 κύτταρα, σε αραιά διάταξη. Διάμετρος 6κύτταρης αποικίας 20μm. Θήκη ευρεία, με ασθενή κοκκίωση. Κύτταρα σφαιρικά, διαμέτρου (2,5) 3μm, περιβαλλόμενα από ατομική θήκη.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Κοσμοπολιτικό. Απαντάται στην Ευρώπη και στην Ασία, Ισραήλ (Vinogradova et al. 2000).

Οικολογία: Υπεναέριο, σε υγρούς βράχους. Έχει αναφερθεί από το σπήλαιο Corral Nou της Ισπανίας (Roldán et al. 2004).

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K5W)

- ***Gloeocapsa decorticans*** (Braun) Richter in Wile 1925

Αποικίες αποτελούμενες από θυγατρικές αποικίες εντός των μητρικών, 2-8 κυττάρων. Θήκες βλενωδείς, άχρωμες, ευρείες, με σαφείς στρώσεις. Κύτταρα σφαιρικά έως ελαφρώς επιμηκυσμένα, διαμέτρου 6-7 (9)μm, κυανοπράσινου χρωματισμού.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Σποραδική εξάπλωση.

Οικολογία: Υπεναέριο, σε υγρούς ασβεστολιθικούς βράχους. Έχει αναφερθεί από το σπήλαιο Corral Nou της Ισπανίας (Roldán et al. 2004), και ως *Gloeocapsa cf. decorticans* από σπήλαια της Πολωνίας (Czerwik-Marcinkowska & Mrozinska 2011).

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K5W)

- ***Gloeocapsa punctata*** Nägeli 1849

Αποικίες φαιοπράσινες, συνιστάμενες από θυγατρικές αποικίες περιβαλλόμενες από θήκες άχρωμες, άνευ στρώσεων. Κύτταρα σφαιρικά, διαμέτρου (1,5) 2-3μm, κυανοπράσινου χρωματισμού.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Συναντάται στην Ευρώπη: Μεγάλη Βρετανία (Whitton et al. 1998), Ρουμανία (Caraus 2002), Ισπανία (Aboal 1988, Alvarez-Cobelas & Gallardo 1988), Σλοβενία (Mulek & Kosi 2008) Ασία: Ισραήλ (Vinogradova et al. 2000), Κίνα (Hu & Wei 2006).

Οικολογία: Υπεναέριο, σε υγρούς βράχους. Έχει αναφερθεί από το σπήλαιο 'Baradla' της Ουγγαρίας (Claus 1955, Palik 1960) και από το σπήλαιο 'Račiške' της Σλοβενίας (Mulek & Kosi 2008).

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (S1S, S1A)

- ***Gloeocapsopsis crepidinum*** (Thuret) Geitler ex Komárek 1993

Αποικίες μεγάλες, πράσινης απόχρωσης. Κύτταρα σφαιρικά, και ενίοτε ασθενώς γωνιώδη, διαμέτρου 2,5-3μm, με λεπτή, άχρωμη θήκη. Το κυτταρικό περιεχόμενο είναι ομοιογενές, κυανοπράσινης απόχρωσης.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Κοσμοπολιτικό. Ως *Gloeocapsa crepidinum* έχει αναφερθεί στην Ευρώπη: Μ. Βρετανία (Batters 1902, Whitton et al. 1998), Ισπανία (Miranda 1931, Seoane-Camba 1965, Alvarez-Cobelas & Gallardo 1988, Bárbara & Cremades 1996) στις ΗΠΑ: Connecticut (Hylander 1928), στην Ασία: Τουρκία (Taskin et al. 2008). Ως *Gloeocapsopsis crepidinum* στην Ευρώπη: Πορτογαλία (Araujo et al. 2009), Ισπανία (Calvo & Bárbara 2002, Bárbara & Cremades 1999, Calvo & Bárbara 2002, Pena & Bárbara 2002, Bárbara et al. 2005, Cires Rodriguez & Cuesta Moliner 2010), στην Αμερική: Βραζιλία (Werner 2010) στην Ασία: Ισραήλ (Vinogradova et al. 2000).

Οικολογία: Αλόφιλο, επιλιθικό. Συναντάται σε βράχους, πέτρες ή ξύλινα υποστρώματα, παράλιες και υποπαράλιες περιοχές καθώς και σε εσωτερικές αλατούχες λίμνες. Δεν έχει αναφερθεί από σπήλαια.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγχθι

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F1P, F2S, F3S, F6W, F6P)

- ***Gloeocapsopsis pleurocapsoides*** (Nováček) Komárek & Anagnostidis 1986

Αποικίες αποτελούμενες από συσσωματώματα μεμονωμένων κυττάρων ή κυττάρων διαμορφωμένων σε ομάδες. Θήκη ζελατινώδης κατά στρώσεις, και έντονο καστανοκίτρινο χρωματισμό. Κύτταρα σφαιρικά έως ελλειψοειδή, συνήθως σχηματίζονται θυγατρικές, (δευτερογενείς) αποικίες εντός των μητρικών. Κύτταρα σφαιρικά, διαμέτρου 4-5μm, επιμηκυμένα διαστάσεων 5-6 × 6-12μm. Παρατηρήθηκαν έμμονα κύτταρα με έντονη ευρεία κίτρινη θήκη.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Σποραδική εξάπλωση: Ισπανία, Τσεχία, Ασία, Αργεντινή.

Οικολογία: Υπεναέριο, σε άνυδρους ή παροδικά υγρούς βράχους. Δεν έχει αναφερθεί από σπήλαια.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά, Σπήλαιο Φράγχθι

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K1A, F6A)

- ***Gloeotheca fusco-lutea*** Nägeli 1849

Αποικίες με 4,8,16 έως 32 κύτταρα περιβαλλόμενα από θήκες ενίοτε κιτρινόχρωμες. Διαστάσεις αποικίας με 16 κύτταρα έως 25μm. Κύτταρα σκοτεινής πράσινης απόχρωσης, κυλινδρικά, πλάτους 5μm και μήκους 7-9μm.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Αποτελεί ένα είδος κοινό για την Ευρώπη. Ωστόσο έχει αναφερθεί και από τις ΗΠΑ: Florida (Taylor 1928) και την Ασία: Κίνα (Hu & Wei 2006).

Οικολογία: Υπεναέριο, σπανίως κάτω από υγρούς βράχους, σε γλυκά ύδατα, βυθισμένο μεταξύ άλλων υδρόβιων φυτών και φυκών. Δεν έχει αναφερθεί από σπήλαια.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K5S, K5A)

- ***Herpyzonema pulverulentum*** Hernández-Mariné & Canals 1994

Θαλλός ενασβεστωμένος. Νήματα φαιοπράσινου χρωματισμού, ο οποίος εξαρτάται από την ηλικία και τον βαθμό ενασβέστωσης. Νήματα πλάτους 15-25μm. Κύτταρα βραχύτερα του πλάτους, κυλινδρικά έως πιθοειδή, πλάτους 6-8μm και μήκους 3-6μm. Επάκριο κύτταρο ημισφαιρικό. Ετερόκυτα δισκοειδή, πλάτους 7- μm. Αληθής διακλάδωση Υ-τύπου καθώς και παρουσία ψευδών διακλαδώσεων. Παρατηρήθηκαν νεκρίδια. Αναπαραγωγή με ορμοκύστεις. Δεν παρατηρήθηκαν ακινήτες και νανοκύτταρα.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Ευρώπη.

Οικολογία: Υπεναέριο, σε υγρούς βράχους σπηλαίων της Ισπανίας (Hernández-Mariné & Canals 1994, Roldán et al. 2004).

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K5A)

- ****Hydrocoleum stankovicii*** Čado 1958 (Απεικόνιση 3.27/ εικ. 1-2)

Νήματα μεμονωμένα ή κατά ομάδες. Κολεός άχρωμος, λεπτός με περισσότερα των 2 τριχωμάτων. Τριχώματα κυανοπράσινα, φαιά, χωρίς σύσφιξη στα εγκάρσια τοιχώματα, πλάτους 5-6 (7)μm. Επάκριο κύτταρο αποστρογγυλεμένο, κωνικό, με κωνική καλύπτρα.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.. Η ανεύρεσή του στο σπήλαιο Καστριά αποτελεί τη δεύτερη ανεύρεση παγκοσμίως και επιβεβαιώνει την υπόσταση του είδους.

Εξάπλωση: Έχει αναφερθεί μόνον από την Πρώην Γιουγκοσλαβική Δημοκρατία της Μακεδονίας (ΠΓΔΜ) (Čado 1958).

Οικολογία: Επιλιθικό στις ακτές της λίμνης Οχρίδας.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K1A)

- ***Leptolyngbya compacta*** (Kützing ex Hansgirg) Komárek in Anagnostidis 2001

Θαλλός παχύς, ο οποίος διαμορφώνει δερματώδεις επίπαγους στο υπόστρωμα, ελαιοπράσινου έως καστανού χρωματισμού. Τριχώματα περιπεπλεγμένα, χωρίς σύσφιξη στα εγκάρσια τοιχώματα, πλάτους 1,5-2μm. Κύτταρα κυρίως ισοδιαμετρικά, με ομογενές περιεχόμενο και κυανοπράσινη απόχρωση.

Ταξινομικές παρατηρήσεις : Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Κοινό στην Κεντρική Ευρώπη.

Οικολογία: Υπεναέριο, σε υγρούς βράχους και σε ξύλα. Έχει αναφερθεί και από θέσεις κοντά σε θερμές πηγές.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (S1S, S1A, S3P)

- ***Leptolyngbya ercegovicii*** Čado 1958 (Απεικόνιση 3.27/ εικ. 6)

Νήματα περιπεπλεγμένα, πλάτους 1,5-2μm. Κολεός άχρωμος, λεπτός έως δυσδιάκριτος. Τρίχωμα πολύ λεπτό, πλάτους 1-1,5μm. Κύτταρα μακρύτερα του πλάτους, μήκους 3-4μm. Παρατηρείται η χαρακτηριστική μορφή των ευενδολιθικών οργανισμών.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Τα μελετηθέντα δείγματα έχουν μεγαλύτερο πλάτος τριχώματος σε σύγκριση με το τυπικό είδος *Leptolyngbya ercegovicii* (1-1,5μm έναντι 0,5-0,8μm). Σε όλα τα άλλα μορφολογικά γνωρίσματα ανταποκρίνεται προς τον τύπο του είδους. Τα μεγαλύτερα τριχώματα ενθυμίζουν το είδος *Leptolyngbya gracillima* 1,6-1,8 (-3,5)μm. Επειδή όμως δεν διαπιστώθηκαν σε ανεξάρτητους πληθυσμούς αλλά σε ανάμειξη με τα υπόλοιπα άτομα και επειδή δεν διαφέρουν ως προς κάποιο άλλο μορφολογικό γνώρισμα θεωρούμε ότι μπορούν να ενταχθούν στα όρια ποικιλομορφίας του είδους.

Εξάπλωση: Περιορισμένης εμφάνισης, στη Πρώην Γιουγκοσλαβική Δημοκρατία της Μακεδονίας (ΠΓΔΜ). Προσφάτως έχει αναφερθεί από το Μαρόκο (Douma et al. 2009). Η ανεύρεσή του επιβεβαιώνει την υπόσταση του είδους.

Οικολογία: Ευενδολιθικό σε ασβεστολιθικούς βράχους, στη κατώτερη παράλια ζώνη σε στάσιμα νερά, συνήθως μαζί με το είδος *Phormidium lacustre*.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά, Σπήλαιο Φράγγθι, Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K2W, K2S, K4W, K4P, K5A, K7S, F1S, F6P, S1P, S3P)

- ***Leptolyngbya henningsii*** (Lemmermann) Anagnostidis 2001 (Απεικόνιση 3.27/ εικ. 5)

Νήματα πλάτους 1,8-2μm. Τριχώματα πλάτους 1-1,2μm. Κολεός άχρωμος, λεπτοφυής. Κύτταρα συνεσφιγμένα, σχεδόν ισοδιαμετρικά. Επάκριο κύτταρο κυρίως αποστρογγυλεμένο ενίοτε αμβλύ. Σπανίως παρατηρήθηκαν ενασβεστώσεις του νήματος.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Από τον τύπο του είδους διαφέρει ως προς τη σύσφιξη των κυττάρων και την σπάνια ενασβέστωση των νημάτων. Όλα τα άλλα μορφολογικά γνωρίσματα εμπίπτουν στα όρια ποικιλομορφίας του τυπικού είδους.

Εξάπλωση: Απαντάται στην κεντρική Ευρώπη αλλά και στην Ασία, Ισραήλ (Vinogradova et al. 2000).

Οικολογία: Σε υγρούς τοίχους και βράχους, συχνά και σε υγρό έδαφος, επιφυτικό σε όξινα ύδατα κοντά σε *Sphagnum*. Αναφορές από ενδιαιτήματα υδάτων πρέπει να επανεξεταστούν σύμφωνα με τους Komárek & Anagnostidis (2005). Έχει αναφερθεί από τα σπήλαια της Ουγγαρίας 'Baradla' και 'Abaligeter' (Claus 1955, Claus 1962).

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγχθι

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F4W)

- ***Leptolyngbya nana*** (Tilden) Anagnostidis & Komárek 1988 (Απεικόνιση 3.27/ εικ. 4)

Θαλλός εκτεταμένος με χαρακτηριστικό γνώρισμα τον σχηματισμό ενασβεστωμένων επιπάγων. Νήματα ευθέα, πλάτους 1,5-2μm. Κολεός άχρωμος και λεπτοφυής. Κύτταρα ισοδιαμετρικά, μήκους (1,5), 2-2,5μm και ιώδους χρωματισμού. Επάκριο κύτταρο αποστρογγυλεμένο.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Αναφέρεται από την Αμερική και την Γαλλία.

Οικολογία: Υπεναέριο, αναφερόμενο από ξύλινη δεξαμενή κοντά σε νερό. Δεν έχει αναφερθεί από σπήλαια.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγχθι

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F1W, F4P)

- ***Leptolyngbya palikiana*** Claus 1955 (Απεικόνιση 3.27/ εικ. 7)

Θαλλός με έντονη κυανοπράσινη απόχρωση. Νήματα πλάτους 2-3μm. Κολεός επαπτόμενος του τριχώματος, λεπτοφυής έως δυσδιάκριτος. Κύτταρα ισοδιαμετρικά, πλάτους 2-2,5μm, με ομοιογενές κυτταρικό περιεχόμενο. Επάκριο κύτταρο αποστρογγυλεμένο.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Τα μελετηθέντα δείγματα ανταποκρίνονται πλήρως προς τη μορφή *Lyngbya palikiana* f. *minor* Claus 1962. Το είδος *Lyngbya palikiana* Claus 1955 στο ταξινομικό σύστημα των Anagnostidis & Komárek 2005 αναφέρεται υπό το γένος *Phormidium* και εντάσσεται στις ταξινομικές μονάδες που χρήζουν αναθεώρησης χωρίς όμως να μετονομάζεται ως *Phormidium*. Οι συγκεκριμένοι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι η μορφή *Lyngbya palikiana* f. *minor* Claus 1962 πιθανότατα αποτελεί κάποιο άλλο είδος *Leptolyngbya*, χωρίς να το αναθεωρούν. Κατά την άποψή μας αμφότερες οι ταξινομικές μονάδες θα πρέπει με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά να ενταχθούν στο γένος *Leptolyngbya*. Το είδος *L. palikiana* αναφέρθηκε μόνο μία φορά από σπήλαιο της Ουγγαρίας. Η ύπαρξή του αμφισβητείται, ωστόσο, η παρούσα δεύτερη ανεύρεση και μάλιστα από το ίδιο ενδιαίτημα σπηλαίων, κατά την άποψή μας, ισχυροποιεί την υπόσταση του είδους. Η παρατήρηση πλούσιου υλικού εξ αιτίας της ανεύρεσης και στα τρία υπό μελέτη σπήλαια μας επιτρέπει επί του παρόντος να εντάξουμε το είδος υπό το γένος *Leptolyngbya*. Ωστόσο περαιτέρω έρευνα με πολυφασική προσέγγιση είναι αναγκαία για να καθορισθεί η ταξινομική του θέση.

Εξάπλωση: Έχει ανευρεθεί μόνο στην Ουγγαρία.

Οικολογία: Βενθικό αλλά και από το σπήλαιο της Ουγγαρίας (Claus 1962).

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά, Σπήλαιο Φράγγχι, Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K1W, K2W, K2S, K2A, K3P, K3S, K3A, K5W, K7S, K7A, F2S, F5A, F6A, S5S, S5A)

- ****Leptolyngbya undosa*** (Čado) Anagnostidis & Komárek 1988

Νήματα πλάτους 2,5-3μm. Τριχώματα περιπεπλεγμένα, κυανοπράσινης απόχρωσης χωρίς σύσφιξη στα εγκάρσια τοιχώματα. Κολοοί άχρωμοι, λεπτοί. Κύτταρα μήκους 2-3μm. Επάκριο κύτταρο αποστρογγυλεμένο.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Έχει ανευρεθεί στη λίμνη Οχρίδα της Πρώην Γιουγκοσλαβικής Δημοκρατίας της Μακεδονίας (ΠΓΔΜ). Η εκ νέου ανεύρεσή του στο σπήλαιο «Σεληνίτσα» της Ελλάδος ισχυροποιεί την υπόσταση του είδους.

Οικολογία: Σε γλυκά ύδατα, ενδολιθικό, σε βυθισμένες ασβεστολιθικές πέτρες.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (S5S, S5A)

- ***Nostoc letestui*** Frémy 1930 (Απεικόνιση 3.28/ εικ. 1)

Θαλλός φυλλοειδής, ανοιχτού πράσινου χρωματισμού. Θήκη άχρωμη, λεπτοφυής. Νήματα πλάτους 6μm. Κύτταρα μήκους 5-6,5μm και πλάτους έως 6μm. Ετερόκυτα σφαιρικά, πλάτους 9-10 μm. Έμμονα κύτταρα δεν παρατηρήθηκαν.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Έχει ανευρεθεί στη Αφρική (Frémy 1930). Η εκ νέου ανεύρεσή του σε σπήλαια της Ελλάδος ισχυροποιεί την υπόσταση του είδους.

Οικολογία: Σε γλυκά ύδατα, ενδολιθικό (κυρίως χασμοενδολιθικό), σπανιότερα επιλιθικό σε βυθισμένες ασβεστολιθικές πέτρες.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (S3A)

- ***Oscillatoria rupicola*** Hansgirg 1890

Τριχώματα κυανοπράσινα, πλάτους 4-5μm, χωρίς σύσφιξη στα εγκάρσια τοιχώματα. Κύτταρα κατά πολύ βραχύτερα του μήκους, 0,5-1μm. Επάκριο κύτταρο αποστρογγυλεμένο.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Απαντάται κυρίως στην κεντρική και νότια Ευρώπη αλλά πιθανώς είναι ευρύτερα διαδεδομένο.

Οικολογία: Υπεναέριο σε υγρούς βράχους, συνήθως σε βλέννη άλλων φυκών. Έχει αναφερθεί από το σπήλαιο 'Mammoth' της Αμερικής (Smith & Olson 2007).

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγχθι, Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F1A, F7W, S6S, S6A)

- ***Phormidium articulatum*** (Gardner) Anagnostidis & Komárek 1988 (Απεικόνιση 3.28/ εικ. 2)

Θαλλός κυνοπράσινος. Νήματα πλάτους 2,5-3μm. Κολεοί, άχρωμοι, λεπτοί έως δυσδιάκριτοι. Τριχώματα κυανοπράσινα, χωρίς σύσφιξη στα εγκάρσια τοιχώματα, με χαρακτηριστική κυκλική διάταξη. Κύτταρα βραχύτερα του πλάτους, μήκους 1-2μm. Επάκριο κύτταρο αποστρογγυλεμένο.

Ταξινομικές Παρατηρήσεις: Κατά τους Komárek & Anagnostidis (2005) χρειάζεται επανεξέταση καθώς πρόκειται για ένα συλλογικό είδος. Τα μελετηθέντα δείγματα ανταποκρίνονται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Κοσμοπολιτικό. Απαντάται σε πολλές περιοχές όπως Ευρώπη, ΗΠΑ, Ασία: Ινδία, Αφρική.

Οικολογία: Έχει ευρεία εξάπλωση απαντώμενο σε γλυκά ύδατα έως και υγρούς βράχους. Έχει αναφερθεί από σπήλαια της Ισπανίας (Roldan et al. 2004).

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (S1S, S5P)

- ***Phormidium interruptum*** Kützing ex Gomont 1892

Θαλλός δερματώδης, κυανοπράσινου χρωματισμού. Νήματα ευθέα ενίοτε περιπεπλεγμένα. Κολοί άχρωμοι, λεπτοφυείς. Τριχώματα άνευ συσφίξεως στα εγκάρσια τοιχώματα, πλάτους 5-6μm. Κύτταρα βραχύτερα του πλάτους, με μήκος 2μm. Επάκριο κύτταρο αποστρογγυλεμένο.

Ταξινομικές Παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Κατά το πλείστον στην Ευρώπη π.χ. Ρουμανία (Caraus 2002).

Οικολογία: Απαντάται σε υγρούς βράχους και τοίχους. Δεν έχει αναφερθεί από σπήλαια.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (S4A)

- ***Phormidium inundatum*** Kützing ex Gomont 1892

Θαλλός ανοιχτού πράσινου χρωματισμού. Νήματα περιπεπλεγμένα. Κολοί άχρωμοι, λεπτοί, σχεδόν δυσδιάκριτοι. Τριχώματα κυανοπράσινα, πλάτους 3-5μm, χωρίς σύσφιξη στα εγκάρσια τοιχώματα. Κύτταρα σχεδόν ισοδιαμετρικά, μήκους 4-5μm. Επάκριο κύτταρο κωνικό με αποστρογγυλεμένη κορυφή.

Ταξινομικές Παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Κοσμοπολιτικό είδος π.χ. Ευρώπη: Μεγάλη Βρετανία (Whitton et al. 1998), Ρουμανία (Caraus 2012), Ασία: Ισραήλ (Vinogradova et al. 2000), Αμερική: νήσοι Χαβάη (Sherwood 2004).

Οικολογία: Απαντάται ως περιφυτικό σε ολιγοτροφικά έως μεσοτροφικά γλυκά ύδατα και πιθανώς σε υγρούς βράχους και τοίχους.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (S1W)

- ***Phormidium priestleyi*** Fritsch 1917 (Απεικόνιση 3.28/ εικ. 3)

Θαλλός σκοτεινού πράσινου χρωματισμού. Νήματα περιπεπλεγμένα. Κολοί, άχρωμοι, λεπτοφυείς έως δυσδιάκριτοι. Τριχώματα κυανοπράσινα έως ελαιοπράσινα, πλάτους 2,5-3μm. Κύτταρα βραχύτερα του μήκους, πιθοειδή.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους. Οι Komárek & Anagnostidis 2005 θέτουν τη συγκεκριμένη ταξινομική μονάδα υπό αμφισβήτηση. Πρόσφατα το *Phormidium priestleyi* Fritsch αναθεωρήθηκε και εντάχθηκε στο γένος *Phormidesmis* Turicchia et al. 2009, ως *Phormidesmis priestleyi* (Fritsch) Komárek et al. 2009. Ωστόσο, υπάρχουν ακόμα στελέχη στη διεθνή βιβλιογραφία τα οποία αναφέρονται με το όνομα *Phormidium priestleyi* όπως το στέλεχος *Phormidium priestleyi* ANTL 52.6 από την Ανταρκτική που δεν έχει ενταχθεί υπό το νέο γένος *Phormidesmis*. Υπογραμμίζεται δε ότι στην τράπεζα Genbank δεν υπάρχουν διαθέσιμες αλληλουχίες υπό το γένος *Phormidesmis*. Το στέλεχος από την Ανταρκτική (ANTL 52.6) θεωρείται επίσης από τους Komárek et al. (2009), ότι πιθανώς ανήκει στο γένος *Phormidesmis*. Επειδή ακόμα δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως η ταξινομική θέση προτιμήσαμε να διατηρήσουμε το όνομα *Phormidium priestleyi* της αρχική περιγραφής.

Εξάπλωση: Από την Ανταρκτική και από σπήλαιο της Ουγγαρίας (Claus 1955).

Οικολογία: Επιλιθικό σε ρέοντα ή στάσιμα ύδατα στην Ανταρκτική. Η αναφορά από το σπήλαιο της Ουγγαρίας αμφισβητείται από τους Komárek & Anagnostidis (2005) οι θεωρούν πως πιθανότατα πρόκειται για κάποιο είδος *Leptolyngbya*.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά, Σπήλαιο Φράγγχι, Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K2A, K3A, K5A, F1A, F3P, F4P, F5W, F5P, S2W, S6W)

- ***Phormidium lacustre*** (Čado) Anagnostidis 2001

Νήματα περιπεπλεγμένα. Κολοί άχρωμοι, λεπτοφυείς. Τριχώματα φαιού, κυανοπράσινου χρωματισμού, πλάτους 4μm. Κύτταρα μακρύτερα του πλάτους, με μήκος 6-8μm. Επάκριο κύτταρο κωνικό, αποστρογγυλεμένο.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Περιορισμένη εξάπλωση. Έχει ανευρεθεί και εδραιωθεί από την πρώην Δημοκρατία της Γιουγκοσλαβίας (ΠΓΔΜ). Προσφάτως έχει αναφερθεί από το Μαρόκο (Douma et al. 2009). Η ανεύρεσή του ισχυροποιεί την υπόσταση του είδους.

Οικολογία: Ευενδολιθικό ή επιλιθικό σε ασβεστολιθικούς βράχους στην παράλια ζώνη γλυκών υδάτων. Δεν έχει αναφερθεί από σπήλαια.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (S2W)• ****Phormidium macedonicum*** Čado 1959

Θαλλός σκοτεινού καστανού χρωματισμού. Νήματα περιπεπλεγμένα. Κολεοί λεπτοί, εφαιπτόμενοι του τριχώματος. Τριχώματα κυανοπράσινα έως καστανά πλάτους 2,5-3μm, χωρίς σύσφιξη στα εγκάρσια τοιχώματα. Κύτταρα ισοδιαμετρικά, 2-2,5μm. Επάκριο κύτταρο αποστρογγυλεμένο.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Περιορισμένη εξάπλωση. Έχει ανευρεθεί μόνον μία φορά στην πρώην Δημοκρατία της Γιουγκοσλαβίας (ΠΓΔΜ). Η παρούσα αναφορά αποτελεί τη δεύτερη ανεύρεση παγκοσμίως ισχυροποιώντας την υπόσταση της συγκεκριμένης ταξινομικής μονάδος.

Οικολογία: Σε παράλιους βράχους και πέτρες.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά, Σπήλαιο Φράγγχι,

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K2A, K3P, K4S, F6P, F6S)

• ***Phormidium setchellianum*** Gomont 1892

Θαλλός χαρακτηριστικού ιώδους χρωματισμού. Νήματα ευθέα, περιβαλλόμενα από κολεούς αρκετά δυσδιάκριτους. Νήματα πλάτους 6-7μm. Τριχώματα ροδόχροα—ιώδη, πλάτους 5-6 (7)μm. Κύτταρα κατά το πλείστον ισοδιαμετρικά ή βραχύτερα του πλάτους, με μήκος 4-5μm. Επάκριο κύτταρο σε ορισμένα τριχώματα με πεπαχυμένη μεμβρανή.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Τα μελετηθέντα νήματα φέρουν μεγαλύτερο πλάτος από το αναφερόμενο για τον τύπο του είδους (τυπ. είδος: 4-6,5μm). Ωστόσο η μικρή αυτή διαφορά αποδίδεται στο γεγονός ότι τα μελετηθέντα δείγματα προέρχονταν από καλλιεργημένο υλικό.

Εξάπλωση: Απαντάται στην Ευρώπη π.χ. Ισπανία: (Alvarez-Cobelas & Gallardo 1988) και στη Βόρεια Αμερική.

Οικολογία: Ο τύπος του είδους έχει περιγραφεί από πετρώδες υπόστρωμα σε κρύα ποτάμια και λίμνες. Το *Phormidium setchellianum* είναι ένα είδος που απαντάται και σε υγρά εδάφη από ορεινές περιοχές.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K7A)

- ***Phormidium vulgare*** (Kützing) ex Anagnostidis 2001 (Απεικόνιση 3.28/ εικ. 4)

Θαλλός δικτυοειδής, ελαιοπράσινου χρωματισμού. Νήματα ενίοτε περιπεπλεγμένα. Κολεοί άχρωμοι, λεπτοί σχεδόν δυσδιάκριτοι. Τριχώματα πλάτους 5-6μm, με σαφή λέπτυνση στα άκρα. Κύτταρα σχεδόν ισοδιαμετρικά, χωρίς σύσφιξη στα εγκάρσια τοιχώματα. Επάκριο κύτταρο λεπτινόμενο με χαρακτηριστική καλύπτρα.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους. Αποτελεί ένα ελάχιστα γνωστό είδος καθώς συγγέεται με άλλα είδη παρόμοιων διαστάσεων που φέρουν καλύπτρα (Komárek & Anagnostidis 2005).

Εξάπλωση: Από την κεντρική Ευρώπη αλλά και από βόρειες περιοχές της Αρκτικής.

Οικολογία: Σε υγρό έδαφος.

Τόπος ανεύρεσης: Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (S1W, S1P)

- ****Plectonema araucanum*** Schwabe 1960

Θαλλός εκτεταμένος. Νήματα με ψευδοδιακλαδώσεις. Κολεός έντονος, παχύς, κίτρινης απόχρωσης στο μέσον του τριχώματος. Νήματα πλάτους (6) 7-9 (10)μm. Τρίχωμα λεπτινόμενο προς τα άκρα, πλάτους 6μm στα άκρα, 7-9 (10)μm στο μέσον. Κύτταρα βραχύτερα του πλάτους, μήκους 2-4μm. Επάκριο κύτταρο αποστρογγυλεμένο, κωνικό.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Έχει ανευρεθεί μόνον μία φορά στη Χιλή. Η παρούσα ανεύρεσή του συνιστά τη δεύτερη παγκόσμιως και την πρώτη για την Ευρώπη ισχυροποιώντας την υπόσταση του είδους.

Οικολογία: Υπεναέριο, μεταξύ βρυοφύτων, υπεράνω της θαλάσσιας παράλιας ζώνης, σε υγρές θέσεις. Δεν έχει αναφερθεί από σπήλαια. Αποτελεί τη δεύτερη ανεύρεση παγκοσμίως και την πρώτη στην Ελλάδα

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγχθι

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F5P)

- ***Pleurocapsa fuliginosa*** Hauck 1885 (Απεικόνιση 3.28/ εικ. 6-7)

Αποικίες ακανόνιστες, αποτελούμενες από συσσωματώματα κυττάρων με ρόδινη έως καστανή απόχρωση. Παρατηρήθηκαν συσσωματώματα κυττάρων με πλευρική ανάπτυξη

(ψευδονήματα). Κύτταρα κατά το πλείστον ακανόνιστου σχήματος, ροδόχροα έως καστανά, διαμέτρου 5-8 (9)μm. Παρατηρήθηκαν νανοκύτταρα.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Ευρώπη, Βαλτική θάλασσα, Μαύρη θάλασσα, Νορβηγία αλλά και ακτές του Ατλαντικού.

Οικολογία: Σε βράχους που εκτίθενται στη θάλασσα. Πρόκειται για την πρώτη ανεύρεση από σπήλαιο. Σημειώνεται ότι το σπήλαιο Φράγγχι όπου ανευρέθη γειτνιάζει μες τη θάλασσα.

Τόπος ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγγχι

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F5W, F5A)

- ****Pseudophormidium spelaoides*** (Čado) Anagnostidis 2001 (Απεικόνιση 3.28/ εικ. 8)

Θαλλός ενασβεστωμένος, σκοτεινής κυανοπράσινης απόχρωσης. Νήματα περιπεπλεγμένα, πλάτους 3-5μm, με ψευδοδιακλαδώσεις. Κολοί άχρωμοι, λεπτοφυείς έως δυσδιάκριτοι. Τριχώματα πλάτους 2-3μm, χωρίς σύσφιξη στα εγκάρσια τοιχώματα. Κύτταρα ισοδιαμετρικά, ελαιοπράσινου χρωματισμού. Επάκριο κύτταρο αποστρογγυλεμένο.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση : Περιορισμένη εξάπλωση. Έχει ανευρεθεί στην Πρώην Γιουγκοσλαβική Δημοκρατία της Μακεδονίας (ΠΓΔΜ). Η ανεύρεσή του και στα τρία σπήλαια επιβεβαιώνει την υπόσταση του είδους.

Οικολογία: Σε γλυκά ύδατα, σε ασβεστολιθικά υποστρώματα.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Κασριά, Σπήλαιο Φράγγχι, Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K2W, K2S, K3W, K3P, K3A, K4S, K4A, K5A, K6P, K7W, F2P, F2S, F2A, F5W, F5P, F5A, S2P, S3W)

- ***Symploca lacrimans*** Claus 1962

Θαλλός θυссανώδης, κιτρινοκαστανού χρωματισμού. Νήματα κατά δεσμίδες, παραλλήλως διευθετημένα. Τριχώματα πλάτους 1,5-2μm, κυανοπράσινης απόχρωσης. Κύτταρα μακρύτερα του πλάτους, έως και 5μm. Επάκριο κύτταρο αποστρογγυλεμένο.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Η ανεύρεσή του σε δύο σπήλαια της Ελλάδος ισχυροποιούν την υπόσταση του είδους.

Οικολογία : Υπεναέριο, από σπήλαιο της Ουγγαρίας (Claus 1962).

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγχθι, Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F5P, S4W, S4P, S4A)

- ***Symploca muralis*** Kützing ex Gomont 1892

Θαλλός ελαιοπράσινος, θυσοσανώδης. Νήματα πλάτους (2) 3-4 (5)μm. Κύτταρα ισοδιαμετρικά ή βραχύτερα, και ορισμένα μακρύτερα του πλάτους, με μήκος 2-5μm. Επάκριο κύτταρο αποστρογγυλεμένο ή ελαφρώς λεπτυνόμενο και αποστρογγυλεμένο.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξαπλωση: Κοσμοπολιτικό.

Οικολογία: Υπεναέριο σε υγρά εδάφη και βράχους, επιφυτικό σε κορμούς κωνοφόρων. Οι αναφορές από θερμές πηγές χρήζουν αναθεώρησης. Έχει αναφερθεί η παρουσία του από σπήλαιο της Ουγγαρίας (Palik 1960).

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγχθι

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F5W, F6S, F7S)

- ***Symploca radians*** (Kützing) Rabenhorst ex Gomont 1892

Θαλλός θυσοσανώδης, με καστανή απόχρωση. Νήματα κατά δεσμίδες παραλλήλως διευθετημένα. Τριχώματα πλάτους 2,5-3μm, κυανοπράσινα. Κύτταρα ισοδιαμετρικά. Επάκριο κύτταρο κωνικό, με αποστρογγυλεμένη κορυφή.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Περιορισμένη εξάπλωση, με αναφορές από τη Γαλλία, τη Γερμανία καθώς και από τη Σερβία (Simic 2002).

Οικολογία : Υπεναέριο σε υγρό έδαφος.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (S4W, S4P, S4A)

- ***Synechocystis pevalekii*** Ercegovic 1925 (Απεικόνιση 3.28/ εικ. 9)

Κύτταρα μεμονωμένα, σφαιρικά, διαμέτρου 2,5-4μm, κυανοπράσινα.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Κεντρική και νότια Ευρώπη.

Οικολογία: Απαντάται σε ασβεστολιθικούς βράχους, σε βλέννη επιλιθικών φυκών.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγγθι, Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F1S, F6W, F6P, F6A, S1S, S5A, S6S)

- ***Scytonema hofmanii* var. *calcicolum*** Agardh ex Bornet et Flahault 1887

Θαλλός σκοτεινός καστανοπράσινος με ζελατινώδεις αναπτύξεις. Νήματα ψευδοδιακλαδιζόμενα, πλάτους 6-9 μm έως 10μm. Οι ψευδείς διακλαδώσεις δημιουργούνται μεταξύ των ετεροκύτων. Κολεός επαπτόμενος του τριχώματος, παχύτερος στα γηραιότερα νήματα, κιτρινοκαστανός. Τριχώματα πλάτους 4-6 μm. Κύτταρα πιθοειδή, κυανοπράσινα. Ετερόκυτα διαστάσεων 3-5μm, μονήρη ή ανά ζεύγη.

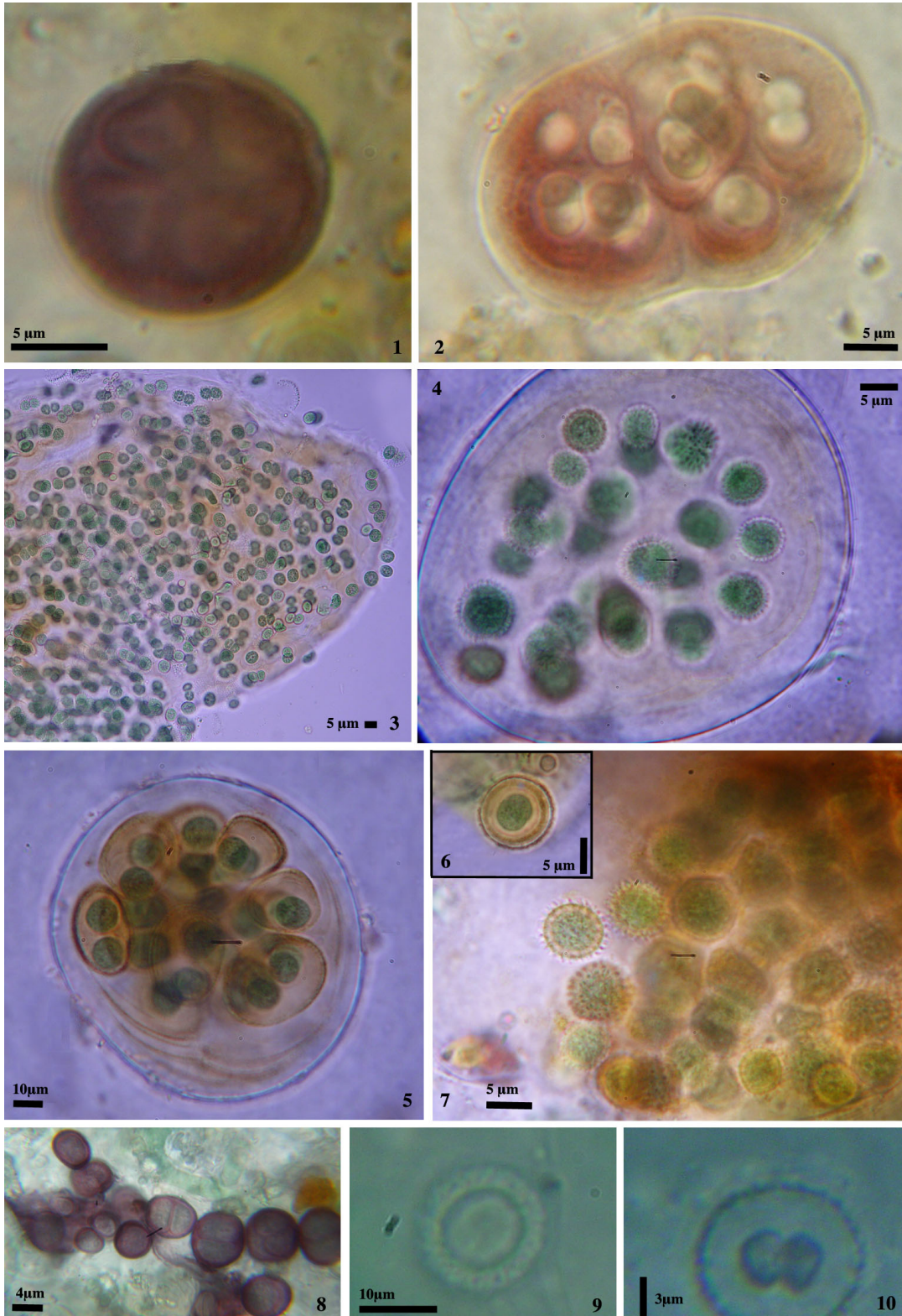
Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται πλήρως προς τον τύπο του είδους.

Εξάπλωση: Έχει αναφερθεί από την Ινδία (Desikachari 1959).

