



## **ПРОГРАМА ЗА ПОДДРШКА НА МЛАДИ ЕКОЛОЗИ**

### **„Д-Р ЉУПЧО МЕЛОВСКИ“ 2021**

- ЗАВРШЕН ИЗВЕШТАЈ ЗА МАЛ ГРАНТ -

**Микроорганизми како индикатори за контаминација на минерални води од термални извори на Р.С.Македонија**

**Раководител: Огнен Бошковски**

**Извештај за периодот: 10.3.2022-15.12.2022**

**Датум на поднесување: 15.12.2022**



## 1. Резиме (на Македонски и Англиски).

### 1.1) Контекст / Context (до 50 збора)

Геотермалните и минералните извори се домаќини на високоспецијализирани животни форми и заслужуваат поголем научен и конзервациски интерес (Gorgieva et Popovski, 2007). Нивната долготрајна експлоатација довела до појава на антропогени микробни контаминанти (Edberg *et al.*, 1997) и ерозија на нативната микрофлора (Valverde *et al.*, 2012). Правилното управување со овие системи зависи од нивната соодветна валоризација.

Geothermal and mineral springs represent habitats with highly specialized life forms. As such they deserve scientific and conservation interest, not just because of these life forms, but as cultural treasure of Macedonia as well. Long-term exploitation lead to extensive anthropogenic influence, such as the occurrence of contaminants and erosion of native microflora. Without an examination of biodiversity and the degree of anthropogenic damage to date, these natural treasures are handicapped for establishing conservation efforts and are in an uncertain state of risk that must necessarily be evaluated.

### 1.2) Цел на истражувањето /Aims and research questions (до 50 збора)

- Главна хипотеза: Природните геотермални-минерални извори на различните локалитети имаат различна хетеротрофна и олиготрофна микрофлора.
  - Подхипотеза: Разликите во бројноста на присутната хетеротрофна и олиготрофна микрофлора зависат од антропогена активност.
  - Подхипотеза: Разликите во бројност на присутната хетеротрофна и олиготрофна микрофлора зависат од разликите во физичко-хемиските карактеристики на водите
- 
- Main hypothesis: Natural geothermal-mineral springs in different localities have different heterotrophic and oligotrophic microflora.
  - Sub-hypothesis: The differences in the abundance of the present heterotrophic and oligotrophic microflora depend on anthropogenic activity.
  - Sub-hypothesis: The differences in the number of the present heterotrophic and oligotrophic microflora depend on the differences in the physico-chemical characteristics of the waters.

### 1.3) Методологија / Methodology (до 50 збора)

- Физичко-хемиски параметри вклучувајќи температура, апсорбанца(610nm), Ph, спроводливост кои беа анализирани со инструментални методи.
- Контаминантите беа анализирани со стандардни ISO-методи (EN-ISO9308/1, 7899/2, 6222, 21527/1, 1626 и 6461/1)
- Еколошки значајните бактерии беа анализирани со селективни и диференцијални медиуми и техники. (Manaia *et al.*, 1990), подлоги (Panda *et al.*, 2013; Al-Garni *et al.*, 2014; El-Karkouri *et al.*, 2019; Senthilkumar *et al.*, 2021).
- Статичка обработка на податоците со ANOVA и изведување на микробиолошки индекси.
- Physico-chemical parameters including temperature, absorbance (610nm), pH and conductivity were analyzed by instrumental methods.
- Contaminants were analyzed using standard ISO methods (EN-ISO9308/1, 7899/2, 6222, 21527/1, 1626 and 6461/1)
- Ecologically important bacteria were analyzed by selective and differential media and techniques. (Manaia *et al.*, 1990), substrates (Al-Garni *et al.*, 2014; El-Karkouri *et al.*, 2019), (Panda *et al.*, 2013; Senthilkumar *et al.*, 2021).
- Static data processing with ANOVA and derivation of microbiological indices.

