

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ & ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ & ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

---

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΗ  
ΣΥΓΚΟΜΠΟΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΡΕΩΝ ΚΑΙ ΥΓΡΩΝ  
ΑΓΡΟΤΟΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ  
ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ»**

---

**ΒΑΣΙΛΙΚΗΣ Γ. ΣΚΙΑΔΑ**



ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ  
ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ & ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ  
ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΤΟΥ ΓΕΩΠΟΝΙΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ  
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ: «ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΓΕΩΡΓΑΚΑΚΗΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ, 2011



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ & ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ & ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

---

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΗ  
ΣΥΓΚΟΜΠΟΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΡΕΩΝ ΚΑΙ ΥΓΡΩΝ ΑΓΡΟΤΟΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ»**

---

**ΒΑΣΙΛΙΚΗΣ Γ. ΣΚΙΑΔΑ**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ  
ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ & ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ  
ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΤΟΥ ΓΕΩΠΟΝΙΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ  
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ: «ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΓΕΩΡΓΑΚΑΚΗΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ, 2011

[2]

---

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΗ  
ΣΥΓΚΟΜΠΟΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΡΕΩΝ ΚΑΙ ΥΓΡΩΝ ΑΓΡΟΤΟΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ»

---

ΒΑΣΙΛΙΚΗΣ Γ. ΣΚΙΑΔΑ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ  
ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ & ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ  
ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΤΟΥ ΓΕΩΠΟΝΙΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ  
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ: «ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ & ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γεωργακάκης Δημήτρης, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Κατινάκης Παναγιώτης, Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Χατζηπαυλίδης Ιορδάνης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

<i>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</i>	5
<i>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</i>	9
<i>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</i>	10
<i>ABSTRACT</i>	11
<i>Κεφάλαιο 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</i>	13
1. Το Πρόβλημα των Αποβλήτων	13
1.1. Ορισμοί	13
1.2. Ευρωπαϊκή Νομοθεσία	14
1.3. Η κατάσταση στην Ελλάδα	15
2. Κομποστοποίηση	16
2.1. Γενικά	16
2.2. Οι φάσεις της κομποστοποίησης	17
2.3. Φυσικοχημικοί παράγοντες που επηρεάζουν την πορεία της κομποστοποίησης	20
2.3.1. Οξυγόνο και αερισμός	21
2.3.2. Υγρασία	21
2.3.3. Θερμοκρασία	22
2.3.4. Θρεπτικά	23
2.3.5. pH	24
2.4. Συστήματα Κομποστοποίησης	25
3. Μικροβιολογία της κομποστοποίησης	26
4. Αζωτοδέσμευση & Κομποστοποίηση	32
4.1. Αμμωνιοποίηση	33
4.2. Νιτροποίηση	33
4.3. Απονιτροποίηση	34
4.4. Βιολογική Αζωτοδέσμευση	35
4.4.1. Δομή των πρωτεϊνών της νιτρογενάσης	35
4.4.2. Τρόπος δράσης της νιτρογενάσης	36
4.4.3. Μέθοδος εκτίμησης αζωτοδεσμευτικής δραστηριότητας : Η αναγωγή του ακετυλενίου	38
4.4.4. Γενετική της δέσμευσης N <sub>2</sub>	39
4.4.5. Ρύθμιση της δέσμευσης N <sub>2</sub>	40

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

4.4.6 Διακριτοί φυλογενετικοί κλάδοι	41
4.4.7 Ποικιλότητα συστημάτων βιολογικής δέσμευσης αζώτου	42
4.4.8 Φυλογενετική Ταξινόμηση Αζωτοδεσμευτικών Οργανισμών	43
4.4.9 Αζωτοδέσμευση στην κομποστοποίηση	46
5. Μέθοδοι εκτίμησης μικροβιακής ποικιλότητας κατά την κομποστοποίηση	47
6. Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ) & Υπολείμματα Εκκοκκιστηρίου Βάμβακος (ΥΕΒ)	48
6.1 Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου	48
6.2 Υπολείμματα Εκκοκκιστηρίου Βάμβακος	50
7. Σκοπός της μελέτης	51
<i>Κεφάλαιο 2. ΥΛΙΚΑ &amp; ΜΕΘΟΔΟΙ</i>	53
1. Υποστρώματα Κομποστοποίησης	53
2. Παρασκευή των Σωρών Κομποστοποίησης	53
3. Δειγματοληψία	54
4. Μελέτη Φυσικοχημικών Παραμέτρων	55
4.1 Παρακολούθηση θερμοκρασίας	55
4.2 Προσδιορισμός υγρασίας	55
4.3 Προσδιορισμός pH και Ηλεκτρικής Αγωγιμότητας (Electrical Conductivity, EC)	55
4.4 Προσδιορισμός του νιτρικού αζώτου ( $\text{N-NO}_3^-$ ) με τη μέθοδο του καδμίου	55
4.5 Χρωματομετρικός προσδιορισμός του αμμωνιακού αζώτου ( $\text{NH}_4^+-\text{N}$ ) με τη μέθοδο της ινδοφαινόλης	57
4.6 Προσδιορισμός του ολικού αζώτου (μέθοδος Kjeldahl)	58
5. Μικροβιολογικές αναλύσεις με χρήση κλασσικών μεθόδων	59
5.1 Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων	60
5.1.1 Θρεπτικό Υλικό Ανάπτυξης Ολικών Βακτηρίων	60
5.1.2 Θρεπτικό Υλικό Ανάπτυξης Σποριογόνων Βακτηρίων	60
5.1.3 Θρεπτικό Υλικό Ανάπτυξης Μυκήτων	60
5.1.4 Θρεπτικό Υλικό Ανάπτυξης Ακτινομυκήτων	60
5.1.5 Θρεπτικό Υλικό Ανάπτυξης Κυτταρινολυτικών Βακτηρίων	60
5.1.6 Αζωτοδεσμευτικά βακτήρια	61
5.2 Απομόνωση μικροοργανισμών σε καθαρή καλλιέργεια	63
5.3 Εκτίμηση της αναπνευστικής δραστηριότητας	63
6. Μοριακές τεχνικές	67
6.1 Επιλογή βακτηριακών στελεχών για ταυτοποίηση	67

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

6.2	Απομόνωση ολικού γενετικού υλικού (DNA)	67
6.2.1	Συλλογή βακτηριακών κυττάρων (pellet)	67
6.2.2	Απομόνωση DNA (genomic extraction)	68
6.3	Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊκών οξέων	69
6.4	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	70
6.5	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	74
6.6	Απομόνωση – ανάκτηση DNA από πήκτωμα αγαρόζης.	75
6.7	Κλωνοποίηση σε πλασμιδιακούς φορείς	75
6.7.1	Τεχνητή σύνδεση δύο μορίων DNA (Ligation Reaction)	77
6.7.2	Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων E. coli (Transformation)	78
6.7.3	Επιλογή μοναδικής αποικίας	79
6.8	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα E. coli	79
6.8.1	Μέθοδος βρασμού (Boiling Preparation), (Holmes & Quigley, 1981)	80
6.8.2	QIAPrep Miniprep	81
6.9	Ανάλυση αλληλουχιών & Φυλογενετική ανάλυση	82
<i>Κεφάλαιο 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</i>		84
1.	Φυσικοχημικές Παράμετροι	84
1.1	Θερμοκρασία	84
1.2	Υγρασία	86
1.3	Οξύτητα (pH)	87
1.4	Ηλεκτρική αγωγιμότητα (EC)	88
1.5	Το νιτρικό άζωτο ( $\text{NO}_3^-$ - N)	89
1.6	Το αμμωνιακό άζωτο ( $\text{NH}_4^+$ -N)	90
1.7	Ολικό Άζωτο	91
2.	Μικροβιολογικές αναλύσεις με χρήση κλασσικών μεθόδων	92
2.1	Ολικά βακτήρια	92
2.2	Μύκητες	93
2.3	Ακτινομύκητες	94
2.4	Σποριογόνα Βακτήρια	95
2.5	Κυτταρινολυτικά βακτήρια	96
2.6	Αζωτοδεσμευτικά Βακτήρια	97
2.7	Αζωτοδεσμευτική Ικανότητα Δειγμάτων Κόμποστ	99
2.8	Αναπνευστική δραστηριότητα	100



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

3.	Μικροβιολογικές Αναλύσεις με τη χρήση μοριακών τεχνικών	102
3.1	Ενίσχυση τμήματος 16S rRNA και nifH γονιδίου - υποκλωνοποίηση	102
3.2	Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας 16S rRNA γονιδίου	104
3.3	Φυλογενετική Ανάλυση 16S rRNA γονιδίου	104
3.4	Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας nifH γονιδίου	106
3.5	Φυλογενετική Ανάλυση nifH γονιδίου	106
<i>Κεφάλαιο 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</i>		<i>110</i>
<i>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄. ΣΥΝΘΕΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ &amp; ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ - ΧΡΩΣΕΙΣ</i>		<i>119</i>
<i>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β΄.</i>		<i>125</i>
<i>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</i>		<i>134</i>
<i>ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ</i>		<i>141</i>

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

---

Η επαφή μου με το εργαστήριο Γενικής & Γεωργικής Μικροβιολογίας ξεκίνησε στα πλαίσια της παρούσας ερευνητικής εργασίας. Χαίρομαι που στα πλαίσια της Μεταπτυχιακής μου Διατριβής βρέθηκα σε ένα Εργαστήριο αξιόλογο, επαρκώς εξοπλισμένο αλλά προπαντός φιλικό προς ανθρώπους που βρίσκονται στα πρώτα βήματα της ερευνητικής τους εργασίας, και κατάφερα να γνωρίσω αξιόλογους ανθρώπους.

Θα ήθελα κατ' αρχάς να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθηγητή κ. Γεωργακάκη Δημήτρη που με επέλεξε για την εκπόνηση της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής εργασίας, για τη στήριξη, καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με αυτό το ενδιαφέρον θέμα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Καθηγητή κ. Κατινάκη Παναγιώτη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Χατζηπαυλίδη Ιορδάνη, για την επιλογή του θέματος, για την ευκαιρία που μου έδωσαν καθώς με δέχτηκαν στο εργαστήριό τους, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου επέδειξαν καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μελέτης. Επίσης τους ευχαριστώ για την εποικοδομητική κριτική και τις συμβουλές που μου παρείχαν απλόχερα, καθώς και για τη συμμετοχή τους στην τριμελή μου επιτροπή.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη Διδάκτορα κ. Κεφαλογιάννη Ηώ για τη συνεχή βοήθεια και τις εποικοδομητικές συμβουλές σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, και τη Διδάκτορα κ. Βενιεράκη Αναστασία για την ουσιαστική συμβολή στη διεξαγωγή των μοριακών τεχνικών και τις πολύτιμες συμβουλές.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τους συνεργάτες μου και μεταπτυχιακούς φοιτητές Ξεξάκη Κωνσταντίνο και Ευθυμίου Κατερίνα για τη συμπαράσταση, καθώς και για την ευχάριστη και εποικοδομητική συνεργασία, χωρίς την οποία η διεξαγωγή της παρούσας πτυχιακής δεν θα ήταν ίδια.

Επίσης ευχαριστώ τον κ. Δάλα Στέλιο για την πολύτιμη βοήθειά του σε όλες τις αναλυτικές μεθόδους.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στους κοντινούς μου φίλους για όλη τους την υποστήριξη και αγάπη.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

Κόμποστ είναι το τελικό προϊόν της βιολογικής αποικοδόμησης και σταθεροποίησης των οργανικών υποστρωμάτων κάτω από συνθήκες που επιτρέπουν τις υψηλές θερμοκρασίες, ως αποτέλεσμα της βιολογικά παραγόμενης θερμότητας.

Στόχος της παρούσας πτυχιακής είναι η μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας και των φυσικο – χημικών παραμέτρων που την επηρεάζουν, κατά την κομποστοποίηση και συγκομποστοποίηση αγροτοβιομηχανικών υποπροϊόντων. Παρασκευάστηκαν δύο σωροί. Ο πρώτος (σωρός 1) χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας, και σαν υπόστρωμα για την παρασκευή του χρησιμοποιήθηκαν Υπολείμματα Εκκοκκιστηρίου Βάμβακος (ΥΕΒ). Ο δεύτερος (σωρός 2) ήταν το αποτέλεσμα συγκομποστοποίησης ΥΕΒ με Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ).

Μελετήθηκε μια σειρά φυσικοχημικών παραμέτρων, μεταξύ των οποίων η θερμοκρασία, η υγρασία, το pH, η ηλεκτρική αγωγιμότητα, το ολικό άζωτο, το αμμωνιακό και το νιτρικό άζωτο, η αναπνευστική δραστηριότητα. Η μικροβιακή διαδοχή μελετήθηκε με χρήση τόσο κλασσικών (εκτίμηση Αριθμού Βιώσιμων Μονάδων-ABM, με χρήση μεθόδων καλλιέργειας, ολικών, σποριογόνων, κυτταρινολυτικών, αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, μυκήτων και ακτινομυκήτων), όσο και μοριακών τεχνικών (υποκλωνοποίηση και φυλογενετική ανάλυση με βάση τα γονίδια 16S rRNA και *nifH*, τριών καλλιεργήσιμων στελεχών, απομονωμένων από διαφορετικές φάσεις κομποστοποίησης των δύο σωρών). Η εκτίμηση της αζωτοδεσμευτικής ικανότητας των βακτηριακών στελεχών πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμή αναγωγής ακετυλενίου προς αιθυλένιο.

Ο σωρός 2 ανέπτυξε υψηλότερες θερμοκρασίες σε σχέση με το σωρό 1. Η μέγιστη θερμοκρασία επιτεύχθηκε την 4<sup>η</sup> ημέρα της κομποστοποίησης, και ήταν 52 και 59 °C για το σωρό 1 και 2 αντίστοιχα. Ο ABM για το σωρό 2 ήταν, σε όλες τις μικροβιακές ομάδες και σε όλα τα στάδια κομποστοποίησης, χαμηλότερος σε σχέση με το σωρό 1. Εντούτοις οι πληθυσμιακές διακυμάνσεις των μικροβιακών ομάδων είχαν παρόμοια εξέλιξη. Ταυτοποιήθηκαν τρία αζωτοδεσμευτικά στελέχη, τα Co1 και Co2 από το σωρό 2, και το Co5 από το σωρό 1. Και τα τρία εμφάνισαν υψηλή ομολογία με είδη του γένους *Klebsiella*, με το Co2 να παρουσιάζει μεγαλύτερη εξελικτική απόσταση από τα άλλα δύο στελέχη.

Λέξεις-κλειδιά: μικροβιακή ποικιλότητα, κόμποστ, συγκομποστοποίηση, αζωτοδέσμευση, αγροτοβιομηχανικά υποπροϊόντα, υπολείμματα εκκοκκιστηρίου βάμβακος, υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου.

## ABSTRACT

## ABSTRACT

---

Compost is the end-product of a biological decomposition and stabilization of organic substrates under conditions that allow high temperatures as a result of biologically produced heat.

In the present study we aimed at investigating the microflora diversity and the physicochemical parameters affecting it, during composting and co-composting of agroindustrial residues. Two piles were prepared. Pile 1 was used as control, and ginned cotton residues were used as a basic substrate for its preparation. For pile 2, ginned cotton residues were co-composted with Olive Mill Wastewater (OMW).

The physicochemical parameters examined, were temperature, moisture, pH, electrical conductivity, total nitrogen, ammonium and nitrate nitrogen, respiration rate. The microbial evolution was studied not only with *traditional techniques* (culture-dependent methods for estimating the Colony Forming Units-CFU of total, endospore-forming, cellulolytic, nitrogen-fixing bacteria, fungi, actinomycetes), but with *molecular techniques* also (sub-cloning and phylogenetical analysis of three strains, isolated from different piles, during different composting stages, using the 16S rRNA and *nifH* gene). The Acetylene Reduction Assay was used to evaluate the nitrogen fixation.

Higher temperatures were measured in pile 2, when comparing with pile 1. Maximum temperature was observed at the 4<sup>th</sup> day of composting process for both piles, and reached 52 and 59 °C, for pile 1 and 2 respectively. During the composting process, CFU measurements were lower in pile 2 than those in pile 1. Microbial population fluctuations though, were evolved in a similar way. Three diazotrophic bacterial strains were identified. Co1 and Co2 strains were isolated from pile 2, whereas Co5 was isolated from pile 1. All strains showed high homology with *Klebsiella* sp. bacteria. Co2 showed greater evolutionary distance in comparison to the other two diazotrophs.

*Key-words:* microbial diversity, compost, co-composting, nitrogen fixation, agroindustrial residues, ginned cotton residues, olive mill wastewater.



## *Κεφάλαιο 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ*

---

### *1. Το Πρόβλημα των Αποβλήτων*

---

#### *1.1. Ορισμοί*

Για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης κρίνεται αναγκαίο να δοθούν κάποιιοι ορισμοί, όπως αυτοί έχουν συνταχθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Οδηγία 2008/98/ΕΚ).

«Απόβλητα»: κάθε ουσία ή αντικείμενο το οποίο ο κάτοχός του απορρίπτει ή προτίθεται ή υποχρεούται να απορρίψει.