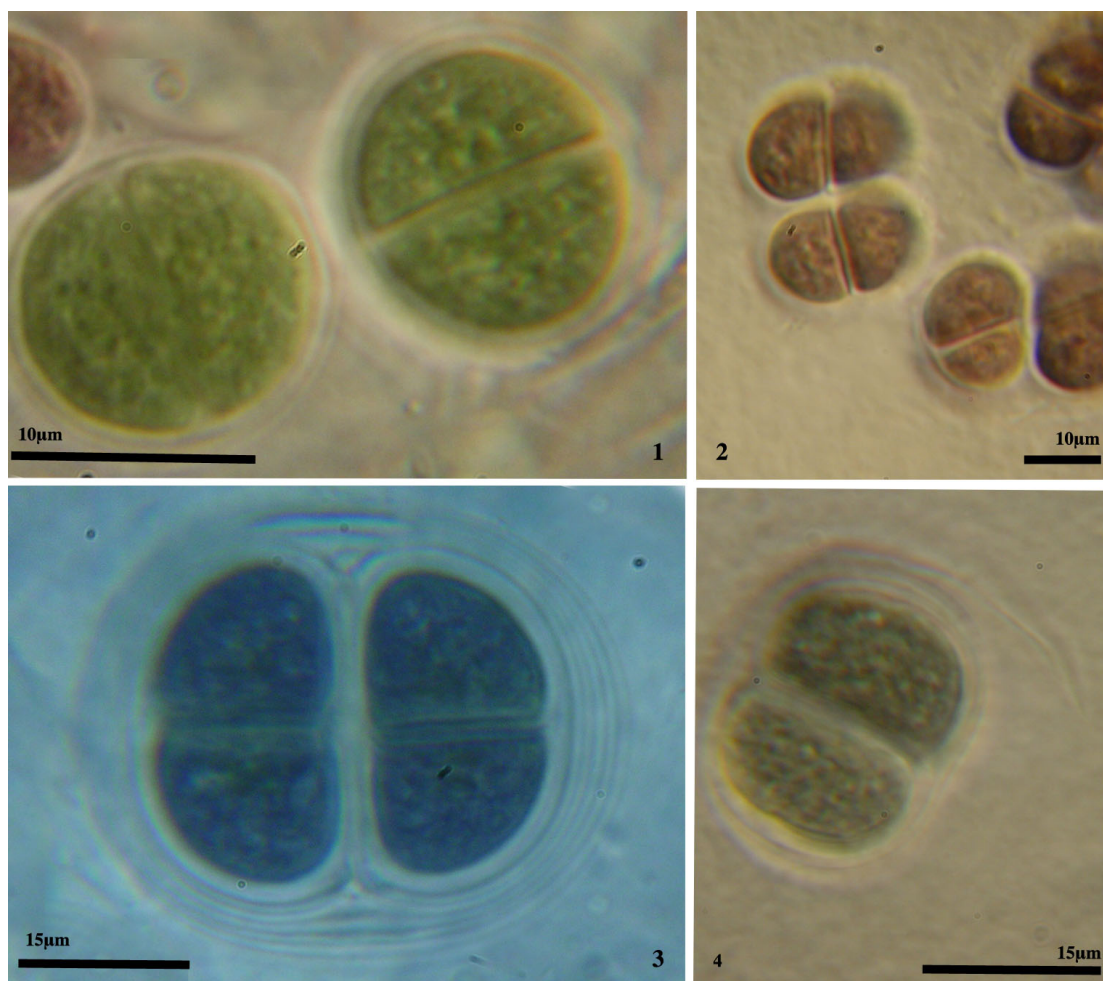
Οικολογία: Απαντάται σε ασβεστολιθικούς βράχους.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

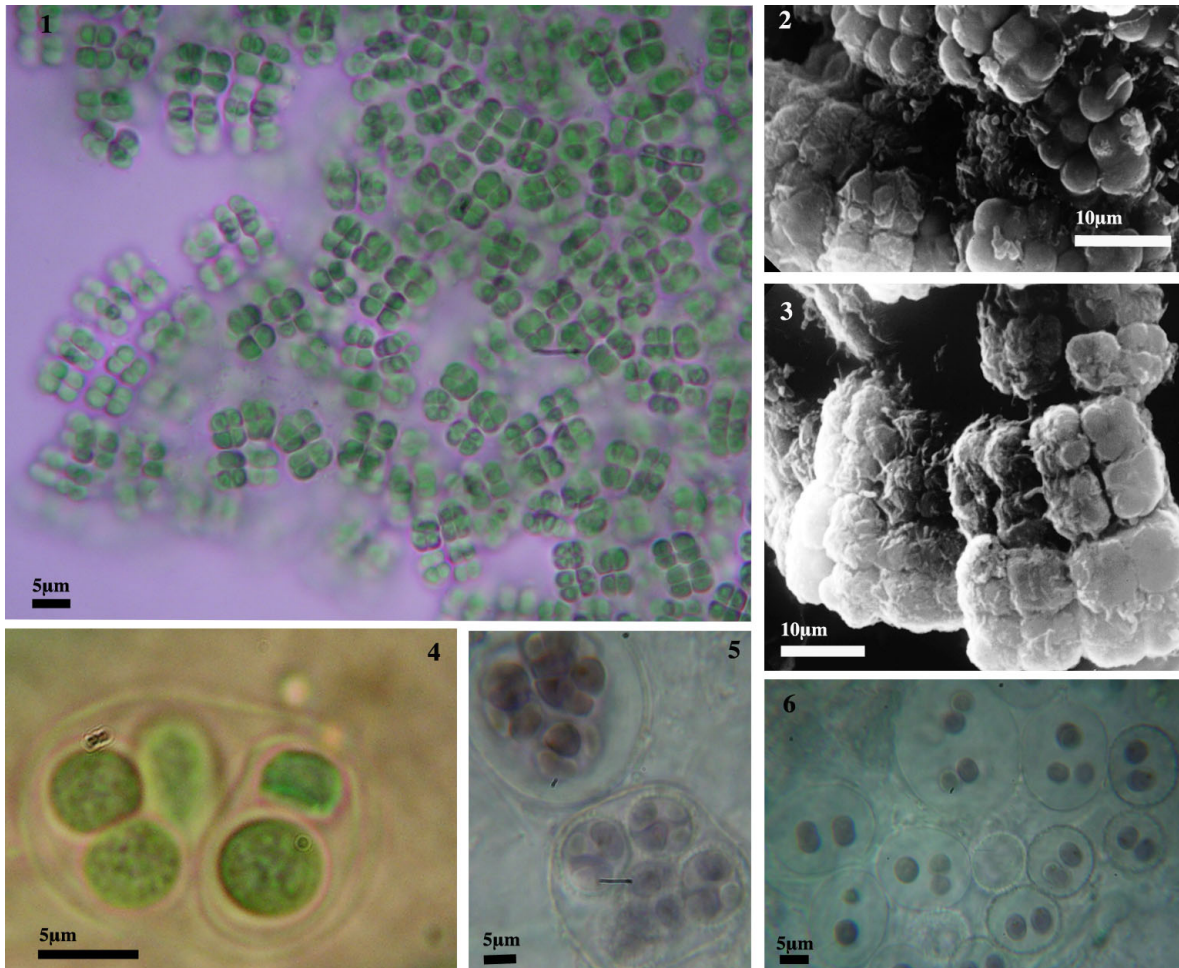
Δειγματοληπτικές θέσεις: (K5W, K6W)



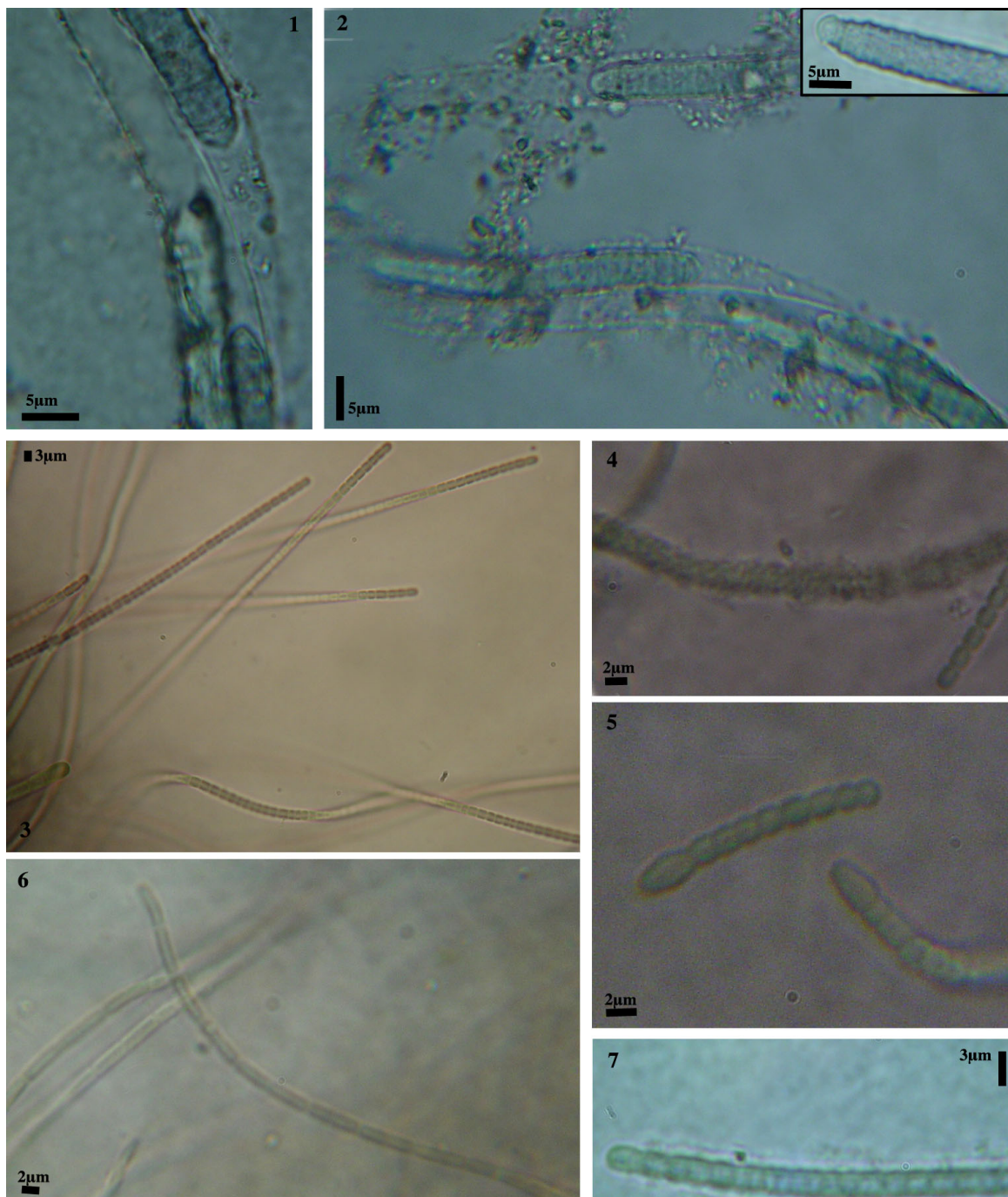
Απεικόνιση 3.24: Στάδιο του κύκλου ζωής: “Status arthrocytosus” *Asterocapsa aerophytica* (1), Αποικία *A. aerophytica* με ελλειψοειδή κύτταρα και χαρακτηριστικές ακτινωτές ακίδες στην επιφάνεια της θήκης (2), Αποικία *A. divina* (3), ο τρίτος κύκλος ζωής της *A. divina* (κύτταρα ακανόνιστου σχήματος με «ακιδωτές» θήκες, εγκλεισμένα σε άμορφη ζελατινώδη μάζα κατά Komárek & Anagnostidis 1998 (4), Τυπική αποικία *A. divina* με δικύτταρες θυγατρικές αποικίες οι οποίες περιβάλλονται από έγχρωμη θήκη με στρώσεις (5), Αρθροσπόριο της *A. divina* με ισχυρό εξωτερικό φάκελο με τις χαρακτηριστικές ακτινωτές ακίδες στην επιφάνεια (6), Διάλυση του φακέλου των αποικιών και απελευθέρωση μεμονωμένων κυττάρων *A. divina* (7), Αρθροσπόρια *A. jilnica* ελλειψοειδή, ωοειδή έως γωνιώδη, ιώδη-μελανά με έντονο κοκκιωμένο φάκελο (8), Αρθροσπόριο της *A. sinica* με ευρεία φάκελο και χαρακτηριστικές ακίδες (9), Δικύτταρη αποικία της *A. sinica* με χαρακτηριστικές ακίδες στη θήκη (10).



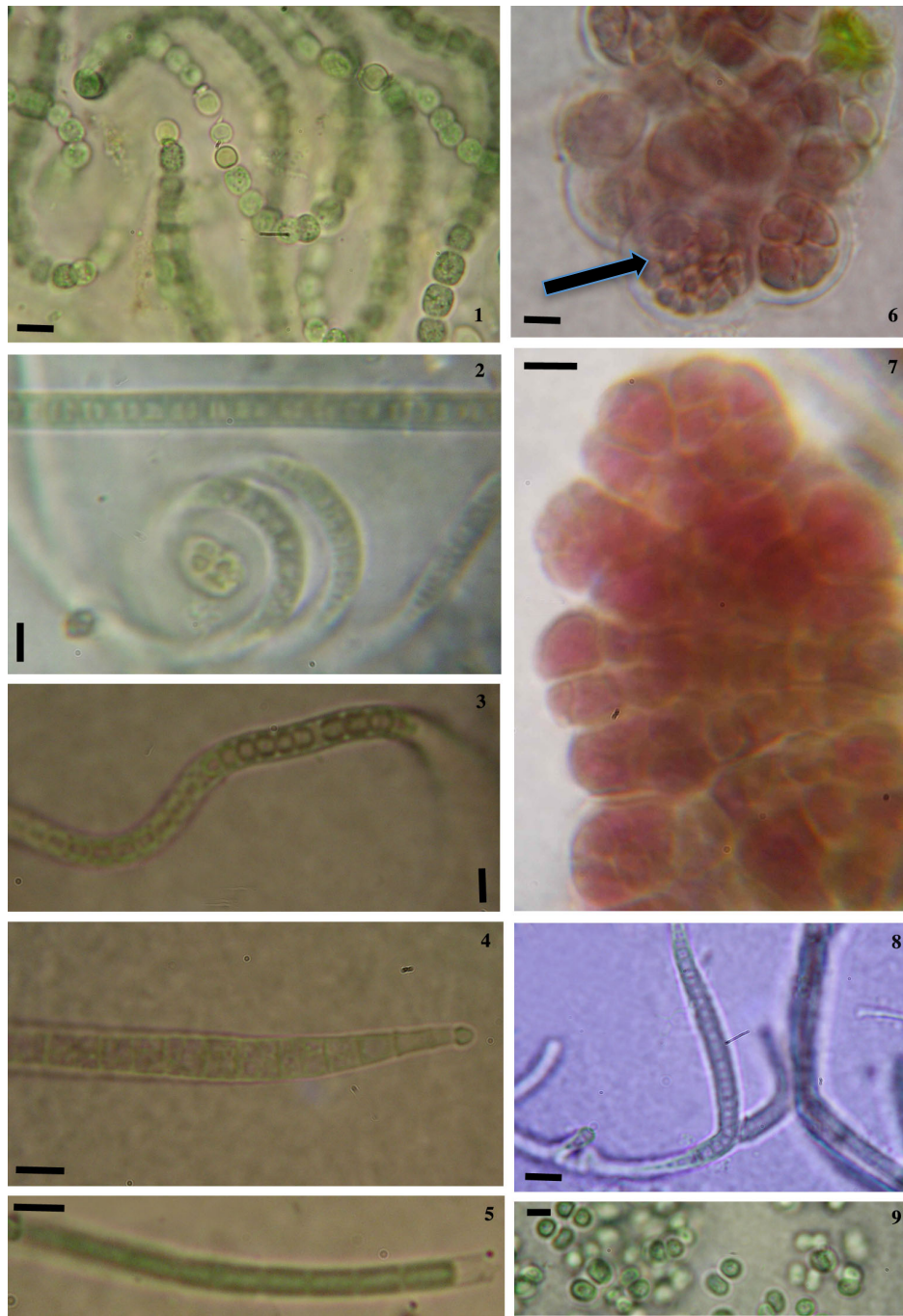
Απεικόνιση 3.25: Κύτταρα *Chroococcus subnudus* έντονου κυανοπράσινου χρωματισμού με θήκη υαλώδη, εφαιπτόμενη του κυττάρου, άνευ στρώσεων (1), Κύτταρα *Ch. subsphaericus* με κιτρινοκαστανό χρωματισμό και εφαιπτόμενη δυσδιάκριτη θήκη (2), Κύτταρα *Ch. westii* ελαιοπράσινα έως ιώδη με πυκνή κοκκίωση που περιβάλλονται από θήκη με συγκεντρικές στρώσεις (3-4), στα οποία η θήκη ενίοτε διαρρηγνύεται σαν να σχίζεται (4).



Απεικόνιση 3.26: *Eucapsis parallelepipeda* με κυβόμορφες αποικίες (1), Οι κυβόμορφες αποικίες του κυανοβακτηρίου *Eucapsis parallelepipeda* όπως παρατηρήθηκαν υπό το SEM (2,3), Αποικία *Gloeocapsa atrata* (4), Δικότταρες και πολυκύτταρες αποικίες της *Gloeocapsa bituminosa* βλεννώδεις με ασθενή κοκκίωση και κύτταρα ρόδινης απόχρωσης (5-6).



Απεικόνιση 3.27: *Hydrocoleum stankovicii* με κολεό άχρωμο ο οποίος φέρει τριχώματα φαιά εως κυανοπράσινα, στην ένθετη εικόνα διαφαίνεται το επάκριο άκρο με την καλύπτρα (1,2), Νήματα *Leptolyngbya cebennensis* χρυσοκαστανής απόχρωσης (3), Νήματα *Leptolyngbya nana* με χαρακτηριστικές ενασβεστώσεις επί του κολεού (4), Νήματα *Leptolyngbya henningssii* με χαρακτηριστικό αμβλύ επάκριο κύτταρο (5), Περιπεπλεγμένα νήματα *Leptolyngbya ercegovicii* (6), Νήματα *Leptolyngbya ralikiana* με κυανοπράσινα ισοδιαμετρικά κύτταρα (7).



Απεικόνιση 3.28: Νήματα του ετεροκυστώδους *Nostoc letestui* στα βέλη φαίνονται τα ετερόκυτα (1), Τριχώματα *Phormidium articulatum* με χαρακτηριστική περιέλιξη (2), Νήμα του είδους *Phormidium priestleyi* (3), *Phormidium vulgare* με λεπτυνόμενο άκρο με καλύπτρα (4) *Leptolyngbya tenue* (5). *Pleurocapsa fuliginosa* με χαρακτηριστικό ρόδινο χρωματισμό και σχηματισμούς ψευδονημάτων, το βέλος δείχνει τα νανοκύτταρα (6-7). *Pseudophormidium spelaoides* με χαρακτηριστικές ψευδοδιακλαδώσεις (8), *Synechocystis penalekii* (9). Κλίμακες = 5μm.

3.2.3 «ΣΠΗΛΑΙΟ ΚΑΣΤΡΙΑ»: ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΕΣ ΜΟΝΑΔΕΣ ΜΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΘΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΕΙΔΟΥΣ

- ***Aphanothece cf. rubra*** Liebetanz 1925

Αποικίες άμορφες, ερυθρού χρωματισμού. Κύτταρα πυκνώς διευθετημένα στην αποικία, ερυθρόχροα. Κύτταρα ραβδόμορφα, πλάτους 2,5 -3μm και μήκους 1-1,5μm.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ο χρωματισμός και το μέγεθος της αποικίας και των κυττάρων συμφωνούν με την περιγραφή του τυπικού είδους *Aphanothece rubra* Liebetanz 1925. Ωστόσο, η οικολογία διαφέρει (τυπ. είδος: υπεναέριο, αλοβιοτικό σε αλατούχα έλη στην Πολωνία). Επίσης κατά τους Komárek & Anagnostidis (1998) αποτελεί ένα είδος που χρήζει αναθεώρησης. Επειδή διαπιστώθηκε η παρουσία του άπαξ και μόνο σε φυσικό υλικό και μία μόνον φορά, θεωρούμε ότι δεν διαθέτουμε επαρκή στοιχεία για την οριστική ταυτοποίησή του υπό το είδος *Aphanothece rubra*.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K3S)

- ***Aphanothece cf. rufescens*** Hansgirg 1892

Θαλλός βλεννώδης, άμορφος, κιτρινοπράσινος έως πρασινοκαστανός. Αποικίες κίτρινης έως καστανής απόχρωσης. Κύτταρα ελλειψοειδή, πλάτους 2,5- 3,5 μm. Στα περιφερειακά τμήματα ορισμένων θαλλών επισημάνθηκε η παρουσία ελάχιστων κυττάρων με ατομικές, σχεδόν δυσδιάκριτες θήκες.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ο υπό μελέτη οργανισμός ως προς τις διαστάσεις και τον χρωματισμό ομοιάζει με το είδος *Aphanothece rufescens* Hansgirg 1892. Το συγκεκριμένο είδος είναι ελάχιστα γνωστό με περιορισμένη αναφορά στη διεθνή βιβλιογραφία. Κατά τους Komárek & Anagnostidis (1998) αποτελεί ένα είδος που χρήζει αναθεώρησης. Η ανεύρεσή του μόνο από φυσικό υλικό σε μία δειγματοληπτική θέση δεν επιτρέπει την ασφαλή του ταυτοποίηση.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K4A)

- ***Asterocapsa sp.*** Chu 1952

Κύτταρα ελλειψοειδή, ωοειδή έως γωνιώδη, πλάτους 3-4μm και μήκους 4,5-5,5μm χωρίς τη θήκη, ενώ με τη θήκη είναι 5-6 × 6-7μm. Θήκη ευρεία, άχρωμη έως κιτρινόχρους. Δεν παρατηρούνται στρώσεις στη θήκη, η οποία φέρει επιφανειακές προεκβολές. Κύτταρα

μεμονωμένα ή σε σφαιρικές αποικίες >48 κυττάρων, διαμέτρου έως 25μm. Τα αρθροσπόρια είναι ελλειψοειδή, ωσειδή έως γωνιώδη, χρυσοκίτρινης απόχρωσης. Τα αρθροσπόρια φέρουν έναν στερεό παχύ φάκελο με χαρακτηριστικές προεκβολές στην επιφάνεια. Παρατηρήθηκε επίσης αποικία όπου τα κύτταρα εξέρχονται από την σπασμένη θήκη.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Τα μελετηθέντα δείγματα ομοιάζουν με το είδος *Asterocapsa divina*. Ωστόσο, δεν κατέστη δυνατή η ταυτοποίηση υπό το συγκεκριμένο είδος επειδή δεν διαπιστώθηκε ο πλήρης κύκλος ζωής.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K5P, K5A)

- ***Chroococcus cf. arhanocapsoides* Skuja 1964**

Αποικίες βλεννώδεις, σφαιρικές, διαμέτρου 22-25μm. Κύτταρα κυανοπράσινου χρωματισμού, σπανίως μεμονωμένα, συνήθως κατά τετράδες διαμέτρου 1-1,5μm, σε κοινή θήκη.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ο υπό μελέτη οργανισμός ως προς τα μορφολογικά γνωρίσματα ομοιάζει με το είδος *Chroococcus arhanocapsoides* Skuja 1964. Ωστόσο, η εντελώς διαφορετική οικολογία (το *C. arhanocapsoides* είναι ένα είδος πλαγκτικό απαντώμενο σε ολιγοτροφικά και μεσοτροφικά ύδατα) δεν επιτρέπει την ασφαλή ταυτοποίηση αυτού υπό το συγκεκριμένο είδος.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K5W)

- ***Chroococcus sp.* Nägeli 1849**

*(στον συνολικό πίνακα των ειδών από όλα τα σπήλαια αναφέρεται ως *Chroococcus sp.*2)

Κύτταρα ανά 2 ή 4, σπανίως μεμονωμένα. Κύτταρα με ελαιοκίτρινη απόχρωση, και με κοκκίωση στο κυτταρικό περιεχόμενο. Κύτταρα πλάτους 34-35μm, μήκους 30-32μm, περιβαλλόμενα από θήκη άχρωμη, ζελατινώδη χωρίς στρώσεις.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ο υπό μελέτη οργανισμός ανευρέθη μόνο μία φορά σε φυσικό υλικό και δεν αναπτύχθηκε σε καλλιεργητικό μέσο. Επομένως, δεν κατέστη δυνατή η ασφαλής του ταυτοποίηση.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K1W)

- ***Cyanosarcina cf. burmensis*** (Skuja) Κονάčík 1988

Αποικίες συνήθως ακανόνιστου σχήματος. Κύτταρα κυανοπράσινα, πυκνώς τοποθετημένα μέσα στις αποικίες, διαμέτρου 1,5-2 (2,5)μm.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Τα μελετηθέντα δείγματα ομοιάζουν ως προς το μέγεθος των κυττάρων και της αποικίας με το είδος *Cyanosarcina burmensis* (Skuja) Κονάčík 1988, το οποίο όμως αναφέρεται ως πλαγκτικό, και μετάφυτον αβαθών υδάτων. Ωστόσο, το είδος *Cyanosarcina burmensis* έχει αναφερθεί από υπόγεια οικοσυστήματα της Ελλάδος (Pantazidou & Roussomoustakaki 2005) και σε περιβάλλοντα σπηλαίων στην Ισπανία (Ascencio & Aboal 2000, 2004).

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K1W, K1A, K3W, K3S, K3A)

- ***Cyanosarcina cf. spectabilis*** (Geitler) Κονάčík 1988

Αποικίες σφαιρικές, με ευκρινή θήκη διαμέτρου έως 80μm. Κύτταρα συνήθως ωοειδή, με αραιή κυρίως διάταξη μέσα στην αποικία. Κύτταρα ιώδη, διαμέτρου 4-6μm.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Τα μελετηθέντα δείγματα ομοιάζουν ως προς το μέγεθος των κυττάρων και της αποικίας με το είδος *Cyanosarcina spectabilis* (Geitler & Ruttner) Κονάčík 1988, αλλά ο βióτοπος είναι διαφορετικός (τυπ. είδος: θερμά νερά). Ομοιάζει σχεδόν απόλυτα με την περιγραφή ενός είδους *Cyanosarcina* sp. (Abdelahad 1989) από σπήλαιο της Ιταλίας. Ίσως πρόκειται για είδος *Cyanosarcina* που απαντάται σε σπήλαια. Περαιτέρω μελέτη και επιπρόσθετο υλικό απαιτούνται για την ταυτοποίηση αυτού του οργανισμού.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K4S)

- ***Eucapsis* sp.** Clements et Shantz 1909

*(στον συνολικό πίνακα των ειδών από όλα τα σπήλαια αναφέρεται ως *Eucapsis* sp.2)

Αποικίες κυβόμορφες σχετικώς μικρές, αποτελούμενες από 4-32 κύτταρα. Δεν παρατηρήθηκαν αποικίες με περισσότερα των 32 κυττάρων. Κύτταρα διαστάσεων 2-3 × 1,5-3μm, κυανοπράσινα, πυκνώς τοποθετημένα.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Τα παρατηρηθέντα δείγματα ομοιάζουν ως προς τις διαστάσεις και τον χρωματισμό με το είδος *Eucapsis minor* (Skuja) Elenkin, αλλά ο αριθμός των κυττάρων στις αποικίες είναι πολύ μικρότερος του αναφερομένου για το τυπικό είδος. Το είδος *Eucapsis minor* σχηματίζει μεγάλες αποικίες (έως 128 κύτταρα). Η περιορισμένη εμφάνιση, η μη

ανάπτυξη σε καλλιεργητικά μέσα καθώς και οι ολιγάριθμες αποικίες μέχρι 32 κυττάρων, δεν επιτρέπουν την ταυτοποίηση του υπό μελέτη οργανισμού υπό το είδος *Eucapsis minor*.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K2S, K2A)

- ***Microcoleus cf. chthonoplastes*** (Mertens) Zanardini 1840

Θαλλός με σκοτεινή πράσινη απόχρωση. Τριχώματα κυανοπράσινα, πολυάριθμα σε έναν κοινό κολεό, πλάτους 1,8-2μm. Κολεός άχρωμος, παχύς. Κύτταρα ισοδιαμετρικά ή συνήθως μακρύτερα του πλάτους, διαστάσεων 2-4μm. Επάκριο κύτταρο λεπυνόμενο, αλλά όχι οξύληκτο.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Τα παρατηρηθέντα δείγματα παρουσιάζουν διαστάσεις που ανταποκρίνονται στα κατώτατα όρια του τυπικού είδος [τυπ. είδος: (2) 3-6μm]. Το *Microcoleus chthonoplastes* είναι ένα είδος κοσμοπολιτικό που απαντάται σε θαλάσσια ύδατα, σε βράχους, στο έδαφος, σε ιλύ.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K5A)

- ***Nostoc sp.*** Vaucher ex Bornet et Flahault 1886

*(στον συνολικό πίνακα των ειδών από όλα τα σπήλαια αναφέρεται ως *Nostoc sp.*3)

Κύτταρα πιθοειδή, ελλειψοειδή, συνήθως ελαιοπράσινα, πλάτους 2,5-3μm και μήκους 4μm. Ετερόκυτα μάλλον σπάνια, διαμέτρου 4-5μm. Έμμονα κύτταρα διαστάσεων 7-8μm, με σκοτεινό πράσινο χρωματισμό.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Τα μελετηθέντα δείγματα ομοιάζουν με το είδος *Nostoc punctiforme* αλλά και με στάδια των ειδών *Nostoc linkia* και *Nostoc commune*. Το *Nostoc* είναι ένα αρκετά πολύμορφο γένος με δυσχερή διάκριση των ειδών του. Για παράδειγμα, ο Drouet (1978) θεωρούσε ότι το είδος *Nostoc punctiforme* είναι ταυτόσημο με το *Nostoc commune*, αλλά δεν υπήρξαν υποστηρικτές επ'αυτού. Το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε ο θαλλός, σημαντικό γνώρισμα για το γένος *Nostoc*, δεν επιτρέπει την ταυτοποίηση του συγκεκριμένου οργανισμού υπό συγκεκριμένο είδος.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K3A, K4S)

- ***Phormidium cf. ambiguum*** Gomont ex Gomont 1892

Θαλλός εκτεταμένος, σκοτεινής καστανής απόχρωσης. Νήματα ευθέα και παραλλήλως διατεταγμένα, πλάτους 4-5μm. Κολεός άχρωμος, λεπτός. Τριχώματα πλάτους 3-4μm, φαιάς απόχρωσης, με σύσφιξη στα εγκάρσια τοιχώματα. Κύτταρα βραχύτερα του πλάτους, με μήκος 1,5-2μm. Επάκριο κύτταρο αποστρογγυλεμένο.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Τα μελετηθέντα δείγματα διαφέρουν από το τυπικό είδος ως προς τις ελάχιστα μικρότερες διαστάσεις [τυπ. είδος: νήματα (4-7), τριχώματα (3,5) 4-6)], ως προς τον χρωματισμό των κυττάρων (τυπ. είδος: έντονα κυανοπράσινο, ελαιοπράσινο). Το είδος *Ph. ambiguum* έχει αναφερθεί από αρκετά σπήλαια (Claus 1962, Roldán et al. 2004, Mulek et al. 2007, Abdullin 2009).

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K2P)

- ***Pleurocapsa cf. fuliginosa*** Hauck 1885

Αποικίες ακανόνιστες, αποτελούμενες από συσσωματώματα κυττάρων με ρόδινη έως καστανή απόχρωση. Παρατηρήθηκαν συσσωματώματα κυττάρων με πλευρική ανάπτυξη (ψευδονήματα). Κύτταρα κατά το πλείστον ακανόνιστου σχήματος, ροδόχροα έως καστανά, διαμέτρου 5-7μm. Δεν παρατηρήθηκαν νανοκύτταρα.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Η μη παρατήρηση νανοκυττάρων δεν μας επιτρέπει με σιγουριά να ταυτοποιήσουμε την συγκεκριμένη ταξινομική μονάδα υπό το είδος *Pleurocapsa fuliginosa*.

Τόπος ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K2W, K2S, K2A, K3W, K3A)

- ***Scytonema sp.*** Agardh ex Bornet et Flahault, 1886

Θαλλός καστανόχρους. Κολεοί άχρωμοί έως ασθενώς κιτρινωποί, λεπτοί έως ευρείς στα γηραιότερα τριχώματα. Νήματα πλάτους 6-7 (9)μm, συχνά κατά δεσμίδες, σποραδικά ψευδιακλαδιζόμενα. Τριχώματα κυανοπράσινα, πλάτους 4-5μm, με ασθενή σύσφιξη στα εγκάρσια κυτταρικά τοιχώματα. Κύτταρα κατά το πλείστον βραχύτερα του πλάτους και σπανιότερα ισοδιαμετρικά, διαστάσεων 2-4μm. Ετερόκυτα πλάτους 5μm, βασικά, μονόπορα.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Τα μελετηθέντα δείγματα ομοιάζουν με το είδος *Scytonema hofmanni* (Agardh ex Bornet et Flahault 1886), αλλά διαφέρουν ως προς μέγεθος των κυττάρων (τυπ. είδος, μήκος κυττάρων: 6-15μm).

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K5P)

- ***Xenococcus cf. kernerii*** Hansgirg 1887

Αποικίες με κύτταρα διευθετημένα σε σειρά με τάση να σχηματίζουν ψευδονήματα. Χρωματισμός αποικίας καστανός. Κύτταρα ακανόνιστης μορφής, πολυγωνικά έως γωνιώδη, σπανιότερα σφαιρικά, διαστάσεων 4,5-7 (8)μm με κυτταρικό περιεχόμενο ομογενές. Θήκες παχείς, υαλώδεις, άνευ στρώσεων.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Τα μελετηθέντα δείγματα ομοιάζουν προς το είδος *Xenococcus kernerii* Hansgirg 1893, το οποίο στη συνέχεια μετονομάστηκε ως *Dermocarpa kernerii* (Hansg.) Bourr. Σύμφωνα με τους Geitler (1932), Desikachary (1959) και Starmach (1966), τα ψευδονήματα διαθέτουν μέχρι και 10 κύτταρα. Ο Golubić (1967) καθώς και οι Economidou-Amilli & Anagnostidis (1981) παρατήρησαν ψευδονήματα έως 4 κυττάρων, αριθμός παρόμοιος με τα μελετηθέντα δείγματα από το σπήλαιο Καστριά. Τελευταία, οι Gold-Morgan et al. (1994) μετέφεραν το συγκεκριμένο είδος υπό το γένος *Xenotholos*. Το τελευταίο γένος εμφανίζει κύτταρα σε δύο ή περισσότερα επίπεδα χωρίς να δημιουργεί ψευδονήματα και είναι κυρίως επιφυτικό, γνωρίσματα που δε συνάδουν με το *Xenococcus kernerii* όπως περιγράφηκε από τον Hansgirg (1887). Κυανοβακτήριο υπό το όνομα *Dermocarpa kernerii* έχει ανευρεθεί στην Ελλάδα ως επιλιθικό είδος των μαρμάρων του Παρθενώνα (Anagnostidis et al. 1983).

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K2W, K2A, K3A)

- ***Nostocales***

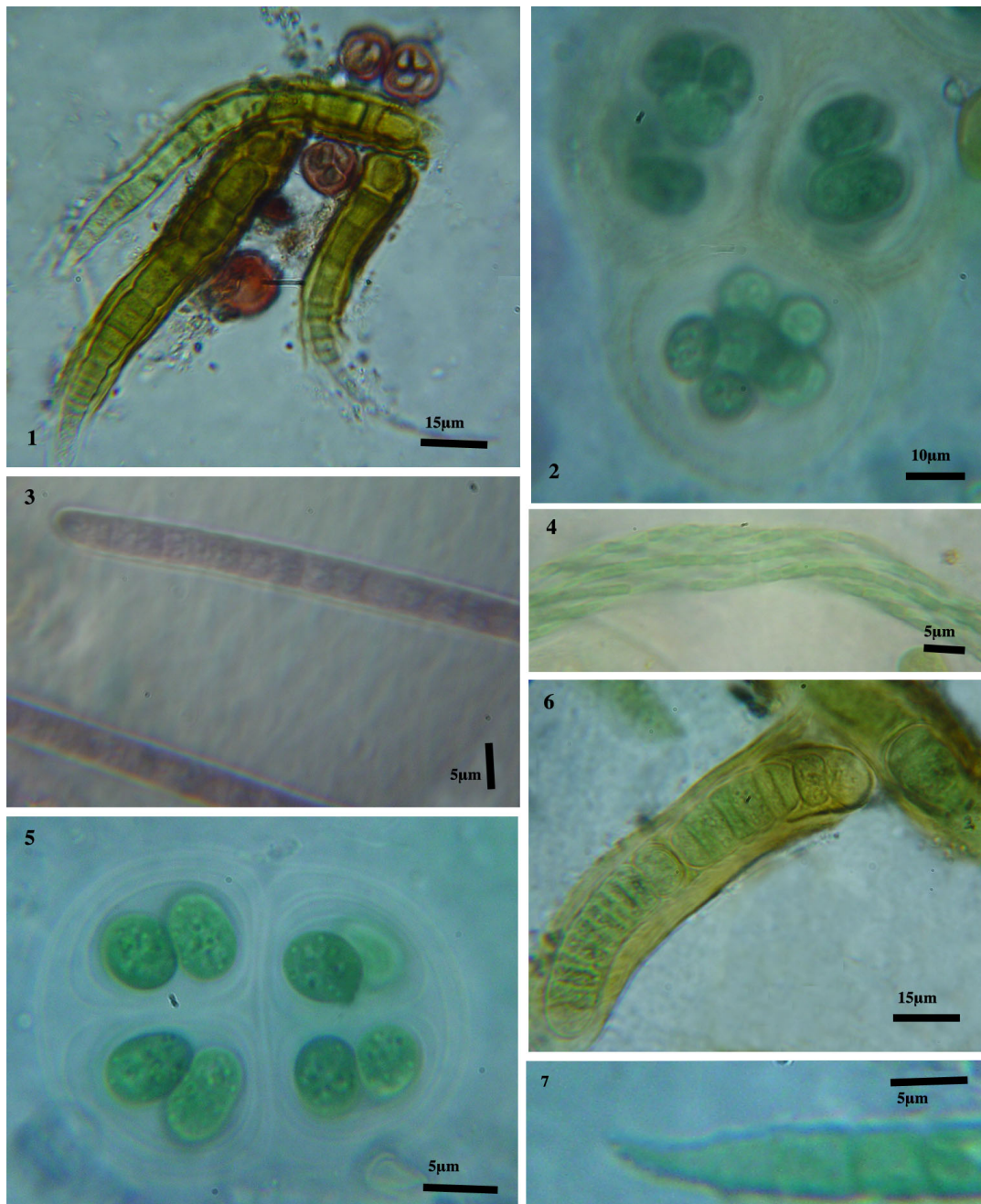
*(στον συνολικό πίνακα των ειδών από όλα τα σπήλαια αναφέρεται ως *Nostocales* sp.2)

Θαλλός σκοτεινής καστανής απόχρωσης. Νήματα πλάτους 12-15μm λεπτυνόμενα στο άκρον (7-8μm). Κύτταρα καστανο-ιώδη, πλάτους 10μm, και μήκους 4-8μm. Επάκριο κύτταρο πλάτους 7μm και μήκους 7-9μm. Ετερόκυτο παρατηρήθηκε μόνον άπαξ σε φυσικό υλικό, και ήταν παρεμβόλιμο, διαστάσεων 9 × 10μm.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Η αδυναμία ανάπτυξης του μορφοτύπου αυτού σε καλλιεργητικό μέσο BG11 και BG11₀ δεν επέτρεψε την ασφαλή του ταυτοποίηση με κάποια από τα γνωστά γένη.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Καστριά

Δειγματοληπτικές θέσεις: (K3A)



Απεικόνιση 3.29: Είδη από το σπήλαιο «Κασριά». Νήματα *Calothrix parietina* με κιτρινόχρωμο ευρύ κολεό (1), Αποικία *Gloeothece rupestris* με θυγατρικές αποικίες που περιβάλλεται από ζελατινώδη φάκελο με στρώσεις (2), *Phormidium setchelianum* (3), *Schizothrix lardacea* (4), Αποικίες *Gloeothece rupestris* 2-4 κυττάρων που εγκλείονται σε κοινή ζελατινώδη θήκη με στρώσεις (5), *Hassalia byssoidea* με χαρακτηριστικό βασικό μονόπορο ετρόκυτο στη διακλάδωση (6), *Phormidium animale* με χαρακτηριστικό οξύληκτο επάκριο κύτταρο (7).

3.2.4. «ΣΠΗΛΑΙΟ ΦΡΑΓΧΘΙ»: ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΕΣ ΜΟΝΑΔΕΣ ΜΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΘΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΕΙΔΟΥΣ

- ***Calothrix* sp.1** Agardh ex Bornet et Flahault 1886

Νήματα μεμονωμένα, συνήθως κεκαμμένα, ενίοτε ευθέα, πλάτους 6-9μm. Κολεός άχρωμος, λεπτός, υαλώδης επαπτόμενος των τριχωμάτων. Τριχώματα πλάτους 5-7μm, συνεσφιγμένα στα εγκάρσια τοιχώματα λεπτυνόμενα αλλά μη απολήγοντα σε τρίχα. Κύτταρο στη βάση του νήματος, πλάτους 6-9μm. Κύτταρα βραχύτερα του πλάτους, μήκους 3-4μm, ελαιοπράσινου χρωματισμού. Επάκριο κύτταρο αποστρογγυλεμένο, διαστάσεων 3-4μm. Ετερόκυτα στη βάση του τριχώματος, πλάτους 8-9 μm.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ο υπό μελέτη οργανισμός συμφωνεί με τα διακριτικά γνωρίσματα του είδους *Calothrix marchis* Lemmerman. Ωστόσο, η μεμονωμένη του ανεύρεση σε φυσικό υλικό δεν επιτρέπει την ασφαλή του κατάταξη υπό συγκεκριμένο είδος του γένους *Calothrix*.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγχθι

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F5A, F7P)

- ***Calothrix* sp.2** Agardh ex Bornet et Flahault 1886 (Απεικόνιση 3.30/εικ. 6)

Νήματα μεμονωμένα, ανορθωμένα. Κολεός στην κορυφή των νημάτων ανοιχτός, άχρωμος έως κιτρινόχρωμος. Κύτταρο στη βάση πλάτους 12-14μm. Κύτταρα βραχύτερα του πλάτους, μήκους 3-4μm, κυανοπράσινα. Ακραίο κύτταρο αποστρογγυλεμένο λεπτυνόμενο, διαστάσεων 4-5μm. Ετερόκυτο στη βάση πλάτους 8-10μm και μήκους 3-4μm.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ο υπό μελέτη οργανισμός συμφωνεί με τα διακριτικά γνωρίσματα του είδους *Calothrix parietina*. Ωστόσο, η μεμονωμένη του ανεύρεση σε φυσικό υλικό δεν επιτρέπει την ασφαλή του κατάταξη υπό το συγκεκριμένο είδος.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγχθι

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F6A, F7P)

- ***Chroococcus* cf. *lithophilus*** Ercegoniá 1925

Αποικίες μικροσκοπικά και μακροσκοπικά άμορφες. Κύτταρα σφαιρικά, με κοκκίωση ελαιοπράσινου χρωματισμού, διαμέτρου (4)5-8μm, περιβαλλόμενα από άχρωμη και δυσδιάκριτη θήκη. Κύτταρα με τη θήκη, διαμέτρου 6-8(9)μm.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Τα μελετηθέντα δείγματα είχαν ευκρινή ελαιοπράσινο χρωματισμό, σε συμφωνία με την αρχική περιγραφή του *Ercegonis*, όμως οι μικρότερες σε διαστάσεις των κυττάρων δεν μας επιτρέπουν την ταυτοποίηση υπό τον τύπο του είδους

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγχθι

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F1W, F1P, F1A, F3W)

- ***Chroococcus* sp.** Nägeli 1849

*(στον συνολικό πίνακα των ειδών από όλα τα σπήλαια αναφέρεται ως *Chroococcus* sp.1)

Κύτταρα συνήθως ανά 2-4, σπανιότερα μεμονωμένα, ελλειψοειδή έως σφαιρικά, ιώδη, με λεπτή ή αδρή κοκκίωση, διαμέτρου 8-12μm χωρίς τη θήκη. Θήκες άχρωμες, λεπτές, χωρίς ορατές στρώσεις,

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Τα άτομα αυτά εμφανίζουν γνωρίσματα που ανταποκρίνονται προς στα είδη *Chroococcus lithophilus* (διαφορές ως προς τον χρωματισμό) και *Chroococcus spelaeus* (διαφορές ως προς τις διαστάσεις). Επειδή η ταξινομική αυτή μονάδα παρατηρήθηκε μόνον σε φυσικό υλικό, οποιαδήποτε ταυτοποίηση υπό συγκεκριμένο είδος, χωρίς υλικό καλλιεργειών, θα ήταν βεβιασμένη.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγχθι

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F1S, F1A, F2S, F5W, F5A)

- ***Coleodesmium* sp.** (Απεικόνιση 3.30/εικ. 3)

Νήματα, πλάτους (10), 13- 15μm, στο άκρον λεπτυνόμενα, πλάτους 8-10μm με ψευδείς διακλαδώσεις. Κολοί παχείς, βλενωδείς, κιτρινοκαστανής απόχρωσης. Τριχώματα πολικά με βασικό ετερόκυττο. Κυτταρικό περιεχόμενο με κοκκίωση. Παρατηρήθηκαν νεκρίδια. Επάκριο κύτταρο κωνικό, αποστρογγυλεμένο, πλάτους 7μm. Παρατηρήθηκαν ορμογόνια μήκους 25μm και πλάτους 10μm.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ο υπό μελέτη οργανισμός παρατηρήθηκε μόνο στο φυσικό υλικό σε μία δειγματοληπτική θέση. Η περιορισμένη εμφάνιση στις καλλιέργειες δεν επέτρεψε την παρατήρηση των ετερόκυττων με αποτέλεσμα να μην ταυτοποιηθεί ο υπό μελέτη οργανισμός σε επίπεδο είδους.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγχθι

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F5P)

- ***Cyanosarcina* sp.** Κονάčík 1988

Αποικίες κατά το πλείστον σφαιρικές (2-8 κυττάρων) με θήκη που φαίνεται στα νεαρά στάδια και αργότερα γίνεται δυσδιάκριτη, διαστάσεων 8×9μm, 9×10μm. Κύτταρα κυανοπράσινα έως κιτρινοπράσινα, διαμέτρου (2,5) 3-4μm. Νανοκύτταρα δεν παρατηρήθηκαν.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Το γένος *Cyanosarcina* παρουσιάζει ομοιότητες με το γένος *Myxosarcina* ως προς τη μορφολογία και τον τρόπο διαίρεσης. Ωστόσο η *Cyanosarcina* δεν εμφανίζει νανοκύτταρα σε αντίθεση με τη *Myxosarcina*. Ο υπό μελέτη οργανισμός δεν εμφανίζει νανοκύτταρα επομένως εντάσσεται στο γένος *Cyanosarcina*. Ως προς τις διαστάσεις των κυττάρων ομοιάζει με το είδος *Cyanosarcina parthenonensis* Anagnnostidis in Anagnnostidis & Pantazidou 1991. Ωστόσο, ενδεχόμενη ταυτοποίηση υπό το είδος *C. parthenonensis* δεν επετεύχθη επειδή οι αποικίες είναι αρκετά μικρότερες με μικρότερο αριθμό κυττάρων.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγχθι

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F1S, F4P, F6P, F6S, F7S, F7A)

- ***Eucapsis cf. terrestris*** Akiyama 1965

Αποικίες μικρές, κυβόμορφες, παραλληλεπίπεδες, κυρίως με 4-8 ή περισσότερα κύτταρα, πυκνώς διατεταγμένες και εγκλεισμένες σε κοινή θήκη. Κύτταρα σφαιρικά ή ελαφρώς επιμήκη, διαμέτρου 4-6 μm, κυανοπράσινα με ομοιογενές κυτταρικό περιεχόμενο.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται προς τον τύπο του είδους αλλά εμπίπτει στα ανώτατα όρια των διαστάσεων (τυπ. είδος: 2,5-3 -4,8 πριν τη διαίρεση).