#### 1.4) *Најзначајни резултати / Results (до 100 збора)*

По целосно спроведување на анализите, констатирано беше дека нема преголема контаминација на изворите со исклучок на топлиот извор во Негорци каде беше детектирано присуство на колиформи и *Pseudomonas*. Од еколошко значајните групи на бактерии во сите извори беше детектирано присуство на актинобактерии, сулфуро-оксидирачки бактерии како и факултативни олиготрофи. Како најважни податоци кои што може да ги издвоиме од спроведените анализи е микробиолошкиот индекс FO/H<sup>1</sup> кој се користи како индикатор на трофичките нивоа во водните тела. Водите од Дебар покажаа најнизок индекс (0,33), а највисок во изворот во Проевце (40), што укажува дека Проевце е релативно најчистиот извор според микробиолошките анализи.

---

<sup>1</sup> Однос помеѓу број на факултативни олиготрофи и хетеротрофи, укажува на поголема или помала способност на самопочистување (автопурификација) на водениот екосистем.



After fully conducting the analyses, we found that there is no excessive contamination of the springs with the exception of the hot spring in Negorci where the presence of coliforms and *Pseudomonas* was detected. Among the ecologically significant groups of bacteria, the presence of actinobacteria, sulfur-oxidizing bacteria and facultative oligotrophs was detected in all sources. The most important data that can be extracted from the conducted analyzes is the microbiological index FO/H, which is used as an indicator that shows the trophic levels in water bodies. It was lowest in the samples from Debar (0.33), and highest from the source in Proevce (40), which indicates that Proevce is relatively the cleanest source according to microbiological analyses.

1.5) *Научен придонес / Contribution to science (до 50 збора)*

Резултатите од овој проект се први од ваков тип. Беше воочена статистичка зависност помеѓу кондуктивитетот, температурата, бројноста на Актинобактерии, Сулфур-оксидирачките бактерии и вкупната присутна микрофлора и FO/H ( $p < 0.01$ ). Исклучок беше забележан помеѓу кондуктивитетот и FO/H со незначајна зависност ( $p = 0.97$ ). Овие пионерни резултати можат да поттикнат и да помогнат во понатамошни истражувања.

All resulting assays were carried out in triplicate. ANOVA indicated a statistically significant correlation ( $p < 0.01$ ) between conductivity, temperature, number of Actinobacteria, Sulfur-oxidizing bacteria and total present microflora and FO/H. An exception was observed between conductivity and FO/H with an insignificant correlation ( $p = 0.97$ ). These are the first such results for waters from geothermal sources from N.Macedonia.

1.6) *Придонес кон зачувување и заштита / Conservation importance (до 50 збора)*

Само преку темелно истражување на микробниот биодиверзитет на природните богатства може да се воочи точниот состав на присутните микробни заедници, кои понатаму може да послужат како основа за покренување на дополнителни конзервациски напори за заштита на овие природни ресурси.

Only through a thorough investigation of the microbial biodiversity of natural resources can the exact composition of the present microbial communities be discerned, which can further serve as a basis for initiating additional conservation efforts to protect these natural resources.

2. Опишете ги планираните активности една по една и прогресот кој резултирал од истите.

Напредок низ бројки (100%)	Иницијално планирани активности	Постигнат напредок (реализирани активности)	Очекувани резултати	Постигнати резултати
<i>Активност 1: Анализа на бројноста на бактериската популација во минерални води од термални извори од претходни истражувања. (100 %)</i>	1.1 Преглед на подлоги и добавувачи 1.2 Преглед на техники	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Формирање на листа на добавувачи</li> <li>• Нарачка на потребни ресурси</li> <li>• Проверка на логистички можности</li> </ul>	1.1.1 Успешно спроведени анализи	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Валидизација на техники</li> <li>• Собирање на потребни материјали</li> </ul>
<i>Методологија за активност 1</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Дискусија за наведените трудови во точка 10 од формуларот.</li> <li>• Тимско усвојување на протоколот на работа за активност 2 и 3.</li> </ul>			
<i>Активност 2: Колекционирање на примероци (Теренска работа) (100 %)</i>	2.1 План за транспортација и колекционирање 2.2 Терени и колекционирање	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Координација на тимот и создавање временска рамка</li> <li>• Реализација на терените</li> <li>• Втора изворна точка Негорци (дополнителна активност)</li> </ul>	2.1.1 Спроведување на терени 2.1.2 Колекционирање на примероци	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Успешно спроведени терени и колекционирани анализи</li> </ul>
<i>Методологија за активност 2</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Дискусија и формирање консензус интерно во рамките на тимот</li> <li>• Колекционирањето ќе се одвива според EN ISO 19458:2006.</li> <li>• Мерењето на температурата на водата ќе се одвива со класичен термометар.</li> <li>• Координатите ќе се евидентираат преку Google Earth.</li> </ul>			