«Βιολογικά απόβλητα»: τα βιοαποδομήσιμα απόβλητα κήπων και πάρκων, τα απορρίμματα τροφών και μαγειριών από σπίτια, εστιατόρια, εγκαταστάσεις ομαδικής εστίασης και χώρους πωλήσεων λιανικής και τα συναφή απόβλητα από εγκαταστάσεις μεταποίησης τροφίμων.

«Διαχείριση αποβλήτων»: η συλλογή, μεταφορά, ανάκτηση και διάθεση αποβλήτων, συμπεριλαμβανομένης της εποπτείας των εργασιών αυτών, καθώς και της επίβλεψης των χώρων απόρριψης και των ενεργειών στις οποίες προβαίνουν οι έμποροι ή οι μεσίτες.

Με τον όρο «γεωργικά απόβλητα» χαρακτηρίζουμε κάθε μορφής υποπροϊόντα ή παράγωγα της γεωργικής δραστηριότητας, που είτε έπαψαν να έχουν οποιαδήποτε οικονομική αξία για την επιχείρηση είτε η παραπέρα διαχείριση ή επεξεργασία τους κρίνεται οικονομικά ασύμφορη. Σε μια τέτοια περίπτωση θεωρούνται «άχρηστα» για τη δραστηριότητα που τα παράγει και μεθοδεύεται η απομάκρυνσή τους, είτε σε στερεή, είτε σε υγρή μορφή (Γεωργακάκης, 2003).

Τα βιοαπόβλητα είναι το αποτέλεσμα πολλών ανθρώπινων δραστηριοτήτων, συμπεριλαμβανομένης της γεωργίας, της ανθοκομίας και της βιομηχανίας. Έτσι ταξινομούνται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: κόπρινα/κοπριά, ακατέργαστη φυτική ύλη και επεξεργασμένα απόβλητα (Evans & Furlong, 2003).

Στην παρούσα μελέτη μας ενδιαφέρουν εκείνα τα αγροτοβιομηχανικά απόβλητα, τα οποία είναι πλούσια σε οργανικό φορτίο, έχουν δυνατότητα βιοαποδόμησης, και στη διεθνή βιβλιογραφία

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

εντάσσονται στον ευρύ όρο «biowastes». Ανάλογα με τη σύστασή τους, υπάρχουν αρκετοί τρόποι επεξεργασίας των βιοαποβλήτων:

Ανοιχτά συστήματα κομποστοποίησης - Κλειστά συστήματα κομποστοποίησης - Αναερόβια χώνευση - Μηχανική βιολογική επεξεργασία - Αποτέφρωση (όχι ιδανική για τα βιοαπόβλητα) - Υγειονομική ταφή (εκπομπή αερίων του θερμοκηπίου - CH<sub>4</sub>, παραγωγή μολυσματικών υγρών αποστράγγισης – landfill leachate).

### *1.2. Ευρωπαϊκή Νομοθεσία*

Τα τελευταία χρόνια βλέπουμε μία στροφή της Ευρώπης προς την περιβαλλοντικά ορθή πολιτική, καθιστώντας τα απόβλητα μία πρόκληση για ολόκληρη την Ευρωπαϊκή Κοινότητα. Τα τελευταία 30 χρόνια έχει επιτευχθεί σημαντική πρόοδος σε αυτό τον τομέα. Οι βιομηχανίες έχουν αρχίσει να αντιμετωπίζουν τα απόβλητα σαν ένα πόρο που μπορούν να επαναχρησιμοποιήσουν, να ανακυκλώσουν ή σαν ένα μέσο ανάκτησης ενέργειας. Όλα αυτά σε συνδυασμό με τη βασική αρχή «ο ρυπαίνων πληρώνει», σύμφωνα με την οποία τα οιαδήποτε βάρη επωμίζονται στον παραγωγό, οδήγησαν σε μία στροφή προς μια περιβαλλοντικά φιλική προσέγγιση του θέματος των αποβλήτων.

Σύμφωνα με την ανακοίνωση της Επιτροπής των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων {SEC(2005) 1681, SEC(2005) 1682}, έως το 2005 στην Ε.Ε. τα αστικά απόβλητα διατίθενται σε χώρους υγειονομικής ταφής (49%), αποτέφρωση (18%), ανακύκλωση και λιπασματοποίηση (33%). Εντούτοις υπάρχουν και κράτη – μέλη που ανακυκλώνουν τις μικρότερες ποσότητες (90% ΧΥΤΑ<sup>1</sup>, 10% ανακύκλωση και ανάκτηση ενέργειας). Ενώ η ανακύκλωση και η αποτέφρωση αυξάνονται, το απόλυτο ποσό των αποβλήτων που οδηγείται προς υγειονομική ταφή δε μειώνεται, λόγω αύξησης της παραγωγής αποβλήτων. Σήμερα στην Ε.Ε. επικρατεί η έννοια της «εράρρησης των αποβλήτων» (Άρθρο 4, Οδηγία 2008/98/ΕΚ): α) πρόληψη, β) προετοιμασία για επαναχρησιμοποίηση, γ) ανακύκλωση, δ) άλλου είδους ανάκτηση π.χ. ανάκτηση ενέργειας, ε) διάθεση.

Όσον αφορά στα βιολογικά απόβλητα το άρθρο 22 της οδηγίας 2008/98/ΕΚ είναι σαφές. Τα κράτη μέλη λαμβάνουν κατάλληλα μέτρα προκειμένου να ενθαρρύνουν:

---

<sup>1</sup> ΧΥΤΑ: Χώροι Υγειονομικής Ταφής Απορριμμάτων.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

α) τη χωριστή συλλογή βιολογικών αποβλήτων, ενόψει της λιπασματοποίησης και της ζύμωσης των βιοαποβλήτων, β) την επεξεργασία των βιολογικών αποβλήτων κατά τρόπο που να διασφαλίζεται υψηλό επίπεδο περιβαλλοντικής προστασίας, γ) τη χρήση περιβαλλοντικώς ασφαλών υλικών παραγόμενων από βιολογικά απόβλητα.

Οι κύριες αρνητικές επιπτώσεις των βιολογικών αποβλήτων επέρχονται όταν αυτά υπόκεινται σε υγειονομική ταφή. Αποτέλεσμα της ταφής είναι η παραγωγή CH<sub>4</sub>.

### **1.3. Η κατάσταση στην Ελλάδα**

Συνοπτικά, στην Ελλάδα το 75% των Αστικών Στερεών Αποβλήτων καταλήγει σε χωματερές, το 23% ανακυκλώνεται και μόλις το 2% λιπασματοποιείται. Επομένως βλέπουμε ότι ο κύριος τρόπος χειρισμού των αποβλήτων είναι η διάθεσή τους σε χωματερές (ΧΥΤΑ και ΧΑΔΑ<sup>2</sup>).

Η Ελλάδα έχει πέντε εργοστάσια Μηχανικής Ανακύκλωσης και Κομποστοποίησης (ΕΜΑΚ), ένα στην Αττική (Ανω Λιόσια), δύο στην Κρήτη (Χανιά και Ηράκλειο), ένα στην Κεφαλονιά και ένα στην Πελοπόννησο (Καλαμάτα). Από αυτά, μόνο της Αττικής και των Χανίων λειτουργούν κανονικά (Μπουρτσάλας *et al.*, 2011). Σε γενικές γραμμές η Ελλάδα προσπαθεί να συμμορφωθεί και να ακολουθήσει τα πλαίσια της περιβαλλοντικής πολιτικής που θέτει η Ευρωπαϊκή Κοινότητα.

Όσον αφορά στα γεωργικά υπολείμματα, που αποτελούν και το ενδιαφέρον της παρούσας μελέτης, ισχύουν τα εξής (ΚΥΑ - 50910/2727, ΦΕΚ Β' 1909/22.12.2003):

Υφιστάμενη κατάσταση: Τα αποσυρόμενα γεωργικά προϊόντα οδηγούνται προς ταφή σε ειδικούς χώρους που δεν πληρούν τις απαιτούμενες προϋποθέσεις για την τελική διάθεση των συγκεκριμένων αποβλήτων.

Στόχοι & Δράσεις: Επιδιώκεται η αξιοποίησή τους, ως πηγή οργανικής ουσίας και ενέργειας (βιοαέριο). Το παραγόμενο κόμποστ μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αγροτικές καλλιέργειες, καθώς και για την επανένταξη στο φυσικό περιβάλλον «τραυματισμένων» φυσικών ανάγλυφων ή και σε άλλες εφαρμογές.

---

<sup>2</sup> ΧΑΔΑ: Χώροι Ανεξέλεγκτης Διάθεσης Απορριμμάτων



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 2. Κομποστοποίηση

---

#### 2.1. Γενικά

Βιολογικές, θεωρούνται οι μέθοδοι, που βασίζονται στη δράση μικροοργανισμών, οι οποίοι διασπούν τα οργανικά συστατικά των αποβλήτων προς απλούστερα, μη τοξικά και ενεργειακά σταθερότερα προϊόντα, όπως CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, κ.λ.π. (Γεωργακάκης, 2003).

Οι στόχοι της βιολογικής επεξεργασίας των αποβλήτων συνοψίζονται στους εξής:

- α) Ελαχιστοποίηση των αρνητικών επιπτώσεων ως προς το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία
- β) Ανακύκλωση/ανάκτηση πολύτιμων μετάλλων για επαναχρησιμοποίηση
- γ) Παραγωγή ενός χρήσιμου τελικού προϊόντος

Η κομποστοποίηση είναι η αερόβια<sup>3</sup> διαδικασία μικροβιακής αποικοδόμησης, κατά την οποία η παραγωγή και επικείμενη μόνωση της πλεονάζουσας μεταβολικής θερμότητας του κόμποστ, μπορεί ταχέως να οδηγήσει σε παρατεταμένες θερμοκρασίες άνω των 50 °C, με θερμοκρασιακό εύρος των θερμομονωμένων περιοχών από 60 °C έως και 80 °C (Dees & Ghiorse, 2001). Μία τυπική διαδικασία κομποστοποίησης χαρακτηρίζεται από μία σειρά σταδίων, που περιλαμβάνουν ταχεία αύξηση της θερμοκρασίας, παρατεταμένες υψηλές θερμοκρασίες και βαθμιαία πτώση της θερμοκρασίας της μάζας του κόμποστ. Η κομποστοποίηση είναι η αποσύνθεση της οργανικής ουσίας από τους μικροοργανισμούς κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες, κατά τη διάρκεια της οποίας οι μικροοργανισμοί καταναλώνουν οξυγόνο ενώ «τρέφονται» από την οργανική ουσία. Η κομποστοποίηση μειώνει τόσο τον όγκο όσο και τη μάζα των πρώτων υλών, μετατρέποντάς τα σε ένα οργανοχουμικό εδαφοβελτιωτικό προϊόν (Rynk *et al.*, 1992).

Ως αποτέλεσμα της μικροβιακής αποικοδομητικής δραστηριότητας, η θερμοκρασία του κόμποστ αυξάνει και το pH αλλάζει ταχέως σε σύντομο χρονικό διάστημα, προκαλώντας μείωση σε κάποια είδη μικροοργανισμών και αφθονία σε άλλα. Κατά τη διαδικασία της κομποστοποίησης μπορεί να παρουσιαστούν εγγενή προβλήματα. Τα επίπεδα απόδοσης στα αρχικά στάδια της κομποστοποίησης είναι συνήθως υψηλά. Αυτό μπορεί να προκαλέσει προβλήματα, όπως ανεπιθύμητες οσμές ως αποτέλεσμα αναερόβιων συνθηκών σε τμήμα της μάζας του κόμποστ.

---

<sup>3</sup> **Αερόβια αποικοδόμηση:** διάσπαση πολύπλοκων οργανικών ενώσεων από μικροοργανισμούς σε απλούστερες, παρουσία οξυγόνου.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Επιτυχής κομποστοποίηση απαιτεί αντικατάσταση της τυπικής μεσόφιλης αναερόβιας μικροχλωρίδας από αερόβια μικροχλωρίδα, ικανή να παράγει θερμότητα (Hultman *et al.*, 2010).

Τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της κομποστοποίησης παρουσιάζονται στον **Πίν. 2.1**:

**Πίνακας 2.1** Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα κομποστοποίησης (Προσαρμοσμένο από Epstein, 1997).

Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Η πλειοψηφία των στερεών αποβλήτων μπορεί να κομποστοποιηθεί. Έτσι μία εγκατάσταση κομποστοποίησης μπορεί να επεξεργαστεί τόσο αστικά όσο και βιομηχανικά απόβλητα.	Δυσάρεστες οσμές και εκπομπές βιοαερίων μπορεί να συνυπάρχουν κατά την κομποστοποίηση. Απαιτείται καλός σχεδιασμός των εγκαταστάσεων και αποτελεσματική διαχείριση.
Ελαχιστοποίηση περιβαλλοντικών επιπτώσεων.	Πιθανή απαίτηση περισσότερου χώρου από άλλες τεχνολογίες διαχείρισης αποβλήτων.
Μείωση χώρων υγειονομικής ταφής – μεγιστοποίηση ανακύκλωσης.	Το προϊόν πρέπει να προωθηθεί στην αγορά.
Αποικοδόμηση οργανικών ουσιών.	
Παραγωγή χρήσιμου προϊόντος.	

Πολύ διαδεδομένη είναι και η έννοια της συγκομποστοποίησης, κυρίως για αγροτοβιομηχανικά υποπροϊόντα, τα οποία προκαλούν ρύπανση μετά τη διάθεσή τους στο περιβάλλον. Οι Georgakakis *et al.* (1995) μελέτησαν τη συγκομποστοποίηση μηχανικά διαχωρισμένων στερεών υπολειμμάτων χοιροστασίου με υπολείμματα λιγνίτη, εμπλουτισμένα με υπολείμματα εκκοκκιστηρίου βάμβακος (YEB) και φλοιούς από σπόρους ρυζιού. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η συγκομποστοποίηση στερεών αποβλήτων χοιροστασίου με υπολείμματα λιγνίτη, μαζί με YEB και φλοιούς σπόρων ρυζιού, οδήγησε σε βελτιωμένη κομποστοποίηση, σε σύγκριση με την ανάμιξη στερεών αποβλήτων χοιροστασίου και υπολειμμάτων λιγνίτη μόνο, ή έπειτα από εμπλουτισμό αυτών είτε με YEB, είτε με φλοιούς σπόρων ρυζιού.

### 2.2 Οι φάσεις της κομποστοποίησης

Η άνοδος της θερμοκρασίας της οργανικής ύλης είναι μια διαδικασία αυτο-θέρμανσης που είναι το αποτέλεσμα της μικροβιακής δραστηριότητας και της μικροβιακής αναπνοής. Έτσι, όταν η μάζα του κόμποστ μονώνεται, η παραγόμενη θερμότητα αυξάνει τη θερμοκρασία του υλικού. Η αύξηση της θερμοκρασίας επηρεάζει το μικροβιακό πληθυσμό μέσα από αλλαγές στους μεσόφιλους και θερμοφίλους μικροοργανισμούς, το οποίο με τη σειρά του επηρεάζει το ρυθμό

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

αποικοδόμησης. Η μικροβιακή αναπνοή μπορεί επομένως να χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης της αποικοδόμησης και της σταθεροποίησης του τελικού προϊόντος. Κατά τη διάρκεια της κομποστοποίησης το  $O_2$  καταναλώνεται, ενώ απελευθερώνονται  $CO_2$  και  $H_2O$ . Επιπλέον  $NH_4^+$  και άλλα πτητικά συστατικά απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα (Erstein, 1997).