Εξάπλωση: Ελλάδα (Θήρα), Ιαπωνία, Ιβηρική χερσόνησος.

Οικολογία: Εδαφικό, σε χώμα από ηφαιστειογενείς περιοχές Δεν έχει αναφερθεί από σπήλαια.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγχθι

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F5W, F5A)

- ***Eucapsis* sp.** Clements et Shantz 1909

Αποικίες διαμέτρου 23-30μm. Κύτταρα με έντονη κυανοπράσινη απόχρωση, διαμέτρου 2-3μm.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Η μη παρουσία κανονικών κυβοειδών αποικιών δεν επιτρέπει την ταυτοποίηση του συγκεκριμένου οργανισμού υπό το είδος *Eucapsis minor* (Skuja) Elenkin 1933.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγχθι

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F2S)

- ***Gloeocapsopsis* sp.** Geitler 1925

*(στον συνολικό πίνακα των ειδών από όλα τα σπήλαια αναφέρεται ως *Gloeocapsopsis* sp.1)

Αποικίες μακροσκοπικά ορατές, ζελατινώδεις, σκοτεινές πράσινες. Σε μικροσκοπική παρατήρηση οι αποικίες είναι συνήθως άμορφες, κατά το πλείστον αποτελούμενες από μικρότερες αποικίες. Θήκες άχρωμες και ενίοτε κιτρινοκαστανές χωρίς στρώσεις. Κύτταρα ακανόνιστα έως σφαιρικά, διαμέτρου 2-3μm, κυανοπράσινα.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Εξαιτίας του μικρού μεγέθους των κυττάρων δεν είναι δυνατή η ταυτοποίηση του υπό μελέτη οργανισμού με κάποιο από τα γνωστά είδη του γένους *Gloeocapsopsis*. Ως πλησιέστερη ταξινομική μονάδα μπορεί να θεωρηθεί το είδος *Gloeocapsopsis crepidinum* (Thuret) Geitler ex Komárek 1993 (διαστάσεις 4-8 μm). Πιθανότατα οι μορφότυποι που ανευρέθησαν στα σπήλαια Φράγχθι και Καστριά αποτελούν μια νέα ταξινομική μονάδα του γένους *Gloeocapsopsis*. Επειδή όμως ανευρέθη μόνον σε φυσικό υλικό είναι αναγκαίες νέες δειγματοληψίες και ανάπτυξη του υλικού σε καλλιεργητικό μέσο καθώς και μοριακή ανάλυση ώστε να καθιερωθεί ως νέα ταξινομική μονάδα σύμφωνα με τους κανόνες της διεθνούς ονοματολογίας. Σημειώνεται ότι δεν αναφέρεται είδος του γένους *Gloeocapsopsis* να έχει αναπτυχθεί με επιτυχία σε καλλιεργητικό μέσο

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγχθι

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F1S, F1A, F2S, F5W, F5A)

- ***Leptolyngbya* cf. *carnea*** (Kützing ex Hansgirg) Anagnostidis et Komárek 1988

Θαλλός μεμβρανώδης, ρόδιου χρωματισμού. Νήματα περιπεπλεγμένα, ενίοτε με ψευδοδιακλαδώσεις. Τριχώματα χωρίς σύσφιξη στα εγκάρσια τοιχώματα, πλάτους 1,5-2μm. Κύτταρα μακρύτερα του πλάτους 2-4μm. Δεν παρατηρήθηκαν πολικά κοκκία.

Ταξινομικές παρατηρήσεις : Η μη παρατήρηση των πολικών κοκκίων που φέρει ο τύπος του είδους δεν επιτρέπει την ασφαλή κατάταξή του υπό το συγκεκριμένο είδος.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγχθι

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F6W, F6S)

- ***Leptolyngbya* cf. *compacta*** (Kützing ex Hansgirg) Komárek in Anagnostidis 2001

Θαλλός παχύς, ο οποίος διαμορφώνει δερματώδεις επίπαγους στο υπόστρωμα, ελαιοπράσινου έως καστανού χρωματισμού. Τριχώματα περιπεπλεγμένα, χωρίς σύσφιξη στα εγκάρσια τοιχώματα, πλάτους 1,5-2μm. Κύτταρα μακρύτερα του πλάτους 3-4μm, με ομογενές περιεχόμενο και κυανοπράσινη απόχρωση.

Ταξινομικές παρατηρήσεις : Τα μη ισοδιαμετρικά κύτταρα (τύπος του είδους), και η ανεύρεσή του μία μόνον φορά δεν μας επιτρέπουν την ασφαλή ταυτοποίηση του υπό το τυπικό είδος.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγχθι

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F7A)

- ***Myxosarcina* sp.** Printz 1921

Αποικία διαστάσεων 11×12μm, 26×20μm σαφώς οριοθετημένη από μια ορατή και συνήθως έγχρωμη (κίτρινη) θήκη. Κύτταρα πυκνώς διατεταγμένα, σφαιρικά, ωσειδή ή γωνιώδη, διαμέτρου 2-3μm (ωστόσο παρατηρήθηκαν και μεγαλύτερα κύτταρα διαμέτρου 4-6μm, ή 6×3μm με ελαιοπράσινο ή κιτρινοπράσινο χρωματισμό). Παρατηρήθηκαν νανοκύτταρα διαμέτρου 2-3μm. Σε ορισμένα σημεία παρατηρήθηκε θραύση της λεγόμενης θήκης, και απελευθέρωση κυττάρων.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Η ύπαρξη νανοκυττάρων συνηγορεί ότι ο υπό μελέτη μορφότυπος ανήκει στο γένος *Myxosarcina*. Το μέγεθος και το σχήμα της αποικίας και των κυττάρων συμφωνεί με τα γνωρίσματα του είδους *Myxosarcina concina* Print 1921. Το γένος *Myxosarcina* διεσπάσθη σε είδη που παράγουν νανοκύτταρα και παρέμειναν σύμφωνα με τους Komarek & Angnostidis 1986 και Κονάτσικ 1988 υπό το γένος *Myxosarcina*, και σε αυτά που δεν παράγουν νανοκύτταρα και αποτέλεσαν τα γένη *Cyanosarcina* και *Pseudocapsa*. Ο κύκλος ζωής των παρατηρηθέντων ατόμων συμφωνεί κατά πολύ με αυτόν που αναφέρεται για το κυανοβακτήριο *Myxosarcina* sp. από το σπήλαιο Inferniglio (Abdelahad 1989).

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγχθι

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F2P, F5P)

- ***Nostoc* sp.** Vaucher ex Bornet & Flahault 1886

*(στον συνολικό πίνακα των ειδών από όλα τα σπήλαια αναφέρεται ως *Nostoc* sp.1)

Κύτταρα πλάτους 3-5μm, πιθσειδή έως σχεδόν σφαιρικά, με λεπτοφυή κοκκίωση και κυανοπράσινο χρωματισμό. Ετερόκυτα συχνά παρεμβόλιμα, διαστάσεων 6×4μm. Έμμονα κύτταρα εν σειρά, πλάτους 6-7μm, ελαιοπράσινα, με πυκνή κοκκίωση.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Τα μελετηθέντα δείγματα ενθυμίζουν το είδος *Nostoc edarphicum* Kondratjeva 1962. Ωστόσο, ο οργανισμός αυτός παρατηρήθηκε μόνο σε καλλιέργεια, και η έλλειψη πληροφοριών θαλλού δεν επιτρέπει την ταυτοποίησή του υπό συγκεκριμένο είδος.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγχθι

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F1S, F2S, F4S, F5P)

• *Phormidium cf. griseo-violaceum* (Skuja) Anagnostidis 2001

Τριχώματα με ελαφριά σύσφιξη, φαιο-ιώδη πλάτους 4-6μm. Κύτταρα πιθοειδή, ισοδιαμετρικά ιώδους περιεχομένου με κοκκία στα εγκάρσια τοιχώματα. Επάκριο κύτταρο αποστρογγελευμένο, ενίοτε με καλύπτρα.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Η διαφορετική του οικολογία (τύπος του είδους: επιπλέον σε λίμνες) δεν επιτρέπει την ασφαλή ταυτοποίησή του.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγχθι

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F6S, F7S)

• *Phormidium sp.* Kützing ex Gomont 1892

Θαλλός ροδόχρους-καστανός. Νήματα περιπεπλεγμένα, πλάτους 3μm. Τριχώματα χωρίς σύσφιξη, φαιο-ιώδη. Κύτταρα ελαφρώς μακρύτερα του πλάτους, με μήκος 4μm. Επάκριο κύτταρο λεπτυνόμενο (κωνικό).

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Η μορφή του επάκριου κυττάρου καθώς και οι διαστάσεις νημάτων και τριχωμάτων του υπό μελέτη οργανισμού ενθυμίζουν γνωρίσματα του είδους *Phormidium inundatum* Kützing ex Gomont 1892. Ωστόσο, υπάρχουν διαφορές ως προς τον χρωματισμό (σκοτεινός κυανοπράσινος) και το ενδιαίτημα (περιφυτικό σε ολιγοτροφικά-μεσοτροφικά ύδατα). Περαιτέρω μελέτη του οργανισμού καθώς και μοριακή ανάλυση απαιτείται για την ασφαλή του ταυτοποίηση.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγχθι

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F1A, F2A)

• *Nostocales*

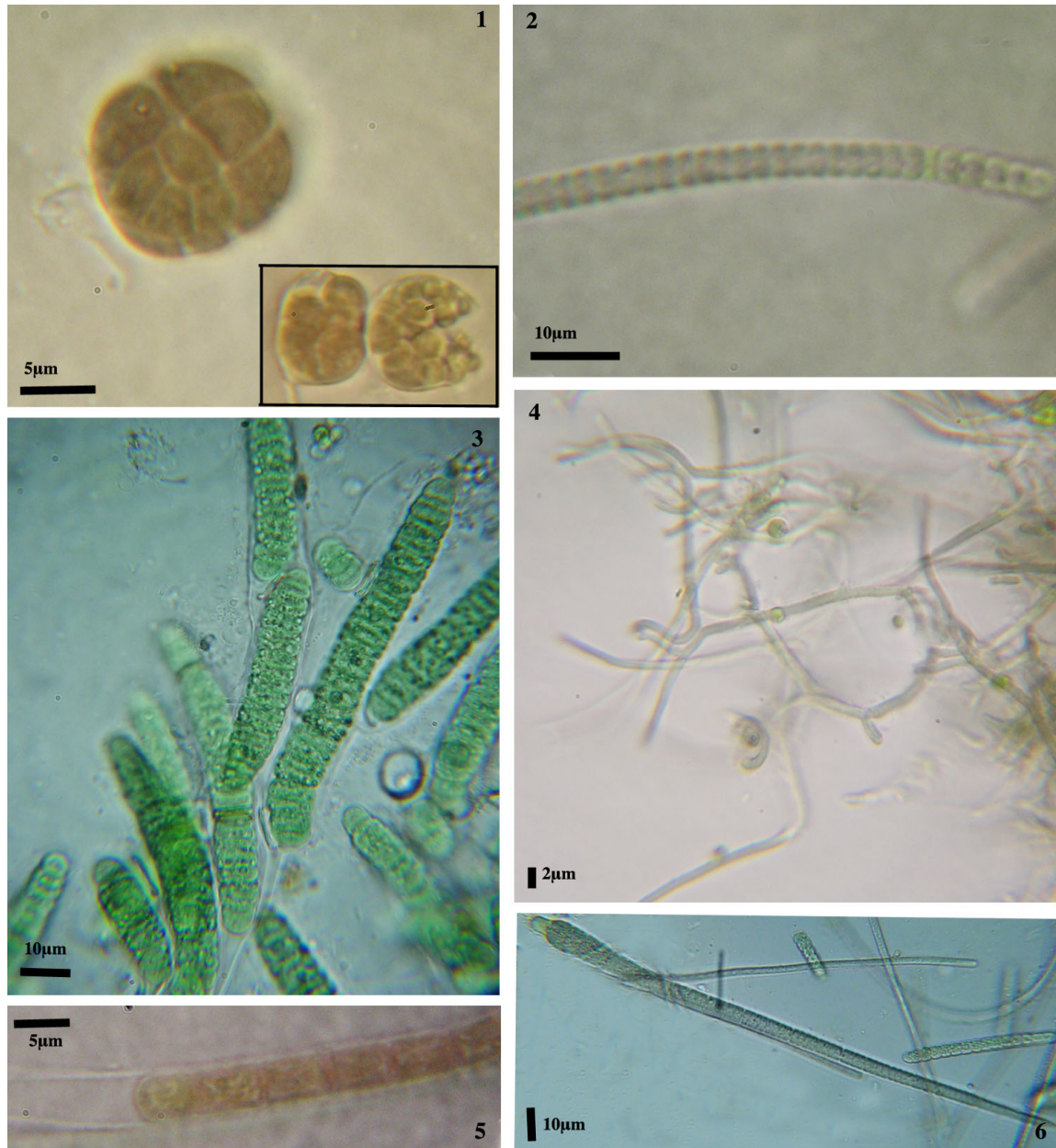
*(στον συνολικό πίνακα των ειδών από όλα τα σπήλαια αναφέρεται ως *Nostocales sp.1*)

Νήμα ελαφρώς λεπτυνόμενο. Κολοί άχρωμοι, παχείς, λείοι. Κύτταρα στη βάση πλάτους 9-10 (15)μm και μήκους 3μm. Επάκριο κύτταρο κωνικό αποστρογγυλευμένο πλάτους 4-5μm και μήκους 6μm. Το χρώμα των κυττάρων είναι φαιοπράσινο. Ετερόκυτο στη βάση των τριχωμάτων διαστάσεων 8-10 × 5-4μm.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ο υπό εξέταση οργανισμός θα μπορούσε να ταυτοποιηθεί υπό το γένος *Tolgythrix* όμως δεν ομοιάζει με κάποιο από τα υπάρχοντα είδη του συγκεκριμένου γένους.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Φράγχθι

Δειγματοληπτικές θέσεις: (F1P, F1S, F2S, F6W, F7S)



Απεικόνιση 3.30: Είδη από το σπήλαιο «Φράγγχι». Αποικία *Mycosarcina* sp., στο ένθετο η παρουσία νανοκυττάρων (1), *Phormidium priestleyi* με πιθοειδή κύτταρα (2), Νήματα και ορμोगόνια *Coleodesmium* sp. (3), Νήματα *Pseudophormidium hollerbachianum* με ψευδοδιακλαδώσεις (4), *Phormidium kuetzingianum* (5), *Calothrix* sp.2 με επάκριο ετερόκυτο (6).

3.2.5. «ΣΠΗΛΑΙΟ ΣΕΛΗΝΙΤΣΑ»: ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΕΣ ΜΟΝΑΔΕΣ ΜΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΘΕΙΣΕΣ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΕΙΔΟΥΣ

- ***Aphanocapsa cf. elachista*** W. et. G.S. West 1894

Θαλλός άχρωμος έως φαιοπράσινος, αποτελούμενος από επιμέρους αποικίες. Θήκη άχρωμη, λεπτή, βλενωδής με ακανόνιστο περίγραμμα. Κύτταρα κυανοπράσινα, διαμέτρου 1,5-2μm, σφαιρικά, μεμονωμένα ή ανά δύο, μέτριας πυκνότητας.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Σημειώνεται ότι το είδος *Aphanocapsa elachista* έχει ενδοειδικές ταξινομικές μονάδες όπως η μορφή *Aphanocapsa f. conferta* West & G.S. West, οι ποικιλίες *Aphanocapsa var. planktonica* G.M. Smith και *Aphanocapsa elachista var. Irregularis*. Τα μελετηθέντα δείγματα ομοιάζουν με την ποικιλία *Aphanocapsa elachista var. irregularis* Boue-Pet (Pettersen 1923), η οποία έχει ανευρεθεί στον Ελλαδικό χώρο (Ρουσσομουστακάκη 1983). Η ποικιλία αυτή σύμφωνα με τον Elenkin 1938, ανήκει στο είδος *Microcystis pulvurea*, σύμφωνα με τον Starmach 1966a εντάσσεται στο είδος *Microcystis incerta*, ενώ ορισμένοι άλλοι τη θεωρούν συνώνυμη του είδους *M.elachista* Compère 1967. Για την ασφαλή κατάταξή του χρειάζεται περαιτέρω μελέτη.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (S1W, S1S, S1A)

- ***Calothrix cf. fusca*** Bornet et Flahault 1886

Νήματα πλάτους 7-15μm στη βάση, και 7-5μm στο μέσον. Νήματα κατά το πλείστον μεμονωμένα, μη σχηματίζοντα θαλλούς. Κολεοί άχρωμοι, χωρίς στρώσεις. Κύτταρα σκοτεινά πράσινα ή φαιοπράσινα, βραχύτερα του πλάτους, με μήκος συνήθως 3-4μm και με σύσφιξη στα εγκάρσια τοιχώματα. Επάκριο κύτταρο κωνικό αποστρογγυλεμένο, κατά το πλείστον πλάτους 4-5μm. Ετερόκυτα βασικά, πλάτους 7-9μm και μήκους 3-4μm. Παρατηρήθηκαν ορμογόνια, μήκους 70-80μm.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Όπως αναφέρεται από τους Geiteler (1932) και Golubić (1976) τα είδη *Calothrix fusca* και *C. parientina* αν και έχουν σημαντικές ομοιότητες, διαφέρουν ως προς το πλάτος των ετερόκυτων, τα οποία στο μεν *C. fusca* είναι μικρότερα των βλαστητικών κυττάρων της βάσης, στο δε *C. parientina* είναι μεγαλύτερα. Τα μελετηθέντα δείγματα έχουν μικρότερο πλάτος ετερόκυτων από τα βλαστητικά κύτταρα στη βάση. Όμως το είδος *C. fusca* αναπτύσσεται σε βλέννη ειδών των γενών *Chaetophora*, *Batrachospermum*, *Gloeotrichia*, *Nostoc* κ.α. Ο μελετηθείς οργανισμός δεν παρατηρήθηκε σε κάποια βλέννη των ανωτέρω οργανισμών, και τα στοιχεία αυτά δεν επιτρέπουν την ασφαλή ταυτοποίησή του.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (S1P, S2W)• ***Cyano sarcina* sp.** Κονάčík 1988

*(στον συνολικό πίνακα των ειδών από όλα τα σπήλαια αναφέρεται ως *Cyano sarcina* sp.2)

Αποικίες κατά το πλείστον σφαιρικές με 4-8 κύτταρα και θήκη που αναγνωρίζεται στα νεαρά στάδια και αργότερα γίνεται δυσδιάκριτη. Κύτταρα σκοτεινά κυανοπράσινα, διαστάσεων (2) 2,5-3 μm. Νανοκύτταρα δεν παρατηρήθηκαν.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Το μέγεθος των κυττάρων ομοιάζει με αυτό του είδους *C. parthenonensis*, ωστόσο, οι αποικίες είναι αρκετά μικρότερες με μικρότερο αριθμό κυττάρων. Επίσης υπάρχει διαφορά ως προς τον χρωματισμό των κυττάρων: το είδος *C. parthenonensis* έχει κύτταρα ελαιοπράσινα, ενώ τα μελετηθέντα δείγματα έχουν χρωματισμό κυττάρων σκοτεινό κυανοπράσινο.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (S1S, S2W, S2S, S4S)

• ***Microchaete cf. tenera*** Thuret ex Bornet et Flahault 1887

Νήματα πλάτους 7-9 μm λεπτυνόμενα στα άκρα (5μm). Κύτταρα πλάτους 4-7μm και μήκους 4-11μm. Χρωματισμός κυττάρων ελαιοπράσινος. Επάκριο κύτταρο κωνικό με αποστρογγυλεμένη κορυφή. Παρατηρήθηκαν ψευδείς διακλαδώσεις μετά από νεκρίδιο. Αναπαράγεται με ορμογόνια (έως 18 κυττάρων) τα οποία στη βάση φέρουν ετερόκυτο διαστάσεων 6×5μm. Στα ορμογόνια, τα κύτταρα είναι πιθόμορφα, ενώ στα γηραιότερα νήματα τα κύτταρα είναι μακρύτερα του πλάτους.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Τα μελετηθέντα δείγματα ανευρέθησαν μόνον σε φυσικό υλικό σε μία δειγματοληπτική θέση, στοιχεία που δεν επιτρέπουν την ασφαλή ταυτοποίησή τους. Το είδος *Microchaete tenera* έχει αναφερθεί από το σπήλαιο Mammoth της Αμερικής (Harris 1981).

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (S1A)

- ***Nostoc sp.*** Vaucher ex Bornet et Flahault, 1886

*(στον συνολικό πίνακα των ειδών από όλα τα σπήλαια αναφέρεται ως *Nostoc sp.2*)

Κύτταρα πλάτους 4-5μm και μήκους έως 4μm, πιθοειδή, ελλειψοειδή, εντόνως κυανοπράσινα. Ετερόκυτα μάλλον σπάνια, διαμέτρου 4-5μm. Έμμονα κύτταρα διαστάσεων 6-7μm σε σειρά, με σκοτεινό πράσινο χρωματισμό.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Τα μελετηθέντα δείγματα ενθυμίζουν το είδος *Nostoc linckia f. muscorum* από το οποίο διαφέρουν ως προς τη διάμετρο των ετερόκυτων (τυπ. μορφή: 6-7μm) και ως προς τη μορφή των εμμόνων κυττάρων (τυπ. μορφή: ελλειψοειδή έως επιμήκη). Το εξετασθέν υλικό προέρχεται από καλλιέργειες και η μη παρατήρηση της μορφής και του χρώματος του θαλλού δεν επιτρέπουν την ασφαλή ταυτοποίησή του ανευρεθέντος οργανισμού υπό συγκεκριμένη ταξινομική μονάδα του γένους.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (S1W, S3P)

- ***Nostoc sp.*** Vaucher ex Bornet & Flahault 1886 (*Απεικόνιση 3.31/εικ. 7α,β,γ*)

*(στον συνολικό πίνακα των ειδών από όλα τα σπήλαια αναφέρεται ως *Nostoc sp.4*)

Κύτταρα πλάτους 2-5μm, πιθοειδή έως σχεδόν σφαιρικά, με λεπτοφυή κοκκίωση και κυανοπράσινο χρωματισμό. Ετερόκυτα παρεμβόλιμα, διαστάσεων 5X4μm. Έμμονα κύτταρα σε σειρά, πλάτους 6μm, ελαιοπράσινα και με πυκνή κοκκίωση.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Τα μελετηθέντα δείγματα ενθυμίζουν το είδος *Nostoc edaphicum* Kondratjeva (και την ταξινομική μονάδα *Nostoc sp.1*, από το σπήλαιο Φράγγχι). Ωστόσο, τα δείγματα αυτά παρατηρήθηκαν μόνο σε καλλιέργεια και η έλλειψη πληροφοριών για το χαρακτηρισμό του θαλλού (χρώμα, μορφή κ.α.) δεν επιτρέπει την ασφαλή ταυτοποίηση του ανευρεθέντος οργανισμού.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (S1W, S1P)

- ***Oscillatoria cf. mauchiana*** Claus 1962

Θαλλός εντόνως κυανοπράσινος. Νήματα πλάτους 2μm, λεπτυνόμενα και ελαφρώς κεκαμμένα στο άκρον. Κύτταρα πλάτους 2μm, κατά το πλείστον βραχύτερα του πλάτους, με μήκος 1,5μm.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Ανταποκρίνεται προς τον τύπο του είδους από σπήλαιο της Ουγγαρίας (Claus 1962). Σύμφωνα με τους Komárek & Anagnostidis 2005 το είδος αυτό χρήζει αναθεώρησης. Θα μπορούσε η δεύτερη αυτή ανεύρεση να ισχυροποιήσει την ταξινομική του

υπόσταση ωστόσο, η παρουσία του μόνον σε καλλιεργημένο υλικό δεν επιτρέπει την ασφαλή ταυτοποίηση υπό το συγκεκριμένο είδος.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (S7P, S7S)

- ***Phormidium cf. retzii*** (Agardh) Gomont ex Gomont 1892

Θαλλός εντόνως κυανοπράσινος. Νήματα πλάτους 5-6μm. Κολοί ευρείς, πάχους έως και 1μm. Τριχώματα πλάτους 4-5μm, κυανοπράσινα, χωρίς σύσφιξη στα εγκάρσια τοιχώματα. Κύτταρα κατά το πλείστον ισοδιαμετρικά ή ασθενώς μακρύτερα του πλάτους. Επάκριο κύτταρο κωνικό με αποστρογγυλεμένη κορυφή.

Ταξινομικές παρατηρήσεις: Τα μελετηθέντα δείγματα έχουν χαρακτήρες που εντάσσονται εντός των ορίων του τυπικού είδους, με εξαίρεση το πλάτος του τριχώματος (τυπ. είδος φθάνει μέχρι και 12μm). Αποτελεί ένα κοσμοπολιτικό, συλλεκτικό είδος. Απαντάται σε γλυκά ύδατα, σε βράχους και βυθισμένες ξυλώδεις επιφάνειες, σε καταρράκτες και κατά το πλείστον σε ορεινές περιοχές ενώ οι πληθυσμοί από θερμές πηγές χρήζουν αναθεώρησης σύμφωνα με τους Komarek & Anagnostidis 2005. Οι Sheath & Cole (1992) το αναφέρουν ως το πλέον διαδεδομένο είδος στη Β. Αμερική. Οι Casamatta et al. 2003, έδειξαν με μοριακή ανάλυση ότι το *Ph. retzii* αντιπροσωπεύει αρκετά κρυπτικά είδη που είναι δύσκολο να διακριθούν με το οπτικό μικροσκόπιο και με κοινούς μορφολογικούς χαρακτήρες.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Σεληνίτσα

Δειγματοληπτικές θέσεις: (S2W)

- ***Stigonematales***

Νήματα πλάτους 8-10μm. Κύτταρα πλάτους 6-10μm και μήκους 5-10 (12)μm με ασθενή κοκίωση. Επάκριο κύτταρο αποστρογγυλεμένο, πλάτους 5-6μm. Παρατηρούνται διακλαδώσεις σε θέσεις με νεκρίδιο και ετερόκυτο. Παρατηρήθηκε άπαξ αληθής διακλάδωση τύπου T. Ετερόκυτα ενδιάμεσα, δίπορα, διαστάσεων 10 × 8μm. Αναπαραγωγή με ορμογόνια που φέρουν ακραίο ετερόκυτο διαστάσεων 8 × 5μm. Το ορμογόνιο λεπτύνεται με βασικό κύτταρο πλάτους 9μm και ακραίο κύτταρο που φθάνει τα 7μm. Το ορμογόνιο διαθέτει σκοτεινός πράσινο χρωματισμό.

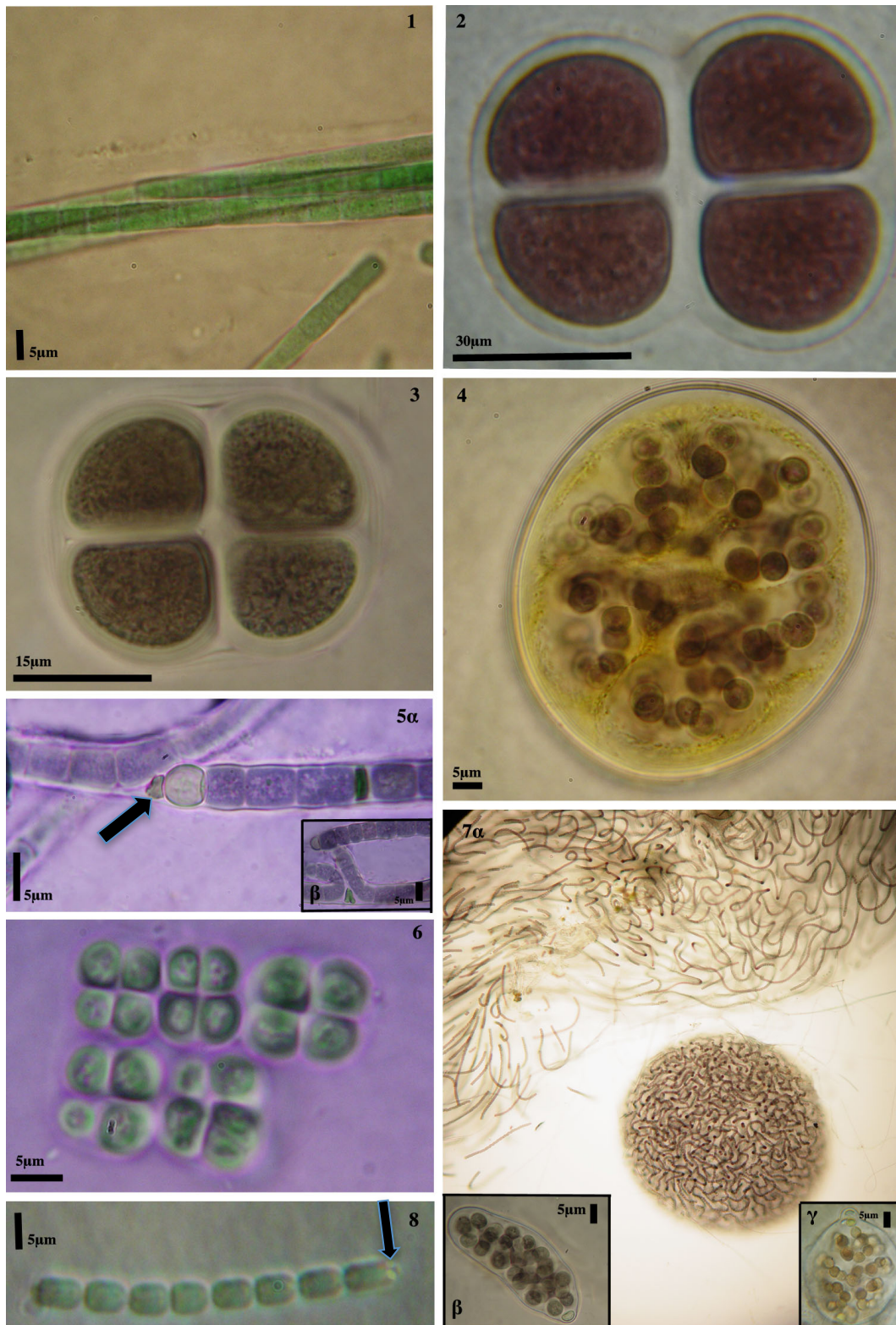
Ταξινομικές παρατηρήσεις: Δεν ήταν δυνατή η ταυτοποίηση των μελετηθέντων δειγμάτων υπό συγκεκριμένη ταξινομική μονάδα. Ο οργανισμός αυτός διατηρείται στο εργαστήριο σε καλλιέργειες με θρεπτικό διάλυμα BG11₀ αλλά υπάρχει και σε φυσικό υλικό ώστε να

πραγματοποιηθεί μελλοντικά η μοριακή του ανάλυση που θα επιτρέψει την ασφαλή του ταυτοποίηση.

Τόπος Ανεύρεσης: Σπήλαιο Σεληνίτσα

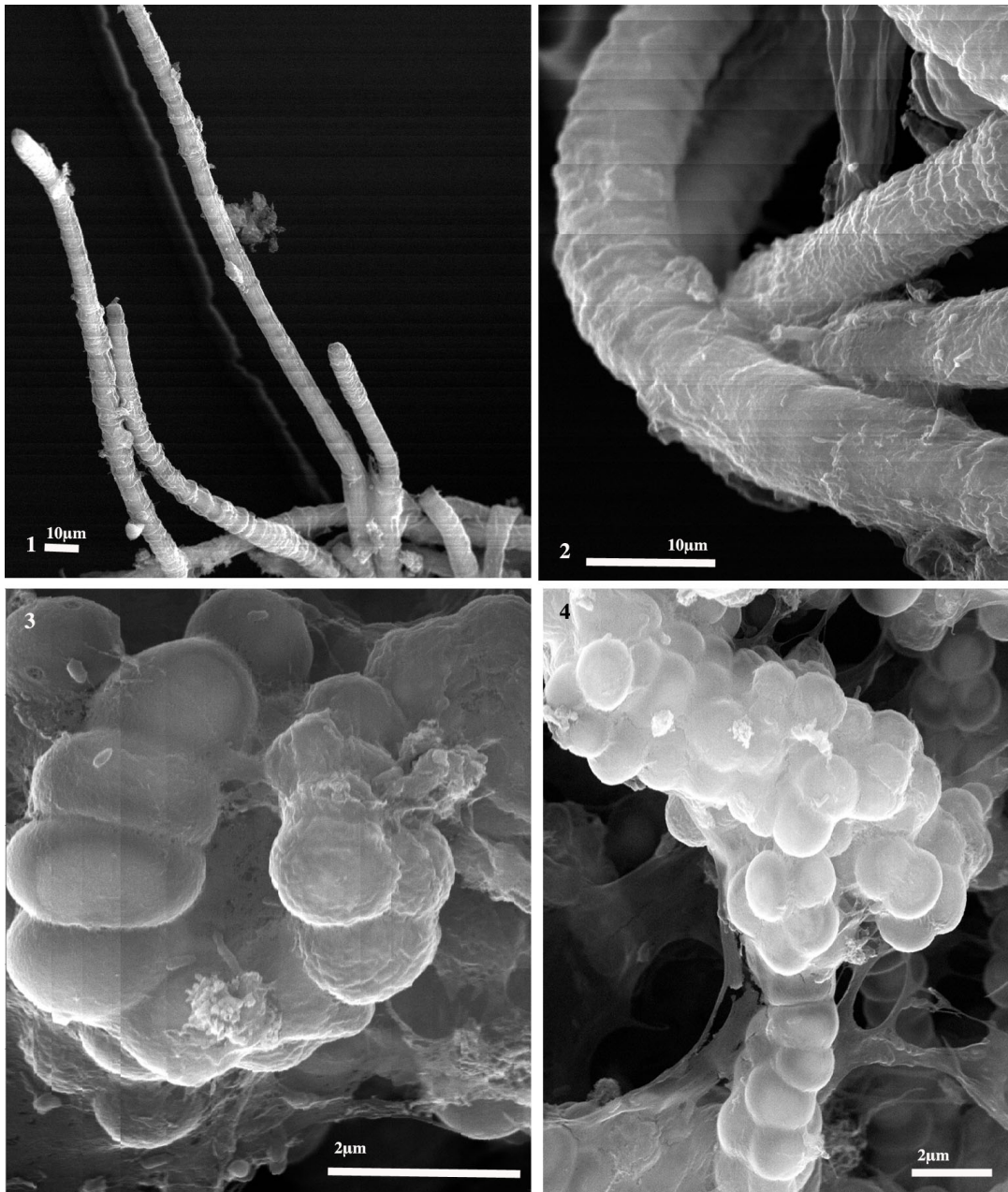
Δειγματοληπτικές θέσεις: (S3P)

-----Η εξάπλωση βασίστηκε σε διαθέσιμη βιβλιογραφία των σπηλαίων, στα βιβλία Anagnostidis and Komárek 1998, Komárek & Anagnostidis 2005 καθώς και στη βάση δεδομένων (AlgaeBase)



Απεικόνιση 3.31: Είδη από το σπήλαιο «Σεληνίτσα». *Microcoleus steenstrupii* τριχώματα έντονα κυανοπράσινα σε κοινό κολεό (1), τετρακύτταρη αποικία *Chroococcus spelaeus* (2), τετρακύτταρη

αποικία *Chroococcus tenax* η οποία περιβάλλεται από φάκελο που φέρει στρώσεις (3), Αποικία *Nostoc* sp.4 αποτελούμενη από νήματα αποτελούμενα από κύτταρα με κοκκίωση (4), μη ταυτοποιημένη ταξινομική μονάδα η οποία ανήκει στα ετεροκουστώδη νηματοειδή και φέρει διακλάδωση μετά από νεκρίδιο (βέλος) (6), κυβοειδείς αποικίες *Eucapsis minor* (5), Αποικίες *Nostoc macrosporum* (7α,β,γ), Νημα *Pseudanabaena galeata*, στο βέλος τα χαρακτηριστικά κοκκία του επάκριου κυττάρου, ενώ τα κύτταρα διαχωρίζονται από τη λεγόμενη υαλώδη γέφυρα (8).



Απεικόνιση 3.32: Είδη υπό το SEM. Νήματα *Tolypothrix fragilissima* (1-2), Αποικίες *Nostoc* sp. 4 με νήματα που περιβάλλονται από βλενώδες πολυσακχαρικό υλικό (3-4).

3.3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΙΟΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ

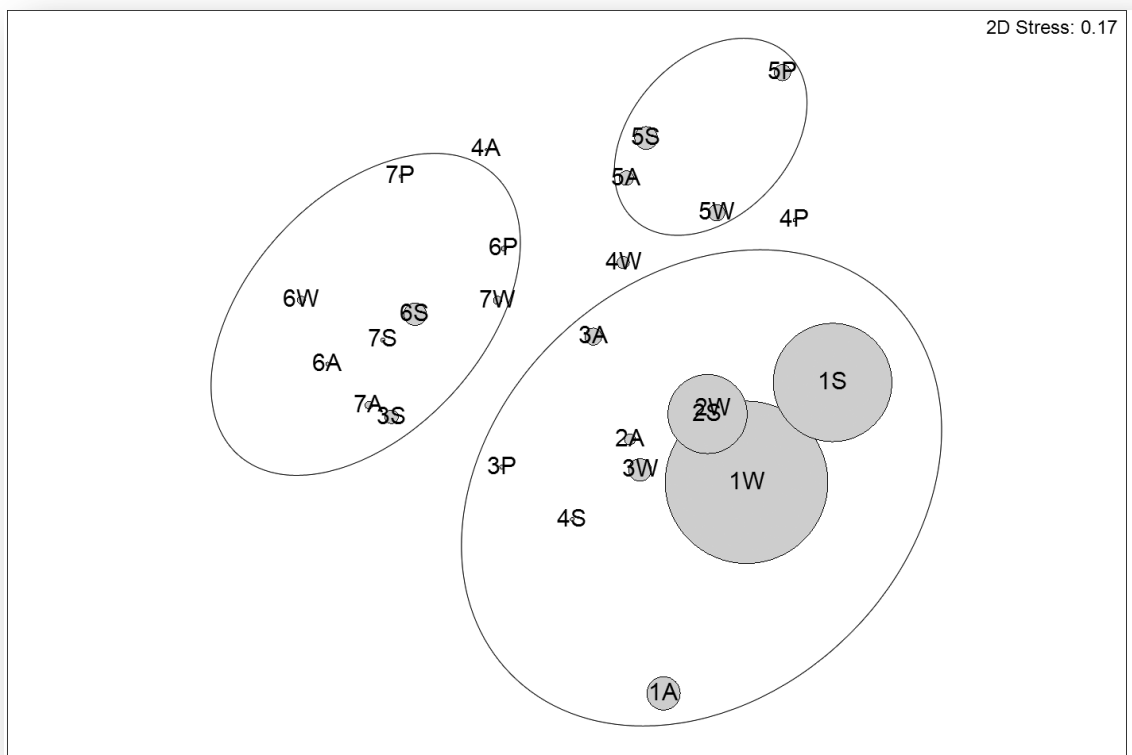
Οι αναλύσεις βασίζονται σε δεδομένα παρουσίας–απουσίας, του συνόλου των δειγμάτων δηλαδή τόσο φυσικού όσο και καλλιεργημένου υλικού. Για να εξηγηθούν οι ομοιότητες και οι ανομοιότητες των θέσεων σε κάθε σπήλαιο καθώς και η ομοιότητα/ανομοιότητα των σπηλαίων μεταξύ τους εφαρμόστηκε η μη παραμετρική μέθοδος nMDS (Multidimensional Scaling) καθώς και η ανάλυση ομοιοτήτων (Simpser analysis) που βασίζονται στον δείκτη ομοιότητας Jaccard με τη βοήθεια του προγράμματος Primer software v.6.

Η nMDS μέθοδος αποτελεί ένα σύνολο τεχνικών ανάλυσης που παρουσιάζουν τη δομή των στοιχείων ως μια γεωμετρική εικόνα. Κάθε στοιχείο, στην προκειμένη περίπτωση, δειγματοληπτική θέση, αναπαρίσταται ως ένα σημείο σε πολυδιάστατο χώρο έτσι ώστε οι αποστάσεις των σημείων να έχουν τη μεγαλύτερη πιθανή σχέση.

Η Simpson analysis, εφαρμόστηκε για να προσδιοριστούν οι χαρακτήρες που δημιουργούν τη διάκριση/ανομοιογένεια μεταξύ των θέσεων σε κάθε σπήλαιο και μεταξύ των σπηλαίων. Η Simpson analysis υπολογίζει τον μέσο όρο της ανομοιότητας του δείκτη Jaccard μεταξύ ζευγών των δεδομένων

3.3.1. ΣΠΗΛΑΙΟ «ΚΑΣΤΡΙΑ»

Το σπήλαιο των «Καστριών» είναι το πιο τυπικό, από τα εξετασθέντα, καρστικό σπήλαιο. Οι 7 δειγματοληπτικές θέσεις φαίνεται να το διαχωρίζουν στις -βιβλιογραφικώς παραδεκτές- τρεις ζώνες: α) εισόδου, β) ενδιάμεσης ζώνης και γ) εσωτερικής ζώνης. Αυτό επιβεβαιώνεται και στην nMDS ανάλυση όπου οι δειγματοληπτικές θέσεις ομαδοποιούνται σε 3 επίπεδα.



Διάγραμμα 1: Σπήλαιο «Καστριά», nMDS ανάλυση των συνολικών εποχιακών δειγμάτων ανά θέση με την επίδραση του μέσου όρου της περιβαλλοντικής παραμέτρου PAR (σκιασμένοι κύκλοι).

Όπως διαφαίνεται στο διάγραμμα οι θέσεις 1,2,3 ομαδοποιούνται μαζί και θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως η 'ζώνη εισόδου'. Ακολουθεί η 'ενδιάμεση ζώνη' με τη δειγματοληπτική θέση 5 και η 'εσωτερική ζώνη' με τις δειγματοληπτικές θέσεις 6,7. Η δειγματοληπτική θέση 4 εμφανίζεται να έχει μεγάλη διασπορά και παρουσιάζει εποχική διακύμανση.

Οι κύκλοι αναπαριστούν την επίδραση της φωτοσυνθετικής ενεργού ακτινοβολίας (PAR). Είναι εμφανές ότι οι θέσεις 1,2 είναι αυτές που επηρεάζονται περισσότερο από τη διακύμανση της περιβαλλοντικής αυτής παραμέτρου. Η θερμοκρασία (T) και η σχετική υγρασία (RH) δεν φαίνεται να επηρεάζουν τη σύνθεση των κυανοβακτηριακών ειδών.