<p>Активност 3: Лабораториски анализи (100 %)</p>	<p>3.1 Физичко-хемиски параметри 3.2 Контаминанти 3.3 Останата микрофлора</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Анализе за рН, турбидиметрија, кондуктметрија и органолептички и анализи</li> <li>Анализе за колиформи, ентерококи, <i>Pseudomonas</i>, мезофили, психрофили, <i>Clostridium</i> spp. и <i>E. coli</i></li> <li>Анализе за сулфурни, хетеротрофи, факултативни олиготрофи, актинобактерии и <i>Bacillus</i> spp.</li> </ul>	<p>3.1 Очекуваме јасно дефинирани резултати кои би можеле подоцна статистички да ги обработиме</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Прикажани се резултати во сегментот 3</li> <li>Табелата од првата цел укажува на добиените податоци за физичко-хемиските параметри</li> <li>Табелата под втората цел укажува на податоците на контаминантите</li> <li>Табелата под третата цел се однесува на останатата микрофлора</li> </ul>
<p>Методологија за активност 3</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Мерење на рН вредност со рН метар</li> <li>Мерење на заматеност со турбидиметар</li> <li>Елекстропроводливост со потенциометар или амперметар</li> <li>Органолептички својства со сензорните органи на членовите на тимот</li> <li>ISO методи</li> <li>Изолација на селективна подлога за актинобактерии</li> <li>Изолација на <i>Bacillus</i> spp. со термички шок</li> <li>Вкупни хетеротрофи и олиготрофи со разредувања и со инокулација на неспецифичен медиум за бактерии</li> </ul>			
<p>Активност 4 : Анализа на резултати (100%)</p>	<p>4.1 Отчитување на резултати 4.2 Визуелизација на резултати</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Табеларно претставување на резултати</li> </ul>	<p>4.1 Јасни поврзаности помеѓу податоците</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Изработени графици и табели за полесен приказ на податоците во ANOVA.</li> </ul>
<p>Методологија за активност 4</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Употреба на стандарди за отчитување</li> <li>Употреба на литература за отчитување</li> <li>Потврда преку експертизата на менторот</li> <li>Изработка на графици и воочување генерални трендови на зависност на абиотски фактори и микробиота</li> <li>Изработка на персонални профили за испитаните извори.</li> </ul>			
<p>Активност 5 : Презентирање на наоди (100 %)</p>	<p>5.1 Учество на конгрес</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Учество на симпозиум на студенти биологи (ИДСБ)</li> </ul>	<p>5.1.1 Успешно презентирање 5.1.2</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Презентирано</li> <li>Објавено во атракт-книга</li> </ul>

			Објава во книга со апстракт и	
Методологија за активност 5	<ul style="list-style-type: none"> <li>Присуство на симпозиумот на ИДСБ во соработка со МЕД</li> </ul>			

### 3. Детален опис на резултатите

**Цел 1: Главна хипотеза: Природните геотермални-минерални извори на различните локалитети имаат различна хетеротрофна и олиготрофна микрофлора.**