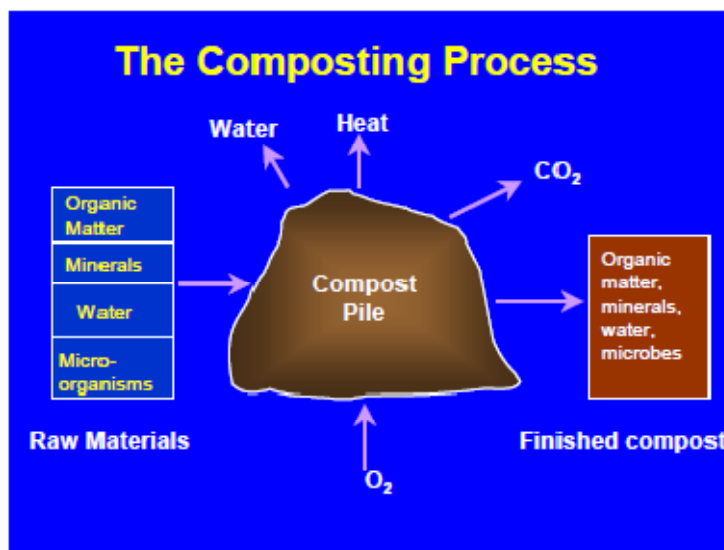
Η διαδικασία της κομποστοποίησης διακρίνεται από τέσσερις φάσεις σύμφωνα με τον Miller (1996), όπως αναφέρεται στους Bonito *et al.* (2010):

α) η αρχική μεσόφιλη φάση ( $10 - 42\text{ }^\circ\text{C}$ ) κατά την οποία η θερμοκρασία αυξάνει ραγδαία,

β) η θεرمόφιλη φάση ( $45 - 70\text{ }^\circ\text{C}$ ), η οποία χαρακτηρίζεται από εκτεταμένες υψηλές θερμοκρασίες,

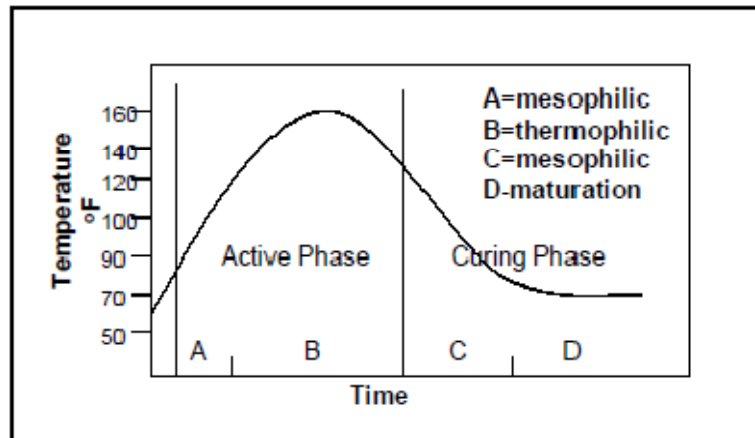
γ) η ενδιάμεση μεσόφιλη φάση ( $65 - 50\text{ }^\circ\text{C}$ ) κατά την οποία η θερμοκρασία μειώνεται,

δ) η φάση ωρίμανσης ( $50 - 23\text{ }^\circ\text{C}$ ) κατά την οποία η οργανική ουσία και η βιολογικά παραγόμενη θερμότητα σταθεροποιούνται.



Εικόνα 2.1 Η διαδικασία της κομποστοποίησης.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ



**Εικόνα 2.2** Θερμοκρασιακές μεταβολές σε ένα μέσο σωρό κομποστοποίησης.

Η θερμοκρασία αντανακλά τόσο την προ κομποστοποίησης μικροβιακή δραστηριότητα, όσο και τον τρέχοντα ρυθμό μικροβιακής δραστηριότητας. Η αρχική γρήγορη αύξηση της θερμοκρασίας περιλαμβάνει μια ταχεία μετάβαση από τη μεσόφιλη στη θερμόφιλη μικροχλωρίδα. Το οικοσύστημα του κόμποστ τότε, τείνει να περιορίσει τον εαυτό του εξαιτίας των ανασταλτικών υψηλών θερμοκρασιών, οι οποίες οφείλονται στην υπερβολική συσσώρευση θερμότητας. Εάν η διαχείριση γίνεται σωστά (καλός αερισμός, συχνά γυρίσματα κ.α.), η θερμόφιλη φάση συνεχίζεται έως ότου η παραγωγή θερμότητας γίνει μικρότερη από τη σπατάλη θερμότητας, εξαιτίας της εξάντλησης των εύκολα αφομοιώσιμων υποστρωμάτων. Στη φάση ωρίμανσης η ποσότητα των εύκολα διαθέσιμων θρεπτικών γίνεται περιοριστικός παράγοντας, προκαλώντας πτώση στη μικροβιακή δραστηριότητα και στην παραγωγή θερμότητας. Σε όλες αυτές τις θερμοκρασιακές αλλαγές πλήθος μικροβιακών ομάδων επικρατεί έναντι άλλων, με κάθε ομάδα να προσαρμόζεται σε ένα ιδιαίτερο περιβάλλον (Beffa *et al.*, 1995).

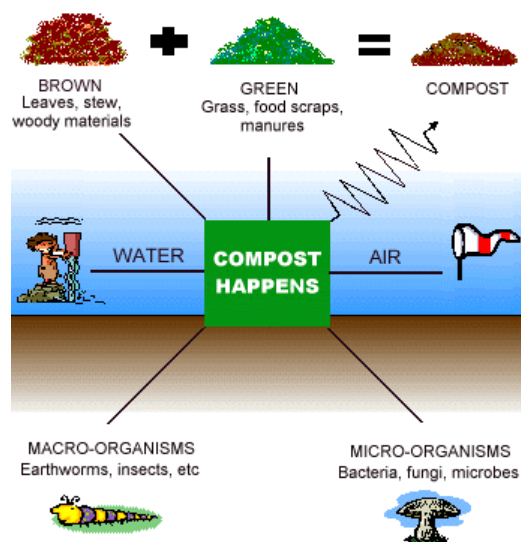
Ο απώτερος στόχος της κομποστοποίησης είναι η παραγωγή ενός χουμικού προϊόντος το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη βελτίωση του εδάφους και στη φυτική ανάπτυξη. Δύο όροι αναφέρονται στη βιβλιογραφία, ο όρος «σταθεροποίηση» και ο όρος «ωρίμανση». Αυτοί οι δύο δεν είναι συνώνυμοι μεταξύ τους. Η σταθεροποίηση είναι ένα στάδιο της αποικοδόμησης της οργανικής ουσίας και μια λειτουργία της βιολογικής δραστηριότητας. Η ωρίμανση είναι μια οργανο – χημική κατάσταση του κόμποστ η οποία δείχνει την παρουσία ή απουσία φυτοτοξικών οργανικών οξέων. Η ωρίμανση σχετίζεται με τη φυτοτοξικότητα η οποία προκύπτει από ανόργανα χημικά και την αλατότητα του προϊόντος. Άλλοι παράγοντες που εμπλέκονται στη φυτοτοξικότητα και οδηγούν στην αναστολή της βλάστησης και της φυτικής ανάπτυξης είναι τα

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ιχνοστοιχεία, τα βαρέα μέταλλα, η αμμωνία, το CO<sub>2</sub> (Epstein, 1997). Διάφορα τεστ έχουν αναπτυχθεί για τη μελέτη της σταθεροποίησης του κόμποστ, μεταξύ των οποίων η αναπνευστική δραστηριότητα (μέσω της παραγωγής CO<sub>2</sub> ή της κατανάλωσης O<sub>2</sub>) και η αυτοθέρμανση του σωρού. Μειωμένη αναπνευστική δραστηριότητα συνεπάγεται μείωση του βιοδιασπώμενου C και αυξημένη σταθεροποίηση του C (Brewer & Sullivan, 2003). Οι Bernal *et al.* (1998) καθόρισαν τους εξής δείκτες ωρίμανσης για διαφορετικούς σωρούς κομποστοποίησης: C/N<12, NH<sub>4</sub>/NO<sub>3</sub><0.16, NH<sub>4</sub>-N<0.04%, δείκτης φυτοτοξικότητας μεγαλύτερος του 50% κ.α.

### 2.3. Φυσικοχημικοί παράγοντες που επηρεάζουν την πορεία της κομποστοποίησης

Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την αποικοδόμηση της οργανικής ουσίας από τους μικροοργανισμούς είναι το οξυγόνο και η υγρασία. Η θερμοκρασία επίσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, εντούτοις είναι το αποτέλεσμα της μικροβιακής δραστηριότητας. Άλλοι περιοριστικοί παράγοντες είναι το pH, τα θρεπτικά και κυρίως ο άνθρακας και το άζωτο. Ο άνθρακας είναι η κύρια πηγή ενέργειας, ενώ το άζωτο είναι απαραίτητο για την κυτταρική σύνθεση. Άλλα στοιχεία απαραίτητα για ενζυμικές λειτουργίες των μικροοργανισμών είναι P, S, Cu, Ni, Mo, Fe, Mg, Zn, Na, εντούτοις λίγα είναι γνωστά για τη σημαντικότητά τους στη διαδικασία της κομποστοποίησης. Παρακάτω αναλύονται οι κυριότεροι φυσικοχημικοί παράγοντες.



Εικόνα 2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδικασία της κομποστοποίησης.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 2.3.1 Οξυγόνο και αερισμός

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η κομποστοποίηση είναι μια αερόβια διαδικασία, επομένως το οξυγόνο είναι απαραίτητο για τη μικροβιακή δραστηριότητα. Τρεις βασικές μέθοδοι αερισμού παρέχουν O<sub>2</sub> κατά την κομποστοποίηση: i) φυσικό γύρισμα της μάζας του κόμποστ, ii) μεταφορά ροής αέρα, iii) μηχανικός αερισμός.

Στην περίπτωση των σειραδιών κομποστοποίησης (*windrow method*) χρησιμοποιούνται οι δύο πρώτοι τρόποι αερισμού, ενώ στα στατικά συστήματα (*static systems*) το O<sub>2</sub> παρέχεται με χρήση αεριστήρων ή μεταφερόμενης ροής αέρα (Erstein, 1997).

Οι απαιτήσεις των μικροοργανισμών σε αέρα εξαρτώνται από τη δομή, τον τύπο του αποβλήτου (θρεπτικά), τη θερμοκρασία, το στάδιο της κομποστοποίησης (υψηλότερες απαιτήσεις στα πρώιμα στάδια), τις συνθήκες του σταδίου (υγρασία κ.α.).

Στη βιομηχανία μανιταριών για την προετοιμασία του υποστρώματος ανάπτυξης τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται ένα εντελώς κλειστό σύστημα κομποστοποίησης, που λειτουργεί με ανακύκλωση του αέρα. Σε αυτά τα συστήματα ο εξαντλούμενος αέρας επαναδιοχετεύεται στη μάζα του κόμποστ, και όταν κρίνεται απαραίτητο, είτε για έλεγχο της θερμοκρασίας είτε για πρόληψη ανασταλτικών αερίων, διοχετεύεται φρέσκος αέρας στο σύστημα (Stentiford, 1995).

### 2.3.2 Υγρασία

Η υγρασία επηρεάζει τη μικροβιακή δραστηριότητα και κατ' επέκταση μπορεί να επηρεάσει τη θερμοκρασία και το ρυθμό αποικοδόμησης. Επιπλέον είναι ικανή να επηρεάσει τη σύνθεση του μικροβιακού πληθυσμού του κόμποστ (Erstein, 1997). Σε πείραμά τους ο Viel *et al.* (1987), όπως αναφέρεται στον Erstein (1997) αναφέρουν ότι το νερό που παράγεται σαν αποτέλεσμα της μικροβιακής δραστηριότητας είναι περισσότερο από το νερό που χάνεται μέσω εξάτμισης. Ένα μεγάλο μέρος της διαδικασίας κομποστοποίησης είναι η απώλεια νερού, σαν αποτέλεσμα της εξάτμισης αυτού. Είναι ευρέως γνωστό ότι αναστολή της μικροβιακής δραστηριότητας συμβαίνει όταν οι τιμές υγρασίας πέσουν κάτω από 30 - 35% (Stentiford, 1995).

Η ιδανική υγρασία ενός σωρού κομποστοποίησης κυμαίνεται στο 46-60% του βάρους. Χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία θα επιβραδύνει τη διαδικασία κομποστοποίησης. Επίσης η υγρασία λειτουργεί σαν ρυθμιστικός παράγοντας της θερμοκρασίας. Στεγνοί σωροί τείνουν να

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

θερμαίνονται και να κρυσταλλώνουν γρηγορότερα από τους πιο υγρούς σωρούς, καθιστώντας τους περισσότερο ευάλωτους σε πιθανή ανάφλεξη. Από την άλλη πλευρά υπερβολική υγρασία (>60%) σημαίνει πως οι πόροι του σωρού είναι γεμάτοι με νερό αντί για αέρα, οδηγώντας έτσι σε αναερόβιες συνθήκες (Cooperband, 2002).

Σύμφωνα με τον Schulze (1961), η ιδανική περιεκτικότητα σε υγρασία κυμαίνεται από 50 έως 60%. Οι Wiley & Pierce (1955), όπως αναφέρεται στον Epstein (1997), εκτίμησαν τρεις διαφορετικές περιεκτικότητες σε υγρασία κατά την κομποστοποίηση Αστικών Στερεών Αποβλήτων. Η υψηλότερη θερμοκρασία επιτεύχθηκε σε υγρασία 55-69%. Υγρασία 72-77% οδήγησε στις χαμηλότερες θερμοκρασίες, ενώ 40-53% υγρασίας, έδωσε ενδιάμεσες θερμοκρασιακές τιμές.

Η μικροβιακή αποσύνθεση συμβαίνει κυρίως σε μια λεπτή υγρή μεμβράνη (biofilms) στην επιφάνεια των οργανικών τεμαχιδίων. Εάν η περιεκτικότητα σε υγρασία πέσει κάτω από ένα κρίσιμο επίπεδο (<30%), η μικροβιακή δραστηριότητα μειώνεται και όλοι οι μικροοργανισμοί πέφτουν σε λανθάνουσα κατάσταση. Από την άλλη πλευρά, όταν η περιεκτικότητα σε υγρασία είναι πολύ υψηλή (>65%) μπορεί να προκληθεί εξάντληση του O<sub>2</sub> και απώλειες θρεπτικών μέσω στράγγισης. Σαν αποτέλεσμα όλων αυτών είναι η ανάπτυξη αναερόβιων συνθηκών, η μείωση του ρυθμού αποικοδόμησης και η εμφάνιση προβλημάτων οσμών. Εντούτοις, ακόμα και κάτω από άριστες συνθήκες, μπορεί να υπάρχουν αναερόβια μικροπεριβάλλοντα (Ryckeboer *et al.*, 2003).

Ένας κοινός τρόπος επίτευξης υψηλής υγρασίας κατά την κομποστοποίηση είναι η ανάμιξη στερεών αποβλήτων, υψηλής περιεκτικότητας σε C και χαμηλής περιεκτικότητας σε υγρασία (π.χ. υπόστρωμα άχυρων – straw bedding), με κοπριά (π.χ. υγρά απόβλητα χοιροστασίου), η οποία είναι πλούσια σε N και χαρακτηρίζεται από υψηλές τιμές υγρασίας.

### **2.3.3 Θερμοκρασία**

Οι αλλαγές στη θερμοκρασία επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη μικροβιακή κοινότητα του κόμποστ. Επιδρά και στα επίπεδα υγρασίας, τα οποία με τη σειρά τους επηρεάζουν τις μικροβιακές κοινότητες. Η σχέση χρόνου – θερμοκρασίας επηρεάζει το ρυθμό αποικοδόμησης της οργανικής ουσίας και για αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντική για την παραγωγή ενός σταθερού

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

και ώριμου για χρήση προϊόντος. Η επίδραση της θερμοκρασίας στην κομποστοποίηση αντανακλάται και από τις κατηγορίες των μικροοργανισμών που επικρατούν στις διάφορες φάσεις της κομποστοποίησης (μεσόφιλοι – θερμόφιλοι μικροοργανισμοί κ.α.)

Εφόσον η κατανάλωση οξυγόνου είναι λειτουργία της μικροβιακής δραστηριότητας, όσο μεγαλύτερος είναι ο ρυθμός αυτής της κατανάλωσης τόσο περισσότερο πλησιάζουμε τη βέλτιστη θερμοκρασία αποικοδόμησης. Οι Jeris & Regan (1973c) ανέφεραν ότι η βέλτιστη θερμοκρασία αποικοδόμησης για τα αστικά στερεά απόβλητα ήταν κοντά στους 60 °C, ενώ ο Schulze (1961) τους 65-70 °C, όπως αναφέρεται στον Epstein (1997).

Η ρύθμιση της θερμοκρασίας γίνεται με αερισμό του υλικού. Ο αερισμός μπορεί να είναι ασυνεχής (με αναστροφή των σωρών) ή συνεχής (με διοχέτευση αέρα μέσα στη μάζα του υλικού). Στην πρώτη περίπτωση παρατηρείται μια πρόσκαιρη πτώση της θερμοκρασίας η οποία γρήγορα επανέρχεται σε υψηλά επίπεδα. Στη δεύτερη περίπτωση η θερμοκρασία διατηρείται σταθερά στα επιθυμητά επίπεδα, με μειονέκτημα την όχι ομοιόμορφη κατανομή του αέρα στη μάζα του υλικού (Γεωργακάκης, 2009).

### **2.3.4 Θρεπτικά**

#### Άνθρακας (C)

Ο C παρέχεται στη μικροβιακή κοινότητα από την αποικοδόμηση των φυτικών, ζωικών ή/και ανθρώπινων αποβλήτων και χρησιμοποιείται για την κυτταρική αύξηση. Κατά τη μικροβιακή δραστηριότητα το CO<sub>2</sub> της αναπνοής αυξάνει και εκλύεται στην ατμόσφαιρα. Ο άμεσα διαθέσιμος C καταναλώνεται αρχικά. Καθώς η κομποστοποίηση προχωρά, ο ρυθμός παραγωγής CO<sub>2</sub> μειώνεται ως αποτέλεσμα της μειούμενης μεταβολικής δραστηριότητας και του διαθέσιμου άνθρακα. Αυτό που έχει σημασία, είναι ο άνθρακας που είναι διαθέσιμος για τους μικροοργανισμούς, και όχι ο ολικός άνθρακας που εμπεριέχεται στο υλικό.