Η κοινωνία της εισόδου είναι η πλουσιότερη με 51 ταξινομικές μονάδες, ακολουθούν η ενδιάμεση και η εσωτερική ζώνη με 33 και 18 ταξινομικές μονάδες αντιστοίχως.

Η μεγαλύτερη ομοιογένεια στη σύνθεση των κυανοβακτηριακών ειδών παρατηρείται στις εσωτερικές θέσεις 6,7 με ομοιότητα (44,64% και 39,05% αντιστοίχως). Αυτό υποδηλώνει ότι οι

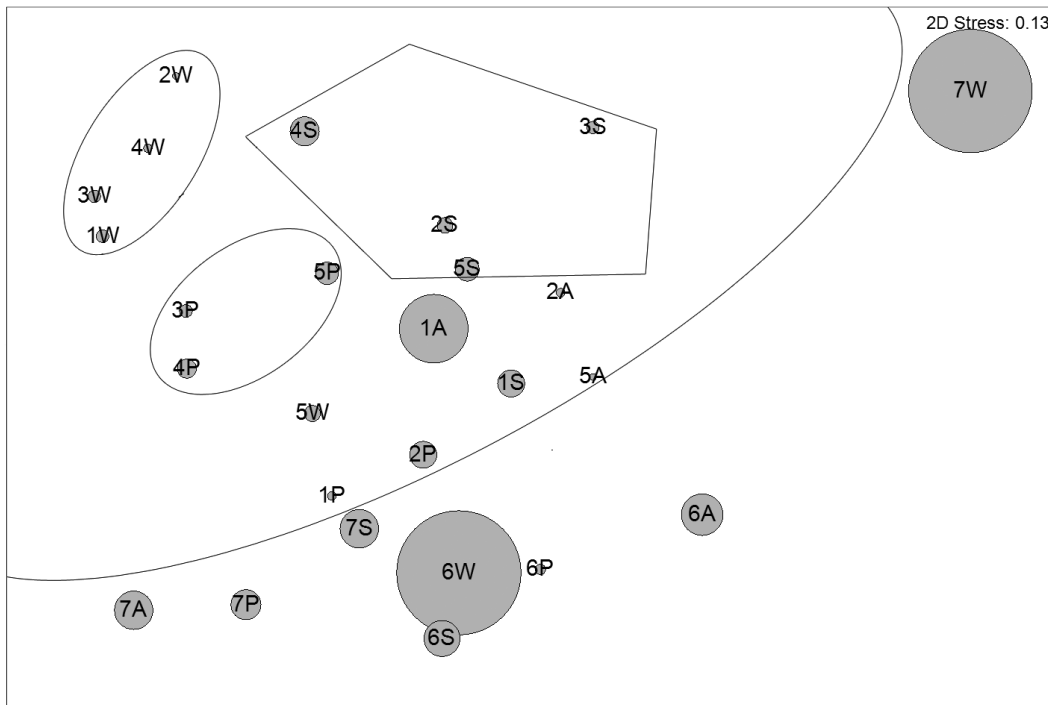
βιοκοινότητες των κυανοβακτηρίων που υπάρχουν σε αυτές τις θέσεις, αν και απαρτίζονται από ολιγάριθμα είδη, είναι αρκετά προσαρμοσμένες σε συνθήκες ελαχίστου φωτός.

Τα είδη *Scytonema julianum* και *Irhinoe spelaebios* εμφανίζονται σχεδόν σε όλη τη διάρκεια του έτους σε αυτές τις θέσεις. Η παρουσία ειδών με ανθρακικές αποθέσεις επί της πολυσακχαριτικής θήκης, όπως τα προαναφερθέντα, έχουν παρατηρηθεί και αναφερθεί από τη σκοτεινή ζώνη και άλλων σπηλαίων (Hernández-Mariné et al. 2001, Roldán et al. 2004). Τα είδη *Scytonema julianum*, *Leptolyngbya palikiana*, *L. gracillima*, *Pseudophormidium spelaeoides*, παρατηρούνται σχεδόν σε όλες τις θέσεις από την είσοδο μέχρι και την εσωτερική ζώνη του σπηλαίου.

Η φωτοσυνθετικώς ενεργή ακτινοβολία παρουσιάζει σαφή διαβάθμιση από την είσοδο του σπηλαίου προς το εσωτερικό με αποτέλεσμα οι κυανοβακτηριακές κοινότητες να οργανώνονται σε βιοϋμένια ακολουθώντας αυτήν τη διαβάθμιση. Στη ζώνη εισόδου τα βιοϋμένια είναι βλενώδη, με εποχική παρουσία εξαρτώμενη από τις καιρικές συνθήκες. Οι βιοκοινότητες σε αυτή τη ζώνη απαρτίζονται από τις εξής ταξινομικές μονάδες: *Aphanocapsa* spp., *Chroococcus* spp., *Eucapsis minor*, *Leptolyngbya gracillima*, *L. perelegans* και *Pseudophormidium spelaeoides*. Στην ζώνη εισόδου τα είδη της τάξης Chroococcales επικρατούν. Καθώς μειώνεται το PAR τα βιοϋμένια μετατρέπονται σε λεπτότερα, με σαφή επικράτηση ειδών που ανήκουν στην τάξη Oscillatoriales, φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενες μελέτες σπηλαίων (π.χ. Vinogradova et al. 1998, Roldán & Hernández-Mariné 2009).

3.3.2. ΣΠΗΛΑΙΟ «ΦΡΑΓΧΘΙ»

Στο συγκεκριμένο σπήλαιο ένα μεγάλο μέρος της οροφής έχει καταρρεύσει συμβάλλοντας στην μη τυπική διαμόρφωση των αναμενόμενων ζωνών. Με βάση την nMDS ανάλυση οι δειγματοληπτικές θέσεις ομαδοποιούνται σε 2 μεγάλα σύνολα : το πρώτο (α) περιλαμβάνει τις δειγματοληπτικές θέσεις 1-5 παρουσιάζοντας εποχική υποομαδοποίηση, και το δεύτερο (β) περιλαμβάνει τις δειγματοληπτικές θέσεις 6 και 7.

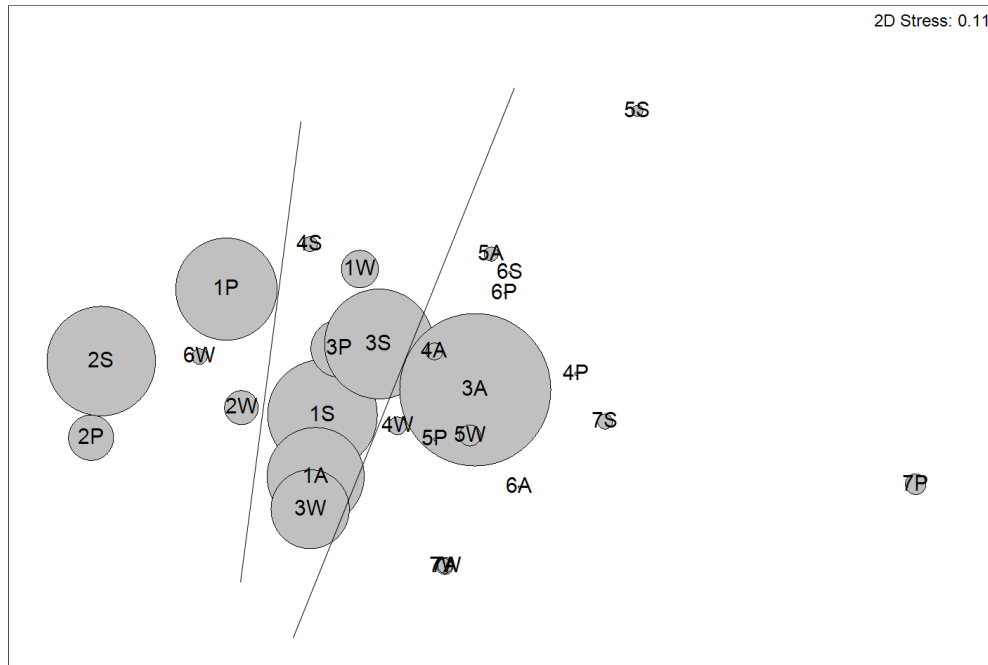


Διάγραμμα 2: nMDS ανάλυση στο σπήλαιο «Φράγγθι», των συνολικών εποχιακών δειγμάτων ανά θέση με την επίδραση του μέσου όρου της περιβαλλοντικής παραμέτρου PAR (κύκλοι).

Από την παραπάνω απεικόνιση φαίνεται η εποχική διακύμανση που εμφανίζουν οι δειγματοληπτικές θέσεις 1-5 με ένα υποσύνολο τον χειμώνα (W), ένα την άνοιξη (P) και ένα το καλοκαίρι (S). Οι θέσεις 6-7 είναι εκτεθειμένες στο εξωτερικό περιβάλλον καθώς εντοπίζονται στο σημείο όπου έχει καταρρεύσει η οροφή και για αυτό επηρεάζονται περισσότερο από τη διακύμανση του PAR. Η αφθονία των ειδών ανέρχεται στις 53 ταξινομικές μονάδες για το πρώτο σύνολο, ενώ το δεύτερο περιλαμβάνει 32 ταξινομικές μονάδες.

3.3.3. ΣΠΗΛΑΙΟ «ΣΕΛΗΝΙΤΣΑ»

Η «Σεληνίτσα» ευρίσκεται σε απόσταση μόλις 2 m από το επίπεδο θαλάσσης επομένως επηρεάζεται από τους ατμούς αυξημένης αλατότητας της ζώνης ψεκασμού. Οι 7 δειγματοληπτικές θέσεις ομαδοποιούνται σε 3 σύνολα: (α) την ζώνη εισόδου (θέσεις 1,3) που επηρεάζεται άμεσα από τη ζώνη ψεκασμού, (β) την ενδιάμεση ζώνη (θέση 2) και (γ) την εσωτερική ζώνη (θέσεις 4-7).



Διάγραμμα 3: nMDS ανάλυση στο σπήλαιο «Σεληνίτσα», των συνολικών εποχιακών δειγμάτων ανά θέση με την επίδραση του μέσου όρου της περιβαλλοντικής παραμέτρου PAR (κύκλοι).

Η μεγαλύτερη τιμή της αφθονίας των ειδών παρατηρήθηκε στη 'ζώνη εισόδου' με 48 ταξινομικές μονάδες, και ακολουθούν η 'ενδιάμεση ζώνη' και η 'εσωτερική ζώνη' με 11 και 35 ταξινομικές ταξινομικές μονάδες αντιστοίχως.

Το είδος *Chroococcidiopsis kashii* εμφανίζεται σε όλες τις δειγματοληπτικές θέσεις του συγκεκριμένου σπηλαίου γεγονός που αποδίδεται στις ανθεκτικές στην αλατότητα θήκες που περιβάλλουν τα κύτταρα.

Επίσης, είναι μεγάλη η παρουσία βιοϋμενίων με επικράτηση των νηματοειδών ετεροκυστωδών ειδών του γένους *Nostoc*. Οι ισχυρές θήκες με πλεόνασμα εξωπολυμερικών πολυσακχαριτικών συστατικών (EPS) αποτελούν πλεονέκτημα στην αντιμετώπιση της ξηρασίας και της αφυδάτωσης εξαιτίας της αλατότητας.

3.3.4. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΤΡΙΩΝ ΣΠΗΛΑΙΩΝ

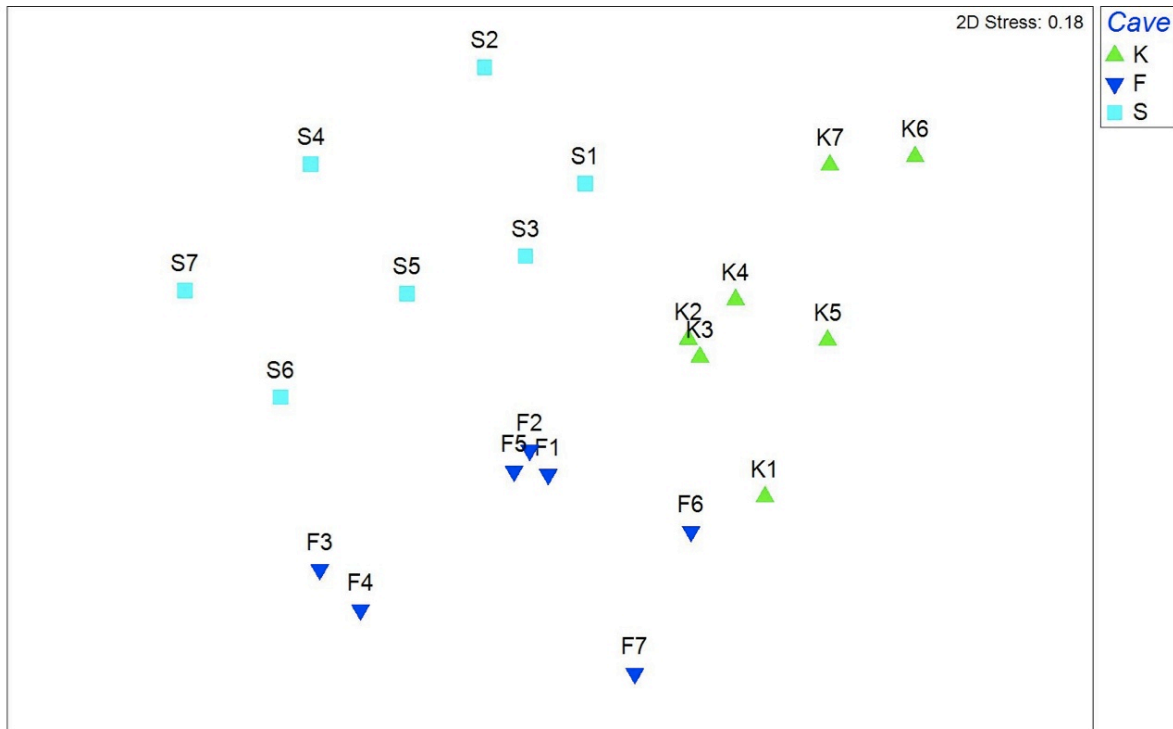
Τα τρία σπήλαια διαφέρουν όσον αφορά στη διαμόρφωση/δομή καθώς και στην απόσταση από το επίπεδο θαλάσσης.

Το σπήλαιο «Καστριά» εμφανίζει την τυπική δομή ενός κλειστού σπηλαίου με σαφή μειούμενη φωτοσυνθετική ακτινοβολία στις εσωτερικές θέσεις.

Το «Φράγχθι» παρουσιάζει πτώση ενός τμήματος της οροφής, καθιστώντας το μη τυπικό σπήλαιο, ενώ το σπήλαιο «Σεληνίτσα» επηρεάζεται από την αλατότητα της γειτνιάζουσας θάλασσας.

Το γενικό πρότυπο κατανομής των κυανοβακτηριακών κοινωνιών όπως περιγράφεται σε άλλα σπήλαια (Roldán & Hernández-Mariné 2009), σε σχέση με τις περιβαλλοντικές παραμέτρους (PAR, T, RH) δεν διαφαίνεται στη σύγκριση των συγκεκριμένων σπηλαίων (βλ. διάγραμμα 4).

Εκτός από τις περιβαλλοντικές παραμέτρους, η μορφολογία του σπηλαίου, η διαθεσιμότητα του νερού, ο τύπος και η συνεκτικότητα του υποστρώματος αποτελούν σημαντικές μεταβλητές που διαμορφώνουν τη βιοκοινότητα των ειδών. Η nMDS ανάλυση των συνολικών εποχιακών δειγμάτων ανά δειγματοληπτική θέση δείχνει σαφή διάκριση των τριών σπηλαίων.

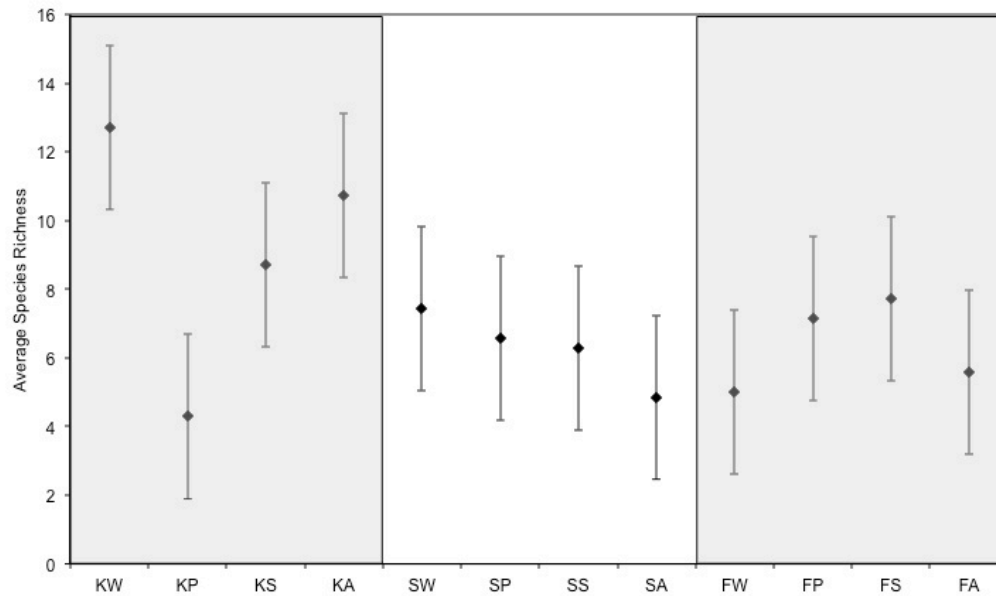


Διάγραμμα 4: nMDS ανάλυση των συνολικών εποχιακών δειγμάτων ανά δειγματοληπτική θέση (1-7) για όλα τα σπήλαια (K = Καστριά, F = Φράγχθι, S = Σεληνίτσα).

Η ανάλυση ομοιοτήτων (Simper analysis) των συναθροιστικών εποχικών δειγμάτων μεταξύ των σπηλαίων (ανά ζεύγη) έδειξε ποσοστό ανομοιογένειας κυμαινόμενο μεταξύ 86-89%. Τα είδη που συμβάλλουν περισσότερο σε αυτή την ανομοιογένεια φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

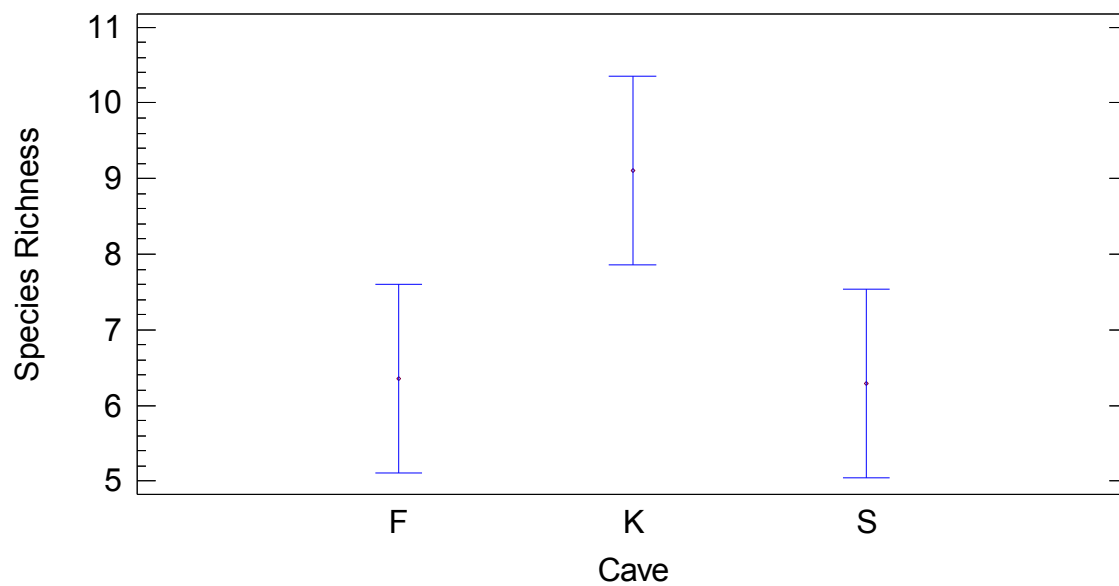
Μέσος όρος ανομοιογένειας 86.25%	Μέσος όρος ανομοιογένειας 86.35%	Μέσος όρος ανομοιογένειας 88.98%
Καστριά <i>Scytonema julianum</i> <i>Iphinoe spelaebios</i> <i>Pseudophormidium spelaeoides</i> <i>Leptolyngbya palikiana</i>	Φράγχθι <i>Pseudophormidium sp.</i> <i>Cyanosarcina sp.1</i> <i>Nostoc sp.1</i> <i>Asterocapsa aerophytica</i> <i>Chroococcus cf. lithophilus</i>	Καστριά <i>Scytonema julianum</i> <i>Iphinoe spelaebios</i> <i>Pseudophormidium spelaeoides</i> <i>Leptolyngbya gracillima</i> <i>Leptolyngbya palikiana</i>
Φράγχθι <i>Chroococidiopsis kashaii</i> <i>Pseudophormidium sp.</i> <i>Leptolyngbya gracillima</i>	Σεληνίτσα <i>Leptolyngbya tenuis</i> <i>Cyanosarcina sp.2</i> <i>Nostoc macrosporum</i>	Σεληνίτσα <i>Chroococidiopsis kashaii</i> <i>Nostoc commune</i>

Συγκρίνοντας τον μέσο όρο του πλούτου των ειδών μεταξύ των τριών σπηλαίων φαίνεται ότι στα σπήλαια «Φράγχθι» και «Σεληνίτσα» ο μέσος όρος του πλούτου ανά εποχή παραμένει σταθερός κατά τη διάρκεια του έτους, ενώ στο σπήλαιο «Καστριά» παρατηρείται μεγάλη τιμή κατά το φθινόπωρο και χειμώνα, και σημαντική πτώση την άνοιξη όπου σε δύο δειγματοληπτικές θέσεις (K1, K2) δεν παρατηρήθηκαν αναπτύξεις κυανοβακτηρίων.



Διάγραμμα 5: ANOVA του μέσου όρου αφθονίας ειδών ανά εποχή και στα τρία σπήλαια (error bars 95% LSD).

Το σπήλαιο με το μεγαλύτερο πλούτο ειδών είναι το τυπικό σπήλαιο «Καστριά» όπως αναμενόταν και όπως διαφαίνεται στην κάτωθι απεικόνιση.



3.4. ΑΒΙΟΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΤΩΝ ΜΕΛΕΤΗΘΕΝΤΩΝ ΣΠΗΛΑΙΩΝ

Οι τιμές των περιβαλλοντικών παραμέτρων (PAR,T,RH), οι οποίες καταγράφηκαν σε κάθε θέση για κάθε δειγματοληπτική περίοδο (Χειμώνας = W, Άνοιξη = P, Καλοκαίρι = S, Φθινόπωρο = A), στα τρία σπήλαια «Κασριά-(K)», «Φράγθι-(F)», «Σεληνίτσα-(S)» φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 3.1:

	K1W	K1P	K1S	K1A	K2W	K2P	K2S	K2A	K3W	K3P	K3S	K3A	K4W	K4P	K4S	K4A	K5W	K5P	K5S	K5A	K6W	K6P	K6S	K6A	K7W	K7P	K7S	K7A
PAR	40,37	20,51	21,46	1,70	1,40	8,68	9,56	0,18	0,79	0,03	0,29	0,44	0,23	0,02	0,02	0,01	0,42	0,41	0,79	0,33	0,09	0,04	0,78	0,02	0,11	0,01	0,03	0,09
T	5,79	14,51	22,14	12,08	5,73	13,83	16,99	12,33	6,31	12,82	18,50	11,67	7,51	11,73	17,21	11,55	6,65	11,55	13,54	12,25	7,25	11,08	12,46	12,45	6,98	11,08	12,63	11,75
RH	82,72	81,80	62,64	90,29	93,39	92,04	75,64	80,48	94,10	88,06	69,98	91,77	92,34	92,44	76,65	94,15	93,06	95,23	93,78	91,72	94,84	96,93	96,04	89,29	96,02	97,76	96,70	93,46
	F1W	F1P	F1S	F1A	F2W	F2P	F2S	F2A	F3W	F3P	F3S	F3A	F4W	F4P	F4S	F4A	F5W	F5P	F5S	F5A	F6W	F6P	F6S	F6A	F7W	F7P	F7S	F7A
PAR	0,28	0,13	1,27	8,14	0,08	1,26	0,42	0,13	0,27	0,29	0,27	2,06	0,12	0,63	1,48	2,11	0,45	0,88	0,98	0,08	26,70	0,19	2,24	3,00	26,35	1,57	2,57	2,56
T	15,35	13,15	26,18	18,45	16,49	12,25	25,34	18,26	14,73	11,52	23,99	17,92	14,97	12,45	24,35	19,18	15,11	12,78	25,25	18,35	17,45	12,77	25,94	23,69	17,33	12,76	24,68	20,68
RH	61,84	52,76	51,68	94,11	59,46	56,32	61,06	93,51	66,28	57,61	63,44	92,25	63,80	52,94	63,91	79,03	61,62	53,52	64,95	86,19	52,94	51,73	64,56	88,94	53,87	50,73	65,65	88,94
	S1W	S1P	S1S	S1A	S2W	S2P	S2S	S2A	S3W	S3P	S3S	S3A	S4W	S4P	S4S	S4A	S5W	S5P	S5S	S5A	S6W	S6P	S6S	S6A	S7W	S7P	S7S	S7A
PAR	2,69	20,02	23,46	18,40	2,22	3,99	23,00	20,23	11,96	6,32	23,11	44,55	0,61	0,02	0,43	0,54	0,87	0,01	0,25	0,39	0,47	0,00	0,01	0,01	0,56	0,83	0,43	0,41
T	16,35	17,17	25,99	20,39	15,46	16,39	24,35	19,99	15,28	16,28	24,35	19,61	16,40	17,33	18,44	20,90	16,09	16,85	17,44	19,89	16,23	16,61	17,00	19,84	16,52	16,50	17,06	19,92
RH	86,38	58,43	58,13	72,73	88,66	61,87	60,45	75,00	89,67	82,45	73,46	78,40	83,62	58,91	58,98	72,26	84,37	66,79	59,00	75,94	85,23	84,69	69,90	77,54	86,23	63,65	69,87	79,46

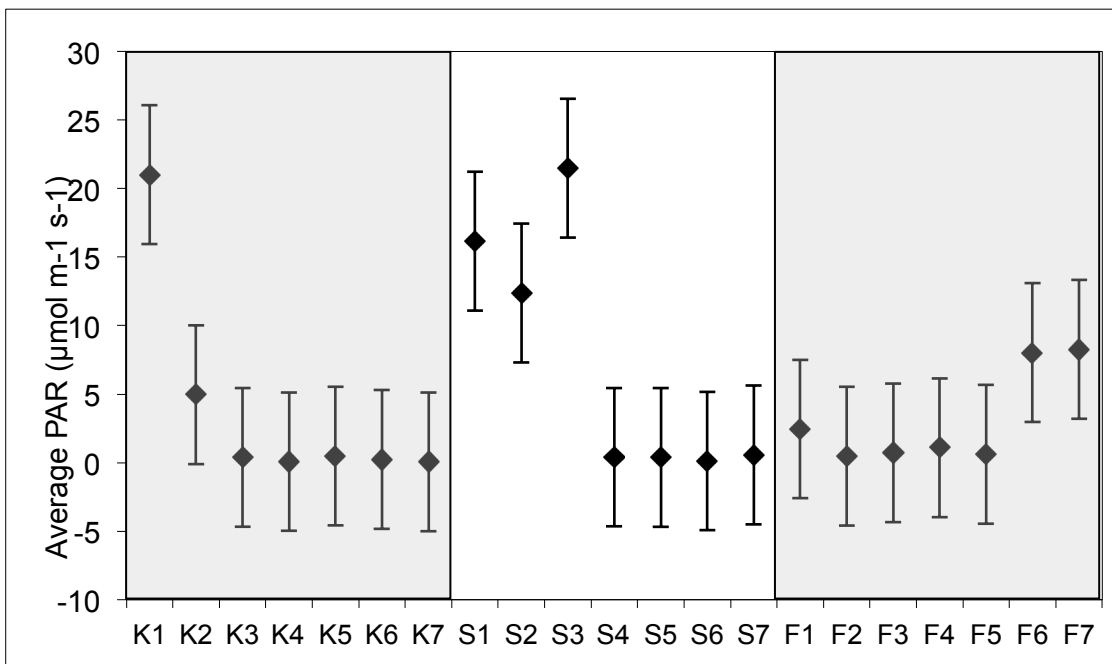
Οι μέσοι όροι εποχικών τιμών καθώς και η τυπική απόκλιση (sd) των περιβαλλοντικών παραμέτρων φαίνονται στον κάτωθι πίνακα 3.2:

	PAR $\mu\text{mols} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$		T °C		RH %	
	average	sd	average	sd	average	sd
FA	2.58	2.70	19.50	2.06	89.00	5.23
FP	0.71	0.56	12.53	0.53	53.66	2.46
FS	1.32	0.86	25.10	0.81	62.18	4.86
FW	7.75	12.83	15.92	1.15	59.97	4.96
KA	0.40	0.60	12.01	0.35	90.17	4.59
KP	4.24	7.85	12.37	1.37	92.04	5.59
KS	4.70	8.15	16.21	3.56	81.63	13.78
KW	6.20	15.07	6.60	0.69	92.35	4.42
SA	12.08	16.89	20.08	0.43	75.90	2.76
SP	4.46	7.28	16.73	0.40	68.11	10.95
SS	10.10	12.25	20.66	4.03	64.26	6.53
SW	2.77	4.15	16.05	0.48	86.31	2.20

Από των ανωτέρω πίνακα είναι φανερό ότι το σπήλαιο «Καστριά» παρουσιάζει τη μέγιστη ετήσια σχετική υγρασία (RH = 89,05%) και ακολουθούν το σπήλαιο “Σεληνίτσα” (RH = 73,65%) και το «Φράγγθι» (RH = 66,20%). Επίσης, τα “Καστριά” φαίνεται να αποτελούν το σπήλαιο με τη μικρότερη ετήσια θερμοκρασία ($T = 11,80^{\circ}\text{C}$), ενώ το «Φράγγθι» και η «Σεληνίτσα» έχουν παρόμοιες τιμές $18,26^{\circ}\text{C}$ και $18,38^{\circ}\text{C}$ αντιστοίχως.

Από τις περιβαλλοντικές παραμέτρους η ενεργώς φωτοσυνθετική ακτινοβολία είναι αυτή που διαδραματίζει τον σημαντικότερο ρόλο και καθορίζει το πρότυπο κατανομής των κυανοβακτηριακών ειδών.

Χρησιμοποιώντας τον μέσο όρο της ενεργού φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας από όλες τις εποχές για κάθε θέση κατασκευάστηκε το παρακάτω διάγραμμα από το οποίο διαφαίνεται ότι οι εξωτερικές θέσεις των σπηλαίων «Καστριά» (K1) και «Σεληνίτσα» (S 1,2,3) δέχονται την περισσότερη φωτεινή ακτινοβολία. Αντιθέτως, στο σπήλαιο «Φράγγθι», λόγω της κατάρρευσης της οροφής, φαίνεται καθαρά ότι οι εκτεθειμένες στο εξωτερικό περιβάλλον θέσεις (F 6,7) δέχονται την περισσότερη ακτινοβολία.



Διάγραμμα 6: Ο μέσος όρος της ενεργού φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας (PAR) ανά δειγματοληπτική θέση (1-7) για όλα τα σπήλαια (K = Καστριά, F= Φράγγθι, S=Σεληνίτσα).

3.5. ΛΙΠΟΕΙΔΗ

3.5.1. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ –ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ TLC

Όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 2.10, επιλέχθηκαν δύο ενδιαφέρουσες ταξινομικές μονάδες για εκχύλιση των ολικών λιποειδών και μελέτη της πιθανής αντιβακτηριακής τους δράσης.

Η πρώτη ταξινομική μονάδα αποτελεί νέο για την επιστήμη γένος και είδος, υπό το όνομα *Toxopsis calypsus* (Lamprinou et al. 2012), και ανήκει στα νηματοειδή ετεροκυστώδη κυανοβακτήρια, για τα οποία έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικώς ενδιαφέροντα λιποειδή.

Η δεύτερη ταξινομική μονάδα αποτελεί επίσης νέο είδος για την επιστήμη υπό το όνομα *Phormidium melanochrouron* (Lamprinou et al. in press), και στις καλλιέργειες παρουσίαζε ανταγωνιστική δράση έναντι των υπολοίπων κυανοβακτηρίων.

Μετά την εκχύλιση των ολικών λιποειδών (TL =Total Lipid) για αμφότερα τα είδη ακολούθησε κατανομή κατ' αντιρροήν για διαχωρισμό των Ολικών Λιποειδών σε Πολικά Λιποειδή (PL) και Ουδέτερα Λιποειδή (NL). Για το *Toxopsis calypsus* TL = 31mg, NL = 28,5mg και PL = 2,5mg ενώ για το *Phormidium melanochrouron* TL = 51mg, NL = 14,9mg και PL = 36,1mg.

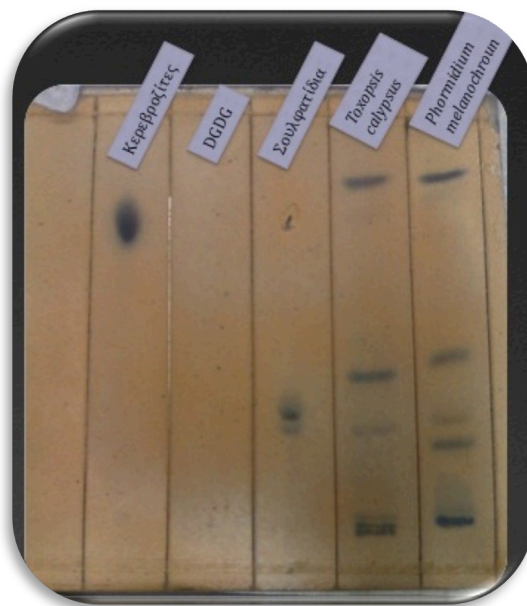
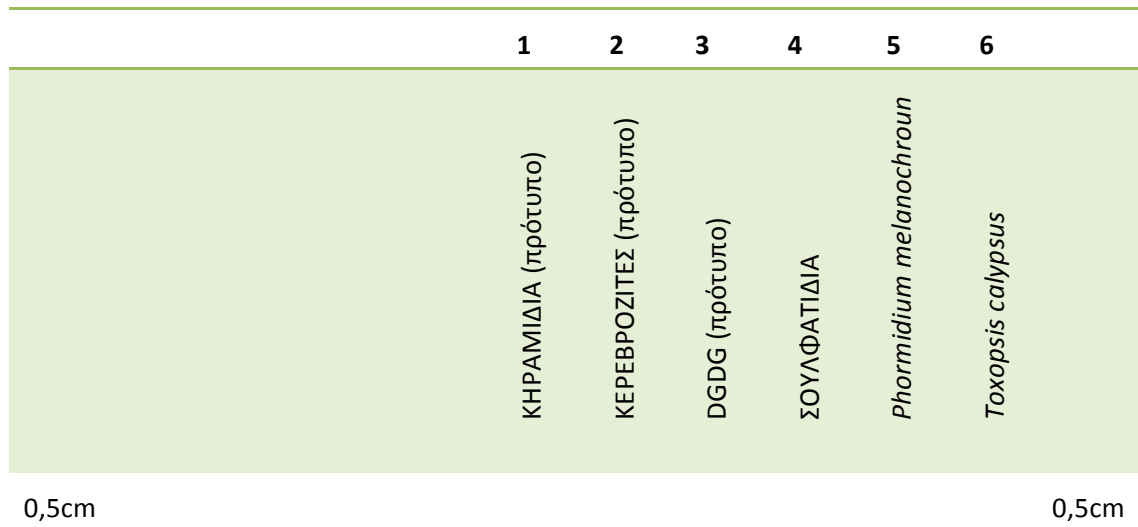
Τα λιποειδή που έχουν ενδιαφέρουσα αντιβακτηριακή δράση ανήκουν στα PL και αυτά στη συνέχεια διαχωρίστηκαν στα συστατικά τους με τη χρήση Χρωματογραφίας Λεπτής Στιβάδος (TLC).

Τα PL αφού αναδιαλύθηκαν σε 4ml C:M/1:1, εφαρμόστηκε ο διαχωρισμός με TLC (περιγράφεται αναλυτικά η διαδικασία στο Κεφάλαιο 2.10) και στο μεν *Toxopsis calypsus* παρελήφθησαν 12 ζώνες, στο δε *Phormidium melanochrouron* 10 ζώνες. Ακολουθούν οι πίνακες με την ακριβή ποσότητα των ζωνών των πολικών λιποειδών.

PL	<i>Toxopsis calypsus</i>
Ζώνη 1	0,2085 mg
Ζώνη 2	0,2038 mg
Ζώνη 3	0,1753 mg
Ζώνη 4	0,1909 mg
Ζώνη 5	0,2024 mg
Ζώνη 6	0,1778 mg
Ζώνη 7	0,2343 mg
Ζώνη 8	0,2266 mg
Ζώνη 9	0,1904 mg
Ζώνη 10	0,2262 mg
Ζώνη 11	0,3250 mg
Ζώνη 12	0,2435 mg

PL	<i>Phormidium melanochroun</i>
Ζώνη 1	3,4 mg
Ζώνη 2	2,97 mg
Ζώνη 3	4,33 mg
Ζώνη 4	4,82 mg
Ζώνη 5	4,28 mg
Ζώνη 6	4,09 mg
Ζώνη 7	3,95 mg
Ζώνη 8	3,04 mg
Ζώνη 9	1,1 mg
Ζώνη 10	4,24 mg

Για έναν αδρό προσδιορισμό των ζωνών των πολικών λιποειδών εφαρμόστηκε η χρώση με α-ναφθόλη για τα γλυκολιποειδή. Συγκρίθηκαν τα πολικά λιποειδή των δύο εξεταζόμενων κυανοβακτηρίων με πρότυπες ουσίες γλυκολιποειδών και τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω:



<i>Toxopsis calypsus</i>	
ΣΟΥΛΦΑΤΙΔΙΑ	Ζώνες (4,5,6)
ΚΕΡΕΒΡΟΖΙΤΕΣ	Ζώνες (9,10,11)

<i>Phormidium melanochroun</i>	
ΣΟΥΛΦΑΤΙΔΙΑ	Ζώνες (4,5,6)
ΚΕΡΕΒΡΟΖΙΤΕΣ	Ζώνες (8,9,)

3.6. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ

3.6.1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΧΥΣΗΣ ΣΕ ΑΓΑΡ (KIRBY BAUER)

Τα βακτήρια που επιλέχθηκαν για τον έλεγχο της βακτηριακής δράσης των λιποειδών -που απομονώθηκαν από το *Toxopsis calypsus* και το *Phormidium melanochroun-* ήταν τόσο πρότυπα όσο και κλινικά στελέχη:

1. πρότυπο στέλεχος *Staphylococcus aureus* (NCTC 6571), Gram⁺
2. κλινικό στέλεχος *Staphylococcus aureus* (MRSA 1629), Gram⁺
3. κλινικό στέλεχος *Staphylococcus* (MSSA 1646), Gram⁺
4. πρότυπο στέλεχος *Escherichia coli* (ATCC 25922), Gram⁻
5. πρότυπο στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), Gram⁻
6. πρότυπο στέλεχος *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), Gram⁺
7. κλινικό στέλεχος *Enterococcus faecalis* (VRE 880), Gram⁺
8. κλινικό στέλεχος *Enterococcus faecium* (VRE 1291), Gram⁺

Το κλινικό στέλεχος, *S. aureus* (MRSA 1629) (methicillin Resistant, MRSA) είναι ανθεκτικό στη μεθικιλίνη. Ήδη από τη δεκαετία του 60, ένα συνεχώς αυξανόμενο ποσοστό των νοσοκομειακών σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων οφείλεται στον *S. aureus* που παρουσιάζει αντοχή στις αντισταφυλοκοκκικές πενικιλίνες. Η αντοχή στην μεθικιλίνη οφείλεται στην παρουσία μιας «νέας» πρόσθετης τρανσπεπτιδάσης (PBP 2' ή PBP 2A), ανθεκτικής στη δράση των αντισταφυλοκοκκικών πενικιλινών.

Επίσης, τα κλινικά στελέχη *Enterococcus faecalis* (VRE 880) και *Enterococcus faecium* (VRE 1291) εμφανίζουν τόσο κλινικό ενδιαφέρον όσο και ενδιαφέρον απο πλευράς δημόσιας υγείας καθώς είναι ανθεκτικά στα γλυκοπεπτιδία (π.χ. βανκομυκίνη). Επομένως, ο έλεγχος της αντιβακτηριακής δράσης έναντι των παραπάνω στελεχών έχει ιδιαίτερη σημασία.

Πραγματοποιήθηκαν αρκετές δοκιμές έως ότου βελτιστοποιηθεί η μέθοδος. Τα λιποειδή είναι διαλυτοποιημένα σε οργανικό διαλύτη μεθανόλη (Meth). Χρησιμοποιώντας ως αρνητικό μάρτυρα τη μεθανόλη διαπιστώσαμε ότι όγκος V > 5μl προκαλεί ζώνη αναστολής. Αρχικά έγινε προσπάθεια να τοποθετηθεί ποσότητα τόση ώστε η μεθανόλη να είναι έως 5μl για να μην υπάρχει ζώνη αναστολής εξ αιτίας του οργανικού διαλύτη. Επειδή η ποσότητα του λιπιδίου όμως ήταν αρκετά μικρή στην αντίστοιχη ποσότητα της μεθανόλης, έγινε δοκιμή του διαλυμένου λιπιδίου σε 10 μl και 20 μl μεθανόλης και συγκρίθηκε με τη ζώνη αναστολής ίσης ποσότητας μεθανόλης.

Παρακάτω παρατίθενται όλα τα αποτελέσματα για αμφότερα τα κυανοβακτηριακά στελέχη. Με κόκκινο και έντονη γραφή φαίνονται οι ζώνες (λιποειδή) που φανερώνουν αντιβακτηριακή δράση (ζώνη αναστολής).