Табела 1. Еколошки параметри

Извор	CFUs/ml					Микробиолошки индекси			
	Хетеротрофи	Ф.олиготрофи	<i>Bacillus</i>	Актинобактерии	Сулфурни	Т/Н	ФО/Н	Психро/Мезо	%Act
Проевце	1	40	0	47	15	41	40	27	45.6%
Негорци Ладна бања	660	3867	0	2220	641	6.86	5.86	0.03	30.0%
Негорци Топла бања	2347	3600	21	4147	1333	2.53	1.53	0.47	36.2%
Катланово	4307	7040	0	6007	760	2.63	1.63	0.02	33.2%
Дебар(Косоврасти)	12	4	7	15	414	1.33	0.33	0.67	3.3%
Кежовица	1	20	11	53	13	21	20	0.00	54.1%

#### Еколошки параметри

#### ЕКОЛОШКИ ПАРАМЕТРИ

Легенда: CFUs/ml означува единици кои формираат колонии на единица милилитар од испитаната течност.

Т/Н претставува индекс сооднос на бројот на вкупни бактерии и бројот на хетеротрофи. ФО/Н претставува индекс сооднос на бројот на факултативни олиготрофи и бројот на хетеротрофи. Психро/мезо претставува индекс сооднос на бројот на психрофили и бројот на мезофили. %Act ја означува процентуалната застапеност на актинобактерии. Сини полиња ги означуваат најниските вредности во рамките на испитаната варијабла, црвени полиња ги означуваат највисоките вредности за испитаната варијабла

Согласно горенаведените податоци, јасно беше констатирано дека различните локалитети имаат различна бројност на присутна микрофлора. Соодветно, микробиолошките индекси на испитани води се разликуваа. Статистичка споредба на варијацијата на овие параметри и на варијацијата на физичките параметри на водите укажа на јасна статистичка зависност, наведени во табелата подолу.

**Цел 2: Подхипотеза: Разликите во бројноста на присутната хетеротрофна и олиготрофна микрофлора зависат од антропогена активност.**

**Табела 2. Показатели на степенот на контаминација на водите**

Вода	CFUs/ml						
	<i>E.coli</i>	Coliform	<i>Pseudomonas</i>	<i>Enterococci</i>	<i>Clostridia</i>	Мезофили	Психрофили
Куманово	0	0	0	0	0	0	27
Негорци чешма	0	0	0	0	0	660	23
Негорци извор	0	3	10	0	0	2347	1107
Катланово	0	0	0	0	0	4307	77
Дебар	0	0	0	0	0	12	8
Кежовица	0	0	0	0	0	0	0

Легенда: CFUs/ml означува единици кои формираат колонии на единица милилитар од испитаната течност.  
Сини полиња ги означуваат најниските вредности во рамките на испитаната варијабла, црвени полиња ги означуваат највисоките вредности за испитаната варијабла

Согласно горенаведените податоци, јасно беше констатирано дека појстојат разлики во бројноста на контаминанти асоцирано со антропогена активност кај различните локалитети. При што, најголем број на контаминанти беа воочени кај примероците од Негорци Топла бања. Отсуство на контаминанти беше воочено во водите на Кежовица. Согласно правилникот за квалитет на вода на Р.С.М. и релевантната ставка опишана во апликацијата на проектот, микробиолошки исправи претставуваа само водите од Дебар, Куманово и Кежовица.

**Цел 3: Подхипотеза: Разликите во бројност на присутната хетеротрофна и олиготрофна микрофлора зависат од разликите во физико-хемиските карактеристики на водите.**

**Табела 3. Физичко хемиски и органолептички параметри**

Извор	Температура (C)	Abs 610	Спроводливост (mS/cm)	pH	Изглед	Мирис
Проевце	23	1	2.56	6.6	бистра	умерено сулфурен
Негорци Ладна бања	38	19.5	0.871	8	умерено матна	слабо сулфурен
Негорци Топла бања	41	15	0.838	8.3	умерено матна	слабо сулфурен
Катланово	40	6	2.76	6.7	бистра	умерено сулфурен
Дебар(Косоврасти)	48	70	4.93	6.4	матна	интензивно сулфурен
Кежовица	74	14	2.27	8.1	бистра	нема мирис
Физичко-хемиски параметри				Органолептички параметри		