#### Άζωτο (N)

Το άζωτο αποτελεί κρίσιμο στοιχείο της μικροβιακής ανάπτυξης. Εάν το N είναι περιορισμένο η αποικοδόμηση θα προχωρήσει αργά. Σε περίσσεια, μπορεί να χαθεί με τη μορφή της πτητικής αμμωνίας ή μέσω της μετατροπής της σε νιτρικά. Οι μικροοργανισμοί χρειάζονται το N για την πρωτεϊνοσύνθεση. Εξαιτίας της ταχείας υδρόλυσης της ουρίας και της απομάκρυνσης των



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

αμινών από τα μη ενσωματωμένα πεπτίδια, η αμμωνία αποτελεί τη σημαντικότερη πηγή αζώτου που είναι διαθέσιμη στα υλικά κομποστοποίησης και μπορεί να λειτουργήσει ως υπόστρωμα για νιτροποίηση. Το N επίσης αποτελεί πρωταρχικό θρεπτικό στοιχείο για τα φυτά, η συγκέντρωσή του επομένως επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό και την αξία του κόμποστ σαν εδαφοβελτιωτικό προϊόν (Rynk, 1962).

### Ο λόγος C/N

Η παροχή του άνθρακα σε σχέση με το άζωτο είναι μια πολύ σημαντική παράμετρος ποιότητας του προς κομποστοποίηση αρχικού υλικού. Αυτή η σχέση χαρακτηρίζεται σαν λόγος C:N. Συνήθως η ιδανική τιμή αυτού του λόγου κυμαίνεται από 25:1 - 35:1. Εάν ο λόγος είναι μεγαλύτερος από 20:1, οι μικροοργανισμοί θα χρησιμοποιήσουν όλο το διαθέσιμο N για τις μεταβολικές τους ανάγκες. Εάν ο λόγος πέσει κάτω από 20:1, υπάρχει περίσσεια N το οποίο μπορεί να διαφύγει στην ατμόσφαιρα υπό τη μορφή αμμωνίας και να προκαλέσει προβλήματα δυσάρεστων οσμών<sup>4</sup>. Σε τιμές που ξεπερνούν το 50:1 η κομποστοποίηση επιβραδύνεται εξαιτίας της ταχείας κυτταρικής ανάπτυξης και παράλληλης εξάντλησης του διαθέσιμου N. Αυτό οδηγεί σε μειωμένη κυτταρική ανάπτυξη. Καθώς τα κύτταρα αποίπτον, οι αποθήκες αζώτου τους γίνονται διαθέσιμες για τα ζώντα κύτταρα (Bishop & Godfrey, 1983 όπως αναφέρεται στον Epstein, 1997).

Τα πράσινα απορρίμματα συνήθως έχουν χαμηλότερες τιμές λόγου C:N σε σχέση με τα υλικά που έχουν ως βάση το ξύλο ή τα νεκρά φύλλα. Τα ζωικά απόβλητα είναι πλουσιότερα σε N σε σχέση με τα φυτικά απόβλητα (Cooperband, 2002).

### **2.3.5 pH**

Η οξύτητα ή αλκαλικότητα των οργανικών υλικών, μετρούμενη με την τιμή του pH, επηρεάζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Οι βακτηριακοί αποικοδομητές προτιμούν εύρος τιμών pH 6.0 – 7.5, ενώ οι μύκητες προτιμούν pH 5.5 – 8.0. Η διαδικασία της κομποστοποίησης προχωρά βέλτιστα σε pH μεταξύ 6.5 – 8.0, εντούτοις επιτυχής κομποστοποίηση παρατηρείται και σε μεγαλύτερο εύρος τιμών pH, εξαιτίας της φυσικής ρύθμισης της οξύτητας του κόμποστ. Όταν το pH του κόμποστ ξεπερνά το 7.5, είναι πολύ πιθανή η απώλεια της πτητικής αμμωνίας

---

<sup>4</sup> Σε κανονικές συνθήκες η αμμωνία απαντά ως άχρωμο αέριο, με χαρακτηριστική καυστική και αποπνικτική οσμή.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

(Rynk, 1992). Το pH επιδρά και στις θερμοκρασιακές συνθήκες του κόμποστ. Οι υψηλότερες θερμοκρασίες, για το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, επιτυγχάνονται σε εύρος pH 6.5 – 9.6 (Epstein, 1997).

**Πίνακας 2.2** Συγκεντρωτική παρουσίαση των ιδανικών συνθηκών για ταχεία αερόβια αποικοδόμηση κατά την κομποστοποίηση (προσαρμοσμένο από Cooperband, 2002).

Συνθήκες	Αποδεκτές τιμές	Άριστες τιμές
Λόγος C:N	20 - 40:1	25 - 35:1
Υγρασία	40 - 65%	45 - 60%
Διαθέσιμη συγκέντρωση οξυγόνου	>5%	>10% ή/και περισσότερο
Μέγεθος μορίων του σωρού	<2.54 cm (1 ίντσα)	Ποικίλο
pH	5.5 – 9.0	6.5 – 8.0
Θερμοκρασία	43 – 66 °C	54 – 60 °C

## 2.4 Συστήματα Κομποστοποίησης

Τα εν δυνάμει συστήματα κομποστοποίησης συνοψίζονται στον **Πίν. 2.3**.

**Πίνακας 2.3** Συστήματα κομποστοποίησης (Προσαρμοσμένο από Leege, 1995).

Ομάδα 1	Ομάδα 2	Ομάδα 3	Ομάδα 4	Ομάδα 5
Ανοιχτοί Σωροί	Ανοιχτά σειράδια και σωροί	Καλυμμένοι σωροί και σήραγγες (tunnels)	Καλυμμένα σειράδια και τάφροι	Καλυμμένες σήραγγες και συστήματα σωλήνων
Αδιατάραχτοι, χωρίς κανένα χειρισμό	Γύρισμα και διαβροχή	Στατικός αερισμός, με έλεγχο της θερμοκρασίας και ρύθμιση υγρασίας	Γύρισμα και αερισμός με έλεγχο της θερμοκρασίας και ρύθμιση υγρασίας	Γύρισμα και αερισμός με έλεγχο της θερμοκρασίας και ρύθμιση υγρασίας

Από πολλούς η ομάδα 1 δε θεωρείται σύστημα κομποστοποίησης. Αυτό το σύστημα δε μειώνει τα παθογόνα και ουσιαστικά είναι αναερόβια μέθοδος. Στις ομάδες 3 έως 5 εφαρμόζεται μηχανικός αερισμός. Αερισμός με γυρίσματα συναντάται μόνο στην ομάδα 2.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 3. Μικροβιολογία της κομποστοποίησης

Η γνώση, η κατανόηση και η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που είναι υπεύθυνοι για τη βιοαποικοδόμηση συγκεκριμένων χημικών ενώσεων είναι πολύ χρήσιμες για τη διαδικασία της κομποστοποίησης, καθώς και για τη βιοαποικοδόμηση ρυπαντών που επιτυγχάνεται μέσω αυτής. Η θερμοκρασία είναι ο μοναδικός κύριος παράγοντας που επηρεάζει τον αριθμό και τον τύπο των μικροοργανισμών σε ένα σωρό κομποστοποίησης. Καθώς η θερμοκρασία αυξάνει, η ανάπτυξη των οργανισμών επιταχύνεται. Οι μικροοργανισμοί είναι η καρδιά της κομποστοποίησης. Οι εμπλεκόμενοι μικροβιακοί πληθυσμοί είναι πολυάριθμοι και πολλές φορές αγγίζουν επίπεδα  $10^9 - 10^{10}$  βακτηριακά κύτταρα/g κόμποστ.

Η κατανόηση της ποικιλομορφίας και της αλληλοδιαδοχής των μικροβιακών πληθυσμών μπορεί να μας βοηθήσει να διακρίνουμε τους παράγοντες που επηρεάζουν την πορεία της κομποστοποίησης. Εφόσον διαφορετικοί οργανισμοί χρησιμοποιούν διαφορετικές πηγές άνθρακα, η γνώση των μικροβιακών πληθυσμών και της δραστηριότητάς τους μπορεί να προτείνει εκείνες τις αλλαγές στην διαδικασία της κομποστοποίησης, οι οποίες να οδηγήσουν σε καλύτερη αποσύνθεση (Erstein, 1997).

Κατά την κομποστοποίηση οι αρχικοί αποικοδομητές δημιουργούν ένα φυσικο-χημικό περιβάλλον κατάλληλο για τους μικροοργανισμούς που θα τους διαδεχθούν, οι οποίοι αδυνατούν να χρησιμοποιήσουν τα αρχικά υποστρώματα. Οι μεταβολίτες που παράγονται από την αρχική μικροβιακή ομάδα μπορούν να χρησιμοποιηθούν από την επόμενη.

Στην 1<sup>η</sup> μεσόφιλη φάση τα υποστρώματα είναι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και το pH είναι συνήθως ελαφρώς όξινο. Μεσόφιλα ή / και θερμοανθεκτικά βακτήρια και μύκητες είναι οι κυρίαρχοι αποικοδομητές της οργανικής ουσίας στα πρώτα στάδια της διαδικασίας κομποστοποίησης. Τα βακτήρια (συμπεριλαμβανομένων και των ακτινομυκήτων) είναι γενικώς αυτά που επικρατούν αριθμητικά. Για τα βακτήρια η άριστη υγρασία κυμαίνεται από 50-60%, ενώ προτιμούν pH ουδέτερο. Οι ακτινομύκητες αναπτύσσονται πιο αργά σε σχέση με τα βακτήρια και τους μύκητες και είναι αναποτελεσματικοί ανταγωνιστές όταν τα επίπεδα των θρεπτικών είναι υψηλά (Beffa *et al.*, 1995).

Καθώς η υγρασία ελαττώνεται, η θερμοκρασία αυξάνει πάνω από 30 °C και τα υποστρώματα γίνονται πιο αλκαλικά, οι ακτινομύκητες, και κυρίως οι στρεπτομύκητες «αγωνίζονται» να επιβιώσουν. Στη θερμοφιλή πλέον φάση οι ακτινομύκητες ανταγωνίζονται με άλλους

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

οργανισμούς για θρεπτικά και μπορεί να αναστέλλουν τη μικροβιακή ανάπτυξη με παραγωγή αντιβιοτικών, λυτικών ενζύμων, ή ακόμη και παρασιτισμό. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κομποστοποίηση αποικοδομώντας φυσικά πολυμερή. Η κυτταρίνη και ημι-κυτταρίνη προερχόμενη από φυτικά υλικά, η χιτίνη από τους μύκητες και πιθανώς η λιγνίνη είναι οι πηγές C και N για αυτούς (Beffa *et al.*, 1996). Οι περισσότεροι ακτινομύκητες αντέχουν σε υψηλότερο pH από τους μύκητες (άριστες τιμές pH μεταξύ 7 και 8).

Οι μεσόφιλοι μικροοργανισμοί απενεργοποιούνται ή θανατώνονται στην αρχή της θερμοφίλης φάσης, ενώ ο πληθυσμός και η ποικιλότητα των θερμοφίλων ή/και θερμοανθεκτικών βακτηρίων, ακτινομυκήτων και μυκήτων αυξάνονται (Beffa *et al.*, 1995). Κατά τη θερμοφίλη φάση της κομποστοποίησης παρατηρείται θερμική απενεργοποίηση των παθογόνων η οποία είναι απαραίτητη προκειμένου να παραχθούν ασφαλή προϊόντα, τόσο σε όρους φυτικής υγιεινής όσο και ανθρώπινων ασθενειών. Γενικώς, όσο υψηλότερη η θερμοκρασία, τόσο αποτελεσματικότερη είναι η εξάλειψη των παθογόνων. Από την άλλη, η ανάκαμψη των μεσόφιλων πληθυσμών ίσως καθυστερήσει, αν οι υψηλές θερμοκρασίες διατηρηθούν για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, και αν η υψηλή θερμοκρασία επιτευχθεί σε όλη τη μάζα του κόμποστ. Σε αυτή την περίπτωση ίσως χρειαστεί επανεμβολιασμός.

Τόσο οι θερμοφιλοί όσο και οι μεσόφιλοι αναφέρονται σαν καλοί αποικοδομητές της κυτταρίνης, αν και οι πρώτοι θεωρούνται καλύτεροι. Η βέλτιστη θερμοκρασία αποικοδόμησης της κυτταρίνης είναι περίπου 65 °C, εξ ου και η αποικοδόμηση της γίνεται κυρίως από ανθεκτικά στις υψηλές θερμοκρασίες ένζυμα. Οι μύκητες έχουν μεγαλύτερη ικανότητα αποικοδόμησης της κυτταρίνης και της λιγνίνης από τους ακτινομύκητες και τα βακτήρια εν γένει. Εντούτοις η ολική βακτηριακή ποικιλότητα μειώνεται σημαντικά κατά τη θερμοφίλη φάση. Τυπικά βακτήρια που είναι πολύ ενεργά σε θερμοκρασίες 50 – 60 °C είναι τα σποριογόνα βακτήρια, π.χ. *Bacillus* spp. (Beffa *et al.*, 1996). Σε θερμοκρασίες άνω των 60 °C, η αποικοδόμηση πραγματοποιείται σχεδόν εξ ολοκλήρου από θερμοφιλα βακτήρια (Beffa *et al.*, 1995). Στις ίδιες θερμοκρασίες ο αριθμός και η ποικιλότητα των ακτινομυκήτων μειώνεται, άρα και η συμβολή τους στην διαδικασία αποικοδόμησης.

Λόγω εξάντλησης των υποστρωμάτων, η δραστηριότητα των θερμοφίλων οργανισμών μειώνεται, η θερμοκρασία πέφτει, και έτσι μπαίνουμε στη 2<sup>η</sup> μεσόφιλη φάση. Οι μεσόφιλοι μικροοργανισμοί επανα-κυριαρχούν στο υπόστρωμα, προερχόμενοι είτε από επιβιώσαντα

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

σπόρια, ή μέσω εξάπλωσης από προστατευμένες στην υψηλή θερμοκρασία περιοχές του κόμποστ, ή από εξωτερικό εμβολιασμό. Πολλοί από αυτούς δεν οξειδώνουν απλά την οργανική ύλη αλλά εμπλέκονται στην οξείδωση του υδρογόνου, της αμμωνίας, των νιτρικών, στην αζωτοδέσμευση, στη μείωση των θεικών, στην παραγωγή εξω-πολυσακχαριτών ή νιτρικών από αμμωνία, κάτω από ετερότροφες συνθήκες (Beffa *et al.*, 1995).

Στη φάση ωρίμανσης ένα πρόβλημα που προκύπτει είναι η ατελής αποικοδόμηση της κυτταρίνης<sup>5</sup>. Η εναπομένουσα κυτταρίνη είναι πιθανόν απρόσιτη σε ενζυματική δράση λόγω έλλειψης νερού ή ισχυρής σύνδεσής της με άλλες ουσίες όπως η λιγνίνη.

Βακτήρια που σχετίζονται με το γένος *Arthrobacter* αποτελούν ένα σημαντικό κλάσμα της φυσικής βακτηριακής χλωρίδας στο χόμα και η παρουσία τους καθώς και ο πληθυσμός τους στα ώριμα κόμποστ αποτελούν μία επιπρόσθετη μικροβιολογική παράμετρο εκτίμησης της ωριμότητας του κόμποστ (Ryckeboer *et al.*, 2003).

Στον Πίν. 3.1 παρουσιάζονται συνοπτικά μικροοργανισμοί που έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορες φάσεις της κομποστοποίησης.