3.6.1.1. ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ *Staphylococcus aureus* (NCTC 6571)

<i>Staphylococcus aureus</i> (NCTC) 6571)			
<i>Toxopsis calypsus</i>			
Όγκος	10μl		20μl
	Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)		Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)
Z1	11		16
Z2	14		18
Z3			
(-)	10		14
Z4	10,13		17
Z5	10/13		17
Z6	10/13		17
(-)	10		14
Z7	13		18
Z8	13		18
Z9	10/13		19
(-)	10		15
Z10	14		18/19
Z11	10		13
Z12	10		14
(-)	10		14
PL	9/15		15
NL	13		18/19
TL	8		11/16
(-)	11		14

<i>Staphylococcus aureus</i> (NCTC) 6571			
<i>Phormidium melanochroun</i>			
Όγκος	10μl		20μl
	Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)		Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)
Z1	8		17
Z2	8		17/18
Z3	11		18
(-)	10		12/13
Z4	8		16
Z5	8		17
Z6	8		17
(-)	8		13
Z7	αναστολή (Meth)		αναστολή (Meth)
Z8	10		15
Z9	9		13
(-)	9		13
Z10	9		13
PL	8		10
NL	9		14
(-)	9		15
TL	7		12
(-)	10		15

3.6.1.2. ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ *Staphylococcus aureus* (MRSA 1629)

<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA 1629)			
<i>Toxopsis calypsus</i>			
Όγκος	10μl		20μl
	Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)		Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)
Z1	14/16		17/18
Z2	11/13		12/18
Z3	13/14		17/18
(-)	9		11/13
Z4	12/13		15
Z5	8		15/16
Z6	6/7		15/16
(-)	9		12/13
Z7	12		18
Z8	13/14 (εσ 10)		18
Z9	13/14 (εσ 10)		16/19
(-)	9		12
Z10	14 (εσ 10)		16/18 (εσ 16)
Z11	7		10
Z12	9		13/14
(-)	9		12
PL	9		10
NL	10		12/13
TL	8		10
(-)	9		12
FOX (+)	19		
CIP(+)	25		

<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 1629			
<i>Phormidium melanochroun</i>			
Όγκος	10μl		20μl
	Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)		Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)
Z1	12/13 (εσ 10)		17
Z2	12 (εσ 9)		17/18
Z3	10/13		18
(-)	9		12/13
Z4	9		16
Z5	9		17
Z6	9		17
(-)	9		13
Z7	αναστολή (Meth)		αναστολή (Meth)
Z8	10		15
Z9	9		13
(-)	9		13
Z10	9		13
PL	8		10
NL	9		14
(-)	10		15
TL	8		12
(-)	9		15
FOX (+)	18		
CIP (+)	24		

3.6.1.3. ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ *Staphylococcus aureus* (MSSA 1646)

<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA 1646)			
<i>Toxopsis calypsus</i>			
Όγκος	10μl		20μl
	Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)		Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)
Z1	10/14		15/17
Z2	13		16/17
Z3	13		18
(-)	9		10/12
Z4	12		17
Z5	8		16
Z6	12		16
(-)	8		12
Z7	12/14		17/19
Z8	11/13		17
Z9	13		17
(-)	9		12
Z10	13		10
Z11	7		9
Z12	10		13/14
(-)	9		11
PL	8		11
NL	8		11/13
TL	9		11
(-)	9		12
FOX (+)	32		
CIP (+)	28		

<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA 1646)			
<i>Phormidium melanochroun</i>			
Όγκος	10μl		20μl
	Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)		Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)
Z1	11		17
Z2	12		15/16
Z3	12		15/18
(-)	9		12
Z4	9		12
Z5	9		13
Z6	9		12
(-)	9		12
Z7	αναστολή (Meth)		αναστολή (Meth)
Z8	10		14
Z9	9		12
(-)	9		12
Z10	9		11/12
PL	6/7		11
NL	10		11/12
(-)	9		12
TL	9		13
(-)	9		12
FOX (+)	32		
CIP (+)	28		

3.6.1.4. ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ *Escherichia coli* (ATCC 2592)

<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)			
<i>Toxopsis calypsus</i>			
Όγκος	10μl		20μl
	Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)		Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)
Z1	9		13
Z2	9		12/13
Z3	10		14
(-)	9		14
Z4	9		12/13
Z5	9		14
Z6	9		14
(-)	10		14
Z7	10		14
Z8	11		13/14
Z9	10		13/15
(-)	9		14
Z10	11		14/15
Z11	8		13
Z12	9		12
(-)	9		13
PL	10		11
NL	9		14
TL	9		12
(-)	9		13

<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)			
<i>Phormidium melanochroun</i>			
Όγκος	10μl		20μl
	Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)		Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)
Z1	9		13
Z2	10		13/14
Z3	9		14/15
(-)	9		12
Z4	9		11/12
Z5	9		14
Z6	9		13
(-)	9		11/13
Z7	αναστολή (Meth)		αναστολή (Meth)
Z8	9		12
Z9	9		12
(-)	9		12
Z10	10		14
PL	αναστολή (Meth)		11
NL	10		13
(-)	10		14
TL	9		11
(-)	10		12
GEN (+)	20		

3.6.1.5. ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)			
<i>Toxopsis calypsus</i>			
Όγκος	10μl		20μl
	Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)		Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)
Z1	9/10		13/14
Z2	10		13/14
Z3	10		13
(-)	10		13/14
Z4	9		13
Z5	8/9		13
Z6	9		13
(-)	9/10		13
Z7	9		14
Z8	9		12/13
Z9	10		13
(-)	10		12/14
Z10	9		13
Z11	9		13
Z12	10		13
(-)	9		13
PL	9		12/13
NL	9		13
TL	9/10		12/13
(-)	9/10		11/13

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)			
<i>Phormidium melanochroun</i>			
Όγκος	10μl		20μl
	Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)		Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)
Z1	9		11/13
Z2	9		11/13
Z3	9		11/13
(-)	9		11/13
Z4	9		10/11
Z5	9		10/11
Z6	9		10/11
(-)	9		10/11
Z7	αναστολή (Meth)		αναστολή (Meth)
Z8	8		10/12
Z9	8/9		10/12
(-)	10		10/12
Z10	9		12
PL	9		9
NL	10		14/12
(-)	9		11
TL	8		10
(-)	8		12

3.6.1.6. ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)

<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)		
<i>Toxopsis calypsus</i>		
Όγκος	10μl	20μl
	Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)	Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)
Z1	12	17
Z2	12	18
Z3	12	17/18
(-)	9	12
Z4	14	17
Z5	12	17
Z6	12	16/19
(-)	9	11
Z7	13	18
Z8	13	18
Z9	13	18/20
(-)	9	12
Z10	13	20
Z11	8	11
Z12	8/9	11/12
(-)	8/9	11/12
PL	11/12	17/16
NL	13	20
TL	7/11	10/16
(-)	9	12

CIP (+)	21		
SXT (+)	31		
AMP (+)	29		
TET (+)	11/12		

<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)			
<i>Phormidium melanochroun</i>			
Όγκος	10μl		20μl
	Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)		Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)
Z1	12		16/19
Z2	12		17/19
Z3	13/14		18/19
(-)	9		18/19
Z4	11		15/17
Z5	12		15/17
Z6	10		15
(-)	9		12/13
Z7	αναστολή (Meth)		αναστολή (Meth)
Z8	12		14
Z9	8		11/12
(-)	8		11/12
Z10	8		12
PL	8		9
NL	9		14/12
(-)	9		11
TL	8		10
CIP (+)	21		

3.6.1.7. ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ *Enterococcus faecalis* (VRE 880)

<i>Enterococcus faecalis</i> (VRE 880)		
<i>Toxopsis calypsus</i>		
Όγκος	10μl	20μl
	Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)	Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)
Z1	12/13	18/2
Z2	13	17/19
Z3	13	15/17
(-)	7	12
Z4	13/14	18
Z5	11	15/17
Z6	12	18
(-)	9	12
Z7	12	18
Z8	13	18
Z9	13	18
(-)	8/9	12
Z10	12	18
Z11	7	11
Z12	9	12/13
(-)	9	12
PL	12	16/17
NL	9	12
TL	9	12/13
(-)	9	12
CIP (+)	6	
AMP (+)	27	

<i>Enterococcus faecalis</i> (VRE 880)			
<i>Phormidium melanochroun</i>			
Όγκος	10μl		20μl
	Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)		Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)
Z1	12/13		15
Z2	12/13		17
Z3	9		15
(-)	9		11/12
Z4	11		12
Z5	9		12
Z6	9		12
(-)	9		12
Z7	αναστολή (Meth)		αναστολή (Meth)
Z8	12		14
Z9	9		11
(-)	9		12
Z10	10		13
PL	8		11
NL	8		12
(-)	9		12
TL	8		12
CIP (+)	6		
AMP (+)	27		

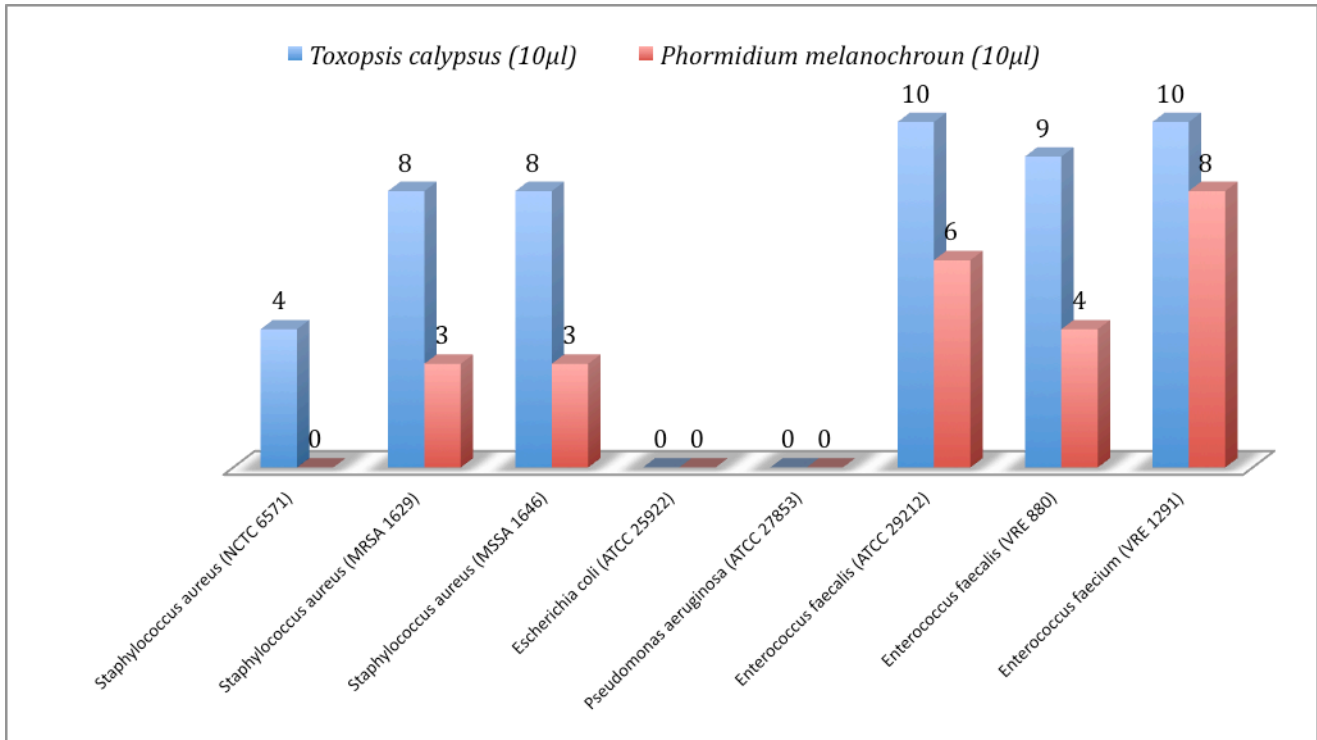
3.6.1.8. ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ *Enterococcus faecium* (VRE 1291)

<i>Enterococcus faecium</i> (VRE 1291)			
<i>Toxopsis calypsus</i>			
Όγκος	10μl		20μl
	Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)		Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)
Z1	14		19
Z2	12		19/20
Z3	14		19
(-)	9		12
Z4	12		19
Z5	14		19
Z6	13		19
(-)	9		11/12
Z7	14		20
Z8	14		19
Z9	13		18/19
(-)	9		12
Z10	13		18/19
Z11	9		18/19
Z12	9		12
(-)	9		12
PL	13		18/19
NL	13		18/19
TL	9		12
(-)	9		12

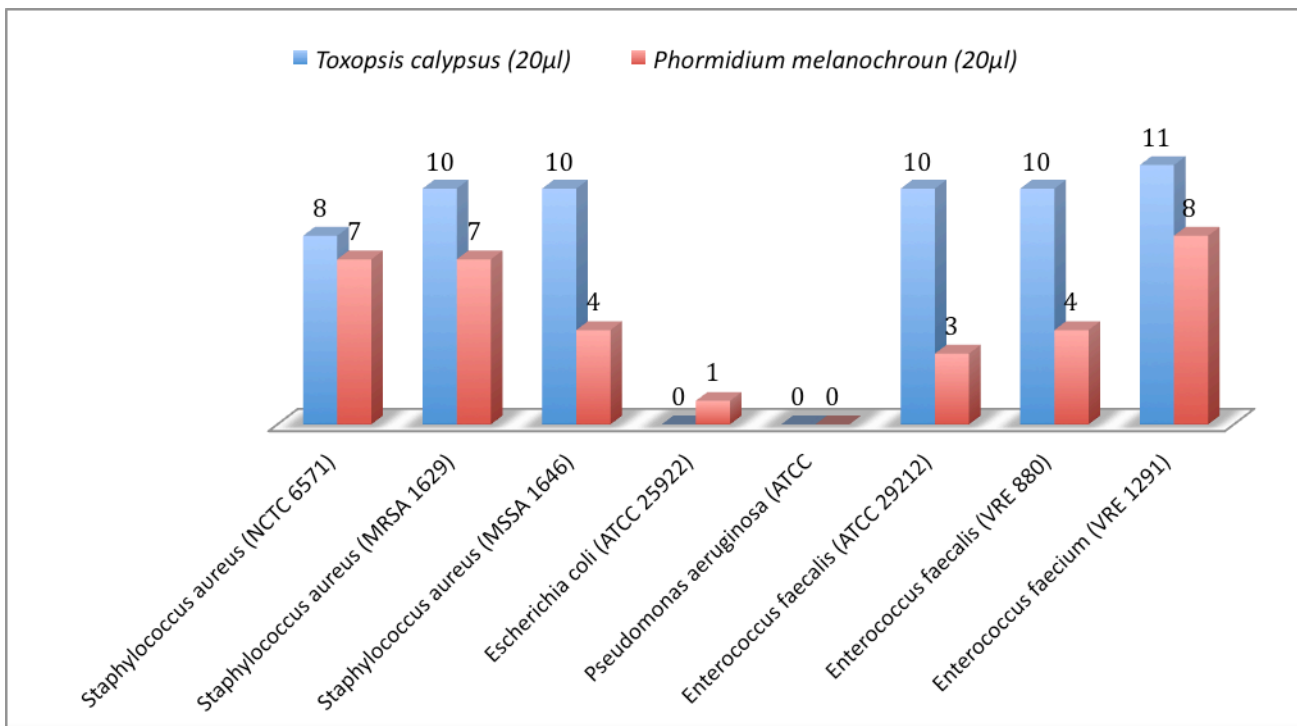
<i>Enterococcus faecium</i> (VRE 1291)		
<i>Phormidium melanochroun</i>		
Όγκος	10μl	20μl
	Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)	Διάμετρος ζώνης ανάσχεσης (mm)
Z1	14	18
Z2	13	21
Z3	13	19/20
(-)	9	12/13
Z4	13	17
Z5	13	18/19
Z6	13	18
(-)	9	13
Z7	αναστολή (Meth)	αναστολή (Meth)
Z8	14/15	18
Z9	12	17
(-)	9	12
Z10	9	13
PL	8	12
NL	12/13	14
(-)	9	14
TL	9	12
(-)	9	12
CIP (+)	6	
STR (+)	6	

Toxoplasma collypus 10µl		Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z12	PL	NL	TL	CP(+)	FOK(+)	AMP(+)	GEN(+)
<i>S.aureus</i> NCTC 6571	11	14	10,13	10,13	13	13,14(->)	13	13,14(->)	13	10,13	14	14	10	10	9,15	13	8	8	10	20
<i>S.aureus</i> MRSA 1629	14,16(->)	11,13	14,13	12,13(->)	13	13,14(->)	13	13,14(->)	13	10,13	14	14	10	10	9,15	13	8	8	10	20
<i>S.aureus</i> MSSA1646	10,14	13	13	12	8	12	12,14	11,13	13	13	13	13	7	10	8	9	9	25	19	
<i>E.faecalis</i> ATCC 29212	12	12	12	14	12	12	12,14	11,13	13	13	13	13	8	8,9	11,12	13	7,11	9	28	32
<i>E.faecalis</i> VRE 880	12,13	13	13	13,14	11	12	12	12	13	13	13	12	7	9	12	9	9	6	27	
<i>E.faecalis</i> VRE 1291	14	13	14	13	14	13	14	14	13	13	13	13	9	9	13	13	9	9	20	
<i>E.coli</i> ATCC 25922	9	10	9	9	9	9	9	10	11	10	11	11	8	9	10	9	9	9	20	
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	9,10	10(->)	10(->)	9	8,9	9	9	9	9	10(->)	9	9	9	10	9	9	9,1	9	20	
Toxoplasma collypus 20µl																				
<i>S.aureus</i> NCTC 6571	16	18	23	24	25	26	27	28	29	Z10	Z11	Z12	PL	NL	TL	CP(+) <th>FOK(+)</th> <th>AMP(+)</th> <th>GEN(+)</th>	FOK(+)	AMP(+)	GEN(+)	
<i>S.aureus</i> MRSA 1629	17,18	16,18	17,18	17	17	17	17	18	18	18,19	13	13	14	14	15	18,19	14	11,16	14	20
<i>S.aureus</i> MSSA1646	15,17	15,17	17	16	15,16	15,16	18	18	18	16,19	16,18	10	13,14	13	10	12,13	10	10	12	19
<i>E.faecalis</i> ATCC 29212	17	17	17	16	16	16	17,18	18	18	17	10	10	13,14	13	11,11,13(->)	12	11,12(->)	28	32	
<i>E.faecalis</i> VRE 880	18,20	17,19	15,17	18	15,17	18	18	18	18	18	18	11	12,13	16,17	16,17	12	10,11,13(->)	12	28	
<i>E.faecalis</i> VRE 1291	19	19,20	19	19	19	19	20	20	19	18,19	18,19	10	13	18,19	18,19	12	12,13	12	6	27
<i>E.coli</i> ATCC 25922	13	12,13	14	12,13	14	14	14	14	14	13,14	14,15	13	12	12	11	14	12	12	6	
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	13,14	13,14	13	13	13	13	13	14	12,13	13,15	14,15	13	12	13	12,13	13	12	12	14	20

Phormidium melanochroum 10µl		Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z12	PL	NL	TL	CP(+)	FOK(+)	AMP(+)	GEN(+)	
<i>S.aureus</i> NCTC 6571	8	8	11	24	25	26	27	27	28	29	Z10	Z11	Z12 <td>PL</td> <td>NL</td> <td>TL <td>CP(+) <th>FOK(+)</th> <th>AMP(+)</th> <th>GEN(+)</th> </td></td>	PL	NL	TL <td>CP(+) <th>FOK(+)</th> <th>AMP(+)</th> <th>GEN(+)</th> </td>	CP(+) <th>FOK(+)</th> <th>AMP(+)</th> <th>GEN(+)</th>	FOK(+)	AMP(+)	GEN(+)	
<i>S.aureus</i> MRSA 1629	12,13(-> 10)	12(-> 9)	10,13(-> 9)	11	8	8	8	8	8	10	9	9	9	9	8	9,10	7	9	24	18	20
<i>S.aureus</i> MSSA1646	11	12	12	12	9	9	9	9	9	10	9	9	9	9	8	9	9	9	28	32	
<i>E.faecalis</i> ATCC 29212	14,15	12	13,14	11	12	12	12	12	12	12	8	8	8	8	6,7	10	9	9	21	27	
<i>E.faecalis</i> VRE 880	14	14	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	8	8	9	9	6	27	
<i>E.faecalis</i> VRE 1291	9	19	9	9	9	9	9	9	9	14,15	9	9	9	9	8	12,13	9	9	6	20	
<i>E.coli</i> ATCC 25922	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	8	8	8	8,9	8,9	8,9	8,9	8,9	8	20	
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	9	9	9	9	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8,9	8,9	8,9	8,9	8,9	8	20	
Phormidium melanochroum 20µl																					
<i>S.aureus</i> NCTC 6571	17	17,18	18	24	25	26	27	27	28	29	Z10	Z11	Z12 <td>PL</td> <td>NL</td> <td>TL <td>CP(+) <th>FOK(+)</th> <th>AMP(+)</th> <th>GEN(+)</th> </td></td>	PL	NL	TL <td>CP(+) <th>FOK(+)</th> <th>AMP(+)</th> <th>GEN(+)</th> </td>	CP(+) <th>FOK(+)</th> <th>AMP(+)</th> <th>GEN(+)</th>	FOK(+)	AMP(+)	GEN(+)	
<i>S.aureus</i> MRSA 1629	14,15	16	17,18	12,13	12,14	12,14	13,14	13,14	13,14	12,13	12	12	11	12,13	11	12,13	10	12	24	18	20
<i>S.aureus</i> MSSA1646	17	15,16	15,18	12	12	13	12	12	14	12,13	12	12	11	11,12	11	11,12	13	12	28	32	
<i>E.faecalis</i> ATCC 29212	16,19	17,19	18,19	15,17	15,17	15,17	15	15	15	11,12	12	12	9	12,14	9	12,14	10	12,13	21	27	
<i>E.faecalis</i> VRE 880	18	21	19,20	17	18,19	18	18	18	18	14	11	12	11	12	11	12	12	12	6	27	
<i>E.faecalis</i> VRE 1291	13	13,14	14,15	11,12	11,12	14	13	13	13	17	17	12	12	12	12	14	14	12	6	20	
<i>E.coli</i> ATCC 25922	11,13	11,13	11,13	10,11	10,11	10,11	10,11	10,11	10,11	10,12	10,12	13	11	11,12	11,12	11,12	10,11,12	11,12	12	20	
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	11,13	11,13	11,13	10,11	10,11	10,11	10,11	10,11	10,12	10,12	10,12	13	11	11,12	11,12	11,12	10,11,12	11,12	12	20	



Διάγραμμα 8: Ο αριθμός των ζωνών (λιπίδια), για το *Toxopsis calypsis* και το *Phormidium melanochroun* (10µl).



Διάγραμμα 9: Ο αριθμός των ζωνών (λιπίδια), για το *Toxopsis calypsis* και το *Phormidium melanochroun* (20µl)

Συγκρίνοντας τα δύο κυανοβακτηριακά στελέχη μεταξύ τους ως προς την αντιβακτηριακή τους δράση προκύπτει ότι το *Toxopsis calypsus*, εν συγκρίσει προς το *Phormidium melanochroun*, έχει αριθμητικά περισσότερες ζώνες με αντιβακτηριακή δράση τόσο έναντι προτύπων όσο και έναντι κλινικών βακτηριακών στελεχών.

Επίσης, καλύτερη δράση των λιποειδών αμφοτέρων των κυανοβακτηριακών στελεχών εμφανίζεται έναντι των εντεροκόκκων. Δηλαδή μεταξύ των θετικών κατά Gram βακτηρίων οι εντερόκοκκοι (πρότυπα και κλινικά στελέχη) είναι λιγότερο ανθεκτικοί στην δράση των λιποειδών των κυανοβακτηρίων.

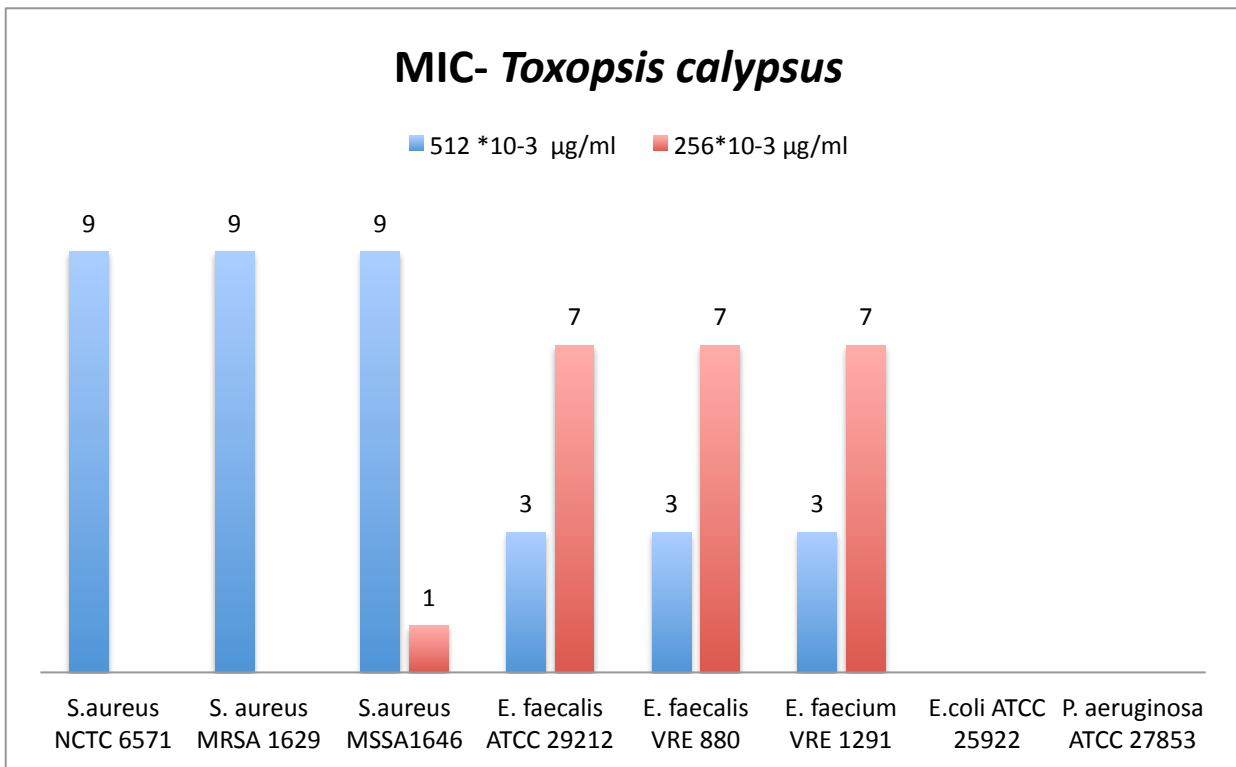
Τέλος, είναι φανερό ότι δεν υπάρχει αντιβακτηριακή δράση έναντι των αρνητικών κατά Gram βακτηριακών στελεχών *Escherichia coli* (ATCC 25922) και *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Αυτό οφείλεται στο κυτταρικό τοίχωμα των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων τα οποία φέρουν λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης (λεπτότερο από αυτό των θετικών κατά Gram) και εξωτερική μεμβράνη από λιποπολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες. Αυτή η εξωτερική μεμβράνη προστατεύει τα βακτήρια από διάφορα αντιβιοτικά με αποτέλεσμα να είναι πιο ανθεκτικά εν συγκρίσει προς τα θετικά κατά Gram.

Η στήλη 1 περιέχει 100μl θρεπτικού μέσου (αρνητικός μάρτυρας), ενώ η στήλη 12 περιέχει 50μl θρεπτικού μέσου και 50μl του εκάστοτε μικροβιακού εναιωρήματος (θετικός μάρτυρας). Οι στήλες 2-11 περιέχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις της προς εξέταση ουσίας.

Συγκρίνοντας την ανάπτυξη του μικροβιακού εναιωρήματος (θολερότητα) στις διαφορετικές συγκεντρώσεις της προς εξέταση ουσίας, με την πλήρη ανάπτυξη (στήλη 12) και τη μη ανάπτυξη (στήλη 1) προσδιορίζεται η μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που δεν επιτρέπει την ανάπτυξη του μικροβίου *in vitro*. Στην ανωτέρο απεικόνιση με κόκκινα βέλη αναδείχονται οι συγκεντρώσεις MIC για το εκάστοτε μικρόβιο των λιποειδών της ζώνης 1 για το κυανοβακτήριο *Toxopsis calypsus*.

	<i>S.aureus</i> NCTC 6571	<i>S. aureus</i> MRSA 1629	<i>S.aureus</i> MSSA1646	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. faecalis</i> VRE 880	<i>E. faecium</i> VRE 1291	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Z1	512 *10 ⁻³	512 *10 ⁻³	512 *10 ⁻³	256*10 ⁻³	256*10 ⁻³	256*10 ⁻³	-	-
Z2	512 *10 ⁻³	512 *10 ⁻³	512 *10 ⁻³	256*10 ⁻³	256*10 ⁻³	256*10 ⁻³	-	-
Z3	512 *10 ⁻³	512 *10 ⁻³	512 *10 ⁻³	256*10 ⁻³	256*10 ⁻³	256*10 ⁻³	-	-
Z4	512 *10 ⁻³	512 *10 ⁻³	512 *10 ⁻³	-	-	-	-	-
Z5	512 *10 ⁻³	512 *10 ⁻³	512 *10 ⁻³	-	-	-	-	-
Z6	-	-	512 *10 ⁻³	-	-	-	-	-
Z7	512 *10 ⁻³	512 *10 ⁻³	512 *10 ⁻³	256*10 ⁻³	256*10 ⁻³	256*10 ⁻³	-	-
Z8	512 *10 ⁻³	512 *10 ⁻³	512 *10 ⁻³	256*10 ⁻³	256*10 ⁻³	256*10 ⁻³	-	-
Z9	512 *10 ⁻³	512 *10 ⁻³	512 *10 ⁻³	256*10 ⁻³	256*10 ⁻³	256*10 ⁻³	-	-
Z10	512 *10 ⁻³	512 *10 ⁻³	256*10 ⁻³	256*10 ⁻³	256*10 ⁻³	256*10 ⁻³	-	-
Z11	-	-	-	-	-	-	-	-
Z12	-	-	-	-	-	-	-	-
PL	-	-	-	512 *10 ⁻³	512 *10 ⁻³	512 *10 ⁻³	-	-
NL	-	-	-	-	-	-	-	-
TL	-	-	-	512 *10 ⁻³	512 *10 ⁻³	512 *10 ⁻³	-	-

Πίνακας 3.1: *Toxopsis calypsus* – Αναφαίνεται η μικρότερη συγκέντρωση (μg/ml) της εκάστοτε ουσίας (Z1-Z12) καθώς και των πολικών (PL), των ουδετέρων (NL) και των ολικών (TL) λιποειδών που δεν επιτρέπει την ανάπτυξη των συγκεκριμένων βακτηρίων.



Διάγραμμα 10: Το σύνολο των λιποειδών (ζωνών) για το *Toxopsis calypsus*, που αναστέλλουν την ανάπτυξη των συγκεκριμένων βακτηρίων σε συγκεκριμένη συγκέντρωση

Τα αποτελέσματα της MIC είναι ενδεικτικά επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της Kirby Bauer για το *Toxopsis calypsus*. Καλύτερη δράση εμφανίζεται έναντι των εντεροκόκκων, ενώ δεν αναστέλλεται η ανάπτυξη των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. ΧΛΩΡΙΔΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα σπήλαια της Ελλάδας στα οποία έχει μελετηθεί η φωτοσυνθετική μικροχλωρίδα και συγκεκριμένα τα κυανοβακτήρια είναι ελάχιστα: Σπήλαιο «Πέραμα» Ιωαννίνων, «Λεοντάρι» Αττικής, «Νυμφόλυπτος» Αττικής (Anagnostidis et al. 1982, Ilioroulou-Georgoudaki et al. 1993, Pantazidou 1996, Pantazidou 1997, Pantazidou & Roussomoustakaki 2005, Lamprinou et al. 2009, Pantazidou et al. 2012).

Στην παρούσα μελέτη, ερευνήθηκαν τρία σπήλαια που ανήκουν στην Πελοπόννησο («Καστριά», «Φράγγθι», «Σεληνίτσα»). Υλικό συλλέχθηκε από 7 δειγματοληπτικές θέσεις εποχικώς σε έναν ετήσιο κύκλο για κάθε σπήλαιο, ενώ προσδιορίστηκαν και μελετήθηκαν λεπτομερώς από φυσικό και καλλιεργημένο υλικό 156 ταξινομικές μονάδες κυανοβακτηρίων. Επίσης καταγράφηκαν οι αβιοτικές παράμετροι (PAR, T, RH) σε κάθε δειγματοληψία για κάθε δειγματοληπτική θέση.

Από το σύνολο των προσδιορισθεισών ταξινομικών μονάδων δύο (2) (*Irphinoe spelaeobios*, *Toxopsis calypsus*) συνιστούν νέα γένη και είδη για την επιστήμη και μία (1) (*Phormidium melanochroun*) νέο είδος για την επιστήμη (Lamprinou et al. 2011, 2012, 2013 in press). Συνολικά προσδιορίστηκαν 156 ταξινομικές μονάδες, εκ των οποίων οι 49 αναφέρονται για πρώτη φορά στον Ελλαδικό χώρο εμπλουτίζοντας τη γνώση για τα κυανοβακτήρια από αδιατάρακτα σπήλαια καθώς και την βιοποικιλότητα της Ελλάδας, ενώ 8 αναφέρονται για δεύτερη φορά παγκοσμίως (*Asterocapsa jilunica*, *Asterocapsa sinica*, *Chroococcus subsphaericus*, *Hydrocoleum stankovicij*, *Leptolyngbya undosa*, *Plectonema araucanum*, *Phormidium macedonicum*, *Pseudophormidium spelaeoides*).

Στο σπήλαιο «Καστριά» (76 ταξινομικές μονάδες), επικρατούν οι αντιπρόσωποι που ανήκουν στην τάξη Chroococcales κατά 40% (τόσο με το παραδοσιακό, όσο και με το σύγχρονο σύστημα ταξινόμησης). Από την κατανομή των taxa σε οικογένειες φαίνεται η επικράτηση των κοκκοειδών αποικιακών κυανοβακτηρίων που ανήκουν στην οικογένεια Chroococcaceae και ακολουθούν τα απλά νηματοειδή που ανήκουν στην οικογένεια Phormidiaceae (Απεικόνιση 3.3).

Στο τυπικό αυτό σπήλαιο είναι φανερόν ότι ο λόγος Chroococcales/Oscillatoriales μειώνεται καθώς μειώνεται η ενεργώς φωτοσυνθετική ακτινοβολία, και στις εσωτερικές θέσεις με ελάχιστο φως επικρατούν απλά νηματοειδή είδη (Απεικόνιση 3.4).

Στο σπήλαιο «Φράγγθι» (66 ταξινομικές μονάδες) επικρατεί η τάξη Chroococcales κατά 29% με το σύγχρονο ταξινομικό σύστημα, ενώ με το παραδοσιακό επικρατούν κατά 46% τα απλά νηματοειδή κυανοβακτήρια που ανήκουν στην τάξη Oscillatoriales (Απεικονίσεις 3.6, 3.7). Η οικογένεια Pseudanabaenaceae έχει τους περισσότερους αντιπροσώπους και ακολουθεί η οικογένεια Phormidiaceae (Απεικόνιση 3.8).

Στο συγκεκριμένο σπήλαιο η πτώση μέρους της οροφής άλλαξε την αρχική τυπική διαμόρφωση του σπηλαίου οπότε και χαρακτηρίζεται πλέον ως μη τυπικό. Ως εκ τούτου ο λόγος Chroococcales/Oscillatoriales δεν ακολουθεί κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο (Απεικόνιση 3.9).

Στο σπήλαιο «Σεληνίτσα» (71 ταξινομικές μονάδες) με το σύγχρονο σύστημα ταξινόμησης οι τάξεις Chroococcales και Oscillatoriales εμφανίζονται με το ίδιο ποσοστό (30%), ενώ με το παραδοσιακό σύστημα ταξινόμησης επικρατεί η τάξη Oscillatoriales κατά 48% (Απεικονίσεις 3.11, 3.12). Η οικογένεια με τους περισσότερους αντιπροσώπους είναι η Phormidiaceae (Απεικόνιση 3.13).

Στο τυπικό αυτό σπήλαιο, όπως και στα «Καστριά», στις θέσεις με χαμηλότερη φωτοσυνθετικώς ενεργή ακτινοβολία επικρατούν τα απλά νηματοειδή κυανοβακτήρια.

4.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΙΟΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ ΣΤΑ ΜΕΛΕΤΗΘΕΝΤΑ ΣΠΗΛΑΙΑ

Για την ανάλυση των βιοκοινοτήτων σε κάθε σπήλαιο χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα τόσο φυσικού όσο και καλλιεργημένου υλικού από 7 δειγματοληπτικές θέσεις για κάθε δειγματοληπτική περίοδο.

Στο τυπικό σπήλαιο «Καστριά» καθώς και στο σπήλαιο «Σεληνίτσα» οι 7 δειγματοληπτικές θέσεις με βάση την nMDS ανάλυση φαίνεται ότι περιλαμβάνονται στις χαρακτηριστικές τρεις ζώνες: α) της εισόδου, β) της ενδιάμεσης ζώνης και γ) της εσωτερικής ζώνης.

Συγκεκριμένα στο σπήλαιο «Καστριά» η κοινότητα της εισόδου είναι η πλουσιότερη με 51 ταξινομικές μονάδες, και ακολουθούν η ενδιάμεση και η εσωτερική ζώνη με 33 και 18 ταξινομικές μονάδες αντιστοίχως (Διάγραμμα 1). Η μεγαλύτερη ομοιογένεια στη σύνθεση των κυανοβακτηριακών ειδών παρατηρείται στις εσωτερικές θέσεις 6 και 7 με ομοιότητα (44,64% και 39,05% αντιστοίχως). Αυτό φανερώνει ότι τα είδη που υπάρχουν σε αυτές τις θέσεις, αν και ολιγάριθμα, είναι αρκετά προσαρμοσμένα σε συνθήκες ελαχίστου φωτός.

Στο σπήλαιο «Σεληνίτσα» το οποίο γειτνιάζει με τη θάλασσα, η μεγαλύτερη τιμή της αφθονίας των ειδών παρατηρήθηκε στη ζώνη εισόδου με 48 ταξινομικές μονάδες, και ακολουθούν η ενδιάμεση ζώνη και η εσωτερική με 11 και 35 ταξινομικές μονάδες αντιστοίχως (Διάγραμμα 3).

Διαφορετικό πρότυπο παρατηρείται στο μη τυπικό σπήλαιο «Φράγγχι» όπου, όπως φαίνεται και από την nMDS ανάλυση, οι δειγματοληπτικές θέσεις ομαδοποιούνται σε 2 μεγάλα σύνολα (Διάγραμμα 2): το πρώτο (α) περιλαμβάνει τις δειγματοληπτικές θέσεις 1-5 παρουσιάζοντας εποχική υποομαδοποίηση, ενώ το δεύτερο (β) περιλαμβάνει δείγματα από σταλαγμίτη (θέση 6) και δείγματα από σταλακτίτη (θέση 7). Ο πλούτος των ειδών ανέρχεται

στις 53 ταξινομικές μονάδες για το πρώτο σύνολο, ενώ το δεύτερο περιλαμβάνει 32 ταξινομικές μονάδες.

Από τη σύγκριση των τριών σπηλαίων, όπως αποτυπώνεται και στην nMDS ανάλυση των συνολικών εποχιακών δειγμάτων ανά δειγματοληπτική θέση (Διάγραμμα 4), προκύπτει ότι τα τρία σπήλαια διαφέρουν μεταξύ τους.

Το γεγονός αυτό αποτυπώνεται και στην ανάλυση ομοιοτήτων (Simpser analysis) των συναθροιστικών εποχικών δειγμάτων μεταξύ των σπηλαίων (ανά ζεύγη), όπου προκύπτει ότι το ποσοστό ανομοιογένειας είναι αρκετά υψηλό. Τα σπήλαια «Καστριά» και «Φράγχθι» εμφανίζουν ποσοστό ανομοιογένειας 86,25%. Το ποσοστό αυτό για το «Φράγχθι» με τη «Σεληνίτσα» είναι 86,35%, ενώ τα σπήλαια «Καστριά» και «Σεληνίτσα» εμφανίζουν το μεγαλύτερο ποσοστό ανομοιογένειας που ανέρχεται στο 88.98%. Τα σπήλαια «Φράγχθι» και «Σεληνίτσα» γειτνιάζουν με τη θάλασσα. Μάλιστα οι εξωτερικές θέσεις του σπηλαίου «Σεληνίτσα» επηρεάζονται από τη ζώνη ψεκασμού, και αυτός πιθανώς είναι ο λόγος της ελάχιστα μικρότερης ανομοιογένειας σε σύγκριση με το ζεύγος «Καστριά – Σεληνίτσα».

Η ανωτέρω διάκριση δεν πρέπει να αποδοθεί μόνο στις περιβαλλοντικές παραμέτρους (PAR, T, RH). Η μορφολογία του σπηλαίου, η διαθεσιμότητα του νερού, ο τύπος και η συνεκτικότητα του υποστρώματος, καθώς και η απόσταση από τη θάλασσα πιθανώς αποτελούν σημαντικές μεταβλητές διαμόρφωσης των βιοκοινοτήτων.

4.3. ΣΧΟΛΙΑ ΕΠΙ ΤΗΣ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΤΩΝ ΣΠΗΛΑΙΩΝ

Τα σπήλαια συνήθως επικοινωνούν με το εξωτερικό περιβάλλον. Επομένως τα βιοϋμένια που σχηματίζονται στις εισόδους, είναι προσαρμοσμένα να ανθίστανται σε διαφόρων τύπων καταπονήσεις όπως η υπερβολική άμεση ακτινοβολία, η ξηρασία και οι ακραίες θερμοκρασίες. Στο εσωτερικό, η τυπολογία – μορφολογία του σπηλαίου, καθώς και τα χαρακτηριστικά των ιδιαίτερων αυτών περιβαλλόντων «διαμορφώνουν» τις κυανοβακτηριακές και μικροβιακές βιοκοινότητες σύμφωνα με τη διαθεσιμότητα του φωτός και τη σχετική υγρασία.

Τα σπήλαια όπως προαναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 1 είναι ολιγοτροφικά περιβάλλοντα όπου η πρωτογενής παραγωγή εξαρτάται από αυτότροφες κοινωνίες (χημειοαυτότροφες και φωτοαυτότροφες). Χαρακτηρίζονται από υψηλή σχετική υγρασία, σταθερή θερμοκρασία και ενεργώς φωτοσυνθετική ακτινοβολία στην είσοδο και πλησίον αυτής καθώς και όπου υπάρχουν ανοίγματα (Pentecost & Whitton 2000, Hoffmann 2002, Albertano 2012). Η μεταφορά των ζώντων κυττάρων γίνεται είτε με αέριες μάζες, είτε από ροή νερού, είτε μέσω των ζώων και του ανθρώπου.

Η παρατηρούμενη «σκεδαστική κατανομή» διασπορά των βιοϋμενίων εξαρτάται από τις τοπικές ανομοιογένειες του πετρώματος, όπως διαφορές στο πορώδες του υποστρώματος και άλλες διαφορές του μικροπεριβάλλοντος όπως η σχετική υγρασία. Η απόσταση από την είσοδο στην οποία εκτείνονται τα βιοϋμένια εξαρτάται από τη διαβάθμιση του φωτός και από το ποσό συγκεκριμένων μηκών κύματος που είναι διαθέσιμα για την πρωτογενή παραγωγή (Albertano & Bruno 2003, Albertano 2012).

Αν και η χλωριδική σύνθεση δεν έχει συσχετισθεί επακριβώς με τη μειούμενη φωτοσυνθετική ακτινοβολία, παρατηρείται ότι η φωτοτροφική ποικιλότητα μειώνεται σε συνθήκες ελάττωσης της φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας, με τα βιοϋμένια στα χαμηλότερα επίπεδα φωτός να συνίστανται από νηματοειδείς οργανισμούς με επικράτηση αντιπροσώπων του γένους *Leptolyngbya* (Hernández-Mariné et al. 2003). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε και στα σπήλαια «Σεληνίτσα» και «Καστριά».

4.4. Η ΕΝΑΣΒΕΣΤΩΣΗ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΑ ΥΠΟΓΕΙΑ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

Εναποθέσεις ανθρακικού ασβεστίου στα νήματα των κυανοβακτηρίων έχει πολύ συχνά παρατηρηθεί σε υπόγεια οικοσυστήματα. Το πιο γνωστό παράδειγμα αποτελεί το είδος *Scytonema julianum*, ικανό να σταθεροποιεί ιόντα σβεστίου από τα ορυκτά υποστρώματα (Couté & Bury 1988). Άλλα παρόμοια μελετηθέντα είδη είναι τα: *Geitleria calcarea*, *Herpyzonema pulverulentum*, *Loriella* sp., και ορισμένα είδη των γενών *Leptolyngbya* και *Fisherella* (Hernández-Mariné & Canals 1994, Ariño et al. 1997, Hernández-Mariné et al. 1993, Albertano 1997). Το είδος *Scytonema julianum* δύναται να δημιουργεί μεγάλες φαιο-πράσινες αναπτύξεις επί των ασβεστολιθικών υποστρωμάτων. Έχουν ανευρεθεί στη θήκη του γλυκουρονικά και γαλακτουρονικά οξέα καθώς και θεικοί πολυσακχαρίτες, με τη χρήση κυτοχημείας και χρωματογραφίας (Albertano & Belezza 2001, Albertano 2012).