Легенда: Abs610 означува апсорбанца на 610nm. Спрободливост е мерката на испитаната вода за спроведување електрична струја и е индикатор на стапката на органски и неоргански растворени материи со полнеж. Сини полиња ги означуваат најниските вредности во рамките на испитаната варијабла, црвени полиња ги означуваат највисоките вредности за испитаната варијабла

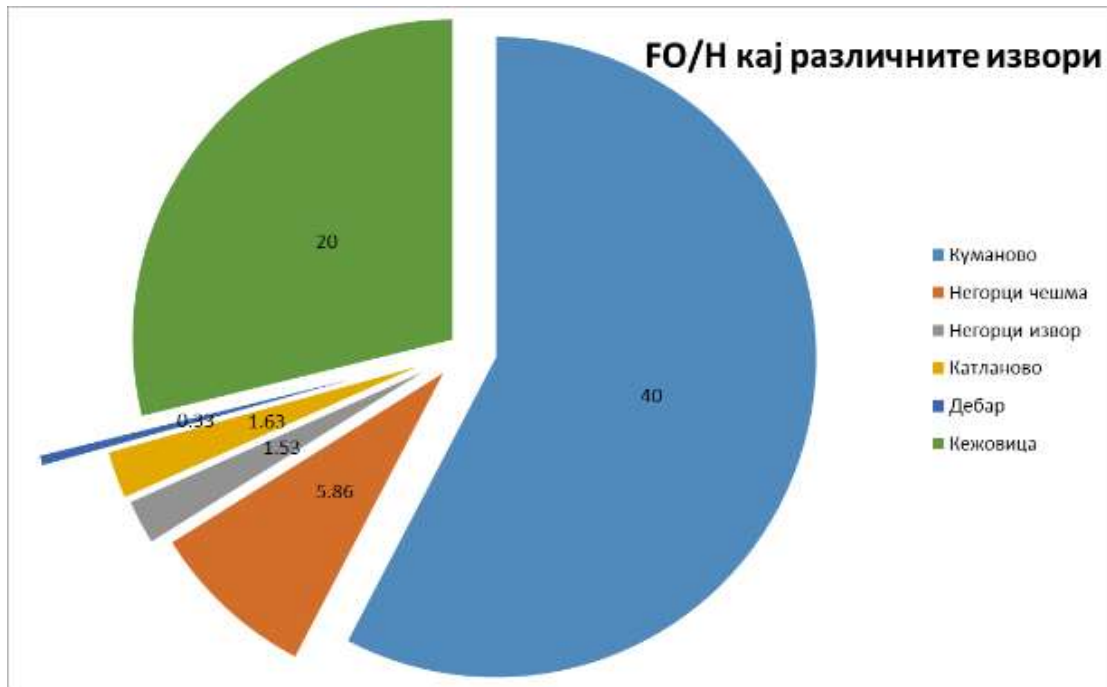
Согласно горенаведените податоци, беше констатирано дека различните води имаат различни физико-хемиски карактеристики. Најголема температура беше евидентирана кај примероците од Кежовица, при што водата беше бистра, без мирис, со релативно висока спроводливост и релативно алкален карактер. Компаративно примероците од Дебар покажаа најголема спроводливост, најголема матност и апсорбанца на 610nm, интензивно сулфурен мирис и најниска рН вредност. Овие наоди укажуваат на присуството на сулфати и/или сулфиди во примероците од Дебар, подржано од доминантниот удел на сулфур-оксидирачки бактерии во овие води.