---

<sup>5</sup> Οι κυτταρινολυτικοί οργανισμοί διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανακύκλωση της κυτταρίνης. Η κυτταρίνη είναι απλό πολυμερές, αλλά σχηματίζει αδιάλυτα, κρυσταλλικά μικροϊνίδια, πολύ ανθεκτικά στην ενζυματική υδρόλυση. Είναι ο κύριος υδατάνθρακας που συντίθεται από τα φυτά. Είναι ένα γραμμικό πολυμερές αποτελούμενο από υπομονάδες γλυκόζης ενωμένες με β-1,4 δεσμούς. Το μήκος της αλυσίδας της ποικίλει από 100 έως 14000 κατάλοιπα. Οι αλυσίδες κυτταρίνης σχηματίζουν πολλούς εσω- και διαμοριακούς υδρογονικούς δεσμούς, οι οποίοι ευθύνονται για το σχηματισμό άκαμπτων, αδιάλυτων μικροϊνιδίων. Όλοι οι οργανισμοί που είναι γνωστοί για την ικανότητά τους να αποικοδομούν την κυτταρίνη παράγουν μια ομάδα ενζύμων με διαφορετικές ειδικότητες, τα οποία όμως δρουν συνεργιστικά. Τα περισσότερα κυτταρινολυτικά ένζυμα εκτός από καταλυτικές περιοχές φέρουν και περιοχές που δεν εμπλέκονται στην κατάλυση, αλλά συμμετέχουν στη δέσμευση στο υπόστρωμα, στο σχηματισμό πολύπλοκων ενζυμικών συμπλόκων ή πιθανόν στη δέσμευση στην κυτταρική επιφάνεια. Επομένως αυτές οι περιοχές εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της κρυσταλλικής κυτταρίνης, αποτρέποντας την απομάκρυνση των ενζύμων από το υπόστρωμα, εστιάζοντας την υδρόλυση σε περιορισμένες περιοχές όπου το υπόστρωμα συνεργιστικά αποσταθεροποιείται μέσω πολλαπλών τεμαχισμών, επιτρέποντας παράλληλα την ανάκτηση των διαλυτών αποικοδομημένων προϊόντων από τους κυτταρινολυτικούς οργανισμούς. Στους περισσότερους κυτταρινολυτικούς οργανισμούς, η σύνθεση των σελουλασών καταστέλλεται παρουσία εύκολα μεταβολίσιμων, διαλυτών πηγών άνθρακα και επάγεται ξανά παρουσία κυτταρίνης (Beguin & Aubert, 1994). Το ενζυμικό σύμπλοκο των σελουλασών αποτελείται από τρία μεγάλα ενζυμικά συστατικά την ενδο-β-(1-4)-D-γλουκανάση, την εξω-β-(1-4)-D-γλουκανάση, και την β-γλυκοζιδάση τα οποία δρουν συνεργιστικά στην αποικοδόμηση της κυτταρίνης. Στη διαδικασία αποικοδόμησης η ενδο-β-(1-4)-D-γλουκανάση ή αλλιώς carboxymethyl cellulase (καρβοξυ – μεθυλική κυτταρίνη) δρα διασπώντας τυχαία τους β-1,4 δεσμούς της αλυσίδας γλυκόζης, εκθέτοντας τη δομή της κυτταρίνης στην επακόλουθη δράση της εξω-β-(1-4)-D-γλουκανάσης. Η τελευταία δρα απελευθερώνοντας το ήμισυ της κελλοβιόζης (2 μόρια γλυκόζης ενωμένα με β-1,4 δεσμό) από το τέλος της αλυσίδας γλυκόζης. Τέλος η β-γλυκοζιδάση απελευθερώνει τη γλυκόζη από την κελλοβιόζη μαζί με μικρές αλυσίδες ολιγοσακχαριτών (Abu Bakar *et al.*, 2010).

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

**Πίνακας 3.1** Συνοπτική παρουσίαση μικροοργανισμών που κατά καιρούς έχουν ταυτοποιηθεί κατά την κομποστοποίηση (Προσαρμοσμένο από Epstein, 1997).

<b>Bacteria</b>		<b>Actinomycetes</b>	
<i>Aerobacter (aerogenes)</i>	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Pseudonocardia</i>
<i>Bacillus megatherium</i>	<i>T. denitrificans</i>	<i>Thermomonospora viridis</i>	<i>Actinoplanes sp.</i>
<i>B. stearothermophilus</i>		<i>T. curvata</i>	
<i>B. cereus</i>		<i>Micromonospora parva</i>	
<i>B. mycoides</i>		<i>M. vulgaris</i>	
<i>Pseudomonas sp.</i>		<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	
<i>Flavobacterium sp.</i>		<i>Thermomonospora fusca</i>	
<i>Micrococcus sp.</i>		<i>T. glaucus</i>	
<i>Sarcina sp.</i>		<i>Streptomyces violaceoruber</i>	
<i>Cellulomonas folia</i>		<i>S. thermoviolaceus</i>	
<i>Chondrococcus exiguus</i>		<i>S. rectus</i>	
<i>Myxococcus virescens</i>		<i>S. thermofuscus</i>	
<i>M. fulvus</i>		<i>S. thermovulgaris</i>	
<i>Proteus sp.</i>			
<b>Fungi</b>			
<i>Rhizopus nigricans</i>	<i>Trichoderma koningi</i>	<i>Trichosporon cutaneum</i>	
<i>Rhizoctonia sp.</i>	<i>Talaromyces (Penicillium) duponti</i>	<i>Verticillium sp.</i>	
<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Stysanus stemonitis</i>	<i>Syncephalastrum sp.</i>	
<i>Mucor pusillus</i>	<i>Glibotrrys (alaboviridis)</i>	<i>Pichia sp.</i>	
<i>Penicillium digitatum</i>	<i>Humicola insolens</i>	<i>Chaetomium (thermophile)</i>	
<i>Mucor racemosus</i>	<i>Humicola griseus var. thermoideus</i>	<i>Lipomyces sp.</i>	
<i>Torulopsis sp.</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>	<i>Sporotrichium thermophile</i>	
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Candida (parapsilosis)</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>	
<i>Absidia (ramosa)</i>	<i>Cladosporium herbarum</i>		
<i>Saccharomyces sp.</i>	<i>Aspergillus tamaris</i>		
<i>Pullularia sp.</i>	<i>Zygorhynchus vuilleminii</i>		
<b>Protozoans</b>	<b>Algae</b>		
<i>Chilomonas (paramecium)</i>	<i>Hormidium (nitens)</i>	<i>Chlorococcum humicola</i>	
<i>Cyathomonas (truncate)</i>	<i>Vaucheria (terrestris)</i>	<i>Microcoleus vaginatus</i>	
<i>Lycogala epidendrum</i>	<i>Euglena mutabilis</i>	<i>Porphyridium (cruentum)</i>	
<i>Cercomonas (crassicanda)</i>	<i>Protococcus vulgaris</i>	<i>Kentrosphaera sp.</i>	
	<i>Dactylococcus (bicandatus)</i>	<i>Diatoms (unidentified)</i>	

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πολλές μελέτες, με χρήση ποικίλων μεθόδων, ανά τον κόσμο, έχουν πραγματοποιηθεί στην προσπάθεια μελέτης της μικροβιακής κοινότητας του κόμποστ, και της επίδρασης των διαφόρων φυσικο-χημικών παραγόντων σε αυτή.

Οι Beffa *et al.* (1995) μελέτησαν για πρώτη φορά τη μικροβιακή ποικιλότητα θερμογενών κόμποστ. Σε θερμοκρασίες 50 - 60 °C απομονώθηκε μεγάλη ποικιλία υποχρεωτικά ετερότροφων βάκιλλων. Η ποικιλότητα μειώθηκε σημαντικά σε θερμοκρασίες <60 °C, ενώ σε θερμοκρασίες 65 - 69 °C μόνο στελέχη σχετιζόμενα με το *Bacillus stearothermophilus* ταυτοποιήθηκαν. Οι ομάδες θερμόφιλων στελεχών ανήκαν κυρίως σε τέσσερις ομάδες: υποχρεωτικά αυτότροφα βακτήρια που οξειδώνουν το υδρογόνο και τα θειικά (*Hydrogenobacter* spp.) – δυνητικά αυτότροφα βακτήρια που οξειδώνουν το υδρογόνο και τα θειικά (*Bacillus schlegelii*) – υποχρεωτικά ετερότροφα βακτήρια, όχι σποριογόνα, που σχετίζονται με το γένος *Thermus* – υποχρεωτικά ετερότροφοι ωοειδούς σχήματος σποριογόνοι βάκιλλοι.

Οι Dees & Ghiorse (2000) μελέτησαν τη μικροβιακή ποικιλότητα σε κόμποστ υψηλής θερμοκρασίας (>60 °C) από απόβλητα συνθετικών τροφών, με τη χρήση κλασσικών και μοριακών τεχνικών, καλλιεργήσιμων και μη στελεχών. Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι τα κυρίαρχα στελέχη ανήκαν στα γένη *Aneurinibacillus* και *Brevibacillus*, τα οποία δε σχετίζονται συχνά με θερμά κόμποστ. Όσον αφορά στους ακτινομύκητες οι περισσότερες αλληλουχίες σχετίζονταν με τα γένη *Saccharomonospora*, *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium*.

Οι Hassen *et al.* (2002) μελέτησαν τη μικροβιακή κοινότητα κατά την κομποστοποίηση αστικών στερεών αποβλήτων και βρήκαν τα εξής: αυτό-αποστείρωση με υψηλές θερμοκρασίες (55-60 °C) η οποία μείωσε τον πληθυσμό του βακτηρίου *E. coli*, των περιττωματικών στρεπτόκοκκων, των ζυμών, των μυκήτων και των μεσόφιλων βακτηρίων – τα βακτηριακά σπόρια αυξήθηκαν στην αρχή της κομποστοποίησης αλλά μειώθηκαν σημαντικά γύρω στην 3<sup>η</sup> εβδομάδα – η *Salmonella* εξαφανίστηκε εντελώς μετά την 25<sup>η</sup> ημέρα, όπου η θερμοκρασία έφτασε τους 60 °C – ο βακτηριακός πληθυσμός αυξήθηκε κατά τη 2<sup>η</sup> μεσόφιλη φάση – οι βάκιλλοι κυριάρχησαν στον υπόλοιπο χρόνο κομποστοποίησης – εφαρμογή υπερήχων (sonication<sup>6</sup>) για τρία λεπτά οδήγησε στην αδρανοποίηση ευαίσθητων βακτηρίων (όπως Gram<sup>-</sup>).

---

<sup>6</sup> **Sonication**: σε βιολογικές εφαρμογές η μέθοδος χρησιμοποιείται για την καταστροφή ή αδρανοποίηση βιολογικών υλικών. Πολλές φορές χρησιμοποιείται για τη διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών και την απελευθέρωση των κυτταρικών περιεχομένων.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι Fracchia *et al.* (2006) μελέτησαν τις βακτηριακές κοινότητες σε δύο σωρούς κομποστοποίησης (κόμποστ και βέρμι – κομπόστ<sup>7</sup>) με τη μέθοδο του πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP). Οι αλληλουχίες που ανακτήθηκαν από το κόμποστ ταξινομήθηκαν στα φύλα *Actinobacteria* και *Firmicutes*. Οι αλληλουχίες που ανακτήθηκαν από το βέρμι – κομπόστ σχετίζονταν με μη – καλλιεργούμενα βακτήρια από τα φύλα *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Gemmatimonadetes*. Η ανάλυση λοιπόν βακτηριακών κοινοτήτων με μεθόδους που δεν απαιτούν καλλιέργεια, αποτελεί ενδεχομένως ένα χρήσιμο δείκτη αξιολόγησης της ποιότητας του τελικού προϊόντος κομποστοποίησης.

Οι Guo *et al.* (2007) χρησιμοποίησαν μεθόδους ανεξάρτητες από την καλλιέργεια των μικροοργανισμών για να μελετήσουν την ποικιλότητα δειγμάτων από διαφορετικά σημεία σωρού κόμποστ παρασκευασμένο κατά τη συγκομποστοποίηση απόβλητων χοιροστασίου με άχυρα από ρύζι. Συνέκριναν τη μικροβιακή ποικιλότητα τριών σημείων του σωρού (βάση – πυρήνας – επιφάνεια) όταν η θερμοκρασία του πυρήνα ήταν 39.9 °C. Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι οι αλληλουχίες σχετίζονταν με τα εξής βακτήρια α) στην επιφάνεια: *Shigella sonnei*, *Comamonas testosterone*, *Acinetobacter sp.*, *Clostridium glycolicum*, *C. disporicum* β) στο κέντρο: *Clostridium sp.*, *C. sartagoforum*, *C. glycolicum*, *S. flexneri*, *Comamonas sp.* γ) στη βάση: *C. disporicum*, *Lactobacillus kitasatonis*, *C. glycolicum*.

Οι Vivas *et al.* (2009) μελέτησαν τις επιδράσεις δύο τεχνολογιών, της κομποστοποίησης και του βέρμι – κομπόστ, σε τοξικά οργανικά απόβλητα (στερεά απόβλητα ελαιοτριβείου) κατά τη συγκομποστοποίηση με κοπριά προβάτων. Για την ανάδειξη της μικροβιακής ποικιλότητας χρησιμοποίησαν δύο μεθόδους μοριακών τεχνικών, τη real-time PCR και την αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση με πήκτωμα διαβάθμισης (DGGE). Στο αρχικό μίγμα αποβλήτων-κοπριάς επικρατούσαν μέλη του φύλου *Proteobacteria*. Οι υπόλοιπες αλληλουχίες ταξινομήθηκαν στα φύλα *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteria*. Κατά την κομποστοποίηση τα *Betaproteobacteria* μειώθηκαν, ενώ οι υπόλοιπες αλληλουχίες ταξινομήθηκαν στην κλάση *Gamma**proteobacteria*, στην κλάση *Alphaproteobacteria* και στα φύλα *Actinobacteria*, *Firmicutes* και *Bacteroidetes*. Στο βέρμι – κομπόστ τα *Betaproteobacteria* μειώθηκαν, ενώ οι υπόλοιπες αλληλουχίες που άνηκαν στα *Proteobacteria* ταξινομήθηκαν στην κλάση

---

<sup>7</sup> **Vermicomposting:** η διαδικασία κομποστοποίησης οργανικών αποβλήτων με την επιπρόσθετη δράση σκουληκιών στη μάζα του σωρού.



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

*Gammaproteobacteria* και στην κλάση *Alphaproteobacteria*. Επίσης βρέθηκαν αλληλουχίες από τα φύλα *Actinobacteria*, *Firmicutes* και *Acidobacteria*.

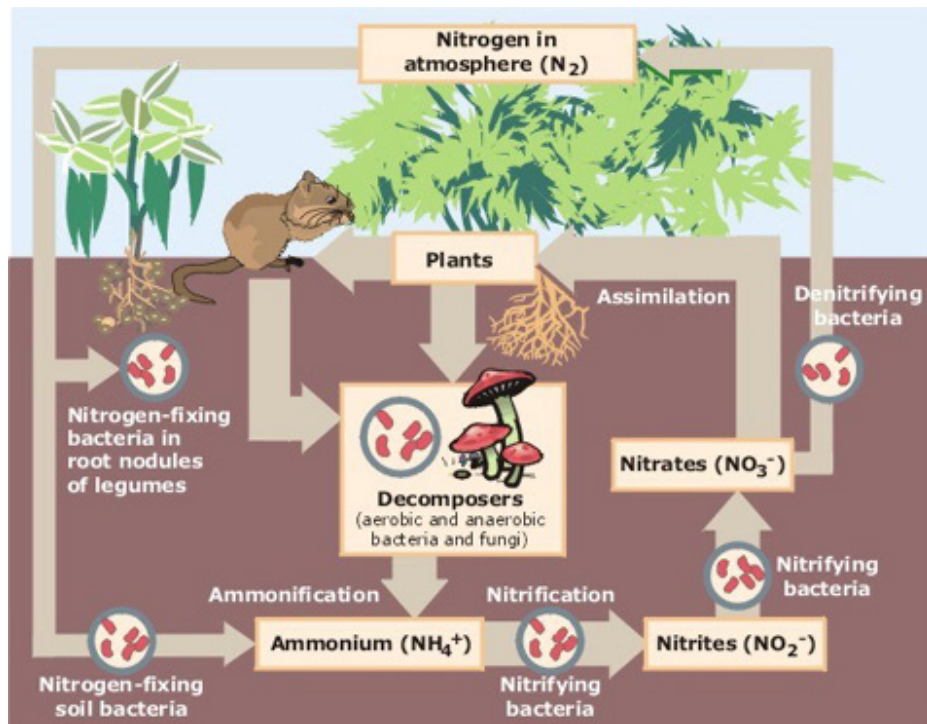
### 4. Αζωτοδέσμευση & Κομποστοποίηση

#### Ο Κύκλος του Αζώτου

Το άζωτο είναι το κύριο συστατικό των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων, θεμέλιων λίθων της ζωής. Ταυτόχρονα είναι το κυριότερο συστατικό της ατμόσφαιρας. Στην αέρια εντούτοις μορφή του, η μεγάλη πλειοψηφία των οργανισμών αδυνατεί να το χρησιμοποιήσει. Απαιτείται λοιπόν η μετατροπή του σε εύχρηστη μορφή, η οποία επιτυγχάνεται με τη διαδικασία της αζωτοδέσμευσης. Διακρίνουμε δύο τύπους αζωτοδέσμευσης, την φυσική ή ατμοσφαιρική και τη βιολογική. Στην πρώτη περίπτωση, το άζωτο της ατμόσφαιρας ενώνεται είτε με το υδρογόνο των ατμών σχηματίζοντας αμμωνία ή με το οξυγόνο, σχηματίζοντας νιτρικά ιόντα. Και τα δύο προϊόντα ως υδατοδιαλυτές ενώσεις, μεταφέρονται με τη βροχή στη γη και από εκεί μπορούν να προσληφθούν από τα φυτά και κατ' επέκταση από τους υπόλοιπους οργανισμούς. Ωστόσο με τη φυσική αζωτοδέσμευση παρέχεται μόνο το 10% του απαιτούμενου για τη ζωή αζώτου. Το υπόλοιπο 90% γίνεται διαθέσιμο με τη βιολογική αζωτοδέσμευση (Αριανούτσου, 2003).

Ο κύκλος του αζώτου περιγράφεται καλύτερα με τον όρο βιογεωχημικός κύκλος, τονίζοντας έτσι τον ενεργό ρόλο των οργανισμών που διεξάγουν τις χημικές μετατροπές (π.χ. στο έδαφος).

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ



Εικόνα 4.1 Ο βιογεωχημικός κύκλος του αζώτου.