Οι κρύσταλλοι στην επιφάνεια της θήκης πιθανώς υπάρχουν λόγω της επαναλαμβανόμενης διαδικασίας ενασβέστωσης/απασβέστωσης που εξαρτάται από το pH, το CO₂, και τη συγκέντρωση ασβεστίου (Riding 2009).

Παρόμοιου τύπου ενασβέστωσης παρατηρήθηκε σε αρκετά από τα είδη των ερευνηθέντων σπηλαίων στην παρούσα διατριβή όπως στο νέο για την επιστήμη γένος και είδος *Iphinoe spelaebios*, το οποίο εμφανίζεται συνήθως μαζί με το είδος *Scytonema julianum*.

Η ενασβέστωση που παρατηρείται στο *Leptolyngbya nana* (είδος που διαπιστώθηκε και στα ελληνικά σπήλαια της παρούσας μελέτης) και στο είδος *Geitleria calcarea* πιθανώς ρυθμίζεται ενδογενώς (Pentecost & Whitton 2000).

4.5. Η ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΑ ΣΠΗΛΑΙΑ

Η ποικιλότητα των κυανοβακτηρίων είναι εξαιρετικά ενδιαφέρουσα και πλούσια εξ αιτίας της μεγάλης διασποράς τους σε ποικίλα ενδιαίτηματα καθώς και της εξέχουσας εξελικτικής ιστορίας, με πολλές εφαρμογές (Whitton & Potts 2000). Η ταξινόμηση και ο προσδιορισμός των κυανοβακτηρίων βασίζεται κυρίως σε μορφολογικούς χαρακτήρες τόσο στο βοτανικό (Geitler 1932, Desikachary 1959, Starmach 1966, Anagnostidis & Komárek 1985, 1988, 1990 και Komárek & Anagnostidis 1986, 1989) όσο και στο βακτηριολογικό σύστημα (Rippka et al. 1979, Castenholz 2001). Η πολυφασική προσέγγιση με χρήση μορφολογικών, κυττολογικών, μοριακών και φυσιολογικών δεδομένων αναγνωρίζεται ως η πλέον καθοριστική για την ορθή ταξινόμηση των κυανοβακτηρίων, τα οποία έχουν πληθώρα μορφών και πλούσια εξελικτική ιστορία.

Επί του παρόντος περίπου 3400 είδη (Βάση Δεδομένων AlgaeBase) είναι ταξινομικώς προσδιορισμένα κυρίως με μορφολογικά χαρακτηριστικά. Από αυτά περίπου 300 (9%) έχουν αναφερθεί-καταγραφεί μία ή περισσότερες φορές στα οικοσυστήματα των σπηλαίων όπως φαίνεται από τη διαθέσιμη βιβλιογραφία.

Από την παρούσα έρευνα προκύπτει ένα σύνολο 49 ταξινομικών μονάδων, οι οποίες αναφέρονται για πρώτη φορά από το ενδιαίτημα των σπηλαίων. Οι νέες αυτές αναφορές συνιστούν ένα αξιόλογο ποσοστό της τάξης του 16% επί του συνόλου της κυανοβακτηριακής χλωρίδας των σπηλαίων, συμβάλλοντας στην αύξηση της βιοποικιλότητας του συγκεκριμένου οικοσυστήματος.

Όπως έχει προαναφερθεί και στο Κεφάλαιο 1 τα σπήλαια συνιστούν ιδιαίτερο περιβάλλον με τη φωτοσυνθετικώς ενεργή ακτινοβολία (PAR) να αποτελεί τον περιοριστικό παράγοντα αύξησης των οργανισμών. Τα οικοσυστήματα αυτά αποτελούν καταφύγια των οργανισμών ενώ οι ιδιαίτερες συνθήκες τους ευνοούν την ειδογένεση (Lamprinou et al. 2009, Zammit et al. 2011).

Νέα για την επιστήμη γένη και είδη που έχουν προσδιοριθεί από τα σπήλαια και δεν αμφισβητούνται από ταξινόμική άποψη είναι τα κάτωθι:

Από την τάξη Chroococcales (6 είδη): *Asterocapsa gloeotheciformis* Chu 1952, *A. hyalina* Chu 1952, *A. trochiscioides* Jao (Chu 1952), *Chroococciopsis kashaii* Friedmann 1961, *Asterocapsa longipapilla* Liu 1985, *Gloeotheca filiformis* Sant'Anna et al. 1991.

Από την τάξη Nostocales με αληθή διακλάδωση (πρώην Stigonematales) (6 είδη): *Spelaopogon somierii* Borzi 1917, *Geitleria calcarea* Friedmann 1955, *Geitleria floridana* Friedmann 1979, *Herpyzonema pulverulentum*, Hernández-Mariné & Canals 1994,

Symphyonema cavernicolum Asencio et al. 1996, *Loriellopsis cavernicolum* Hernández-Mariné & Canals 2011.

Εκτός των ανωτέρω, αναφέρεται και αριθμός νέων ειδών σε εργασίες από σπήλαια των Claus 1962, Dobat 1977, Borzi 1917, τα οποία όμως αμφισβητούνται από ταξινομική άποψη εξ αιτίας ανεπαρκών δεδομένων.

Στην παρούσα έρευνα εδραιώθηκε 1 νέο είδος που ανήκει στην τάξη Oscillatoriales (*Phormidium melanochrouron*) και 2 νέα γένη και είδη που ανήκουν στην τάξη Nosotocales (1 με αληθή διακλάδωση, *Iphinoe spelaeobios* και 1 που στερείται διακλάδωσης, *Toxopsis calypsus*).

4.6. ΣΧΟΛΙΑ ΕΠΙ ΤΗΣ ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗΣ ΤΩΝ ΑΝΕΥΡΕΘΕΝΤΩΝ ΝΕΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

4.6.1. Το γένος *Iphinoe* gen. nov. και το είδος *Iphinoe spelaeobios* sp. nov.

- Ερμπάριο Πανεπιστημίου Αθηνών: ATHU-CY3313
- Ερμπάριο Φιλαδέλφειας (PH) ΗΠΑ, Academy of Natural Sciences: PH1088600
- GenBank: (HM 748317)

4.6.1.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΑΣΕΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ

Το στέλεχος ATHU-CY3313, PH1088600, όπως απομονώθηκε από φυσικό υλικό του σπηλαίου «Καστριά», αναγνωρίστηκε με βάση τα μορφολογικά γνωρίσματα ότι ανήκει στην τάξη Stigonematales (κλασική προσέγγιση) ή στην τάξη Nostocales με αληθή διακλάδωση (σύγχρονη προσέγγιση).

Ταυτόσημη ταξινομική μονάδα απομονώθηκε και από φυσικό υλικό του σπηλαίου «Κουτούκι» στην Παιανία Αττικής (συμπληρωματικό υλικό). Αμφότερες οι ταξινομικές μονάδες έχουν θαλλό ενασβεστωμένο, ο οποίος έρπει στο υπόστρωμα και δημιουργεί λευκές ασημίζουσες αναπτύξεις μαζί με το είδος *Scytonema julianum*.

Το στέλεχος ATHU-CY3313, PH1088600 φαίνεται με βάση τα μορφολογικά γνωρίσματα ότι ομοιάζει με το μονοτυπικό γένος *Loriella*, Borzi 1892. Το τυπικό είδος *L. osteophila* ανευρέθη σε υλικό από ανθρώπινο σκελετό (Parua, New Guinea, Borzi 1892). Το είδος *L. osteophila* αναγνωρίστηκε από τον Hoffmann (1990), σε ασβεστολιθικό υλικό και κυρίως σε χαμηλού φωτισμού ενδιαιτήματα (απολιθώματα κοραλλιογενών υπολειμμάτων και είσοδο ασβεστολιθικού σπηλαίου), και θεωρήθηκε ως ενδημικό της Μελανησίας. Ως κοινά γνωρίσματα των ταξινομικών μονάδων που απομονώθηκαν από τα ελληνικά σπήλαια και

εκείνων που έχουν περιγραφεί ως *L. osteophila* θεωρούνται ότι είναι ο ενασβεστωμένος θαλλός, η αληθής διακλάδωση και ο χρωματισμός του κυτοπλάσματος.

Εν τούτοις, μετά από ενδελεχή παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης και διέλευσης φαίνεται ότι υπάρχουν αρκετά χαρακτηριστικά που διαφοροποιούν αυτά τα δύο γένη.

Η παρουσία αν και σπανίως της V-τύπου διακλάδωσης, η απουσία ακραίας διχοτομικής διακλάδωσης, η αναπαραγωγή με ορμοκύστεις και ακινήτες και η απουσία βοθριακών συνδέσεων είναι γνωρίσματα που διαχωρίζουν τη συγκεκριμένη ταξινομική μονάδα από το γένος *Loriella* και επιτρέπουν την καθιέρωση νέου γένους και είδους για την επιστήμη (Lamprinou et al. 2011).

4.6.1.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΑΣΕΙ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Η αλληλουχία του ριβοσωμικού DNA (16S rRNA) χρησιμοποιήθηκε έναντι άλλων γονιδίων λόγω των πολυάριθμων αντίστοιχων αλληλουχιών που είναι καταχωρημένες στο GenBank, και ως εκ τούτου των διαθέσιμων αλληλουχιών για σύγκριση.

Η γενετική προσέγγιση βοήθησε να λυθούν τα ταξινομικά προβλήματα που προέκυπταν με τα μορφολογικά γνωρίσματα. Τα μοριακά δεδομένα (σύνολο 16S rRNA) έδειξαν ως τον πιο κοντινό συγκρίσιμο συγγενή το *Symphyonemopsis* (Varor-1).

Τα χαρακτηριστικά όμως γνωρίσματα του γένους *Symphyonemopsis* (Υ-τύπος διακλάδωσης και πολύσειρα νήματα) διαφέρουν κατά πολύ από τα στελέχη των δύο ελληνικών σπηλαίων. Εξάλλου έχει αναφερθεί βιβλιογραφικώς ότι το στέλεχος *Symphyonemopsis* (Varor-1) είναι «προβληματικό» και μη τυπικό είδος του γένους *Symphyonemopsis* (Korelusová 2008).

4.6.1.3. Ο ΜΟΡΦΟΤΥΠΟΣ *Iphinoe cf. spelaebios*

- Ερμπάριο Πανεπιστημίου Αθηνών: ATHU-CY3318
- Ερμπάριο Φιλαδέλφειας (PH) ΗΠΑ, Academy of Natural Sciences: PH1095566
- GenBank: (JQ435484)

Συμπληρωματικό υλικό συλλέχθηκε από το σπήλαιο «Δικταίο Άνδρο» (Λασιθί, Κρήτης). Το στέλεχος αυτό διέφερε από το στέλεχος *Iphinoe spelaebios* (HM748317), ως προς τη διακλάδωση (Υ-τύπος, απουσία V-τύπου) και ως προς τα μικρότερων διαστάσεων κύτταρα. Παρά τη διαφοροποίηση που εμφανίζεται στα μορφολογικά χαρακτηριστικά, η γενετική προσέγγιση ανέδειξε ταυτόσημη ριβοσωμική αλληλουχία. Σύμφωνα με την κλασική προσέγγιση ο τύπος της διακλάδωσης αποτελεί ένα ταξινομικό γνώρισμα αρκετά ισχυρό τόσο

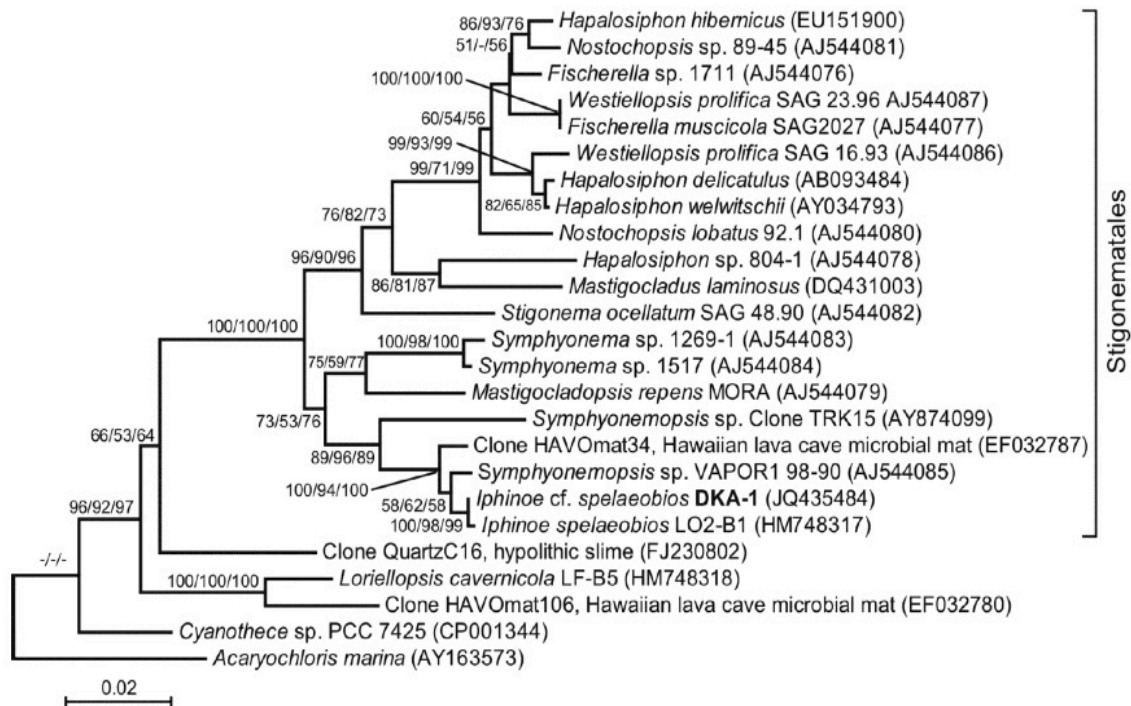
ώστε να διαχωρίζει τις ταξινομικές μονάδες ακόμα και σε επίπεδο οικογένειας (Anagnostidis & Komárek 1990).

Σύμφωνα με τη μοριακή προσέγγιση, ο τύπος της διακλάδωσης χαρακτηρίζει υπο-ομάδες στο φυλογενετικό δένδρο των ετεροκυστωδών με αληθή διακλάδωση κυανοβακτηρίων. Μάλιστα οι Gugger & Hoffmann (2004) πρότειναν την ίδια οντογένεια της Υ -τύπου διακλάδωσης με την ψευδή διακλάδωση. Αντιθέτως, η V-τύπου διακλάδωση θεωρείται εγγύτερη οντογενετικά με την T- τύπου διακλάδωση (Korelusová 2008). Εγείρεται επομένως το ερώτημα πώς ένα ισχυρό μορφολογικό γνώρισμα (τύπος διακλάδωσης) δεν αντικατοπτρίζεται στη συγκεκριμένη περίπτωση στα μοριακά δεδομένα.

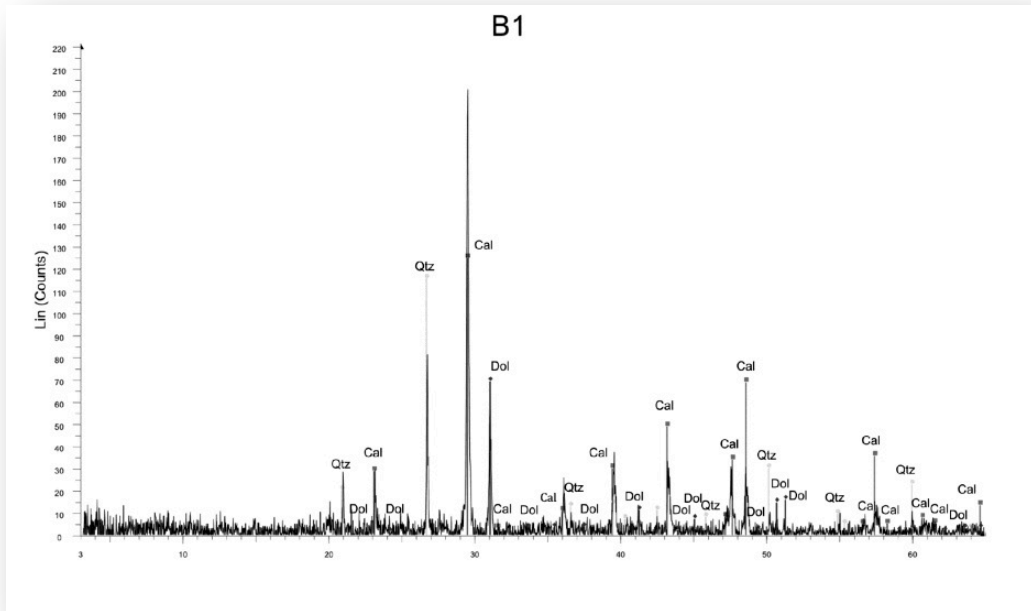
Αμφότερα τα στελέχη απομονώθηκαν από παρόμοια ενδιαίτηματα των γεωγραφικών απομονωμένων σπηλαίων «Καστριά» (Νομός Αχαΐας, Πελοπόννησος) και «Δικταίο Άντρο» (Νομός Λασιθίου, Κρήτη). Επισημαίνεται ότι η XRD ανάλυση των πετρωμάτων από τις δειγματοληπτικές θέσεις των δύο μορφοτύπων («Καστριά» και «Δικταίο Άντρο») ανέδειξε διαφορές στο υπόστρωμα που πιθανόν να αποτελεί τη «δύναμη» ειδογένεσης και να σχετίζεται με τις μορφολογικές διαφορές καθορίζοντας διαφορετικούς οικοτύπους.

Είναι γνωστόν ότι ως οικοτύποι θεωρούνται τα είδη που καταλαμβάνουν μοναδικά ενδιαίτηματα και αντιπροσωπεύουν διαφορετικές εξελικτικές γραμμές (Ward et al. 2006). Οι οικοτύποι που προσαρμόζονται σε μοναδικές χωρικές και χρονικές περιβαλλοντικές αλλαγές μπορεί να παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση γονιδίων, όπως για παράδειγμα το γονίδιο που καθορίζει τον τύπο της διακλάδωσης. Ωστόσο, αυτή η διαφοροποίηση είναι δύσκολο να αποτυπωθεί σε γονίδια τα οποία είναι πολύ συντηρητικά και εξελίσσονται αργά όπως η αλληλουχία του ριβοσωμικού DNA.

Όπως προκύπτει από τα ανωτέρω, απαιτείται χρήση και άλλων γονιδίων και μοριακών τεχνικών για να διαπιστωθεί κατά πόσο τα διαφορετικά μορφολογικά γνωρίσματα οφείλονται σε διαφορετικό γονότυπο (Lampriinou et al. 2013).

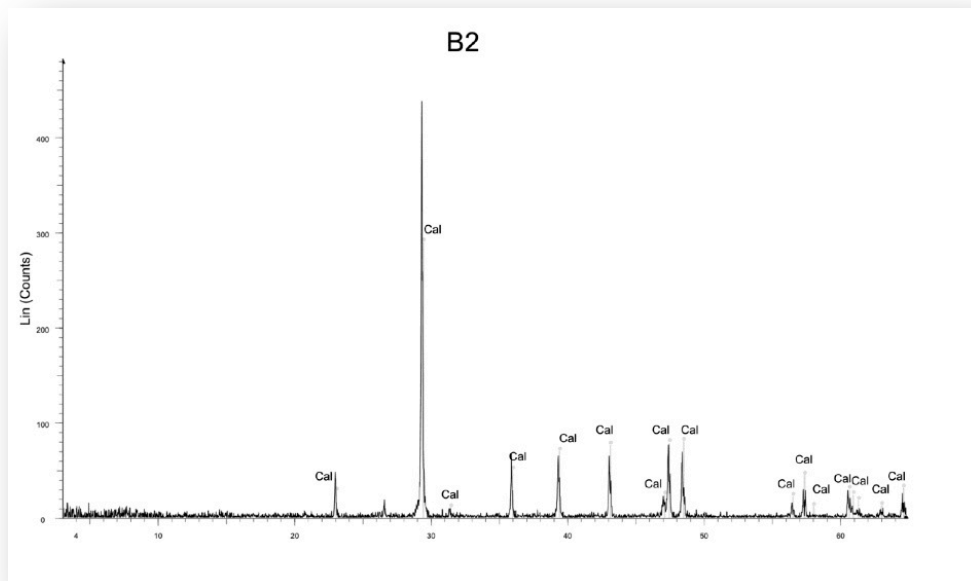


Απεικόνιση 4.1: Φυλογενετικό δένδρο του φυλοτύπου DKA-1 (JQ435484) για το γονίδιο 16S rRNA (1500bp) που βασίζεται στη μέθοδο Σύνδεσης Ομόρων – Neighbor Joining NJ). Οι αριθμοί στους κόμβους αντιπροσωπεύουν την ποσοστιαία (%) δομική ακεραιότητα (bootstrap values >50%), με ανάλυση: Σύνδεση Ομόρων – Neighbor Joining NJ αριστερά, Μεγίστης Πιθανοφάνειας – Maximum Likelihood ML μέση, και Ελαχίστης Εξέλιξης – Minimum Evolution δεξιά. Η κλίμακα δείχνει 2% νουκλεοτιδική υποκατάσταση ανά θέση.



Απεικόνιση 4.2: XRD ανάλυσης πατρώματος από το σπήλαιο «Δικταίον Άντρο» Cal = Ασβεστίτης, Dol= Δολομίτης, Qtz=Χαλαζία.

Απεικόνιση 4.3: XRD ανάλυσης πατρώματος από το σπήλαιο «Καστριά» Cal = ασβεστίτης.



4.6.2. Το ΜΟΝΟΤΥΠΙΚΟ ΓΕΝΟΣ *Toxopsis* gen. nov. ΚΑΙ ΕΙΔΟΣ *Toxopsis calypsus* sp.nov.

- Ερμπάριο Πανεπιστημίου Αθηνών: ATHU-CY 3314
- Ερμπάριο Φιλαδέλφειας (ΡΗ)ΗΠΑ, Academy of Natural Sciences: PH1095565
- GenBank: (JN695681 - JN695685)

4.6.2.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΑΣΕΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ

Το στέλεχος όπως απομονώθηκε από φυσικό υλικό του σπηλαίου «Φράγγχι» παρουσιάζει, στο αρχικό στάδιο του κύκλου ζωής του, κοινά μορφολογικά γνωρίσματα με το είδος *Ammatoidea normanii* (απλό νηματοειδές).

Ωστόσο, η συνεχής παρακολούθηση των μονοκαλλιεργειών μετά από χρονικό διάστημα ενός έτους και πλέον, αποκάλυψε διαφοροποίηση αρκετών κυττάρων σε ετερόκυτα. Η συγκεκριμένη ταξινομική μονάδα παρουσιάζει δύο κύκλους ζωής: τον ισοπολικό και τον ετεροπολικό. Ο ισοπολικός αποτελείται από νήματα που εδραιώνονται στο υπόστρωμα με το μέσο του νήματος και λεπτύνονται σε αμφότερα τα άκρα. Η αναπαραγωγή πραγματοποιείται με ορμογόνια που αποκόπτονται πλησίον νεκριδίων. Τα ορμογόνια αναπτύσσονται σε νεαρά νήματα τα οποία σταδιακά λεπτύνονται στα δύο άκρα. Ο ετεροπολικός κύκλος ζωής χαρακτηρίζεται από βλαστητικά νήματα τα οποία φέρουν ετερόκυτα και ακινήτες. Τα νήματα είναι ελαφρώς λεπτυνόμενα και αναπαράγονται με ορμογόνια τα οποία φέρουν βασικό ετερόκυτο. Ο διττός αυτός κύκλος ζωής δεν έχει παρατηρηθεί σε κάποιο άλλο μέχρι σήμερα γνωστό γένος.

4.6.2.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΑΣΕΙ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Η διάκριση του νέου για την επιστήμη γένους και είδους επιβεβαιώθηκε και στο φυλογενετικό δένδρο. Το στέλεχος από τα ελληνικά σπήλαια συγγενεύει με το στέλεχος *Tolypothrix distorta* (GQ287651) (95-96% ομοιότητα) και με το στέλεχος *Coleodesmium* (AY493596) με 96% ομοιότητα. Για την αλληλουχία του ριβοσωμικού DNA, η 95% ομοιότητα έχει τεθεί ως το όριο που καθορίζει διαφορετικό γένος. Αν η ομοιότητα είναι πλησίον του 95% ένα μορφολογικό μοναδικό χαρακτηριστικό είναι καθοριστικό για τη διάκριση. Το αυταπομορφικό χαρακτηριστικό επομένως του διττού κύκλου ζωής είναι ικανό για τη διάκριση του νέου γένους (Lamprinou et al. 2012).

4.6.3. Το ΝΕΟ ΕΙΔΟΣ *Phormidium melanochrouron* sp. nov.

- Ερμπάριο Πανεπιστημίου Αθηνών: ATHU-CY 3315
- Ερμπάριο Φιαλδέλφειας (PH), Academy of Natural Sciences: 1095563
- GenBank: (HM 748317)

4.6.3.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΑΣΕΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ

Το στέλεχος *Phormidium melanochrouron* (HM 748317) όπως απομονώθηκε από το σπήλαιο «Φράγγχι» παρουσιάζει ταυτόσημα μορφολογικά γνωρίσματα με ταξινομικές μονάδες που ανευρέθησαν και στα άλλα δύο σπήλαια μελέτης της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Για την καθιέρωση του νέου είδους χρησιμοποιήθηκαν μορφολογικά γνωρίσματα όπως η μορφή των νημάτων (περιπλεγμένα και πολλές φορές συστρεφόμενα), η ψευδής διακλάδωση, ο τύπος και το χρώμα της θήκης (ευρεία με έντονο μελανό χρώμα), το σχήμα και το μέγεθος των κυττάρων (βραχύτερα του πλάτους).

Τα μορφολογικά γνωρίσματα καθώς και η διάταξη των θυλακοειδών (περιφερειακή) κατατάσσουν τα συγκεκριμένα ελληνικά στελέχη στο γένος *Phormidium*. Ωστόσο, το αυταπομορφικό χαρακτηριστικό της ευρείας μελανόχροης θήκης, γνώρισμα που διατηρείται ακόμη και σε καλλιέργειες υπό χαμηλό φωτισμό, καθιστά τα συγκεκριμένα στελέχη σαφώς διακριτά από τα υπάρχοντα είδη του γένους *Phormidium*.

4.6.3.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΑΣΕΙ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Τα μοριακά δεδομένα απέδειξαν ομοιότητα 97-98% με το είδος *Phormidium priestelyi* ANT.L52.6 από την Ανταρκτική. Το τυπικό είδος *Phormidium priestelyi* Fritsch έχει αναθεωρηθεί και μετονομαστεί ως *Phormidesmis priestleyi* (Fritsch) Komárek et al. 2009. Το στέλεχος *Phormidium priestelyi* ANT.L52.6 από την Ανταρκτική δεν έχει ενταχθεί στο γένος *Phormidesmis*, αν και έχει θεωρηθεί από τους Komárek et al. (2009) ότι πιθανώς ανήκει στο γένος αυτό. Επιπροσθέτως δεν υπάρχουν διαθέσιμες αλληλουχίες στο Gen Bank υπό το γένος *Phormidesmis* για σύγκριση. Τα στελέχη από τα ελληνικά σπήλαια σαφώς διαφοροποιούνται από το γένος *Phormidesmis* ως προς το αυταπομορφικό χαρακτηριστικό της μελανόχροης θήκης και στην προαιρετική εμφάνιση ψευδούς διακλάδωσης.

Οι αλληλουχίες των ανωτέρω νέων για την επιστήμη στελεχών είναι μοναδικές και δεν υπάρχουν άλλες παρόμοιες κατατεθειμένες στην τράπεζα αλληλουχιών GenBank. Αυτές οι αλληλουχίες σε συνδυασμό με τη διαθεσιμότητα των συγκεκριμένων στελεχών από τα ελληνικά σπήλαια (καταθέσεις σε ερμπάρια), προσφέρουν στη διεθνή κοινότητα νέες ταξινομικές και οικολογικές πληροφορίες προς σύγκριση και ανάλυση.

4.7. ΣΧΟΛΙΑ ΕΠΙ ΤΟΥ ΕΝΔΗΜΙΣΜΟΥ ΣΤΑ ΣΠΗΛΑΙΑ

Τα κυανοβακτήρια συνιστούν τους κυρίαρχους φωτοτροφικούς οργανισμούς των σπηλαίων (Albertano 1999, 2012 Hernandez-Marine et al. 2001, Lamprinou et al. 2009, Asencio & Aboal 2011). Η πλειοψηφία των κυανοβακτηριακών ειδών που έχουν αναφερθεί από σπήλαια έχουν προσδιοριστεί κυρίως με μορφολογικά κριτήρια με βάση την κλασική προσέγγιση τόσο από φυσικό όσο και από καλλιεργημένο υλικό. Επίσης, δεν υπάρχουν μελέτες σε αυτά τα περιβάλλοντα που να συνδυάζουν τα μοριακά δεδομένα και την οικολογία με μεθόδους ανεξάρτητες των καλλιεργειών. Είναι πολύ πρόσφατη η ανάπτυξη της μοριακής οικολογίας που μας επιτρέπει να προσδιορίσουμε τους μικροοργανισμούς στη φύση και στα σπήλαια με αποτέλεσμα τα διαθέσιμα δεδομένα να είναι ελάχιστα.

Το ερώτημα αν υπάρχει ενδημισμός των κυανοβακτηρίων στα σπήλαια δεν μπορεί να απαντηθεί με τα μέχρι σήμερα δεδομένα. Από τα μέχρι τώρα ευρήματα δεν φαίνεται να υπάρχει συμφωνία μεταξύ γεωγραφικής ποικιλότητας και ενδημισμού. Επιχειρήματα και υποθέσεις υφίστανται και προς τις δύο απόψεις.

Η υποστήριξη της άποψης του μη ενδημισμού βασίζεται στη μεγάλη ικανότητα διασποράς των μικροοργανισμών αυτών και στην εύρεση αρκετών κοσμοπολιτικών (σύμφωνα με τη βιβλιογραφία) ειδών στα σπήλαια. Ωστόσο, ο κοσμοπολιτικός χαρακτηρισμός βασίζεται κυρίως σε ταξινομικές κλείδες που λαμβάνουν υπόψη τα μορφολογικά γνωρίσματα και οικολογικά αλλά όχι τα μοριακά ευρήματα.

Η άποψη ότι ο ενδημισμός είναι υπαρκτός βασίζεται στο γεγονός ότι τα σπήλαια είναι απομονωμένα ενδιαίτηματα με συνθήκες ιδιαίτερες που πιθανώς ευνοούν την ειδογένεση ή /και τις φυσιολογικές προσαρμογές των οργανισμών σε αυτά.

Επομένως, για να αποκτηθεί μια πλήρης εικόνα της διασποράς των κυανοβακτηρίων στα σπήλαια καθώς και του ενδημισμού τους είναι απαραίτητο να μελετηθούν με τον συνδυασμό κλασικών και νέων τεχνικών, επειδή είναι γνωστόν ότι τα μορφολογικά χαρακτηριστικά δεν ανατανακλούν την πραγματική γενετική και φυσιολογική απόκλιση (Taton et al. 2003).

4.8. ΛΙΠΟΕΙΔΗ ΜΕ ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΑΠΟ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΠΗΛΛΙΩΝ

Αντιβακτηριακές δοκιμές έγιναν σε δύο στελέχη που παρουσίαζαν ενδιαφέρον τόσο από ταξινομικής πλευράς όσο και από πλευράς λιποειδών. Το στέλεχος *Toxopsis calypsus*, ανήκει στα Nostocales τα οποία στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται ως φέροντα υποσχόμενα λιποειδή με αντιβακτηριακή και ανιμικητική δράση. Το στέλεχος *Phormidium melanochroun*, εμφάνιζε στις καλλιέργειες ανταγωνιστική δράση έναντι των υπολοίπων κυανοβακτηρίων. Τα ολικά λιποειδών μετά την εκχύλιση διαχωρίστηκαν σε πολικά και ουδέτερα, και στη συνέχεια τα πολικά μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδος TLC διαχωρίστηκαν στα συστατικά τους (ζώνες λιποειδών).

Αντιβακτηριακές δοκιμές πέραν των ζωνών που προέκυψαν ύστερα από τον διαχωρισμό των πολικών λιποειδών πραγματοποιήθηκαν τόσο στα ολικά (TL), όσο και στα ουδέτερα λιποειδή (NL), έτσι ώστε να διαπιστώσουμε κατά πόσον τα αποτελέσματα είναι συνεργιστικά οφειλόμενα σε συνδυασμό αντιβιοτικών, ή κατατάσσονται στα αδιάφορα ή ανταγωνιστικά αποτελέσματα.

Συγκεκριμένες ζώνες πολικών λιποειδών (βλ. αποτελέσματα) του *Toxopsis calypsus* σύμφωνα με τη μέθοδο διάχυσης δισκίων σε άγαρ (Kirby Bauer) εμφανίζουν αναστολή της ανάπτυξης των Gram⁺ παθογόνων βακτηρίων *Staphylococcus aureus* (NCTC 6571), *Staphylococcus aureus* (MRSA 1629), *Staphylococcus aureus* (MSSA 1646), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Enterococcus faecalis* (VRE 880), *Enterococcus faecium* (VRE 1291).

Αντιθέτως, έναντι των Gram⁻ βακτηρίων *Escherichia coli* (ATCC 25922) και *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) δεν παρατηρήθηκε αντιβακτηριακή δράση.

Αντίστοιχα αποτελέσματα έδωσαν και οι ζώνες λιποειδών του είδους *Phormidium melanochroun*. Σημειώνεται ότι ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ζώνη 7 που εμφανίζει αναστολή της δράσης της μεθανόλης, ένα εύρημα με μεγάλο ενδιαφέρον που χρήζει περαιτέρω μελέτης.

Τα αποτελέσματα της μεθόδου διάχυσης δισκίων σε άγαρ (Kirby Bauer) επιβεβαιώθηκαν από προκαταρκτικά αποτελέσματα με την ποσοτική μέθοδο αραιώσεων της αντιβακτηριακής ουσίας σε υγρό θρεπτικό (MIC) για το *Toxopsis calypsus*. Τα ενδεικτικά αυτά αποτελέσματα χρήζουν επαλήθευσης.

Υπογραμμίζεται ότι η μικρότερη συγκέντρωση ουσίας για το *Toxopsis calypsus*, που δεν επιτρέπει ανάπτυξη ($256 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$) εμφανίζεται τόσο έναντι προτύπων όσο και έναντι κλινικών στελεχών εντεροκόκκων (Gram⁺) βακτηρίων, ενώ δεν αναστέλλεται η ανάπτυξη των

Gram⁻ βακτηρίων. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο και οφείλεται στο ανθεκτικό κυτταρικό τοίχωμα των Gram⁻ βακτηρίων.

Η επαλήθευση των αποτελεσμάτων, καθώς και βιολογικές (π.χ. bioassay) και χημικές αναλύσεις (π.χ. HPLC) για να προσδιορισθούν χημικώς οι ουσίες που προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης των παθογόνων βακτηρίων κρίνονται απαραίτητες για εφαρμογή αυτών των ουσιών σε ευρεία κλίμακα.

5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ - SUMMARY

Αντικείμενο της εν λόγω διδακτορικής διατριβής είναι η ταξινομική - οικολογική μελέτη κυανοβακτηρίων από τρία σπήλαια της Ελλάδος: «Καστριά», «Φράγχθι», «Σεληνίτσα», (Πελοπόννησος).

Τα σπήλαια συνιστούν ιδιαίτερα οικοσυστήματα κατά το πλείστον σταθερά, κλειστά, με μικρή ροή ενέργειας και εισροή θρεπτικών. Η μελέτη της φωτοσυνθετικής μικροχλωρίδος με έμφαση στα κυανοβακτήρια από σπήλαια είναι ελάχιστα γνωστή. Στην Ελλάδα παρά τον μεγάλο αριθμό των σπηλαίων, οι έρευνες επί της μικροχλωρίδας τους, παραμένουν σχετικά περιορισμένες.

Συλλογή υλικού και προκαταρκτικές παρατηρήσεις έγιναν σε διάφορα σπήλαια της Πελοποννήσου, από τα οποία επιλέχθηκαν τα σπήλαια «Καστριά», «Φράγχθι» και «Σεληνίτσα» της Πελοποννήσου εξ αιτίας της εύκολης προσβασιμότητας και της διαφοράς τους στο υψόμετρο καθώς και της διαφορετικής απόστασης από τη θάλασσα. Αμφότερα τα σπήλαια «Φράγχθι» και «Σεληνίτσα» είναι αδιατάρακτα. Στο σπήλαιο «Καστριά» ένα τμήμα 500m έχει αξιοποιηθεί τουριστικώς, ωστόσο υλικό συλλέχθηκε από το αδιατάρακτο τμήμα του σπηλαίου πλησίον της φυσικής εισόδου. Διεξοδικότερα, πραγματοποιήθηκαν εποχικές διεγματοληψίες και στα τρία σπήλαια στη διάρκεια ενός έτους και συλλέχθηκε φυσικό υλικό από επτά (7) δειγματοληπτικές θέσεις σε κάθε σπήλαιο. Στις θέσεις αυτές καταγράφηκαν οι περιβαλλοντικές παράμετροι της ενεργού φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας – (PAR $\mu\text{moles s}^{-1} \text{m}^{-2}$), της Θερμοκρασίας ($T^{\circ}\text{C}$) και της Σχετικής Υγρασίας (RH %) και συσχετίσθηκαν με τις κοινότητες των κυανοβακτηρίων.

Η συνδυασμένη ταξινόμηση ειδών με κλασικές μεθόδους (όπως οπτική μικροσκοπία, και ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης και διέλευσης) αλλά και σε κάποιες περιπτώσεις και με πιο σύγχρονες μεθόδους (όπως μοριακές τεχνικές μέσω απομόνωσης και ανάγνωσης αλληλουχιών ριβοσωμικού DNA) αποσκοπεί στον ακριβή προσδιορισμό ταξινομικών μονάδων με ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των ολικών λιποειδών επιλεγμένων ταξινομικών μονάδων, διαχωρισμός των ολικών σε πολικά και ουδέτερα λιποειδή και εν συνεχεία, διαχωρισμός των πολικών λιποειδών στα συστατικά τους. Τα λιποειδή ελέγχθηκαν ως προς την αντιβακτηριακή τους δράση έναντι 8 προτύπων και κλινικών βακτηριακών στελεχών.

Η εργασία διαρθρώνεται σε 6 κεφάλαια: Το πρώτο περιλαμβάνει ανάλυση του οικοσυστήματος των σπηλαίων με έμφαση στο ρόλο της φωτοσυνθετικής μικροχλωρίδας καθώς και σύντομη ιστορική ανασκόπηση της σπηλαιοχλωρίδας και των κυανοβακτηρίων στα σπήλαια. Στο δεύτερο κεφάλαιο παραθέτονται στοιχεία των σπηλαίων μελέτης και περιγράφεται η μέθοδος της έρευνας, συλλογής, καλλιέργειας και επεξεργασίας του υλικού. Στο τρίτο κεφάλαιο παρέχονται αναλυτικά τα αποτελέσματα της μελέτης και χωρίζεται στο

χλωριδικό μέρος, στο συστηματικό μέρος -στο οποίο περιγράφονται αναλυτικά οι ταξινομικές μονάδες που εδραιώνονται ως νέες για την επιστήμη καθώς και εκείνες που αποτελούν πρώτες ανευρέσεις για την Ελλάδα-, στις αναλύσεις των λιποειδών από δύο επιλεγμένα στελέχη (*Toxopsis calypsus* και *Phormidium melanochroun*), και στις αντιβακτηριακές δοκιμές αυτών έναντι προτύπων και κλινικών στελεχών βακτηρίων. Το τέταρτο κεφάλαιο περιλαμβάνει τα συμπεράσματα και τη συζήτηση των αποτελεσμάτων. Το πέμπτο και το έκτο κεφάλαιο περιλαμβάνουν την συζήτηση και την βιβλιογραφία αντιστοίχως.

ΧΛΩΡΙΔΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Προσδιορίστηκαν και μελετήθηκαν λεπτομερώς από φυσικό και καλλιεργημένο υλικό 156 ταξινομικές μονάδες. Από το σύνολο αυτό, οι 49 ταξινομικές μονάδες αναφέρονται για πρώτη φορά στον Ελλαδικό χώρο εμπλουτίζοντας την βιοποικιλότητα της Ελλάδας, ενώ 8 αναφέρονται για δεύτερη φορά παγκοσμίως.

Τα κυανοβακτήρια επί του παρόντος αριθμούν περίπου 3400 είδη (Βάση Δεδομένων AlgaeBase). Από αυτά περίπου 300 (9%) έχουν αναφερθεί-καταγραφεί μία ή περισσότερες φορές στα οικοσυστήματα των σπηλαίων όπως φαίνεται από τη διαθέσιμη βιβλιογραφία (βλέπε Πίνακα 4.1).

Από την παρούσα έρευνα προκύπτει ένα σύνολο 49 ταξινομικών μονάδων, οι οποίες αναφέρονται για πρώτη φορά από το οικοσύστημα των σπηλαίων. Οι νέες αυτές αναφορές συνιστούν ένα αξιόλογο ποσοστό της τάξης του 16% επί του συνόλου της κυανοβακτηριακής χλωρίδας των σπηλαίων, συμβάλλοντας στην αύξηση της βιοποικιλότητας του συγκεκριμένου οικοσυστήματος.

Σπανιότατες μορφές ή γνωστές μόνο από την πρώτη ανεύρεσή τους είναι οι: *Asterocapsa jilinic*, *Asterocapsa sinica*, *Chroococcus subsphaericus*, *Hydrocoleum stankovicii*, *Leptolyngbya undosa*, *Plectonema araucanum*, *Phormidium macedonicum*, *Pseudophormidium spelaeoides*.

Είδη και μορφές με πολύ περιορισμένη στον κόσμο εμφάνιση είναι οι: *Leptolyngbya ercegovicii*, *Phormidium lacustre*, *Phormidium vulgare*, *Nostoc letestui*.

Σε μεγάλο αριθμό ταξινομικών μονάδων διαπιστώθηκαν αποκλίσεις στα μορφολογικά γνωρίσματα από τους τύπους των ειδών ενώ οι λοιπές ανταποκρίνονται προς τους καθιερωθέντες τύπους. Οι αποκλίσεις μορφολογικών γνωρισμάτων δημιουργούν ποικίλα ταξινομικά προβλήματα, ορισμένες δε από αυτές προσφέρουν προϋποθέσεις για την καθιέρωση νέων ταξινομικών μονάδων.

Στο σπήλαιο «Κασριά» πραγματοποιήθηκαν 4 εποχικές δειγματοληψίες στο χρονικό διάστημα 17/01/09 – 8/11/09 και επελέγησαν 7 δειγματοληπτικές θέσεις με αναπτύξεις κυανοβακτηρίων ορατές δια γυμνού οφθαλμού. Από ένα σύνολο 60 δειγμάτων,

αναγνωρίστηκαν 76 ταξινομικές μονάδες, εκ των οποίων 60 ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους. Επικρατούν οι ταξινομικές μονάδες που ανήκουν στην τάξη Chroococcales (τόσο με το κλασικό, όσο και με το σύγχρονο σύστημα ταξινόμησης). Από την κατανομή των ταξινομικών μονάδων σε οικογένειες φαίνεται η επικράτηση της οικογένειας Chroococcaceae και ακολουθεί η οικογένεια Phormidiaceae. Στο τυπικό αυτό σπήλαιο είναι φανερόν ότι ο λόγος Chroococcales/Oscillatoriales μειώνεται καθώς μειώνεται η ενεργός φωτοσυνθετική ακτινοβολία, και στις εσωτερικές θέσεις με ελάχιστο φως επικρατούν απλά νηματοειδή είδη.