Табела 4. Вредности добиени со ANOVA анализи

Р вредности	Кондуктивитет	Температура	Актинобактерии	Вк.број	Сулфурни бакт.	FO/H
Кондуктивитет		7.74477E-13	0.001346758	0.00069305	0.000162751	0.96800321
Температура	7.74477E-13		0.001631476	0.000741409	0.000428914	9.97691E-10
Актинобактерии	0.001346758	0.001631476			0.015370388	0.008410644
Вк.број	0.00069305	0.000741409				0.005225833
Сулфурни бакт.	0.000162751	0.000428914	0.015370388			0.001842409
FO/H	0.96800321	9.97691E-10	0.008410644	0.005225833	0.001842409	

Легенда - црвено поле означува ниска р вредност односно статистички незначајна поврзаност, сини полиња ги означуваат најниските р вредности за дадени две варијабли, односно прикажува кои две варијабли се статистички корелирани. Со црно се обележи полиња каде истиот параметар се пресекува и каде статистичката зависност од два микробиолошки параметри би предизвикало несоодветен аргумент за нивната корелација која не може да се заклучи без дополнителни испитувања за соодносите на нивните популации.

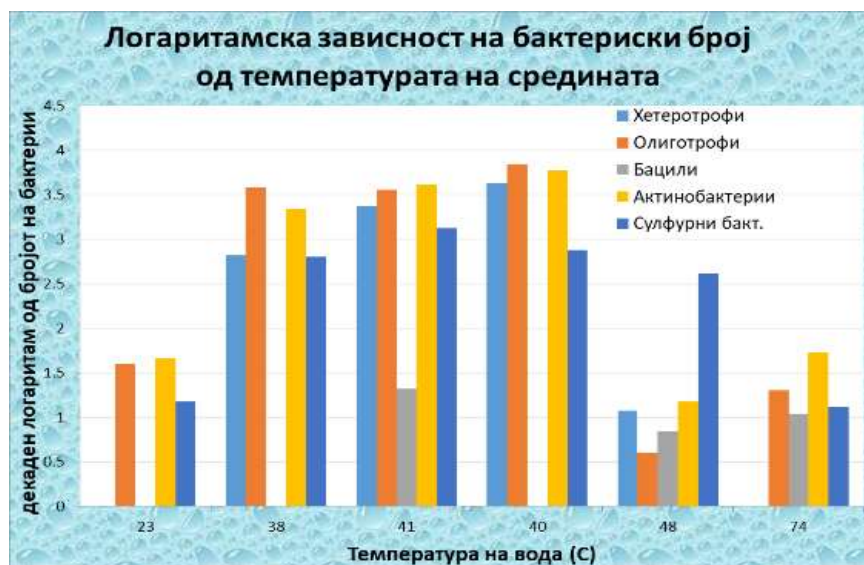
ANOVA анализи беа спроведени и укажаа дека најголема статистичка зависност постои меѓу бројноста на актинобактерии и кондуктивитетот на водата ( $p=0.0013$ ), со блиска зависност од температурата ( $p=0.0016$ ). Согласно ниската р вредност за зависноста на бројноста на актинобактерии и FO/H индексот, може да се претпостави дека актинобактерии претставуваат доминантниот удел во бројноста на факултативните олиготрофи во овие води.



Слика 1. Однос на факултативни олиготрофи и хетеротрофи во водите

Легенда: FO/H претставува индекс сооднос на бројот на факултативни олиготрофи и бројот на хетеротрофи

Согласно горенаведените податоци, јасно беше констатирано дека највисокиот индекс се воочи кај примероците од Куманово и Кежовица. Овој индекс претставува индикатор за присуството на органски материи во водата. Помали вредности укжуваат на позагадена вода со поголема стапка на органски материи.



Слика 2. Логаритамска зависност на бактериски број од температурата на средината



Согласно горенаведените податоци, јасно беше констатирано отсуството на *Bacillus spp.*, во примероците на 23, 38 и 40°C. Меѓутоа ова отсуство не може да се сведе на температурните разлики на средините со исклучување на останатите фактори на средината.

4. Кои беа главните предизвици и како ги надминавте?