### 4.1 Αμμωνιοποίηση

Αμμωνία παράγεται όταν αποικοδομούνται αζωτούχες ενώσεις, όπως τα αμινοξέα και τα νουκλεοτίδια, και σε ουδέτερο pH έχει τη μορφή αμμωνιακού ιόντος (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Στα εδάφη, το μεγαλύτερο μέρος της αμμωνίας που ελευθερώνεται μέσω της αερόβιας αποικοδόμησης ανακυκλώνεται γρήγορα, καθώς μετατρέπεται σε αμινοξέα φυτών και μικροοργανισμών. Η αμμωνία είναι πτητική, επομένως υπάρχει μια μικρή απώλεια λόγω εξάτμισης από τα εδάφη. Σε παγκόσμια κλίμακα πάντως μόνο το 15% του συνόλου των ενώσεων αζώτου βρίσκεται υπό τη μορφή NH<sub>3</sub>, το υπόλοιπο είναι κυρίως N<sub>2</sub> και N<sub>2</sub>O (από την απονιτροποίηση) (Madigan *et al.*, 2005).

Αντιδράσεις: οργανικό – N → NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (πολλοί οργανισμοί)

### 4.2 Νιτροποίηση

Περιλαμβάνει την οξείδωση της αμμωνίας (NH<sub>3</sub>) προς νιτρικά (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται σε δύο στάδια από δύο διαφορετικές ομάδες αυτότροφων βακτηρίων. Στο 1<sup>ο</sup>

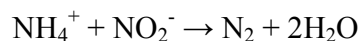
## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

στάδιο η  $\text{NH}_3$  οξειδώνεται προς νιτρώδη ( $\text{NO}_2^-$ ) από βακτήρια που οξειδώνουν την αμμωνία (βακτήρια του γένους *Nitrosomonas*). Το 2<sup>ο</sup> βήμα περιλαμβάνει την οξείδωση των  $\text{NO}_2^-$  προς  $\text{NO}_3^-$  και διεξάγεται από βακτήρια που οξειδώνουν τα νιτρώδη (βακτήρια του γένους *Nitrobacter*). Και στις δύο περιπτώσεις, η οξείδωση του ανόργανου N παρέχει στα αυτότροφα αυτά βακτήρια την απαραίτητη ενέργεια για ανάπτυξη και συντήρηση. Επίσης απαντάται και ετερότροφη νιτροποίηση, όμως οι ρυθμοί παραγωγής  $\text{NO}_2^-$  και  $\text{NO}_3^-$  από αυτή είναι πολύ χαμηλότεροι σε σχέση με την αυτότροφη νιτροποίηση. Τα περισσότερα βακτήρια που οξειδώνουν την αμμωνία ανήκουν σε μια μονοφυλετική ομάδα μέσα στη β υποδιαίρεση των *Proteobacteria* (Daniel, 2000).

Αντιδράσεις:  $\text{NH}_3 + \text{O}_2 \rightarrow \text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}$  (*Nitrosomonas bacteria*)



Αν και τα τυπικά νιτροποιητικά βακτήρια είναι αυστηρώς αερόβια, τουλάχιστον όταν αναπτύσσονται σε υποστρώματα ανηγμένου αζώτου, οξείδωση της αμμωνίας μπορεί να συμβεί και σε ανοξικές συνθήκες. Η διαδικασία ανοξικής οξείδωσης της αμμωνίας, γνωστή ως *annamox* (anoxic ammonia oxidation) είναι έντονα εξώεργη και συνδέεται με τον ενεργειακό μεταβολισμό των εμπλεκόμενων οργανισμών. Δέκτης ηλεκτρονίων στην αντίδραση *annamox* είναι το νιτρώδες, ενώ παράγεται αέριο άζωτο:



Πηγή  $\text{NO}_2^-$  για την αντίδραση *annamox* είναι η οξείδωση της αμμωνίας από αερόβια νιτροποιητικά βακτήρια. Η ανακάλυψη της αντίδρασης *annamox* έχει συνεισφέρει σημαντικά στην πληρέστερη κατανόηση του κύκλου του αζώτου στη φύση. Παλαιότερα θεωρείτο ότι η αμμωνία παραμένει σταθερή στα ανοξικά περιβάλλοντα, σήμερα όμως είναι σαφές ότι μπορεί να οξειδωθεί και απουσία  $\text{O}_2$  (Madigan *et al.*, 2005).

### 4.3 Απονιτροποίηση

Πρόκειται για τη μετατροπή των  $\text{NO}_3^-$  και  $\text{NO}_2^-$  προς αέριες ενώσεις N. Η διαδικασία της απονιτροποίησης περιλαμβάνει μια σειρά αναγωγών των οξειδίων του N, με κατάληξη το σχηματισμό αερίου  $\text{N}_2$ . Γίνεται κάτω από αναερόβιες συνθήκες και τα βακτήρια υπεύθυνα για

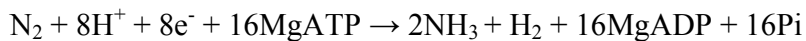
## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

αυτή τη διαδικασία ανήκουν σε μια μεγάλη ποικιλία φυλογενετικών ομάδων. Κυρίως είναι υποτάξεις των *Proteobacteria*, αλλά επεκτείνονται και στα Αρχαία (Daniel, 2000).

Αντιδράσεις:  $2\text{NO}_3^- \rightarrow 2\text{NO}_2^- \rightarrow 2\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$  (*Bacillus*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*)

### 4.4 Βιολογική Αζωτοδέσμευση

Η βιολογική δέσμευση του αζώτου είναι μια διαδικασία που απαντάται μόνο στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, και καταλύεται από το ενζυμικό σύμπλοκο της νιτρογενάσης. Τα βακτήρια που φέρουν το σύστημα της νιτρογενάσης καταλαμβάνουν μια αναπόσπαστη οικολογική θέση τροφοδοτώντας τον παγκόσμιο κύκλο του αζώτου με σταθεροποιημένο άζωτο (Halbleib & Ludden, 2000). Κατά την αζωτοδέσμευση, το  $\text{N}_2$  ανάγεται σε αμμώνιο, και το αμμώνιο με τη σειρά του μετατρέπεται σε οργανικό άζωτο. Η αντίδραση που καταλύεται από τη νιτρογενάση είναι εξαρτώμενη από MgATP για την αναγωγή του αερίου  $\text{N}_2$ , προς παραγωγή 2 μορίων  $\text{NH}_3$ , και περιγράφεται παρακάτω:



Η αντίδραση που καταλύεται από τη νιτρογενάση είναι ενεργειακά ακριβή (16 ATP + 8 ηλεκτρόνια για κάθε μόριο που ανάγεται) και το ίδιο το ένζυμο είναι *in vitro* ευαίσθητο σε αδρανοποίηση από το οξυγόνο (Zehr *et al.*, 2003).

#### 4.4.1 Δομή των πρωτεϊνών της νιτρογενάσης

Η νιτρογενάση είναι ένα σύμπλοκο που αποτελείται από δύο επιμέρους μέταλλο – πρωτεΐνες, τη δινιτρογενάση και την αναγωγάση της δινιτρογενάσης. Η δινιτρογενάση είναι πρωτεΐνη υψηλού μοριακού βάρους (~250 kDa) και περιέχει σίδηρο (Fe), μολυβδαίνιο (Mo) και ασταθές θείο (S). Απαντάται ως ένα αβ τετραμερές ( $\alpha_2\beta_2$  ετεροδιμερές) και κωδικοποιείται από τα γονίδια *nifD* και *nifK* (κωδικοποιούν τις  $\alpha$ ,  $\beta$  πρωτεΐνες αντίστοιχα). Σχετίζεται με δύο μοναδικές μεταλλομάδες (P ομάδες,  $\text{Fe}_8\text{S}_7$  ομάδες) και τον σιδηρομολυβδαινικό συμπάραγοντα (FeMo – co ή M – κέντρο). Ο τελευταίος αποτελεί και το ενεργό κέντρο αναγωγής της δινιτρογενάσης. Ενώ οι P ομάδες είναι παρούσες σε κάθε αβ υπομονάδα, οι FeMo – co είναι παρόντες μόνο «θαμμένοι» μέσα στις  $\alpha$  υπομονάδες. Η αναγωγάση της δινιτρογενάσης είναι ένα  $\alpha_2$  διμερές, μοριακού βάρους ~64 kDa. Είναι προϊόν του γονιδίου *nifH* και αποτελείται από μια ομάδα  $\text{Fe}_4\text{S}_4$

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

η οποία είναι συμμετρικά συντονισμένη από τα κατάλοιπα Cys97 και Cys132 της κάθε υπομονάδας του ομοδιμερούς. Εκτός από την ομάδα Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> αναπτύσσονται πολυάριθμες πολικές αλληλεπιδράσεις και δυνάμεις van der Waals, που βοηθούν στη σταθεροποίηση της δομής του διμερούς. Έχει προταθεί ότι τα e<sup>-</sup> παρέχονται από την P ομάδα της *NifH* και μεταφέρονται έπειτα στο FeMo – co της δινιτρογενάσης, όπου και λαμβάνει χώρα η αναγωγή του N<sub>2</sub> (Rangaraj *et al.* 2000, Halbleib & Ludden 2000, Raymond *et al.* 2003).

Ορισμένα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια μπορούν, κάτω από ειδικές συνθήκες αύξησης, να συνθέτουν δινιτρογενάσες που δεν περιέχουν Mo, αλλά Va (δινιτρογενάση του βαναδίου) ή μόνο Fe (δινιτρογενάση του σιδήρου). Και στις δύο περιπτώσεις υπάρχουν συμπάραγοντες αντίστοιχοι του FeMo – co. Τα γονίδια υπεύθυνα για αυτές τις νιτρογενάσες είναι τα *nif* και *anf* αντίστοιχα, αντί των *nif*. Οι εναλλακτικές αυτές δινιτρογενάσες δε συντίθενται σε περίσσεια μολυβδαινίου. Πιθανόν χρησιμεύουν ως μηχανισμός «επιφυλακής», που διασφαλίζει τη δέσμευση N<sub>2</sub> ακόμη και σε συνθήκες έλλειψης Mo από το ενδιαίτημα (Madigan *et al.*, 2005). Οι FeMo νιτρογενάσες είναι πιο ειδικές και αποτελεσματικές στη δέσμευση και αναγωγή του N<sub>2</sub> προς NH<sub>3</sub>, σε σχέση με τις εναλλακτικές. Συγκεκριμένα ισχύει η σειρά Nif > Vnf > Anf (Raymond *et al.*, 2003).

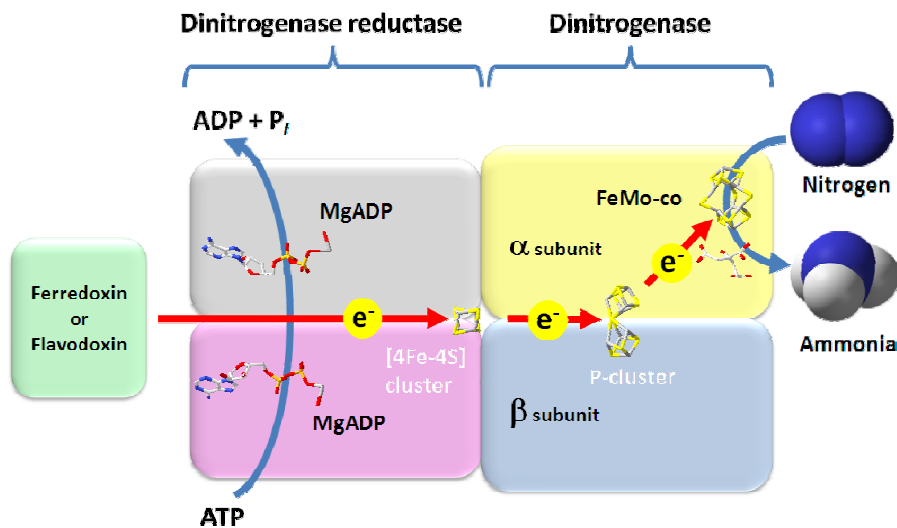
### 4.4.2 Τρόπος δράσης της νιτρογενάσης

Η νιτρογενάση είναι από τα πλέον πολύπλοκα συστήματα στην ενζυμολογία, δεδομένου ότι είναι ένα πολυμελές σύστημα (MoFe πρωτεΐνη, Fe πρωτεΐνη, απαιτεί ATP και Mg<sup>2+</sup>), συνεχίζει να λειτουργεί απουσία της δινιτρογενάσης, δίνει παραπάνω από ένα προϊόντα (NH<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>), ενώ οι πρωτεΐνες του ενζύμου είναι ευαίσθητες στο O<sub>2</sub> και ασταθείς. Στη διερεύνηση του τρόπου λειτουργίας των νιτρογενασών βοήθησαν μια σειρά χημικών, φυσικο – χημικών μελετών και μελετών κινητικής στα *Clostridium pasteurianum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Azotobacter vinelandii* και *A. chroococcum*. Συνοπτικά τα βήματα δράσης της νιτρογενάσης με τη σειρά που λαμβάνουν χώρα είναι τα εξής:

Αναγωγή της Fe πρωτεΐνης – ενεργοποίηση της Fe πρωτεΐνης από ATP – μεταφορά e<sup>-</sup> μεταξύ των πρωτεϊνών της νιτρογενάσης – δέσμευση του αναγωγικού υποστρώματος – σχηματισμός του ενζυμικού συμπλόκου – μεταφορά e<sup>-</sup> στο υπόστρωμα – απελευθέρωση του αναχθέντος προϊόντος, ADP, ανόργανου φωσφόρου (Postgate, 1982).

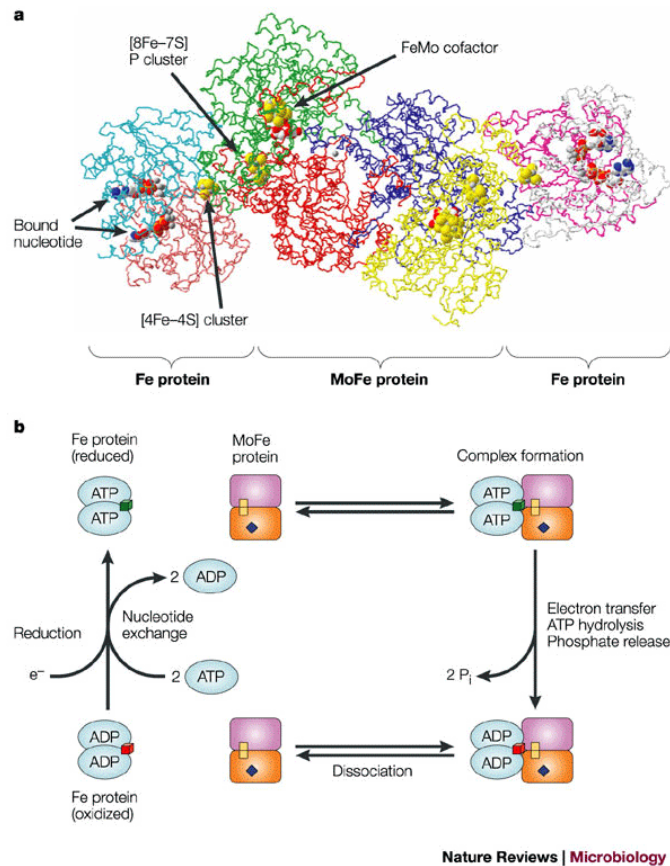
## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Αναλυτικά, τα  $e^-$  που προορίζονται για την αναγωγή του  $N_2$  μεταφέρονται στην αναγωγή της δινιτρογενάσης από τη φερρεδοξίνη ή φλαβοδοξίνη (σιδηροθειούχες ενώσεις), παρουσία ATP. Αυτό συμβαίνει σε κάθε κύκλο μεταφοράς  $e^-$ . Η δέσμευση ATP μεταβάλλει τη στερεοδιάταξη της αναγωγής της δινιτρογενάσης μειώνοντας το αναγωγικό της δυναμικό, επιτρέποντας έτσι την αλληλεπίδρασή της με τη δινιτρογενάση. Το ATP υδρολύεται, η αναγωγή της δινιτρογενάσης αποδεσμεύεται από τη δινιτρογενάση και ξεκινά επόμενος κύκλος αναγωγής και δέσμευσης ATP. Όταν η δινιτρογενάση αναχθεί πλήρως, ανάγει  $N_2$  προς  $NH_3$ , διαδικασία που λαμβάνει χώρα στο M – κέντρο. Αν και η αναγωγή  $N_2$  προς  $NH_3$  απαιτεί 6  $e^-$ , στην πραγματικότητα καταναλώνονται 8  $e^-$ , δύο εκ των οποίων χάνονται με τη μορφή  $H_2$  για κάθε mol αναγόμενου  $N_2$  (Madigan *et al.*, 2005).



**Εικόνα 4.2** Η αντίδραση που καταλύεται από το ενζυμικό σύμπλοκο της νιτρογενάσης.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ



**Εικόνα 4.3** Δομή του συμπλέγματος που σχηματίζεται μεταξύ της Fe – και MoFe – πρωτεΐνης στο ενζυμικό σύμπλοκο της νιτρογενάσης του *Azotobacter vinelandii*.