Στο σπήλαιο «Φράγγχι» πραγματοποιήθηκαν 4 εποχικές δειγματοληψίες (7/12/08 – 7/11/09) και επελέγησαν 7 δειγματοληπτικές θέσεις με αναπτύξεις κυανοβακτηρίων ορατές δια γυμνού οφθαλμού. Από ένα σύνολο 56 δειγμάτων αναγνωρίστηκαν 66 ταξινομικές μονάδες, 50 εκ των οποίων προσδιορίστηκαν σε επίπεδο είδους. Η επικρατούσα τάξη είναι αυτή των Chroococcales με το σύγχρονο ταξινομικό σύστημα, ενώ με το κλασικό σύστημα επικρατούν τα απλά νηματοειδή που ανήκουν στην τάξη Oscillatoriales. Η οικογένεια Psedanabaenaceae έχει τους περισσότερους αντιπροσώπους και ακολουθεί η οικογένεια Phormidiaceae. Στο συγκεκριμένο σπήλαιο εξ αιτίας της πτώσης μέρους της οροφής που συμβάλλει στην μη τυπική διαμόρφωση του σπηλαίου, ο λόγος Chroococcales/Oscillatoriales δεν ακολουθεί κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο.

Στο σπήλαιο «Σεληνίτσα» πραγματοποιήθηκαν 4 εποχικές δειγματοληψίες στο χρονικό διάστημα 7/04/10 – 23/02/11 και επελέγησαν 7 δειγματοληπτικές θέσεις με αναπτύξεις κυανοβακτηρίων ορατές δια γυμνού οφθαλμού. Από ένα σύνολο 56 δειγμάτων αναγνωρίστηκαν 71 ταξινομικές μονάδες εκ των οποίων οι 62 ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους. Με το σύγχρονο σύστημα ταξινόμησης οι τάξεις Chroococcales και Oscillatoriales εμφανίζονται με το ίδιο ποσοστό, ενώ με το παραδοσιακό σύστημα ταξινόμησης επικρατεί η τάξη Oscillatoriales. Η οικογένεια με τους περισσότερους αντιπροσώπους είναι η Phormidiaceae. Στο εν λόγω σπήλαιο όπως και σε αυτό των «Καστριών», στις θέσεις με χαμηλότερη φωτοσυνθετικώς ενεργή ακτινοβολία επικρατούν απλά νηματοειδή είδη.

ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Σύμφωνα με την πολυφασική προσέγγιση (μορφολογικά και μοριακά δεδομένα καθώς και δεδομένα υπερδομής) εδραιώθηκαν δύο (2) ταξινομικές μονάδες (*Irhinoe spelaebios* gen. nov. sp. nov. Lamprinou & Pantazidou, *Toxopsis calypsus* gen. nov. sp. nov. Lamprinou & Pantazidou) ως νέα γένη και είδη για την επιστήμη και μία (1) (*Phormidium melanochrouron* sp. nov. Lamprinou & Pantazidou) ως νέο είδος για την επιστήμη. Οι νέες αυτές ταξινομικές μονάδες απομονώθηκαν σε μονοκαλλιέργειες και κατατέθηκαν στο διεθνές ερμπάριο της Φιλαδέλφειας (PH, ΗΠΑ) και στο ερμπάριο του Πανεπιστημίου Αθηνών ΕΚΠΑ (ATHU), ενώ οι

νέες αλληλουχίες του 16S rRNA από τα στελέχη αυτά των σπηλαίων της Ελλάδος κατατέθηκαν στη διεθνή τράπεζα GenBank .

Για το *Irhinoe spelaeobios* η συχνά παρατηρούμενη T-τύπου διακλάδωση, η σπανίως παρατηρούμενη V-τύπου διακλάδωση, η απουσία ακραίας διχοτομικής, η αναπαραγωγή με ορμοκύστες και ακινήτες και τέλος η απουσία βοθητικών συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων, συνιστούν μορφολογικά γνωρίσματα τα οποία σε συνδυασμό με την αλληλούχιση του 16S rRNA επιτρέπουν την καθιέρωση νέας ταξινομικής μονάδας.

Για το *Toxopsis calypsus*, το αυταπομορφικό χαρακτηριστικό του διττού κύκλου ζωής σε συνδυασμό με τη μοριακή ανάλυση επιτρέπουν την εδραίωση της ταξινομική μονάδος ως νέα για την επιστήμη.

Το *Phormidium melanochrouron* φέρει το αυταπομορφικό χαρακτηριστικό της ευρείας μελανόχροου θήκης , η οποία όπως αποδείχθηκε ύστερα από καλλιέργειες υπό χαμηλό φωτισμό σε εργαστηριακές συνθήκες και ύστερα από κατεργασία με διάλυμα οξέων , δεν συνιστά περιβαλλοντική προσαρμογή. Η θήκη σε συνδυασμό με την ανάλυση αλληλουχιών ριβοσωμικού DNA επέτρεψε την εδραίωση νέου είδους υπό το γένος *Phormidium*.

Παρατηρήσεις σε πλούσιο φυσικό και καλλιεργημένο υλικό του είδους *Lyngbya palikiana* Claus 1955 μας επιτρέπουν να εντάξουμε το είδος υπό το γένος *Leptolyngbya*. Στο ταξινομικό σύστημα των Anagnostidis & Komárek 2005 αναφέρεται υπό το γένος *Phormidium* και εντάσσεται στις ταξινομικές μονάδες που χρήζουν αναθεώρησης χωρίς όμως να μετονομάζεται ως *Phormidium*. Οι συγκεκριμένοι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι η μορφή *Lyngbya palikiana* f. *minor* Claus 1962 πιθανότατα αποτελεί κάποιο άλλο είδος *Leptolyngbya*, χωρίς να το αναθεωρούν. Κατά την άποψή μας αμφότερες οι ταξινομικές μονάδες θα πρέπει με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά να ενταχθούν στο γένος *Leptolyngbya*. Ωστόσο περαιτέρω έρευνα με πολυφασική προσέγγιση είναι αναγκαία για να καθορισθεί η ταξινομική του θέση.

Στον οργανισμό που προσδιορίστηκε ως *Xenococcus* cf. *kernerii*, διαπιστώθηκαν γνωρίσματα του είδους *Xenococcus kernerii* κατά Hansgirg 1893, Το είδος αυτό στη συνέχεια μετονομάστηκε ως *Dermocapra kernerii* (Hansg.) Bourr. Σύμφωνα με τους Geitler (1932), Desikachary (1959) και Starmach (1966), φέρει ψευδονήματα μέχρι και 10 κύτταρων. Οι Gold-Morgan et al. (1994) μετέφεραν το συγκεκριμένο είδος υπό το γένος *Xenotholus*. Το τελευταίο γένος εμφανίζει κύτταρα σε δύο ή περισσότερα επίπεδα χωρίς να δημιουργεί ψευδονήματα και είναι κυρίως επιφυτικό, γνωρίσματα που δε συνάδουν με το *Xenococcus kernerii* όπως περιγράφηκε από τον Hansgirg (1887). Δεδομένης της παρατήρησης ψευδονημάτων στον υπό μελέτη οργανισμό από το σπήλαιο «Καστριά», προτιμήσαμε να τον εντάξουμε με επιφύλαξη υπό το γένος *Xenococcus*. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτη με χρήση μοριακών εργαλείων κρίνεται απαραίτητη για την αναθεώρηση του είδους.

Οι οργανισμοί που αναφέρονται ως Nostocales 1 και Stigonematales δεν φέρουν μορφολογικά χαρακτηριστικά ώστε να μπορούν να ενταχθούν σε κάποια από τις ήδη υπάρχουσες γνωστές ταξινομικές μονάδες. Η διατήρησή τους σε καλλιεργητικά μέσα υπό εργαστηριακές συνθήκες επιτρέπει την περαιτέρω μελέτη τους που θα επιτρέψει την ασφαλή ταξινομική τους τοποθέτηση.

ΟΙΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Τα σπήλαια συνήθως επικοινωνούν με το εξωτερικό περιβάλλον. Επομένως, τα βιοϋμένια που σχηματίζονται στις εισόδους, είναι προσαρμοσμένα να ανθίστανται σε διαφόρων τύπων καταπονήσεις όπως η υπερβολική άμεση ακτινοβολία, η ξηρασία και οι ακραίες θερμοκρασίες. Στο εσωτερικό, η τυπολογία – μορφολογία του σπηλαίου, καθώς και τα χαρακτηριστικά των ιδιαίτερων αυτών περιβαλλόντων «διαμορφώνουν» τις κυανοβακτηριακές και μικροβιακές βιοκοινωνίες σύμφωνα με τη διαθεσιμότητα του φωτός και τη σχετική υγρασία.

Και στα τρία υπό μελέτη σπήλαια η παρατηρούμενη «σκεδαστική κατανομή» διασπορά των βιοϋμενίων εξαρτάται από τις τοπικές ανομοιογένειες του πετρώματος, όπως διαφορές στο πορώδες του υποστρώματος καθώς και σε διαφορές του μικροπεριβάλλοντος όπως η σχετική υγρασία. Επομένως, εκτός από τις περιβαλλοντικές παραμέτρους, η μορφολογία του σπηλαίου, η διαθεσιμότητα του νερού, ο τύπος και η συνεκτικότητα του υποστρώματος αποτελούν σημαντικές μεταβλητές που διαμορφώνουν τη βιοκοινότητα των ειδών

Οι περισσότερες από τις μορφές που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της ξηρής περιόδου, ιδιαιτέρως του θέρους, χαρακτηρίζονται από λίγο ή πολύ συνεκτικές θήκες. Η διαπίστωση αυτή ενισχύει την άποψη ότι οι θήκες λειτουργούν ως αποθήκες νερού και μπορούν να χαρακτηριστούν ως οικολογικές προσαρμογές σε καταστάσεις ξηρασίας. Ενδιαφέρουσα είναι η περίπτωση βιοϋμενίων με επικράτηση των νηματοειδών ετεροκυστωδών ειδών του γένους *Nostoc* στο σπήλαιο «Σεληνίτσα» το οποίο γειτνιάζει στη θάλασσα. Οι ισχυρές θήκες των ειδών του γένους *Nostoc*, με πλεόνασμα εξωπολυμερικών πολυσακχαριτικών συστατικών (EPS) αποτελούν πλεονέκτημα στην αντιμετώπιση της ξηρασίας και της αφυδάτωσης εξαιτίας της αλατότητας.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΙΟΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ

Οι αναλύσεις βασίζονται σε δεδομένα παρουσίας – απουσίας, του συνόλου των δειγμάτων, δηλαδή τόσο του φυσικού όσο και του καλλιεργημένου υλικού. Για να εξηγηθούν οι ομοιότητες και οι ανομοιότητες των θέσεων σε κάθε σπήλαιο καθώς και η ομοιότητα/ανομοιότητα των σπηλαίων μεταξύ τους εφαρμόστηκε η μη παραμετρική μέθοδος nMDS (Multidimensional

Scaling) καθώς και η ανάλυση ομοιοτήτων (Simpser analysis) που βασίζονται στον δείκτη ομοιότητας Jaccard με τη βοήθεια του προγράμματος Primer software v.6.

Στο τυπικό σπήλαιο «Καστριά» καθώς και στο σπήλαιο «Σεληνίτσα», οι 7 δειγματοληπτικές θέσεις με βάση την nMDS ανάλυση φαίνονται να διακρίνονται σε τρεις ζώνες: α) εισόδου, β) ενδιάμεσης ζώνης και γ) εσωτερικής ζώνης. Συγκεκριμένα το σπήλαιο «Καστριά» εμφανίζει το μεγαλύτερο πλούτο ειδών με την κοινότητα της εισόδου να είναι η πλουσιότερη με 51 ταξινομικές μονάδες, και ακολουθούν οι κοινότητες της ενδιάμεσης και εσωτερικής ζώνης με 33 και 18 ταξινομικές μονάδες αντιστοίχως. Η μεγαλύτερη ομοιογένεια στη σύνθεση των κυανοβακτηριακών ειδών παρατηρείται στις εσωτερικές θέσεις 6 και 7 με ομοιότητα (44,64% και 39,05% αντιστοίχως). Αυτό υποδηλώνει ότι τα είδη αυτών των θέσεων αν και ολιγάριθμα είναι αρκετά προσαρμοσμένα σε συνθήκες ελάχιστου φωτός.

Στο σπήλαιο «Σεληνίτσα» η μεγαλύτερη τιμή αφθονίας των ειδών παρατηρήθηκε στη ζώνη εισόδου με 48 ταξινομικές μονάδες, και ακολουθούν η ενδιάμεση ζώνη και η εσωτερική ζώνη με 11 και 35 ταξινομικές μονάδες αντιστοίχως.

Διαφορετικό πρότυπο ακολουθείται στο σπήλαιο «Φράγχθι» όπου, όπως φαίνεται και από την nMDS ανάλυση, οι δειγματοληπτικές θέσεις ομαδοποιούνται σε 2 μεγάλα υποσύνολα : το πρώτο (α) περιλαμβάνει τις δειγματοληπτικές θέσεις 1-5 παρουσιάζοντας εποχική υποομαδοποίηση και το δεύτερο (β) περιλαμβάνει τις δειγματοληπτικές θέσεις 6 (σταλαγμίτης) και 7 (σταλακτίτης). Ο πλούτος των ειδών ανέρχεται στις 53 ταξινομικές μονάδες για το πρώτο σύνολο ενώ το δεύτερο περιλαμβάνει 32 ταξινομικές μονάδες.

Από τη σύγκριση των τριών σπηλαίων, προκύπτει ότι τα τρία σπήλαια είναι διαφορετικά μεταξύ τους. Οι παράγοντες που δημιουργούν αυτή τη διάκριση δεν είναι μόνον οι περιβαλλοντικές (PAR, T, RH). Η μορφολογία του σπηλαίου, η διαθεσιμότητα του νερού, ο τύπος και η συνεκτικότητα του υποστρώματος αποτελούν σημαντικές μεταβλητές διαμόρφωσης των βιοκοινοτήτων.

Από την ανάλυση ομοιοτήτων (Simpser analysis) των συναθροιστικών εποχικών δειγμάτων μεταξύ των σπηλαίων (ανά ζεύγη) προκύπτει ότι το ποσοστό ανομοιογένειας είναι αρκετά υψηλό. Τα σπήλαια «Καστριά» και «Φράγχθι» εμφανίζουν ποσοστό ανομοιογένειας 86,25%. Το σπήλαιο «Φράγχθι» με το σπήλαιο «Σεληνίτσα» 86,35%, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό ανομοιογένειας ανέρχεται στο 88,98% και παρατηρείται στο ζεύγος «Καστριά – Σεληνίτσα». Το «Φράγχθι» και η «Σεληνίτσα» είναι αμφότερα κοντά στη θάλασσα με τις εξωτερικές θέσεις του σπηλαίου «Σεληνίτσα» να επηρεάζονται από τη ζώνη ψεκασμού, και αυτός πιθανώς είναι ο λόγος της ελάχιστα μικρότερης ανομοιογένειας σε σύγκριση με το ζεύγος «Καστριά – Σεληνίτσα».

ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ

Αντιβακτηριακές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε δύο νέα στελέχη για την επιστήμη (*Toxopsis calypsus* και *Phormidium melanochroun*) τα οποία παρουσίαζαν ενδιαφέρον τόσο από ταξινομικής πλευράς όσο και από πλευράς λιποειδών. Το στέλεχος *Toxopsis calypsus*, ανήκει στα Nostocales τα οποία στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται ως φέροντα υποσχόμενα λιποειδή με αντιβακτηριακή και ανιμυκητιακή δράση ενώ το στέλεχος *Phormidium melanochroun*, εμφάνιζε στις καλλιέργειες ανταγωνιστική δράση έναντι των υπολοίπων κυανοβακτηρίων.

Τα ολικά λιποειδή μετά την εκχύλιση διαχωρίστηκαν σε πολικά και ουδέτερα, και στη συνέχεια τα πολικά, μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδος TLC διαχωρίστηκαν στα συστατικά τους (ζώνες λιποειδών).

Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε η ευαισθησία 9 προτύπων και κλινικών βακτηριακών στελεχών σε ζώνες πολικών λιποειδών του *Toxopsis calypsus* και του *Phormidium melanochroun*. Αμφότερα τα κυανοβακτηριακά στελέχη *Toxopsis calypsus* και *Phormidium melanochroun* σύμφωνα με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ (μέθοδος Kirby Bauer) εμφανίζουν αναστολή των θετικών κατά Gram βακτηρίων (Gram⁺) *Staphylococcus aureus* (NCTC 6571), *Staphylococcus aureus* (MRSA 1629), *Staphylococcus aureus* (MSSA 1646), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Enterococcus faecalis* (VRE 880), *Enterococcus faecium* (VRE 1291).

Αντιθέτως, στα αρνητικά κατά Gram (Gram⁻) βακτήρια *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) δεν εμφανίζεται αντιβακτηριακή δράση. Ένα φαινόμενο αναμενόμενο εξ αιτίας της ανθεκτικής σύστασης του κυτταρικού τοιχώματος των Gram⁻ βακτηρίων. Σημειωτέον ότι στο δεύτερο κατά σειρά κυανοβακτήριο (*Phormidium melanochroun*) μία ζώνη πολικών λιποειδών εμφανίζει αναστολή της δράσης της μεθανόλης (χαρακτηριστικό με μεγάλο ενδιαφέρον που χρήζει περαιτέρω μελέτης).

Από τα συνολικά αποτελέσματα της μεθόδου Kirby Bauer καλύτερη δράση εμφανίζει το είδος *Toxopsis calypsus* έναντι του *Phormidium melanochroun*.

Προκαταρκτικά αποτελέσματα με την ποσοτική μέθοδο αραιώσεων της αντιβακτηριακής ουσίας σε υγρό θρεπτικό (MIC) δίδονται για το *Toxopsis calypsus*.

ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- 156 taxa, 39 γένη, 115 είδη
 - 2 νέα για την επιστήμη γένη και είδη (*Iphinoe spelaebios*, *Toxopsis calypsus*)
 - 1 νέο για την επιστήμη είδος (*Phormidium melanochrouron*)
 - 49 taxa αποτελούν πρώτες αναφορές για την Ελλάδα
 - 8 taxa αναφέρονται 2^η φορά παγκοσμίως
 - Σαφής διαφοροποίηση των 3 σπηλαίων από άποψη κοινοτήτων κυανοβακτηρίων
 - Παράγοντες που διαμορφώνουν τις βιοκοινότητες στα σπήλαια δεν είναι μόνο οι περιβαλλοντικές, αλλά η μορφολογία σπηλαίου, η διαθεσιμότητα του νερού, ο τύπος και η συνεκτικότητα του υποστρώματος διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο
 - Αμφότερα τα είδη *Toxopsis calypsus* και *Phormidium melanochrouron* εμφανίζουν αντιβακτηριακή δράση έναντι προτύπων και κλινικών θετικών κατά Gram βακτηρίων - Κανένα από τα δύο είδη δεν εμφανίζει δράση έναντι Gram αρνητικών βακτηρίων - Μία εκ των 10 ζωνών των πολικών λιποειδών του *Phormidium melanochrouron* προκαλεί αναστολή της δράσης της μεθανόλης -Καλύτερη αντιβακτηριακή δράση έναντι των προτύπων και κλινικών στελεχών βακτηρίων εμφανίζει το *Toxopsis calypsus*.
-

In the present doctoral thesis, Cyanobacteria from three distant Greek caves located in Peloponnese, were examined with emphasis on their taxonomy and ecology.

Caves represent relatively stable environments characterized by low energy flow and nutrient input. The photosynthetic cave microflora has generally been subject of investigation worldwide, but little is known on cave Cyanobacteria. Although Greek landscape offers a large variety of caves, studies on the cave microflora are scarce.

After preliminary samplings from various hypogean environments, three morphologically different and easily accessible caves were chosen for further study (“Kastria”, “Franchi” and “Selinitza”), all located in Peloponnese but with different morphology and at varying distance from the sea. Two of the selected caves (“Franchi” and “Selinitza”) are rather pristine, while the third one (“Kastria”) is partly (an area of 500m) touristically exploited; in the last case cyanobacterial sampling was restricted at the undisturbed part close to the physical entrance and at the dim lit sites. Sampling was conducted seasonally at each cave and at selected sites (1-7) starting from the physical entrance, an area generally hosting conspicuous and diversified cyanobacterial growths. The following environmental parameters were measured during the whole survey and at each sampling site: Photosynthetically Active Radiation (PAR $\mu\text{mols} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$), Air Temperature ($^{\circ}\text{C}$), and Relative Humidity (RH %).

For resolving taxonomic problems or for establishing new taxonomic entities, the combined use of traditional (optical and electron microscopy) and more contemporary (rDNA analysis) taxonomical methods was applied.

The thesis contains 6 chapters. In Chapter (I) a general description of the cave ecosystems is given, emphasizing on the photosynthetic microflora and mainly on cyanobacteria, and including a historical review of cyanobacteria from caves. In Chapter (II), the sampling methods and the treatment of fresh and cultured material are reported including LM, SEM, TEM microscopy and molecular analysis, as well as the detailed methodology applied for lipid extraction and antibacterial assays. The following Chapter (III) represents the taxonomic part of the thesis, where a detailed description of the new taxa established during this survey or of taxa reported for the first time from Greece is given, accompanied by taxonomic remarks, ecological information, and data on the species distribution; in the same chapter, results from the lipid extraction and the antibacterial screening are given. Chapter (IV) summarizes the main conclusions of the study, while Chapter (V) and Chapter (VI) include the summary and the references.

FLORISTIC REMARKS

Of a total number of 156 taxa identified from fresh and cultured material, 49 represent new records for Greece and 8 represent taxa reported for second time worldwide. These numbers represent a 16% of the whole cyanobacterial flora recorded from caves (~300 species from caves of a total number of ~3400 taxa of Cyanobacteria according to Records from the Algaebase), contributing to the biodiversity from these little know hypogean environments.

Species scarcely observed in few isolated places, or observed for the first time in caves are the following: *Asterocapsa jilinica*, *Asterocapsa sinica*, *Chroococcus subsphaericus*, *Hydrocoleum stankovicij*, *Leptolyngbya undosa*, *Plectonema araucanum*, *Phormidium macedonicum*, *Pseudophormidium spelaeoides*.

The following taxa can be considered of limited world distribution: *Leptolyngbya ercegovicii*, *Phormidium lacustre*, *Phormidium vulgare*, *Nostoc letestui*.

Deviations of the types in various morphological features were noted in a great number of the identified Cyanobacteria. Some of the deviations are small variations of the types and were considered within the limits of the microorganisms' variability.

In cave "Kastria", 4 seasonal samplings were conducted during the period 17/01/09 – 8/11/09 and material was collected from 7 sampling sites. From a total of 60 samples, 76 taxa were identified, 60 of them at species level. Taxa of the order Chroococcales prevailed (according to both the classical and the modern taxonomic system). The family Phormidiaceae prevails and the family Chroococcales follows. Predominance of Oscillatoriales over Chroococcales was observed in the community of the dim light zone.

In cave "Franthi", 4 seasonal samplings were conducted during the period 7/12/08 – 7/11/09 and material was collected from 7 sampling sites. From a total of 56 samples, 66 taxa were identified, 50 of them at species level. With the modern taxonomic system the orders Oscillatoriales and Chroococcales are represented equally, while with the classical taxonomic system the order Oscillatoriales prevails. Pseudanabaenaceae seems to be the family with the greatest number of representatives followed by Phormidiaceae.

In cave "Selinitza", 4 seasonal samplings were conducted during the period 7/04/10 – 23/02/11 and material was collected from 7 sampling sites. From a total of 56 samples, 71 taxa were identified, 62 of them at species level. With the modern taxonomic system the orders Chroococcales and Oscillatoriales are represented equally, while with the classical taxonomic system Oscillatoriales prevailed over Chroococcales. Phormidiaceae seems to be the family with the greatest number of representatives. Moreover, filamentous taxa prevailed in the deep dim light zone of this cave.

TAXONOMIC REMARKS

Applying the polyphasic concept of taxonomy (morphological characters under LM, SEM and TEM and phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene) two new monospecific genera of Nostocales, i.e. *Iphinoe spelaeobios* gen. nov. sp. nov. and *Toxopsis calypsus* gen. nov. sp. nov., were established. With the same concept, one new species under the generic name *Phormidium* was established after examination of natural and cultured material.

Specific characteristics, in combination with the phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene, clearly differentiate this taxon and encourage the establishment of a new monospecific genus under the name *Iphinoe spelaeobios*, such as (i) the type of branching (mostly T-type, rarely V-type, and also false branching), (ii) the mode of reproduction (hormocytes and akinetes), (iii) the absence of dichotomous terminal branching, and (iv) the absence of intercellular or pit-connections.

For *Toxopsis calypsus*, its morphological autapomorphy of the complex life cycle (isopolarity, heteropolarity) in combination with the molecular analysis of the 16S rRNA indicate monophyly, leading to the establishment of the new taxon.

For *Phormidium melanochroun*, the autapomorphic coloured and thick sheath, and the facultative pseudobranching filaments in combination with the phylogenetic analysis have been decisive for establishing this new taxon.

Lengthy observations on natural and cultivated material give ground to classify the species *Lyngbya palikiana* Claus 1955 under the genus *Leptolyngbya*. According to Anagnostidis & Komárek (2005) this species is referred as *Phormidium* and is included in the catalogue of species needing revision. The aforementioned scientists also believe that *Lyngbya palikiana* f. *minor* Claus 1962 may represent a *Leptolyngbya* species. To our opinion, both taxa should be classified under the generic name *Leptolyngbya*. However, additional study with molecular data is needed for its further clarification under the genus *Leptolyngbya*.

In the organism identified as *Xenococcus* cf. *kernerii* the observed morphological features correspond to *Xenococcus kernerii* Hansgirg 1893, a species later named as *Dermocarpa kernerii* (Hansg.) Bourr. According to Geitler (1932), Desikachary (1959) and Starmach (1966), this species is characterized by pseudofilaments consisting of up to 10 cells. Gold-Morgan et al. (1994) revised this species under *Xenotholos*, a mainly epiphytic genus which is not characterized by pseudofilaments. Taking into consideration the formation of pseudofilaments, observed in both fresh and cultured material, we preferred to identify this taxon as *Xenococcus* cf. *kernerii*. Further investigation is needed in order to ascertain its taxonomic position.

The morphological features of the taxa referred as 'Nostocales 1' and 'Stigonematales' do not correspond to any of the up to now described taxa. Both are maintained in axenic cultures, ready for further investigation.

ECOLOGICAL REMARKS

Caves are normally influenced by the outdoor environment and thus are subjected to climatic and microclimatic shifts. It is known that cave typology and the general characteristics of such confined environments strongly select the microbial community according to light availability and relative humidity. Biofilms at the entrance are usually formed by mucilaginous and dark coloured coccoid cyanobacteria with protective strategies against desiccation, irradiation and abrupt temperature fluctuation.

In the selected Greek caves, the observed «patchy» distribution of biofilms is not controlled exclusively by the environmental parameters (PAR, T, RH); the observed variations in species composition could also be attributed to characteristics such as cave morphology, water availability, and type and coherence of the substratum.

Most of the taxa collected during the dry season are characterized by relatively gelatinous sheaths, a characteristic widely considered as a water reservoir protecting against desiccation. The biofilms observed in cave «Selinitza», consisting of filamentous heterocytous cyanobacterial species such as *Nostoc* with ability to fix atmospheric N₂ and produce exopolymeric substances (EPS), might have a clear advantage in this poor environment which is also affected by the sea spray.

BIOCUMMUNITY ANALYSIS

Data on species presence/absence were analyzed with non-metric Multidimensional Scaling Ordination (nMDS) and Analysis of Similarity (SIMPER) based on Jaccard similarity index.

In cave 'Kastria', the seven (7) sampling sites are grouped in three clusters: (i) the entrance zone consisting of the sites 1, 2, 3, (ii) the transition zone consisting of the sampling site 5, and (iii) the dim light zone consisting of the sampling sites 6, 7. The entrance community is the richest (51 taxa) followed by the transition and the dim light zones (33 and 18 taxa respectively).

In cave 'Francthi', the seven (7) sampling sites are grouped in two major clusters: (i) the first one consisting of the sampling sites 1-5 with seasonal subgrouping, and (ii) the second one with the sampling sites 6 (stalagmite) and 7 (stalactite). Analysis of species richness revealed 52 and 32 taxa in the above clusters, respectively.

In cave 'Selinitza', the seven (7) sampling sites are grouped in three clusters: (i) the entrance zone, mostly affected by the sea spray, consisting of the sampling sites 1, 3, (ii) the transition zone, in terms of PAR and influence of the salt spray, consisting of the sampling site 2, and (iii) the dim light zone consisting of the sampling sites 4,5,6,7. The species richness was higher at the entrance zone (48 taxa); the transition and the dim light zones followed with 11 and 35 taxa, respectively.

nMDS analysis of the cumulative seasonal samples per sampling site showed clear distinction of cyanobacterial communities between the three caves with average dissimilarity among pairs of caves ranging between 86-89%.

LIPIDS ANTIBACTERIAL SCREENING

Axenic cultures of the new species *Toxopsis calypsus* (belonging to Nostocales, an order including taxa with intense antibacterial and antifungal activity) and *Phormidium melanochrouron* (a species showing antifungal activity in cultures), were selected for screening their antibacterial activity against 8 species of bacteria (Gram⁺) and (Gram⁻).

The total lipids (TL) were extracted from cell suspensions using the method Bligh and Dyer and then separated into polar [PL] and neutral (NL). The PL were further fractioned by Thin Layer Chromatography (TLC) and the bands of PL as well as TL and NL were screened for antibacterial activity using the methods of agar well diffusion assay and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by broth microdilution method as recommended by CLSI. Both *Toxopsis calypsus* and *Phormidium melanochrouron* showed antibacterial effect against the Gram⁺ bacteria: *Staphylococcus aureus* (NCTC 6571), *Staphylococcus aureus* (MRSA 1629), *Staphylococcus aureus* (MSSA 1646), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Enterococcus faecalis* (VRE 880), and *Enterococcus faecium* (VRE 1291). On the contrary, negative antibacterial effect was recorded against the Gram⁻ bacteria *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), owing to their resistant cell wall. It is worth noticing that a fraction of PL of *Phormidium melanochrouron* shows effect against methanol.

The results concerning biological activity of the antimicrobial lipids showed a better reaction of *Toxopsis calypsus* in comparison to *Phormidium melanochrouron*. Most fractions of polar lipids showed antibacterial effect against the Gram⁺ enterococci, whereas there was no effect against Gram⁻ bacteria.

SUMMARY OF THE MAIN RESULTS

- Identification of a total of 156 taxa, 39 genera, 115 species
 - Establishment of two new monospecific genera (*Iphinoe spelaebios*, *Toxopsis calypsus*)
 - Description of one new species (*Phormidium melanochroun*)
 - Finding of 49 taxa as new records from Greece
 - Finding of 8 taxa representing the 2nd record worldwide
 - Distinct differentiation of the caves in terms of the cyanobacterial communities
 - Variations in species composition could be attributed to abiotic factors such as cave morphology, water availability, type and coherence of the substratum.
 - Both taxa *Toxopsis calypsus* and *Phormidium melanochroun* showed antibacterial activity against Gram⁺ bacteria –None of them showed activity against Gram⁻ bacteria –In *Phormidium melanochroun* one band of polar lipids showed activity against methanol –*Toxopsis calypsus* showed better antibacterial activity.
-

6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Abarzua, S., Jakubowski, S., Eckert, S. & Fuchs, P. (1999).** Biotechnological investigation for the prevention of marine biofouling II. Blue-green algae as potential producers of biogenic agents for the growth inhibition of microfouling organisms. *Botanica Marina* **42**: 459–465.
2. **Abdelahad, N. (1989).** On four *Myxosarcina*-like species (Cyanophyta) living in the Inferniglio cave (Italy). *Algological Studies* **54**: 3-13.
3. **Abdelahad, N. & Bazzichelli, G. (1988).** *Geitleria calcrea* Friedmann, Cyanophycée cavernicole nouvelle pour l'Italie. *Nova Hedwigia* **46**: 265-270.
4. **Abdullin, S.R. (2009).** Cyanobacterial- Algal Cenoses of the Shulgan – Tash Cave, Southern Urals. *Russian Journal of Ecology* **40**: 301-303
5. **Abed, R.M.M., Dobretsov, S. & Sudesh, K. (2009).** Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology* **106**: 1-12.
6. **Aboal, M., Asencio, A. & Lopez-Jimenez, E. (2003).** Morphological, ultrastructural and ecological study of *Asterocapsa divina* Komarek (Chroococcaceae, Cyanobacteria) from a cave of Southeastern Spain. *Algological Studies* **107**: 57-65.
7. **Acinas, A., Marcelino, L., Klepac-Ceraj, V. & Polz, M. (2004).** Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple *rrn* Operons. *Journal of Bacteriology* **186**: 2629-2635.
8. **Adetutu, E.M., Thorpe, K., Shahsavari, E., Bourne, S., Cao, X., Fard R.M.N, Kirby, G. & Ball, A.S. (2012).** Bacterial community survey of sediments at Naracoorte Caves, Australia. *International Journal of Speleology* **41**: 137-147.
9. **Albertano, P. & Bellezza, S. (2001).** Cytochemistry of cyanobacterial exopolymers in biofilms from Roman hypogea. *Nova Hedwigia* **123**: 501–518.
10. **Albertano, P., Moscone, D., Palleschi, G., Hermosín, B., Saiz-Jimenez, C., Sanchez-Moral, S., Hernández- Mariné, M., Urzi, C., Groth, I., Shroeckh, V., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Graziottin, F., Gallon, J.R., Bisconti, F. & Giuliani, R. (2003).** Cyanobacteria attack rocks (CATS): control and preventive strategies to avoid damage caused by cyanobacteria and associated microorganisms in Roman hypogean monuments. In: Saiz-Jimenez C. (ed.), *Molecular Biology and Cultural Heritage*. Lisse, Balkema, pp. 151–162.
11. **Albertano, P. (2012).** Cyanobacterial Biofilms in Monuments and Caves. In: Whitton, B.A. (ed.), *Ecology of Cyanobacteria II*, New York: Springer. pp. 317-343.
12. **Allen, M.M. (1984).** Cyanobacterial cell inclusion. *Annual Review of Microbiology* **38**: 1-25.
13. **Álvarez Cobelas, M. (1982).** Las algas de una charca ganadera temporal: su sucesión en relación con los factores ambientales *Collectanea Botanica* **13**: 709-722.
14. **Alvarez-Cobelas, M. & Gallardo, T. (1988).** Catálogo de las algas continentales españolas V. Cyanophyceae Schaffner 1909. *Acta Botanica Malacitana* **13**: 53-7

15. **Anagnostidis, K., Economou- Amilli, A. & Roussomoustakaki, M. (1983).** Epilithic and chasmolithic microflora (Cyanophyta, Bacillariophyta) from marble of the Parthenon Akropolis, Athens, Greece. *Nova Hedwigia* **38**: 227-275.
16. **Anagnostidis, K. & Komárek, J. (1985).** Modern approach to the classification system of cyanophytes 1-Introduction. *Algological Studies* **38/39**: 291-302.
17. **Anagnostidis, K. & Komárek, J. (1988).** Modern Approach to the classification system. 3- Oscillatoriales. *Algological Studies* **50/53**: 327-472.
18. **Anagnostidis, K. & Komárek, J. (1990).** Modern approach to the classification system of Cyanophytes. 5-Stigonematales. *Algological Studies* **59**: 1-73.
19. **Anagnostidis, K. & Pantazidou, A. (1991).** Marine and aerophytic *Cyanosarcina*, *Stanieria* and *Pseudocapsa* (Chroococcales) species from Hellas (Greece). *Algological Studies* **92**: 141-157.
20. **Anagnostidis, K., Economou-Amili, A. & Pantazidou, A. (1982).** Studies on the microflora of the cave Perama, Ioannina, Greece. *Bulletin de la Société Spéléologique de Grèce* **18**: 459-530.
21. **Antonopoulou, S., Oikonomou, A., Karantonis, Z., Fragopoulou, E. & Pantazidou A., (2002).** Isolation and structural elucidation of biologically active phospholipids from *Scytonema julianum* (Cyanobacteria). *Biochemistry Journal* **367**: 287-293.
22. **Antonopoulou, S., Nomikos, T., Oikonomou, A., Kyriakou, A., Andriotis, M., Fragopoulou, E. & Pantazidou, A. (2005a).** Characterization of bioactive glycolipids from *Scytonema julianum* (Cyanobacteria). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **140**: 219-231.
23. **Antonopoulou, S., Karantonis, Z., Nomikos, T., Oikonomou, A., Fragopoulou, E. & Pantazidou A. (2000b).** Bioactive polar lipids from *Chroococciopsis* sp. (Cyanobacteria). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **142**: 269-282.
24. **Ariño, X., Hernández-Mariné, M. & Saiz-Jiménez, C. (1997).** Colonization of Roman tombs by calcifying cyanobacteria. *Phycologia* **36**: 366-373.
25. **Asencio, A. & Aboal, M. (1996).** Cyanophytes from Andragulla abrigo (Murcia, SE Spain) and their environmental conditions. *Algological Studies* **83**: 55-72.
26. **Asencio, A. & Aboal, M. (2000a).** Algae from Seretta cave (Murcia, SE Spain) and their environmental conditions. *Algological Studies* **69**: 59-78.
27. **Asencio, A. & Aboal, M. (2000b).** A contribution to knowledge of chasmoendolithic algae in cave-like environments. *Algological Studies* **98**: 133-151.
28. **Asencio A.D. & Aboal M. (2011).** In situ acetylene reduction activity of *Scytonema julianum* in Vapor cave (Spain). *International Journal of Speleology* **40**: 17- 21.
29. **Badger, M.R. & Price, G.D. (2003).** CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *Journal of Experimental Botany* **54**: 609–622.
30. **Barton, H.A. & Northup, D.E. (2007).** Geomicrobiology in cave environments: Past, Current and Future Perspectives. *Journal of Cave and Karst Studies* **69**: 163-178.