Пристапот и локализацијата на самата точка на извирање на дел од изворите се покажа како голема пречка. Моравме да се обратиме кон персоналот во спа центрите или локалното население со цел локализација на истите. Дел од нив беа под клуч и моравме да бараме специјални дозволи од вработените во спа-центрите.

Друг проблем со кој се соочивме беа негативните резултатите во Кежовица каде не беше детектирано присуство на контаминанти. Иако анализите беа спроведени целосно од почеток по втор пат сепак немавме промена во резултатите.

5. Забелешки околу финансискиот менаџмент.

Се соочивме со многу проблеми со однос на правилното завршување на финансискиот извештај. Многу од деловите не беа јасно прецизирани како би требало да бидат спроведени, за некои делови моравме да испробуваме и да учиме од нашите грешки што доведе до непотребно губење на време. Се надеваме дека во иднина појасно би биле дефинирани сите потребни ставки за полесно менаџирање на истото.

6. Користена литература

Al-Garni, S., Sabir, J., Hanafy, Am., Kabli, S., Al-Twiley, D., Ahmed, M. (2014). Isolation and identification of antimicrobial Actinomycetes strains from Saudi environment. *Journal of Food, Agriculture & Environment* Vol.12 (2): 1128-1135.

Custodio, M., Espinoza, C., Peñaloza, R., Peralta-Ortiz, T., Sanchez-Suarez, H., Ordinola-Zapata, A., Vievra-Pena, E. (2022) 1. Microbial diversity in intensively farmed lake sediment contaminated by heavy metals and identification of microbial taxa bioindicators of environmental quality. *Scientific Reports* 12, 80.



Edberg, S. C., Leclerc, H., & Robertson, J. (1997). Natural Protection of Spring and Well Drinking Water Against Surface Microbial Contamination. II. Indicators and Monitoring. Parameters for Parasites. *Critical Reviews in Microbiology*, 23(2), 179-206.

El Karkouri, A., Assou, S. A., El Hassouni, M. (2019). Isolation and screening of actinomycetes producing antimicrobial substances from an extreme Moroccan biotope. *The Pan African medical journal*, 33, 329.

Gorgieva, M., Popovski, K., (2007). Thermal spas in Macedonia. *Geothermal Association of Macedonia – MAGA*. Ch. 1.5

Hui, M. L., Tan, L. T., Letchumanan, V., He, Y. W., Fang, C. M., Chan, K. G., Law, J. W., & Lee, L. H. (2021). The Extremophilic Actinobacteria: From Microbes to Medicine. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(6), 682.

Manaiá, C. M., Nunes, O. C., Morais, P. V., da Costa, M. S. (1990). Heterotrophic plate counts and the isolation of bacteria from mineral waters on selective and enrichment media. *The Journal of applied bacteriology*, 69(6), 871-876.

Panda, M. K., Sahu, M. K., Tayung, K. (2013). Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus* sp. with protease activity isolated from hot spring of Tarabalo, Odisha, India. *Iranian journal of microbiology*, 5(2), 159-165.

Sagova-Mareckova, M., Boenigk, J., Bouchez, A., Cermakova, K., Chonova, T., Cordier, T., Eisendle, U., Elersek, T., Fazi, S., Fleituch, T., Frühe, L., Gajdosova, M., Graupner, N., Haegerbaeumer, A., Kelly, A. M., Kopecky, J., Leese, F., Nöges, P., Orlic, S., Panksep, K., Stoeck, T. (2021). Expanding ecological assessment by integrating microorganisms into routine freshwater biomonitoring. *Water research*, 191.

Senthilkumar M., Amaresan N., Sankaranarayanan A. (2021) Selective Isolation of Spore Forming *Bacillus*. In: *Plant-Microbe Interactions*. Springer Protocols Handbooks. Humana, New York, NY, 221-223.

Valverde, A., Tuffin, M., Cowan, D. (2012). Biogeography of bacterial communities in hot springs: A focus on the actinobacteria. *Extremophiles : life under extreme conditions*. 16. 669-79.