### 4.4.3 Μέθοδος εκτίμησης αζωτοδεσμευτικής δραστηριότητας : Η αναγωγή του ακετυλενίου

Αυτή η αντίδραση ανακαλύφθηκε ταυτόχρονα από τον Dilworth (1966) και από τους Scöllhorn & Burris (1967a). Η δινιτρογενάση δεν είναι απόλυτα εξειδικευμένη στο  $N_2$ , δεδομένου ότι ανάγει επίσης κυάνιο ( $-C\equiv N$ ), ακετυλένιο ( $C_2H_2$ ), και άλλες ενώσεις με τριπλό δεσμό. Η αντίδραση αναγωγής του ακετυλενίου οδηγεί στο σχηματισμό αιθυλενίου ( $C_2H_4$ ). Αυτή η αντίδραση φαίνεται να είναι καθολική και εξειδικευμένη ιδιοκτησία της νιτρογενάσης: κανένα άλλο βιολογικό σύστημα δε διεξάγει αυτή την αντίδραση. Το αιθυλένιο μπορεί να ανιχνευθεί με μεγάλη ευαισθησία μέσω αέριας χρωματογραφίας, χρησιμοποιώντας έναν ανιχνευτή ιονισμού φλόγας, οπότε παρέχει στους ερευνητές ένα γρήγορο και αξιόπιστο τεστ της νιτρογενάσης (Postgate, 1982). Το δείγμα που μπορεί να είναι εδαφικό υλικό, νερό, καλλιέργεια ή κυτταρικό

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

εκχύλισμα, επωάζεται με ακετυλένιο και η αέρια φάση του μίγματος αντίδρασης αναλύεται με αέρια χρωματογραφία για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του αιθυλενίου (Madigan *et al.*, 2005).

### 4.4.4 Γενετική της δέσμευσης $N_2$

Η διαδικασία της αζωτοδέσμευσης είναι μια ενεργοβόρα διαδικασία, για αυτό και η σύνθεση και η ενεργότητα της νιτρογενάσης υπόκεινται σε λεπτομερή ρύθμιση, στην οποία εμπλέκονται πολλά γονίδια. Ένας καλά μελετημένος αζωτοδεσμευτικός οργανισμός είναι η *K. pneumoniae*. Σε αυτόν τον οργανισμό τα γονίδια της δινιτρογενάσης και αναγωγάσης της δινιτρογενάσης ανήκουν σε ένα σύνθετο ρυθμιζόνιο<sup>8</sup>, το ρυθμιζόνιο *nif* (*nif regulon*). Το μήκος του είναι ~24 kb DNA και περιέχει 20 γονίδια οργανωμένα σε ένα αριθμό μεταγραφικών μονάδων. Μεταξύ των γονιδίων του *regulon* περιλαμβάνονται: τα δομικά γονίδια της νιτρογενάσης, τα γονίδια του FeMo – co, γονίδια που ελέγχουν τις πρωτεΐνες μεταφοράς ηλεκτρονίων, ορισμένα ρυθμιστικά γονίδια. Όπως προαναφέρθηκε, τα γονίδια *nifD* και *nifK* κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες  $\alpha$ ,  $\beta$  του τετραμερούς της δινιτρογενάσης. Το γονίδιο *nifH* κωδικοποιεί τις δύο πανομοιότυπες υπομονάδες  $\alpha$  του ομοδιμερούς της αναγωγάσης της δινιτρογενάσης. Στη σύνθεση του FeMo – co συμμετέχουν πολλά γονίδια μεταξύ των οποίων τα *nifN*, *V*, *W*, *E*, *B* καθώς και το *nifQ* το οποίο κωδικοποιεί ένα πολυπεπτίδιο που σχετίζεται με την επεξεργασία του Mo. Το γονίδιο *nifA* κωδικοποιεί μια ρυθμιστική πρωτεΐνη που ενεργοποιεί τη μεταγραφή άλλων γονιδίων *nif* (Madigan *et al.*, 2005). Παρακείμενα των *nifH*, *nifD*, *nifK* γονιδίων στα περισσότερα *nif* οπερόνια βρίσκονται και τα *nifE*, *nifN* γονίδια, συνήθως με τη σειρά *nifHDKEN*. Οι NifE, NifN πρωτεΐνες παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με τις NifD και NifK αντίστοιχα, και πιστεύεται πως έχουν προέλθει από έναν αρχέγονο διπλασιασμό του *nifDK* οπερονίου. Οι NifE, NifN πρωτεΐνες φαίνεται πως λειτουργούν σαν ικρίωμα για το FeMo – co ή FeV – co. Το γονίδιο *nifH* είναι υψηλά συντηρημένο<sup>9</sup>. Τα υπόλοιπα γονίδια είναι λιγότερο συντηρημένα (Raymond *et al.*, 2003). Οι εναλλακτικές νιτρογενάσες κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, το *vnfHDK* στο σύστημα του βαναδίου, και το *anfHDK* στο σύστημα του σιδήρου. Και τα δύο παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία με το *nifHDK* (Madigan *et al.*, 2005).

<sup>8</sup> **Ρυθμιζόνιο (regulon)**: μεγάλο δίκτυο οπερονίων (ομάδα συνεχόμενων γονιδίων, η σύνθεση των οποίων ελέγχεται από ένα μόνο χειριστή – είναι κοινά στα προκαρυωτικά κύτταρα) (Madigan *et al.*, 2005).

<sup>9</sup> **Εξελικτικά συντηρημένο γονίδιο**: ένα γονίδιο που έχει μείνει αναλλοίωτο με την πρόοδο της εξέλιξης.



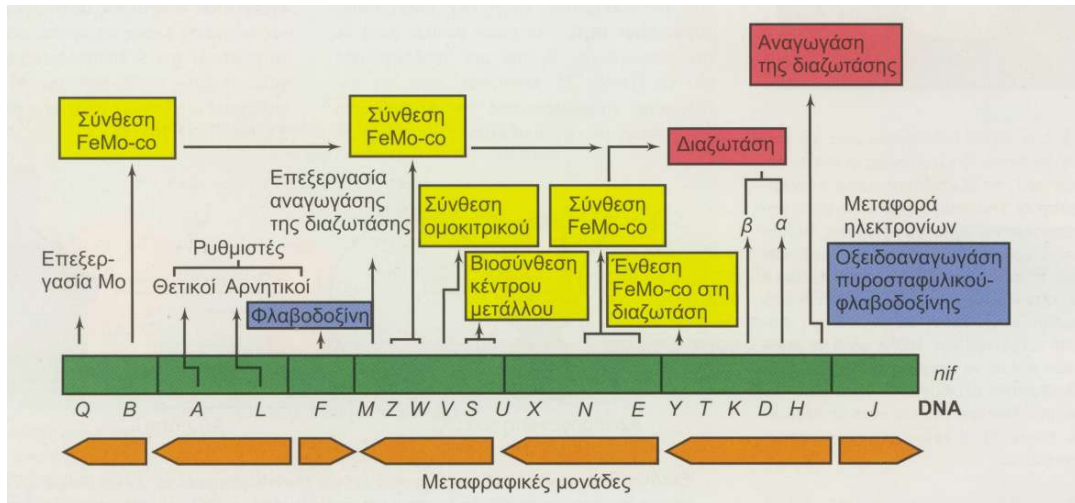
## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 4.4.5 Ρύθμιση της δέσμευσης $N_2$

Η αζωτοδέσμευση ρυθμίζεται σε μεταγραφικό επίπεδο ως απάντηση στα περιβαλλοντικά επίπεδα οξυγόνου και αμμωνίας. Επειδή τα συστατικά της νιτρογενάσης είναι ασταθή παρουσία  $O_2$ , είναι επωφελές για τα βακτήρια να καταστέλλουν τη μεταγραφή, όταν τα επίπεδα  $O_2$  είναι υψηλά. Είναι επίσης ωφέλιμο να καταστέλλουν την έκφραση του μεταβολικά ακριβού συστήματος της νιτρογενάσης, όταν τα κυτταρικά επίπεδα του διαθέσιμου αζώτου είναι υψηλά. Όσον αφορά στην αμμωνία, οι συμβιωτικοί αζωτοδεσμευτικοί μικροοργανισμοί παραμένουν σχεδόν ανεπηρέαστοι, δεδομένου ότι η έξοδος της αμμωνίας προς τον συμβιωτή τους οργανισμό, μειώνει τα επίπεδα αυτής. Η έκφραση όμως των γονιδίων *nif* στα μη – συμβιωτικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια είναι περισσότερο ευαίσθητη στα επίπεδα της αμμωνίας (Halbleib & Ludden, 2000).

Και σε αυτή την περίπτωση το παράδειγμα της μεταγραφικής ρύθμισης έχει μελετηθεί στον πρότυπο αζωτοδεσμευτικό οργανισμό *K. pneumoniae*. Σε αυτό το μοντέλο, η ρύθμιση της έκφρασης των δομικών γονιδίων *nif* γίνεται από την πρωτεΐνη NifA (το προϊόν του γονιδίου *nifA*) η οποία είναι θετικός ρυθμιστής της έκφρασης όλων των γονιδίων *nif*. Η μεταγραφή του *nifA* ρυθμίζεται από τα προϊόντα των γονιδίων *ntrBC* (διμελές μεταγραφικό ενεργοποιητικό σύστημα κυτταρικής ρύθμισης του  $N_2$ ). Το γονίδιο *nifA* μεταγράφεται μαζί με το *nifL*, το οποίο κωδικοποιεί για μια οξειδοαναγωγική φλαβοπρωτεΐνη (NifL). Η NifL δρα σαν αρνητικός ρυθμιστής της NifA, προσθέτοντας άλλο ένα επίπεδο ρύθμισης, σε απόκριση του οξυγόνου και του διαθέσιμου αζώτου (Halbleib & Ludden, 2000). Όταν υπάρχει επάρκεια  $O_2$  η πρωτεΐνη NifL καταστέλλει τη μεταγραφή των *nif*, ώστε να αποφευχθεί η σύνθεση της ευαίσθητης στο  $O_2$  νιτρογενάσης. Η  $NH_3$  καταστέλλει τη δέσμευση του  $N_2$  μέσω της πρωτεΐνης NtrC (η δράση της ρυθμίζεται από τα επίπεδα  $N_2$  στο κύτταρο). Όταν η συγκέντρωση της  $NH_3$  είναι οριακή, η NtrC ενεργοποιείται και επάγει τη μεταγραφή του *nifA*. Έτσι συντίθεται η NifA πρωτεΐνη που δρα σαν ενεργοποιητής της αζωτοδέσμευσης, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μεταγραφής των υπόλοιπων γονιδίων *nif*. Η αμμωνία που παράγεται από τη νιτρογενάση δεσμεύεται υπό κάποια οργανική μορφή αμέσως, οπότε δεν καταστέλλει την περαιτέρω σύνθεση του ενζύμου (Madigan *et al.*, 2005).

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ



**Εικόνα 4.4** Το ρυθμιζόνιο *nif* στην *K. pneumoniae*, τον καλύτερα μελετημένο έως σήμερα αζωτοδεσμευτικό οργανισμό. Ο λειτουργικός ρόλος ορισμένων γονιδίων δεν έχει προσδιοριστεί με βεβαιότητα. Κάτω από τα γονίδια σημειώνονται τα μεταγραφήματα mRNA (μεταγραφικές μονάδες). Τα βέλη υποδεικνύουν την κατεύθυνση της μεταγραφής. Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη σύνθεση του συμπλόκου FeMo-co υποδηλώνονται με κίτρινο χρώμα. Παρ' ότι η *Klebsiella* μπορεί να αναπτύσσεται και σε αερόβιες συνθήκες, με πηγή αζώτου την αμμωνία, το βακτήριο αυτό δεσμεύει άζωτο μόνο υπό ανοξικές συνθήκες (Προσαρμοσμένο από Madigan *et al.*, 2005).

### 4.4.6 Διακριτοί φυλογενετικοί κλάδοι

Αναλύσεις των αλληλουχιών *nifH* αποκάλυψαν διακριτές ομάδες των ομολόγων γονιδίων της νιτρογενάσης, τα οποία πιστεύεται πως είναι σύγχρονα παράλογα<sup>10</sup> γονίδια, τα οποία έχουν προκύψει από πολλαπλούς διπλασιασμούς του γονιδίου. Περαιτέρω φυλογενετική ανάλυση κάθε συστατικού των πρωτεϊνών της νιτρογενάσης και των γνωστών τους ομολόγων υποδεικνύει έναν διαχωρισμό τους σε διακριτούς, τοπολογικά σταθερούς κλάδους, οι οποίοι είναι οι εξής: (1) τυπικές FeMo νιτρογενάσες που συντίθενται από μέλη των φύλων *Proteobacteria* και *Cyanobacteria*, (2) αναερόβιες FeMo νιτρογενάσες που συντίθενται από μεγάλο εύρος αναερόβιων οργανισμών (*clostridia*, *acetogenic bacteria*, *methanogens*), (3) εναλλακτικές νιτρογενάσες, που περιλαμβάνουν *anf* και *vnf* γονίδια (εκτός του *vnfH* που έχει περισσότερες ομοιότητες με το *nifH* παρά με το *anfH*), (4) μη ταυτοποιημένα *nif* ομόλογα, που ανιχνεύονται μόνο σε μεθανογόνα και κάποια ανοξυγενή φωτοσυνθετικά βακτήρια, (5) γονίδια σύνθεσης βακτηριοχλωροφυλλών και χλωροφυλλών κοινών σε όλα τα φωτότροφα (Raymond *et al.*, 2003).

<sup>10</sup> **Παράλογα γονίδια:** γονίδια με ομόλογη δομή που πιθανολογείται ότι προέρχονται από μια διαδικασία διπλασιασμού γονιδίων.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### **4.4.7 Ποικιλότητα συστημάτων βιολογικής δέσμευσης αζώτου**

Η βιολογική αζωτοδέσμευση λαμβάνει χώρα σε μια μεγάλη ποικιλία περιβαλλόντων, μεταξύ των οποίων στο έδαφος, σε τρεχούμενα και αλατώδη νερά και ιζήματα, ή εντός των ριζών, των βλαστών και των φύλλων ορισμένων ανώτερων φυτών, ή ακόμη και εντός των πεπτικών συστημάτων ορισμένων ζώων. Τα βιολογικά συστήματα ικανά για αζωτοδέσμευση ταξινομούνται ως μη – συμβιωτικά και συμβιωτικά, ανάλογα με τις απαιτήσεις τους για εμπλοκή ενός ή περισσότερων οργανισμών, αντιστοίχως, στην διαδικασία.

#### Συμβιωτική Αζωτοδέσμευση

Η σημαντικότερη συμβολή της αζωτοδέσμευσης έρχεται από τη συμβιωτική σχέση ορισμένων μικροοργανισμών με τις ρίζες ανώτερων φυτών. Κλασικό παράδειγμα είναι αυτό των βακτηρίων του γένους *Rhizobium* που προσβάλλει τις ρίζες των ψυχανθών φυτών (φασόλι, σόγια, τριφύλλι κ.α.). Μικρά φυμάτια σχηματίζονται στις ρίζες, τα οποία γεμίζουν με ένα διαφορετικό τύπο βακτηρίων (*bacteroides*). Αυτή και μόνο η συμβίωση παρέχει 20% του παγκοσμίως βιολογικά διαθέσιμου αζώτου, ετησίως (Hubbell & Kidder, 2003).

#### Μη – συμβιωτική Αζωτοδέσμευση

Υπάρχει μεγάλη ποικιλότητα στους μεταβολικούς τύπους των ελεύθερα – διαβιούντων μικροοργανισμών οι οποίοι είναι ικανοί για αζωτοδέσμευση. Αυτό το σύστημα περιλαμβάνει περίπου 20 γένη μη – φωτοσυνθετικών αερόβιων (*Azotobacter*, *Beijerinckia*) και αναερόβιων (*Clostridium*) βακτηρίων καθώς και 15 περίπου γένη φωτοσυνθετικών κυανοβακτηρίων (*blue – green algae*) όπως η *Anabaena* και το *Nostoc*.

Τα ελεύθερα – διαβιούντα, μη – φωτοσυνθετικά βακτήρια εξαρτώνται από την οργανική ουσία του εδάφους σαν πηγή θρεπτικών συστατικών, ενώ οι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί αντλούν θρεπτικά από τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης. Η αζωτοδέσμευση των ελεύθερα – διαβιούντων, μη – φωτοσυνθετικών αερόβιων βακτηρίων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις ευνοϊκές συνθήκες υγρασίας, το οξυγόνο και την πηγή οργανικών ουσιών. Αναερόβιοι αντιπρόσωποι (*Clostridium*) κυριαρχούν σε λιβάδια, και εδάφη μεγάλης περιεκτικότητας σε νερό, καθώς και σε εδαφικά μίγματα όπου οι συνθήκες υγρασίας και τα οργανικά υποστρώματα είναι διαθέσιμα, αλλά η διαθεσιμότητα του O<sub>2</sub> είναι ιδιαίτερα περιορισμένη (Hubbell & Kidder, 2003).