31. **Baskar, S., Baskar, R., Mauclaire, L. & McKenzie, J. A. (2005).** Role of microbial community in stalactite formation, Sahastradhara caves, Dehradun, India. *Current Science* **88**: 1305-1308.
 32. **Batters, E.A.L. (1902).** A catalogue of the British marine algae. *Journal of Botany, British and Foreign* **40**: 1-107.
 33. **Bergman, B., Gallon, J.R., Rai, A.N. & Stal, L.J. (1997).** N₂ fixation by non-heterocystous cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **19**: 139–185.
 34. **Beaumont, J. (1676).** Two letters concerning rock-plants and their growth. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **11**: 732-742.
 35. **Bhateja, P., Mathur, T., Pandya, M., Fatma, T. & Rattan, A. (2006).** Activity of blue- green microalgae extracts against *in vitro* generated *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Fitoterapia* **77**: 233–235.
 36. **Biondi, N., Piccardi, R., Margheri, M.C., Rodolfi, L., Smith, G.D. & Tredici, M.R. (2004).** Evaluation of *Nostoc* strain ATCC 53789 as a potential source of natural pesticides. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 3313–3320.
 37. **Bischoff, H.W. & Bold, H.C. (1963).** Phycological studies. IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. *University of Texas Publications* **6318**: 1-95.
 38. **Blair, R. (2003).** Karst landforms and lakes. *Boletin informativo de la commission de Geospeleologia* **40**: 11-19
 39. **Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959).** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911-917.
 40. **Bloor, S. & England, R.R. (1989).** Antibiotic production by the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *Journal of Applied Phycology* **1**: 367-372.
 41. **Bornet, E. & Flahault, C. (1889).** Sur quelques plantes vivant dans le test calcaire des Mollusques. *Bulletin de la Société. Botanique de France* **36**: 134-177.
 42. **Borowitzka, M.A. (1988).** Fats, oils and hydrocarbons. In: Borowitzka, M.A & Borowitzka, L.J (eds), *Microalgal Biotechnology*, Cambridge, pp. 257-287.
 43. **Borzi, A. (1917).** Studi sulle Mixoficee. *Nuovo Giornale Botanico Italiano* **24**: 100-112.
 44. **Bostock, P.D. & Holland, A.E. (2010).** Census of the Queensland Flora. pp. 1-320. Brisbane: Queensland Herbarium Biodiversity and Ecosystem Sciences, Department of Environment and Resource Management.
 45. **Bourelly, P. (1970).** Les algues d'eau douce. III : Les algues bleues et rouges. Les Euglè niens, Peridiniens et Cryptomonadines, Paris pp. 1–512.
 46. **Bourelly, P. & Dupuy, P. (1973).** Quelques stations françaises de *Geitleria calcarea*, Cyanophyceae cavernicole. *Schweizerische Zeitschrift für Hydrobiologie* **35**: 136-140.
 47. **Boyer, S. L., Flechtner, V. R. & Johansen, J. R. (2001).** Is the 16S-23S rRNA Internal Transcribed Spacer Region a Good Tool for Use in Molecular Systematics and Population Genetics? A Case Study in Cyanobacteria. *Molecular Biology and Evolution* **18**: 1057-1069.
-

48. **Brock, T.D. (1973).** Evolutionary and ecological aspects of the cyanophytes. In: Carr, N.G. & Whitton B.A. (eds), *The Biology of the Blue-Green Algae*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp.487-500.
 49. **Burja, A.M., Banaigs, B., Abou-Mansour, E., Burgess, J.G. & Wright, P.C. (2001).** Marine cyanobacteria – a prolific source of natural products. *Tetrahedron* **57**: 9347- 9377.
 50. **Cado, I. (1958).** Die endolythophyten an den Kliffen und unterwassersteinen des Ochridsees *Rec. Trav. Stat Ochrid*. **3**: 1-13.
 51. **Call, E.R. (1897).** Some notes on the flora and fauna of Mammoth Cave Kentucky. *American Naturalist* **31**: 322-392.
 52. **Calvo, S., Bárbara, I. & Cremades, J. (1999).** Benthic algae of salt-marshes (Corrubedo Natural Park, NW Spain): the flora. *Botanica Marina* **42**: 343-353.
 53. **Cañaveras, J.C., Sanchez-Morales, S., Soler, V. & Saiz-Jimenez, C. (2001).** Microorganisms and Microbially Induced Fabrics in Cave Walls. *Geomicrobiology Journal* **18**: 223–240.
 54. **Caraus, I. (2002).** The algae of Romania. *Studii si Cercetari, Universitatea Bacau, Biologie* **7**: 1-694.
 55. **Casamatta, D.A., Vis, M.L. & Sheath, R.G. (2003).** Cryptic species in cyanobacterial systematics: a case study of *Phormidium retzii* (Oscillatoriales) using RAPD molecular markers and 16S rDNA sequence data. *Aquatic Botany* **77**: 295-309.
 56. **Castenholz, R.W. (1992).** Species usage, concept, and evolution in the cyanobacteria (blue–green algae). *Journal of Phycology* **28**: 737–745.
 57. **Castenholz, R. W. (2001).** Phylum BX. Cyanobacteria. In: Boone D.R. & Castenholz R.W. (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 1, New York: Springer, pp. 473–487.
 58. **Castenholz, R.W. & Waterbury, J.B. (1989).** Group I. Cyanobacteria. In: Krieg, N. & Holt, J.G. (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore: Williams & Wilkins., pp. 1710–1728.
 59. **Chu, H. (1952).** Some new Myxophyceae from Szechwan province China. *Ohio Journal of Science* **21**: 96-101.
 60. **Cigna, A.A. (1978).** A classification of karstic phenomena. *International Journal of Speleology* **1**: 3-9.
 61. **Cigna, A.A. (1993).** Environmental management of tourist caves. *Environmental Geology* **21**: 173-180.
 62. **Cires-Rodriguez, E. & Cuesta-Moliner, C. (2010).** Checklist of benthic algae from the Asturias coast (North of Spain). *Bol. Cien. Nat. RIDEA* **51**: 135-212.
 63. **Claus, G. (1955).** Algae and their mode of life in the Baradla Cave of Aggtelek. *Acta Botanica Academiae Scientiarum Hungaricae* **2**: 1-26.
 64. **Claus, G. (1962a).** Beiträge zur Kenntnis der Algenflora der Abaligeter höhle. *Hydrobiologia* **19**: 192-222.
-

-
65. **Claus, G. (1962b)**. Data on ecology of the Algae of Peace Cave in Hungary. *Nova Hedwigia* **4**: 55-79.
66. **Claus, G. (1964)**. Algae and their life in the Baradla Cave. *International Journal of Speleology* **1**: 13-17.
67. **Coenye, T., Gevers, D., De Peer, Y.V., Vandamme, P. & Swings, J. (2005)**. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiology Reviews* **29**: 147-167.
68. **Cohan, F.M. (2001)**. Bacterial species and speciation. *Systematic Biology* **50**: 513- 524.
69. **Cohen, Y., Jørgensen, B.B., Revsbech, N.P. & Poplawski, R. (1986)**. Adaptation to hydrogen sulfide of oxygenic and anoxygenic photosynthesis among cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **51**: 398–407.
70. **Cohen, Z., Margheri, M.C. & Tomaselli, L. (1995)**. Chemotaxonomy of cyanobacteria. *Phytochemistry* **40**: 1155-1158.
71. **Collignon, B. (1992)**. La Spéléologie en Algérie. *Spelunca* **48**: 14–24.
72. **Colwell, R.R., Clayton, R.A., Ortiz-Conde, B.A., Jacobs, B. & Russek-Cohen, E. (1995)**. The microbial species concept and biodiversity. In: Allsopp, D., Colwell, R.R. & Hawksworth, D.L. (eds), *Microbial diversity and ecosystem function*. CAB International, Wallingford, UK. pp. 3–15.
73. **Cuezva, S., Sanchez-Moral, S., Saiz-Jimenez, C. & Canaveras, J.C., (2009)** - Microbial communities and associated mineral fabrics in Altamira cave, Spain. *International Journal of Speleology* **38**: 83-92.
74. **Cuzman, O.A. (2009)**. Biofilms on exposed monuments stones- mechanism of formation and development of new control methods – Dissertation, Universita de Bologna, pp. 1-124.
75. **Czerwik-Marcinkowska, J. & Mrozinska, T. (2011)**. Algae and Cyanobacteria in caves pf the Polish Jura. *Polish Botanical Journal* **56**, 203-243.
76. **Davies, W.E. (1959)**. Caverns of West Virginia: West Virginia Geological and Economic Survey 19A, pp.330
77. **Davies, W.E. (1960)**. Origin of caves in folded limestone. *National Speleological Society Bulletin* **22**: 5–18.
78. **Day, S.A., Wickham, R.P., Entwisle, T.J. & Tyler, P.A. (1995)**. Bibliographic check-list of non-marine algae in Australia. *Flora of Australia Supplementary Series* **4**: 270- 276.
79. **Deike, G.H. (1967)**. The development of caverns in the Mammoth Cave region- Dissertation, University Park, Pennsylvania State University, pp.235.
80. **DeRuyter, Y.A. & Fromme, P. (2008)**. Molecular structure of the photosynthetic apparatus. In: Herrero, A. & Flores, E. (eds), *The cyanobacteria molecular biology, genomics and evolution*. Caister Academic Press, Norfolk UK. pp. 217– 269.
81. **Desikachary, T.V. (1959)**. Cyanophyta.- I.C.A.R. Monographs on Algae New Delhi. pp. 686.
82. **Dobat, K. (1966)**. Zur Ökogenese und Ökologie der Lampenflora deutscher Schauhöhlen. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, pp. 177-215.
-

83. **Dor, I. & Dor, Y. (1999).** Cyanobacterial flora of the Soreq stalactite Cave (Israel) and way of its control. *Algological Studies* **94**: 115-120.
84. **Drouet, F. (1968).** Revision of the classification of Oscillatoriaceae. Monogr. Acad. Nat. Sci. Philadelphia, pp 370.
85. **Drouet, F. (1978).** Revision of the Nostocaceae with constricted trichomes. *Nova Hedwigia* **12**: 1-258.
86. **Eldredge, N., & Cracraft, J. (1980).** Phylogenetic Patterns and the Evolutionary Process. Columbia University Press, New York. Japanese edition, Soju Shobo, pp.349.
87. **Elenkin, A.A. (1936-1949).** Monographia Algarum Cyanophycearum aquidulcium et terrestrium in finibus URSS inventarum. I et II. I 684pp. II 1908pp, Izd. Akad. Nauk. SSR, Moskva-Lenigrad.
88. **Engel, A.S., Stern, L.A., & Bennett, P.C. (2004a).** Microbial contributions to cave formation: new insights into sulfuric acid speleogenesis. *Geology* **32**:369–372.
89. **Engel, A.S., Porter, M.L., Stern, L.A., Quinlan, S., & Bennett, P.C. (2004b)** Bacterial diversity and ecosystem function of filamentous microbial mats from aphotic (cave) sulfidic springs dominated by chemolithoautotrophic ‘*Epsilonproteobacteria*’. *FEMS Microbiology Ecology* **51**: 31–53.
90. **Ersanli, E. & Gönülol, A. (2006).** A study on the phytoplankton of Lake Simenit, Turkey. *Cryptogamie Algologie* **27**: 289-305.
91. **Fay, P. (1965).** Heterotrophy and Nitrogen Fixation in *Chlorogloea fritschii*. *Journal of General Microbiology* **39**: 11-20.
92. **Flechtner, V. R., Boyer, S. L., Johansen, J. & DeNoble, M. L. (2002).** *Spirirestris rafelensis* gen. et sp. nov. (Cyanophyceae), a new cyanobacterial genus from arid soils. *Nova Hedwigia* **74**: 1-24.
93. **Flemming, H.C. (1993).** Biofilms and environmental protection. *Water Science and Tecnology* **27**: 1-10.
94. **Forti, P. (1980).** Influenza della stratificazione nella geomorfologia Carsica (Studi sul Carso Triestino). Istituto di Geologia e Paleontologia de l' Universita di Trieste - N. 260.
95. **Forti, P. (2001).** Biogenic speleothems: An Overview. *International Journal of Speleology* **30**: 39-56.
96. **Fox, G. E., Wisotzkey, J.D. & Jurtschuk, P. (1992).** How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**: 166-170.
97. **Friedmann, I. (1955).** *Geitleria calcarea* n. gen. and n. sp. A new Atmophytic lime-incrusting blue-green alga. *Botaniska Notiser* **108**: 439-445.
98. **Friedmann, I. (1961).** *Chroococidiopsis kashaii* sp. n. and the genus *Chroococidiopsis*. Studies on vcave algae from Israel. *Osterreichische Botanische Zeit* **108**: 354-367.
99. **Friedmann, I. (1962).** The ecology of the atmophytic nitrate-alga *Chroococidiopsis kashaii* Friedmann. *Archives of Microbiology* **42**: 42-45.
-

100. **Fritsch, F.E. (1944)**. Present day classification of algae. *Botanical Review* **10**: 233-277.
 101. **Gademann, K. & Kobylinska, J. (2009)**. Antimalarial natural products of marine and freshwater origin. *The Chemical Record* **9**: 187-198.
 102. **Gademann, K. & Portmann, C. (2008)**. Secondary metabolites from cyanobacteria: complex structures and powerful bioactivities. *Current Organic Chemistry* **12**: 326–341.
 103. **Gantt, E., Lipschultz, C.A., Grabowski, J. & Zimmerman, B.K. (1979)**. Phycobilisomes from blue-green and red algae. Isolation criteria and dissociation characteristics. *Plant Physiology* **63**: 615–620.
 104. **Garbacki N., Ector, L., Kostikov, I. & Hoffmann, L. (1999)**. Contribution à l'étude de la flore des grottes de Belgique. *Belgian Journal of Botany*. **132**: 43-76.
 105. **Garcia-Pichel, F. (2008)**. Molecular Ecology and Environmental Genomics of Cyanobacteria. In: Herrero, A. & Flores, E. (eds.) *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution*. Caister Academic Press. pp. 59-87.
 106. **Garcia-Pichel, F. & Castenholz, R.W. (1991)**. Comparative anoxygenic photosynthetic capacity in 7 strains of a thermophilic cyanobacterium. *Archives of Microbiology* **153**: 344–351.
 107. **Gardner, N.L. (1927)**. New Myxophyceae from Porto Rico *Mem. New York Bot. Gard.* **7**: 1–144.
 108. **Geitler, L. (1925)**. Cyanophyceae. *Pascher's Süßwasserflora* **12**: 1-450.
 109. **Geitler, L. (1932)**. Cyanophyceae. In: Rabenhorst (ed), *Kryptogamenflora von Deutschland*, Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft, pp. 1196.
 110. **Giovannoni, S.J., Turner, S., Olsen, G.J., Barns, S., Lane, D.J. & Pace, N.R. (1988)**. Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *Journal of Bacteriology* **170**: 3584-3592.
 111. **Gold-Morgan, M., Montejano, G. & Komárek, J. (1994)**. Freshwater epiphytic cyanoprokaryotes from central Mexico 2. Heterogeneity of the genus *Xenococcus*. *Archive für Protistenkunde* **144**: 383-405.
 112. **Golubic, S. (1967)**. Algenvegetation der Felsen, eine ökologische Algenstudie im dinarischen Karstgebiet. In: E;ster, H.J. & Ohle, W. (eds.) *Die Binnengewässer*, Stuttgart, pp. 183.
 113. **Golubic, S. (1973)**. The relationship between blue-green algae and carbonate deposits. In: Carr, N. & Whitton, B.A. (eds.) *The Biology of Blue-green Algae*, Blackwell Scientific Publications, Oxford pp. 434-472.
 114. **Golubic, S. Krumbein, W. & Schneider, J. (1979)**. The carbon cycle. In: Trudinger, P.A. & Swaine, D.J., (eds.). *Biogeochemical Cycling of Mineral-Forming Elements*. *Stud. Environ. Sci.*, **3**: 29–45.
 115. **Golubic, S., Friedmann, I. & Schneider, J. (1981)** The lithobiontic ecological niche, with special reference to microorganisms. *Journal of Sedimentary Petrology* **51**: 475-478.
 116. **Gomont (1892)**. Monographie des Oscillariées (Nostocacees hormocystées). *Annales des Sciences Naturelles Botaniques Ser* **7**: 263-368.
-

117. **Graham, L.E., Graham, J.M. & Wilcox, L.W (2009).** Cyanobacteria In: Algae (2nd Edition). Pearson Education, San Francisco, CA pp. 720.
118. **Groth, I., Vettermann, R., Schütze, B., Schumann, P. & Saiz-Jimenez, C. (1999).** Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). *Journal of Microbiological Methods* **36**: 115-122.
119. **Gugger, M. & Hoffmann, L. (2004).** Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 349-357.
120. **Gugger, M., Lyra, C., Suominen, I., Tsitko, I., Humbert, J.F., Salkinoja-Salonen, M.S. & Sivonen, K. (2002).** Cellular fatty acids as chemotaxonomic markers of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Nostoc* and *Planktotrix* (cyanobacteria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 1007–1015.
121. **Hajdu, I. (1966).** Algological studies in the cave of Matyas Mount, Budapest, Hungary. *International Journal of Speleology* **2**: 137-149.
122. **Hansen, A.J., di Castri, F. & Naiman, R.J., (1988).** Ecotones: what and why? In: di Castri, F., Hansen, A.J., Holland, M.M. (eds.), A New Look at Ecotones. Biology International IUBS, Paris, France, Special Issue 17, pp. 9–46.
123. **Hansgirg, A. (1888).** Synopsis generum subgenerum que Myxophycearum (Cyanophycearum), hucusque cognitorum cum descriptione generis nov. *Dactylococcopsis. Notarisia* **3**: 548-590.
124. **Hernández-Mariné, M. & Canals, T. (1994).** *Herpyzonema pulverulentum* (Mastigocladaceae), a new cavernicolous atmophytic and lime-incrusted cyanophyte. *Algological Studies* **75**: 123-136.
125. **Hernández-Mariné, M., Roldán, M., Clavero, E., Canals, A. & Ariño, X. (2001).** Phototrophic biofilm morphology in dim light. The case of the Puigmoltó sinkhole. *Nova Hedwigia* **123**: 237-253.
126. **Hernández-Mariné, M., Clavero, E. & Roldán, M. (2003).** Why there is such luxurious growth in the hypogean environments. *Algological Studies* **109**: 229-239.
127. **Hoffmann, L. (1990).** Rediscovery of *Loriella osteophila* (Cyanophyceae). *British Phycological Journal* **25**: 391-395.
128. **Hoffmann, L. (2002).** Caves and other low-light environments: Aerophytic photoautotrophic microorganisms In: Bitton, G. (ed), Encyclopedia of environmental microbiology, New York: John Wiley & Sons, pp. 835-843.
129. **Hoffmann, L., Gugger, M. & Ascencio, A. (2003).** Morphological and molecular characterisation of a stigonematalean cyanobacterium isolated from Spanish cave. *Algological Studies* **109**: 259-265.
130. **Hoffmann, L., Komárek, J. & Kaštovský, J. (2005).** System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria)-state in 2004. *Algological Studies* **117**: 95-115.
-

-
131. **Hollerbach, M.M., Kosinskaja, E.K. & Poljanskij, V.J. (1953).** Sinezelenye vodorosli. (Blue-green algae). In. Opred. Presnov. Vodorol. SSRS 1, Sov. Nauka, Moskwa, pp.652.
132. **Houssman, D.C., Powers, H.H., Collins, A.D. & Belnap, J., (2006).** Carbon and nitrogen fixation differ between successional stages of biological soil crusts in the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert. *Journal of Arid Environments* **66**: 620-634.
133. **Howard, A. (1964).** Processes of limestone cave development. *International Journal of Speleology* **1**: 47-60.
134. **Hu, H. & Wei, Y. (2006).** The freshwater algae of China. Systematics, taxonomy and ecology. pp. [4 pls of 16 figs], [i-iv], i-xv, 1-1023.
135. **Iliopoulou-Georgoudaki, J., Pantazidou, A. & Theoulakis, P. (1993).** An Assessment of cleaning photoautotrophic microflora: The case of Perama cave, Ioannina Greece. *Memoires de Biospéologie* **20**: 117-120.
136. **Jacobsen, T.W. & Rarrand, W.A. (1988):** Franchi Cave and Paralia: Maps, Plans and Sections, Indiana Univ. pp. 40.
137. **Jacobshagen, V., Richter, D. & Makris, J. (1978).** Alpidic development of the Peloponnesus In: Closs, H., Roeder, D. & Schmidt, H. (eds.) Alps, Appennines, Hellenides: Stuttgart, E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung,, pp. 415-423.
138. **Jaiswal P., Kumar Singh P., Prasanna R. (2008).** Cyanobacteria bioactive molecules - an overview of their toxic properties. *Canadian Journal of Microbiology* **54**: 701-717
139. **Jansson, C. & Northen, T. (2010).** Calcifying cyanobacteria—the potential of biomineralization for carbon capture and storage. *Current Opinion in Biotechnology* **21**: 1-7.
140. **Johansen, J. & Casamatta, D.A. (2005).** Recognizing cyanobacterial diversity through adoption of a new species paradigm. *Algological Studies* **117**: 71-93.
141. **Jones, H.J. (1965).** Algological investigations in Mammoth cave, Kentucky. *International Journal of Speleology* **1**: 491-516.
142. **Jørgensen B.B., Revsbech, N.P., Blackburn, T.H. & Cohen, Y. (1983).** Photosynthesis and structure of benthic microbial mats: Micro-electrode and SEM studies of four cyanobacterial communities. *Limnology and Oceanography* **28**: 1075-1093.
143. **Karecha, P. Kasting, J. & Siefert, J. (2005).** A coupled atmosphere-ecosystem model of the early Archean Earth. *Geobiology* **3**: 53-76.
144. **Kenyon, C.N., Rippka, R. & Stanier, R.Y. (1972).** Fatty acid composition and physiological properties of some filamentous blue-green algae. *Archives of Microbiology* **83**: 216–236.
145. **Kim., Y.H., Choi, J.S., Yoo, J.S., Park, Y.M. & Kim, M.S. 1999.** Structural identification of glycerolipid molecular species isolated from cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 using fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **267**: 260–270.
146. **Knebel, W. von. (1906).** Höhlenkunde mit berücksichtigung der karstphänomene. Braunschweig: F. Vieweg und solm. pp.222.
-

147. **Knoll, A. (2008)**. Cyanobacteria and Earth History. In: Herrero, A. & Flores, E. (eds), The Cyanobacteria Molecular Biology, Genomics and Evolution. Caister Academic Press, UK, pp. 1-19.
 148. **Komárek, J. (2005)**. The modern Classification of Cyanoprokaryotes (Cyanobacteria). *Oceanological and Hydrobiological Studies* **34**: 5-17.
 149. **Komárek, J. (2006)**. Cyanobacterial Taxonomy: Current Problems and Prospects for the Integration of Traditional and Molecular Approaches. *Algae* **21**: 349-375.
 150. **Komárek, J. (2010)**. Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). *Hydrobiologia* **639**: 245-259.
 151. **Komárek, J. & Anagnostidis, K. (1986)**. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 2- Chroococcales. *Algological Studies* **74**: 157-226.
 152. **Komárek, J. & Anagnostidis, K. (1989)**. Modern approach to the classification system of Cyanophytes. 4-Nostocales. *Algological Studies* **56**: 247-345.
 153. **Komárek, J. & Anagnostidis, K. (1998)**. Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales. In: Ettl H., Gärtner G., Heynig H. & Mollenhauer D. (eds): Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1, Gustav Fischer, Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm, pp. 548.
 154. **Komárek, J. & Kastovsky, J. (2003)**. Coincidences of structural and molecular characters in evolutionary lines of cyanobacteria. *Algological Studies* **109**: 305-325.
 155. **Komárek, J. & Anagnostidis, K. (2005)**. Cyanoprokaryota 2. Teil/ 2nd Part: Oscillatoriales. In: Büdel B., Krienitz L., Gärtner G. & Schagerl M. (eds): Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2, Elsevier/Spektrum, Heidelberg, pp.759.
 156. **Komárek, J., Kaštovský, J., Ventura, S., Turicchia, S., Šmarda J. (2009)**: The cyanobacteria genus *Phormidesmis*. *Algological Studies* **129**: 41-59.
 157. **Komáromy, Z.P., Padisak, J., & Rajczy, M. (1985)**. Flora in the lamp-lit areas of the cave "Anna-Barlang" near Lillafüred (Hungary). *Annales Historico-naturales Musei Nationalis Hungarici* **77**: 103-112.
 158. **Kondratjeva, N.V. (1968)**. Cyanophyta in Vizn. Prsnov. Vodorost. Ukr. RSR 1,2 Kievo, pp. 524.
 159. **Kondratjeva, N.V. (1982)**. On difference of opinions of phycologists and bacteriologists concerning the nomenclature of Cyanophyta. *Arch. Protistenk.* **126**: 247-259.
 160. **Korelusová, J. (2008)**. Phylogeny of heterocytous Cyanobacteria (Nostocales and Stigonematales)- Dissertation, University of South Bohemia. pp. 30.
 161. **Kossinskaja, E.K. (1948)**. Opredeľit'le 'morskich sinezelenuch vodoroslej,. Izd. AN SSSR, Moskva-Lenigrad, pp.278.
 162. **Kreitlow, S., Mundt, S. & Lindequist, U. (1999)**. Cyanobacteria- a potential source of new biologically active substances. *Journal of Biotechnology* **70**: 61-63.
-

-
163. **Krumbein, W.E. (1983).** Stromatolites. The challenge of a term in space and time. *Precambrian Research* **20**: 493-531.
164. **Lämmermayr, L. (1912).** Die grüne Pflanzenwelt der Höhlen I. Teil. Denksch. Akad. Math. naturw. Kl. Band **87**: 325-364.
165. **Lämmermayr, L. (1914).** Die grüne Pflanzenwelt der Höhlen. I. Teil. Denksch. Akad. Math. naturw. Kl. Band **90**: 127-153.
166. **Lämmermayr, L. (1916).** Die grüne Pflanzenwelt der Höhlen. I. Teil. Denksch. Akad. Math. naturw. Kl. Band **92**: 325-364.
167. **Lämmermayr, L. (1918).** Die grüne Vegetation steirischer Höhlen. *Naturwissenschaftlicher Verein für Steiermark* **54**: 53-88.
168. **Lamprinou, V., Pantazidou, A., Papadogiannaki, G., Radea, C. & Economou-Amilli, A. (2009).** Cyanobacteria and associated invertebrates in Leontari cave. *Fottea* **9**: 155-164.
169. **Lamprinou, V., Hernández-Mariné, M., Canals, T., Kormas, K.A., Economou-Amilli, A. & Pantazidou, A. (2011).** Morphology and molecular evaluation of *Iphinoe spelaeobios* gen. nov., sp. nov. and *Loriellopsis cavernicola* gen. nov., sp. nov., two stigonematalean cyanobacteria from Greek and Spanish caves. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**: 2907-2915.
170. **Lamprinou, V., Danielidis, D.B., Economou-Amilli, A. & Pantazidou, A. (2012a).** Distribution survey of Cyanobacteria in three Greek caves of Peloponnese. *International Journal of Speleology* **41**: 267-272.
171. **Lamprinou, V., Skaraki, K., Kotoulas, G., Economou-Amilli, A. & Pantazidou, A. I. (2012b).** *Toxopsis calypsus* gen. nov., sp. nov. (Cyanobacteria, Nostocales) from cave 'Franchi', Peloponnese, Greece - morphological and molecular evaluation *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. doi:10.1099/IJS.0.038679-0IJSEM January 2012.
172. **Lamprinou, V., Hernández-Mariné, M., Pachiadaki, M.G., Kormas, K.A., Economou-Amilli, A. & Pantazidou, A. (2013).** New findings of the true branched monotypic genus *Iphinoe* (Cyanobacteria) from geographically isolated caves (Greece). *Fottea* (in press).
173. **Lamprinou, V., Skaraki, K., Kotoulas, G., Anagnostidis, K., Economou-Amilli, A. & Pantazidou, A. I.** A new species of Phormidium (Cyanobacteria, Oscillatoriales) from Greek caves-Morphological and Molecular evaluation. *Fundamental and Applied Limnology* (in press).
174. **Lane, D.J. (1991).** 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt, E. & Goodfellow, M., (eds.) *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, New York, pp. 115-175.
175. **Leclerc, J.C., Couté, A. & Dupuy, P. (1983).** Le climat annuel de deux grottes et d'une église du Poitou, où vivent des colonies pures d'algues sciaphiles. *Cryptogamie-Algologie* **4**: 1-19.
176. **Lederer, F. (2000).** *Asterocapsa aerophytica* (Cyanobacteria, Chroococcales), a new species from the Triglav National Park (Julian Alps, Slovenia). *Algological Studies* **99**: 23-28.
177. **Lee, R.E. (2008).** Phycology. 4th edition. Colorado State University, USA, .pp.560.
-

178. Lefèvre, M., Laporte, G.S. & Bauer, J. (1964). Sur les microorganismes envahissant les peintures supestres de la Grotte préhistorique de Lascaux. *Studies in Speleology* **258**: 5116-5118.
179. Lefèvre, M. & Laporte, G.S. (1969). The 'Maladie verte' of Lascaux. Diagnosis and treatment. *Studies in Speleology* **2**: 35-44.
180. Leghari, S.M., Khuhawar, M.Y., Jahangir, T.M. & Leghari, A. (2005). Limnological study of Pir Bukhari (Karsaz) and Manghopir warm springs, Karachi, Sindh, Pakistan. *International Journal of Phycology and Phycochemistry* **1**: 151-158.
181. Lemmermann, E. (1907-1910). Algen I. Krypt. Mark Brandenburg **3**: 1-256.
182. Li, R., Yokota, A., Sugiyama, J., Watanabe, M., Hiroki, M. & Watanabe, M.M. (1998). Chemotaxonomy of planktonic cyanobacteria based on non-polar and 3-hydroxy fatty acid composition. *Phycological Research* **46**: 21-28.
183. Liberton, M. & Pakrasi, H. (2008). Membrane Systems in Cyanobacteria, In: Herrero, A. Flores, E. (eds.), The cyanobacteria Molecular Biology, Genomics and Evolution, pp.271-288.
184. Liu, W., Marsh, T., Cheng, H. & Forney, I. (1997). Characterization of microbial diversity by teterming terminal restriction fragmant length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4516-4522.
185. Lokmer, A. (2007). Polyphasic Approach to the taxonomy of the selected Oscillatorian strains (Cyanobacteria)- Dissertation, University of South Bohemia Faculty of Biological Sciences Department of Botany, Budejovice, pp. 29.
186. Marquardt, J. & Palinska, K. (2007). Genotypic and phenotypic diversity of cyanobacteria assigned to the genus *Phormidium* (Oscillatoriales) from different habitats and geographical sites. *Archives of Microbiology* **187**: 397-413.
187. Martinez, A. & Asencio, A. (2010). Distribution of Cyanobacteria at the Gelada cave (Spain) by physical parameters. *Journal of Cave and Karst Studies* **72**: 11-20.
188. Mayr, E. (1942). Systematics and the Origin of Species. New York: Columbia University Press, pp.120.
189. Mishler B.D., Theriot E.C. (2000). The phylogenetic species concept (sensu Mishler and Theriot): monophyly, apomorphy, and phylogenetic species concepts. In: Wheeler Q.D., Meier R., (eds.) Species concepts and phylogenetic theory. New York: Columbia University Press, p. 44-54.
190. Mulec, J., Kosi, G. & Vrhovsek, D. (2007) . Algae promote growth of stalagmites and stalactites in karst caves (Skocjanske Jame, Slovenia). *Carbonates and Evaporates* **22**: 6-9.
191. Mulek, J. (2008). Microorganisms in Hypogeon: Examples from Slovenian Karst Caves. *Acta Carsologica* **37**: 153-160.
192. Mulek, J. & Kosi, G. (2008). Algae in the aerophytic habitat of Racise ponikve cave (Slovenia). *Natura Sloveniae* **10**: 39-49.
-

-
193. **Mulek, J. & Kosi, G. (2009)**. Lampenflora algae and methods of growth control. *Journal of Cave and Karst Studies* **71**: 109-115.
194. **Murata, N. & Nischida, I. (1987)**. Lipids of blue green algae (Cyanobacteria) .In: Stumpf,P.K. (eds) *The Biochemistry of Plants*, Vol 9. Academic Press, Orlando, FL, pp. 315-347.
195. **Murata, N., Wada, H. & Gombos, Z. (1992)**. Modes of fatty-acid desaturation in cyanobacteria. *Plant Cell Physiology* **33**: 933-941.
196. **Nägeli, C. (1849)**. Gattungen einzelliger Algen, physiologisch und systematisch bearbeitet. *Neue Denkschriften der Allg. Schweizerischen Gesellschaft für die Gesamten Naturwissenschaften* 10(7): i-viii, 1-139, pls I-VIII.
197. **National Committee for Clinical Laboratory Standards, (2009)**. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically; Approved Standard –Eighth Edition, Wayne, PA, USA. **29**: 1-65.
198. **Nübel, U., Garcia-Pichel, F. & Muyzer, G. (1997)**. PCR Primers To Amplify 16S rRNA Genes from Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3327-3332.
199. **Othes, S. & Pire, R. (2001)**. Fatty acid composition of Chlorella and Spirulina microalgae species. *Journal of AOAC International* **84**: 1708-1714.
200. **Pace, N.R. (1997)**. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**: 734–740.
201. **Padan, E. & Cohen, Y. (1982)**. Anoxygenic Photosynthesis. – In: Carr, N.G. & Whitton, B.A. (eds), *The Biology of Cyanobacteria*, Blackwell , Scientific Publications, Oxford, pp. 215–236.
202. **Palik, V. (1960a)**. Über die Algenwelt der Höhlen. *Hidrol. Közl.* **40**: 417-422.
203. **Palik, V. (1960b)**. A new blue green Alga from the Cave Baradla near Aggtelek. *Ann Univ. Sci. Budapest R.Eötvös* **3**: 257-285.
204. **Palmer, A.N. (1991)**. Origin and morphology of limestone caves. *Geological Society of America Bulletin* **103**: 1-21.
205. **Palmer, A.N. (2007)**. Cave geology and speleogenesis over the past 65 years: role of the National Speleological Society in advancing the science. *Journal of Cave and Karst Studies* **69**: 3–12.
206. **Pantazidou, A. (1996)**. Cyanophytes (Cyanobacteria) in lighted parts of various Greek caves - Problems associated with their growth. *Algological Studies* **83**: 455- 456.
207. **Pantazidou, A. (1997)**. Cyanobacteria growths on the 5th century BC sculptures and inscription on the limestone walls of cave Nympholypton Greece. In: Koutsoukos P.G., Kontoyiannis C.G. (eds.) (selected paper of the 7th Eurocare-Euromarble Workshop ICE/HT-FORTH, Patras), pp. 153-157.
208. **Pantazidou, A. & Roussomoustakaki, M. (2005)**. Biodiversity and ecology of cyanobacteria in a variety of hypogean ecosystems (Greece). *Proc. of the 14th International Congress of Speleology*, pp. 624-628.
-

209. **Pantazidou, A., Lamprinou, V. & Oikonomou, A. (2012).** Cyanobacteria associated with ancient sculptures and the abiotic parameters of cave Nympholeptos, in Geece. Proc. of the 5th Congress of Greek Archaeometry, pp. 255-265.
210. **Patterson, G.M.L., Larsen, L.K. & Moore, R.E. (1994).** Bioactive natural products from blue-green algae. *Journal of Applied Phycology* **6**: 151–157.
211. **Pentecost, A. & Whitton, B.A. (2000).** Limestones. In: Whitton (ed), *The Ecology of Cyanobacteria*, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 257-279
212. **Plavsic, M., Terzic, S., Ahel, M. & Van den Berg, C.M.G. (2004)** Folic acid in coastal waters of the Adriatic Sea. *Marine and Freshwater Research* **53**: 1245–1252.
213. **Pouličkova, A. & Hašler, P. (2007).** Aerophytic diatoms from caves in central Moravia (Czech Republic). *Preslia* **79**: 185-204.
214. **Quinn, P.J. (2010).** Membranes as targets of antimicrobial lipids. In: Thormar, H. (ed.) *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents* Wiley, Chichester pp.1-24.
215. **Rajeev, K.J. & Xu, Z. (2004).** Biomedical compounds from marine organisms. *Marine Drugs* **2**: 123–146.
216. **Ramadan, M.F., Asker, M.M.S & Ibrahim, Z.K. (2008).** Functional bioactive compounds and biological activities of *Spirulina platensis* lipids. *Czech Journal of Food Science* **26**: 211-222.
217. **Ramírez, M., Hernández-Mariné, M. & Roldán, M. (2009).** Photosynthetic biofilms on cultural heritage: the archaeological site of Palenque, México. *Algas, Bol. Soc. Esp. Ficología* **42**: 21.
218. **Reynolds, E.S. (1963).** The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **17**:208-212.
219. **Řezanka, T., Viden, I., Go, J.V., Dembitsky, V.M. (2003)** Polar lipids and fatty acids of three wild cyanobacterial strains of the genus *Chroococcidiopsis*. *Folia Microbiologica* **48**: 781-786.
220. **Riding, R. (2009).** An atmospheric stimulus for cyanobacterial bioinduced calcification ca. 350 million years ago? *Palaios*, **24**: 685–696.
221. **Rippka, R. (1988).** Recognition and identification of cyanobacteria. *Methods Enzymology* **167**: 28–67.
222. **Rippka, R., DeReuelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. & Stanier, R. Y. (1979).** Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* **111**: 1–61.
223. **Roldán, M. & Hernández-Mariné, M. (2009).** Exploring the secrets of the three-dimensional architecture of phototrophic biofilms in caves. *International Journal of Speleology* **38**: 41-53.
224. **Roldán, M., Clavero, E., Canals, T., Gómez-Bolea, A., Ariño, X. & Hernández-Mariné, M. (2004).** Distribution of phototrophic biofilms in cavities (Garraf, Spain). *Nova Hedwigia* **78**: 329-351.
225. **Rudi, K., Skulberg, O.M. & Jakobsen, K.S. (1998).** Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phylogenetically related strains. *Journal of Bacteriology* **180**: 3453–3461.
-

-
226. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T. Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988). 'Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase'. *Science* **239**: 487-91.
227. Sant'Anna, C., Branco, L. & Silva, S. (1991). A new species of *Gloeotheca* (Cyanophyceae, Microcystaceae) from São Paulo State, Brazil. *Algological Studies* **92**: 1-5.
228. Schirrmeister, B., Antonelli, A. & Bagheri, H. (2011). The origin of multicellularity in cyanobacteria. *BMC Evolutionary Biology* **11**: 1-21.
229. Schneider, J. & Le Campion-Alsumard, T. (1999). Construction and destruction of carbonates by marine and freshwater cyanobacteria. *European Journal of Phycology* **34**: 417-426.
230. Schopf, J.W. (1993). Microfossils of the early Archean Apex: new evidence of the antiquity of life. *Science* **260**: 640-646.
231. Schopf, J.W. & Walter, M.R. (1982). Origin and early evolution of cyanobacteria: The geological evidence. In: Carr, N.G. & Whitton, B.A. (eds). *The Biology of Cyanobacteria*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, pp. 543- 564.
232. Seo, P.S. & Yokota, A. (2003). The phylogenetic relationships of cyanobacteria inferred from 16S rRNA, *gyrB*, *rpoC1* and *rpoD1* gene sequences. *Journal of General and Applied Microbiology* **49**: 191-203.
233. Seoane-Camba, J. (1965). Estudios sobre las algas bentónicas en la costa sur de la Península Ibérica (litoral de Cádiz). *Investigacion Pesquera* **29**: 3-216.
234. Şerbănescu, V. & Decu, M. (1962). To the knowledge of cavernicolous algae of Oltenia. *Revue de Biologie. Revue de Biologie* **7**: 201-214.
235. Sheath, R.G. & Cole, K.M. (1992). Biogeography of stream macroalgae in North America. *Journal of Phycology* **28**: 448-460.
236. Sherwood, A.R. (2004). Bibliographic checklist of the nonmarine algae of the Hawaiian Islands. Records of the Hawaii Biological Survey for 2003. *Bishop Museum Occasional Papers* **80**: 1-26.
237. Shimizu, Y. (2003). Microalgal metabolites. *Current Opinion in Microbiology* **6**: 236–243.
238. Shiveley, J.M. (1974). Inclusion bodies of procaryotes. *Annual Review of Microbiology* **28**: 167-187.
239. Silva, P.C., Basson, P.W. & Moe, R.L. (1996). Catalogue of the benthic marine algae of the Indian Ocean. *University of California Publications in Botany* **79**: 1-1259.
240. Singh, S.C, Sinha, R.P. & Hader, D.P. (2002). Role of Lipids and Fatty Acids in Stress Tolerance in Cyanobacteria. *Acta Protozoologica* **41**: 297-308.
241. Singh, R.K., Tiwari, S P., Rai, A.K. & Mohapatra, T.M. (2011). Cyanobacteria: An Emerging Source for Drug Discovery. *ChemInform* **42**: 401-412.
242. Skuja, H. (1948). Taxonomie des Phytoplanktons einiger Seen in Uppland, Schweden *Symbolae Botanicae Upsalienses* **9**: 1-399.
-

243. **Skuja, H. (1970).** Alghe cavernicole nelle zone illuminate delle grotte di Castellana (Murge di Bari). *Le Grotte d'Italia* **4**: 193-202.
244. **Šmarda J., Šmajš D., Komrska J. & Krzyžánek, V. (2002).** S-layers on cell walls of cyanobacteria. *Micron* **33**: 257-277.
245. **Smith, T. & Olson, R. (2007).** A Taxonomic Survey of Lamp Flora (Algae and Cyanobacteria) in Electrically Lit Passages within Mammoth Cave National Park, Kentucky. *International Journal of Speleology* **36**: 105-114.
246. **Stackebrandt, E. & Goebel, B.M. (1994).** Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**: 846-849.
247. **Stal, L. (2000).** Cyanobacterial mats and Stromatolites. In: Whitton & Potts (eds.), *The Ecology of Cyanobacteria 2000* Kluwer Academic Publishers Netherlands, pp. 61-120.
248. **Stal, L. (2007).** Diversity and Versatility, Clues to Life in Extreme Environments In: Seckbach, J. (ed.), *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*, Springer, pp. 659–680.
249. **Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, R. & Cohen-Bazire, G. (1971).** Purification and properties of unicellular blue green algae (Order Chroococcales). *Bacteriological Reviews* **35**: 171-205.
250. **Starmach, K. (1966).** Cyanophyta-Gaucophyta (Sinice-Glaucophyty). In: *Flora Slodkowodna Polski*, 2, Polska akad. Nauk. Warszawa, pp. 807.
251. **Swingley, W.D., Blankenship, R.E. & Raymond, J. (2008).** Integrating Markov Clustering and Molecular Phylogenetics to Reconstruct the Cyanobacterial Species Tree from Conserved Protein Families. *Molecular Biology and Evolution* **25**: 643-654.
252. **Tan, L.T. (2007).** Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. *Phytochemistry* **68**: 954-979.
253. **Taton, A., Grubisic, S., Brambilla, E., De Wit, R. & Wilmotte, A. (2003).** Cyanobacterial Diversity in Natural and Artificial Microbial Mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a Morphological and Molecular Approach. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 5157-5169.
254. **Taylor, W.R. (1928).** The marine algae of Florida with special reference to the Dry Tortugas. *Publications of the Carnegie Institution of Washington* **379**: 219.
255. **Thuret, G.A. (1875).** Essay de classification des Nostochinées. *Annales of Sciences Naturelles Botaniques* **1**:372–382.
256. **Tiwari, S.P., Rai, A.K. & Mohapatra, T.M. (2011).** Cyanobacteria: An emerging source for drug discovery. *Cheminform* **42**: 401-412.
257. **Tomaselli, L., Lamenti, G., Bosco, M. & Tiano, P. (2000).** Biodiversity of photosynthetic micro-organisms dwelling on stone monuments. *International journal of Biodeterioration and Biodegradation* **46**: 251-258.
-

-
258. **Turicchia, S., Ventura, S., Komárková, J. & Komárek, J. (2009).** Taxonomic evaluation of cyanobacterial microflora from alkaline marshes of northern Belize. 2. Diversity of oscillatorialean genera. *Nova Hedwigia* **89**: 165–200.
259. **Turner, S. (1997).** Molecular systematics of oxygenic photosynthetic bacteria. *Plant Syst Evol Suppl* **11**: 13–52.
260. **Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P. & Palmer, J.D. (1999).** Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **46**: 327–338.
261. **Van Den Hoek, C., Mann, D.G. & Jahns, H.M. (1995).** *Algae, An introduction to phycology.* Cambridge University Press, pp.614.
262. **Vinogradova, O. N., Kovalenko, O. V., Wasser, S.P., Nevo, E. & Weinstein-Evron, M. (1998).** Species diversity gradient to darkness stress in blue-green algae/cyanobacteria: microscale test in a prehistoric cave, Mount Carmel, Israel. *Israel Journal of Plant Sciences* **46**: 229-238.
263. **Vinogradova, O.M., Wasser, S.P. & Nevo, E. (2000).** Cyanoprocaryota. In: Nevo, E. & Wasser, S.P. (eds), Biodiversity of cyanoprocaryotes, algae and fungi of Israel. Cyanoprocaryotes and algae of continental Israel. pp. 32-141.
264. **Wahl, M. (1998).** Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Marine Ecology Progress Series* **58**:1 -2.
265. **Walsby, E. & Booker, M.J. (1980).** Changes in buoyancy of a planktonic blue-green alga in response to light intensity. *British Phycological Journal* **15**: 311-319.
266. **Wang, C.C., Chan, D.C., Leder, P. (1997).** The mouse formin (*Fmn*) gene: genomic structure, novel exons, and genetic mapping. *Genomics* **39**: 303–311.
267. **Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A., Kandler, O., Krichevsky, M.I, Moore, L.H, Moore, W.E., Murray, R.G., Stackebrandt, E., Starr, M.P., & Truper, H.G. (1987).** Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**: 463-464.
268. **Werner, V.R. (2010).** Cyanophyceae. In: Forzza, R.C. (eds), *Catálogo de plantas e fungos do Brasil*. Vol. 1. pp. 356-366.
269. **Wheeler, Q.D. & Platnick, N.I. (2000).** The phylogenetic species concept (*sensu* Wheeler and Platnick). In :Wheeler, Q. D. & R. Meier, (eds.), *Species Concepts and Phylogenetic Theory: a Debate* Columbia University Press. New York, pp. 55–69.
270. **Whitton, B.A., John, D.M., Johnson, L.R., Boulton, P.N.G., Kelly, M.G. & Haworth, E.Y. (1998).** A coded list of freshwater algae of the British Isles. LOIS Publication number 222. pp. 1-274.
271. **Whitton, B. A. & Potts, M. (2000).** *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space.* Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, pp. 669.
-

272. **Wilmotte, A. & Golubic, S. (1991).** Morphological and genetic criteria in the taxonomy of Cyanophyta/Cyanobacteria. *Algological Studies* **64**: 1-24.
273. **Woese, C.R., Kandler, O. & Wheelis, M.L. (1990).** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4576–4579.
274. **Zammit, G., Billi, D., Shubert, E., Kastovsky, J. & Albertano, P. (2011).** The biodiversity of subaerophytic phototrophic biofilms from Maltese hypogea. *Fottea* **11**: 187-201.
275. **Zehr, J.P., Mellon, M.T. & Hiorns, W.D. (1997).** Phylogeny of cyanobacterial *nifH* genes: evolutionary implications and potential applications to natural assemblages. *Microbiology* **143**: 1443–1450.
276. **Γιαννόπουλος, Β. (2000).** Συμβολή στη μελέτη σύγχρονων και παλαιών περιβαλλόντων των πλέον σημαντικών ελληνικών σπηλαίων- Διδακτορική Διατριβή, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Γεωλογίας. Αθήνα: ΕΚΠΑ, σελ.423.
277. **Καμπόλης, Ι. (2007).** Γεωμορφολογική μελέτη του υποθαλάσσιου καρστικού συστήματος του υπόγειου ποταμού «Δράκος», Μεσηνιακής Μάνης-Διπλωματική Εργασία, Τμήμα Γεωλογίας Αθήνα, ΕΚΠΑ, σελ. 148.
278. **Λελούδης, Ν. (2005).** Εξερευνώντας την υπόγεια Έλλαδα, Τα Σπήλαια - Μύθοι και Πραγματικότητα, Τόμος, σελ. 208.
279. **Ρουσσομουστακάκη, Μ. (1983).** Έρευνες επί κυανοφυκών εδάφους περιοχών της Εύβοιας. Ταξινομική, χλωριδική, φυτογεωγραφική, οικολογική μελέτη - Διδακτορική Διατριβή, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας. Αθήνα: ΕΚΠΑ, σελ. 304.
280. **Σαμψών, Α. (1997):** Το σπήλαιο των Λιμνών στα Καστριά Καλαβρύτων. Μια προϊστορική θέση στην ορεινή Πελοπόννησο, Αθήνα. Εταιρεία Πελοποννησιακών Σπουδών αρ. 7.σελ. 77-273.
-