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 4.4.8 Φυλογενετική Ταξινόμηση Αζωτοδεσμευτικών Οργανισμών

#### Φυλογενετική ανάλυση με βάση το γονίδιο 16S rRNA

Όλοι οι γνωστοί αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί είναι προκαρυωτικοί, και η ικανότητά τους να δεσμεύουν άζωτο είναι παραφυλετικά<sup>11</sup>, κατανεμημένη μεταξύ των βακτηρίων και των αρχαίων (Raymond *et al.*, 2003). Το κλειδί για την ταξινόμηση αυτή είναι το 16S ριβοσωμικό RNA (rRNA), το οποίο είναι καθολικό και συντηρημένο σε λειτουργία (Young, 1992). Ο πλέον προφανής παράγοντας που κάνει ένα μόριο μέτρο για τις φυλογενετικές σχέσεις είναι το μέγεθος, το οποίο ισοδυναμεί με το περιεχόμενο σε πληροφορία. Εντούτοις, το μέγεθος αυτό καθ' εαυτό δεν είναι το παν. Η δομική οργάνωση του μορίου είναι εξ ίσου σημαντική (Olsen & Woese, 1993). Λόγω της πιθανής αρχέγονης προέλευσης της πρωτεϊνοσυνθετικής μηχανής, τα ριβοσωμικά RNA αποτελούν εξαιρετικά μόρια για την εξακρίβωση εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των οργανισμών. Τα rRNAs έχουν σταθερή λειτουργικότητα, είναι οικουμενικώς κατανεμημένα και έχουν μια μετρίως διατηρημένη αλληλουχία σε ένα ευρύ φάσμα φυλογενετικών αποστάσεων. Επίσης, επειδή ο αριθμός των διαφορετικών δυνατών αλληλουχιών σε μεγάλα μόρια, όπως το rRNA, είναι τεράστιος, η ομοιότητα μεταξύ δύο αλληλουχιών αποτελεί πάντα ένδειξη κάποιας φυλογενετικής σχέσης. Ένδειξη για τη σχετική εξελικτική απόσταση δύο οργανισμών είναι ο βαθμός ομοιότητας των αλληλουχιών των rRNA τους. Το rRNA των προκαρυωτικών αποτελείται από τρία μόρια, τα 5S<sup>12</sup>, 23S (μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα), 16S (μικρή ριβοσωμική υπομονάδα). Τα 16S και 23S με ~1500 και 2900 νουκλεοτίδια το καθένα αντίστοιχα, περιέχουν αρκετές περιοχές με εκτενώς συντηρημένες αλληλουχίες. Επίσης χαρακτηρίζονται από σημαντική μεταβλητότητα σε άλλες περιοχές του μορίου, χρησιμεύοντας έτσι ως εξαιρετικά φυλογενετικά χρονόμετρα. Περισσότερο εύχρηστο πειραματικά είναι το 16S rRNA, για αυτό και έχει χρησιμοποιηθεί κατά κόρον (Madigan *et al.*, 2005).

#### Φυλογενετική ανάλυση με βάση το γονίδιο *nifH*

Πολλά χαρακτηριστικά του φυλογενετικού δέντρου *nifH* είναι εξ ολοκλήρου συνεπή με τη φυλογένεση που προκύπτει από το 16S rRNA (Young, 1992). Η νιτρογενάση είναι μια πολύ καλά συντηρημένη πρωτεΐνη. Γονίδια του τύπου *nifHDK* έχουν χρησιμοποιηθεί σαν μοριακοί

---

<sup>11</sup> **Παραφυλετικός:** μια ομάδα που έχει εξελιχθεί από μία μόνο προγονική μορφή, η οποία όμως δεν περιλαμβάνει όλους τους απογόνους του πλέον πρόσφατου κοινού προγόνου.

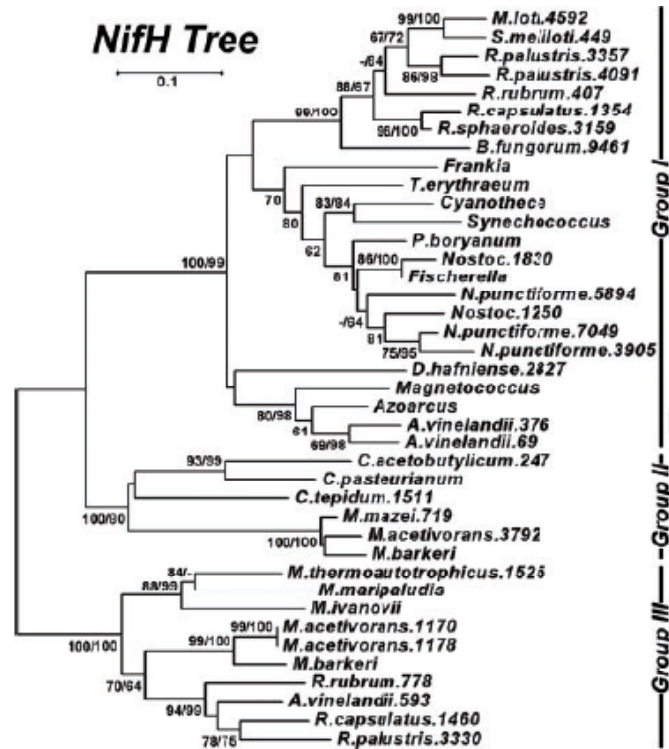
<sup>12</sup> Το «S» σημαίνει «Svedberg», μονάδα εκτίμησης της μάζας.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ανιχνευτές, και έχουν βρεθεί σε όλους του εξεταζόμενους αζωτοδεσμευτικούς μικροοργανισμούς (Madigan *et al.*, 2005). Εντούτοις δύο σημαντικά προβλήματα γεννώνται όταν προσπαθούμε να διεξάγουμε φυλογενετική ανάλυση με αυτό το γονίδιο: (α) υπάρχουν στοιχεία οριζόντιας μεταφοράς του γονιδίου *nifH*, (β) η γνώση ότι έχει συμβεί διπλασιασμός κατά την εξέλιξη του, δεδομένου ότι κάποιοι οργανισμοί έχουν περισσότερα από ένα γονίδια *nifH*. Όσον αφορά στη φυλογενετική ανάλυση, γεννάται το πρόβλημα της διάκρισης μεταξύ ομόλογων και παράλογων συγκρίσεων, όπου στην πρώτη τα γονίδια έχουν προέλθει από το ίδιο γονίδιο του τελευταίου κοινού προγόνου, ενώ στη δεύτερη τα γονίδια ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες γονιδίων που έχουν προκύψει από διπλασιασμό γονιδίου. Όλα αυτά περιπλέκουν πολύ τη χρήση του γονιδίου για φυλογενετικούς σκοπούς.

Η συνέπεια των φυλογενετικών σχέσεων που προκύπτουν μέσω 16S rRNA γονιδίου, με τις φυλογενετικές σχέσεις που προκύπτουν μέσω του γονιδίου *nifH*, όσον αφορά στους αζωτοδεσμευτικούς οργανισμούς, φαίνεται και από την ερευνητική εργασία των Venieraki *et al.* (2011). Μελετήθηκε η φυλογενετική θέση συνολικά 17 καλλιεργήσιμων αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, τα οποία σχετίζονταν με τη ριζόσφαιρα σιταριού, από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδος. Τόσο η φυλογενετική ανάλυση μέσω 16S rRNA γονιδίου, όσο και μέσω γονιδίου *nifH*, ομαδοποίησε τα εν λόγω στελέχη με τα είδη *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum zea* και *Pseudomonas stutzeri*.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ



**Εικόνα 4.5** *NifH* φυλογένεση. Στα δεξιά εμφανίζεται η θέση των ομάδων της νιτρογενάσης όπως αναφέρονται ανωτέρω (§ 4.4.6). Για τους οργανισμούς με διαθέσιμες ολόκληρες τις αλληλουχίες του γονιδιώματος, ο αριθμός μετά το όνομα του οργανισμού δείχνει τη σχετική θέση του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης της πρωτεΐνης μέσα στο γονιδίωμα (εκτός από τις περιπτώσεις των *R. capsulatus* και *R. palustris*). (Προσαρμοσμένο από Raymond *et al.*, 2003).

Στον **Πίν. 4.1** αναφέρονται ορισμένοι αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί, κατηγοριοποιημένοι με βάση τα συστήματα βιολογικής δέσμευσης αζώτου (μη συμβιωτικοί αερόβιοι – μη συμβιωτικοί αναερόβιοι, συμβιωτικοί αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί).

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

**Πίνακας 4.1** Ορισμένοι αζωτοδέσμευτικοί οργανισμοί. Η αζωτοδέσμευση στην *Klebsiella* συμβαίνει μόνο σε ανοξικές συνθήκες (Προσαρμοσμένο από Madigan *et al.*, 2005).

<b>Μη συμβιωτικοί αερόβιοι</b>		
<b>Χημειοοργανότροφα</b>	<b>Φωτότροφα</b>	<b>Χημειολιθότροφα</b>
<u>Βακτήρια</u> <i>Azotobacter</i> spp., <i>Azomonas</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Beijerinckia</i> , <i>Bacillus polymyxa</i> , <i>Mycobacterium flavum</i> , <i>Azospirillum lipoferum</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Acetobacter diazotrophicus</i> , <i>Methylomonas</i> , <i>Methylococcus</i>	<u>Κυανοβακτήρια</u> (ορισμένα, όχι όλα)	<i>Alcaligenes</i> <i>Thiobacillus</i> (μερικά είδη) <i>Streptomyces thermoautotrophicus</i>
<b>Μη συμβιωτικοί αναερόβιοι</b>		
<b>Χημειοοργανότροφα</b>	<b>Φωτότροφα</b>	<b>Χημειολιθότροφα</b>
<u>Βακτήρια</u> <i>Clostridium</i> spp. <i>Desulfovibrio</i> <i>Desulfotomaculum</i>	<u>Βακτήρια</u> <i>Chromatium</i> , <i>Thiocapsa</i> , <i>Chlorobium</i> , <i>Rhodospirillum</i> , <i>Rhodopseudomonas</i> , <i>Rhodomicrobium</i> , <i>Rhodopila</i> , <i>Rhodobacter</i> , <i>Heliobacterium</i> , <i>Heliobacillus</i> , <i>Heliophilum</i>	<u>Αρχαία</u> <i>Methanosarcina</i> <i>Methanococcus</i> <i>Methanobacterium</i> <i>Methanospirillum</i> <i>Methanolobus</i>
<b>Συμβιωτικοί</b>		
<u>Ψυχανθή (όσπρια)</u> Σόγια, μπιζέλι, τριφύλλι, χαρουπιά κ.ο.κ. σε συμβίωση με βακτήριο του γένους <i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Sinorhizobium</i> , <i>Azorhizobium</i> .	<u>Λοιπά Φυτά</u> <i>Alnus</i> , <i>Myrica</i> , <i>Ceanothus</i> , <i>Comptonia</i> , <i>Casuarina</i> σε συμβίωση με ακτινομόκητες του γένους <i>Frankia</i> .	

### 4.4.9 Αζωτοδέσμευση στην κομποστοποίηση

Η αζωτοδέσμευση είναι διαδικασία που μπορεί να συμβεί κατά την κομποστοποίηση, αλλά σε χαμηλά ποσοστά. Το ολικό άζωτο μειώνεται με την πρόοδο της αποικοδόμησης, κυρίως λόγω απομάκρυνσης της αμμωνίας. Εντούτοις, ο λόγος C/N επίσης μειώνεται, λόγω των ακόμη μεγαλύτερων απωλειών σε C (κυρίως με τη μορφή CO<sub>2</sub>). Η ολική περιεκτικότητα σε άζωτο του αρχικού υλικού επίσης επηρεάζει το ρυθμό απωλειών της αμμωνίας. Επιπλέον απώλειες αζώτου κατά την κομποστοποίηση μπορεί να οφείλονται στην απονιτροποίηση (αναερόβια διαδικασία, που πραγματοποιείται σε ανοξικές θέσεις, οι οποίες υπάρχουν ακόμη και στα πολύ καλά αεριζόμενα υλικά).

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Παρά τις απώλειες σε άζωτο, μερική αναπλήρωση αυτού πραγματοποιείται αργότερα κατά τη διάρκεια της κομποστοποίησης, λόγω δράσης των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων. Αρκετά είδη έχουν απομονωθεί κατά την κομποστοποίηση, κυρίως συσχετιζόμενα με τη μεσόφιλη φάση: *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*. Η βιολογική αζωτοδέσμευση αναστέλλεται παρουσία αμμωνίας και σε υψηλές θερμοκρασίες. Επομένως η δραστηριότητα της νιτρογενάσης είναι υψηλότερη στα τελευταία στάδια της διαδικασίας αποικοδόμησης (Insam *et al.*, 2007).

### 5. Μέθοδοι εκτίμησης μικροβιακής ποικιλότητας κατά την κομποστοποίηση

Αναπόσπαστες συνιστώσες στη μελέτη της μικροβιακής οικολογίας είναι η ανίχνευση και η απομόνωση πλήθους μικροοργανισμών. Πολύ σημαντικές είναι οι παραδοσιακές μέθοδοι στην ανίχνευση και καταμέτρηση των μικροοργανισμών. Υπάρχουν πολυάριθμες κλασσικές τεχνικές που εξασφαλίζουν τα ανωτέρω. Οι συμβατικές μέθοδοι είναι σχεδιασμένες για την καταμέτρηση είτε του καλλιεργούμενου, είτε του ολικού πληθυσμού αυτού καθ' εαυτού. Η καταμέτρηση του καλλιεργούμενου πληθυσμού λαμβάνεται μετά από ανάπτυξη σε ένα κατάλληλο θρεπτικό μέσο το οποίο περιέχει πηγή άνθρακα και / ή άλλες πηγές ενέργειας. Εφόσον όλα τα θρεπτικά είναι εκλεκτικά σε ένα μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό, και εφόσον δεν ανακτώνται όλοι οι μικροοργανισμοί, η μέθοδος εκτίμησης των βιώσιμων κυττάρων (διαδοχικές αραιώσεις) είναι σπανίως ποσοτική. Η μέθοδος του πιθανότερου αριθμού (MPN, **M**ost **P**robable **N**umber) χρησιμοποιεί τη διαδοχική αραιώση ενός δείγματος σε κατάλληλο μέσο και έτσι ο υψηλός βαθμός αναπαραγωγής του οργανισμού παρέχει στατιστικά σημαντική καταμέτρηση του καλλιεργούμενου πληθυσμού.

Ένας από τους μεγαλύτερους περιορισμούς στη μελέτη των μικροβιακών κοινοτήτων, και κατ' επέκταση στην ανίχνευση των μικροοργανισμών στο περιβάλλον είναι η δυσκολία απομόνωσης και ανάπτυξης εντός θρεπτικού υλικού ενός μεγάλου αριθμού μικροοργανισμών στο εργαστήριο. Παρομοίως και σε ένα σωρό κομποστοποίησης πολλοί οργανισμοί δεν είναι δυνατόν να καλλιεργηθούν. Οι μικροβιακοί οικολόγοι έχουν ξεκινήσει την εφαρμογή μοριακών τεχνικών για την ανίχνευση μικροοργανισμών στο περιβάλλον, παρακάμπτοντας την ανάγκη κυτταρικής καλλιέργειας. Μοριακές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για την απευθείας μελέτη των κοινοτήτων DNA και RNA του κόμποστ για την παρουσία νέων ομάδων μικροοργανισμών



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

(Dees & Ghiorse, 2001). Τα τελευταία χρόνια, πολλές μοριακές τεχνικές χρησιμοποιούν την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (**Polymerase Chain Reaction, PCR**) για την ταυτοποίηση των μικροβιακών κοινοτήτων κατά την κομποστοποίηση, επιτρέποντας την αποφυγή των προβλημάτων που προκύπτουν από την καλλιέργεια. Αυτές οι μέθοδοι περιλαμβάνουν τον πολυμορφισμό  $\square$  διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (**Single-Stranded Conformational Polymorphism, SSCP**), την αυτόματη ανάλυση της διαγονιδιωματικής ριβοσωμικής περιοχής (**Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, ARISA**), την αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση με πήκτωμα διαβάθμισης (**Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE**), το σύστημα ανάλυσης μικροσυτοιχιών (microarrays), καθώς και βιοχημικές μεθόδους, όπως την ανάλυση φωσφολιπιδικών λιπαρών οξέων (**PhosphoLipid Fatty acid Analysis, PLFA**). Το μειονέκτημα αυτών των μεθόδων είναι η δυσκολία ανεύρεσης μεμονωμένων αλληλουχιών, ενώ κάποιες από αυτές αποκαλύπτουν γενικές όψεις των κοινοτήτων, όχι τα ίδια τα είδη. Με το σχεδιασμό όμως εξειδικευμένων ολιγονουκλεοτιδίων (όχι όμως για νέα είδη), μπορεί να επιτευχθεί πληροφορία σε επίπεδο είδους (Hultman *et al.*, 2010). Τόσο οι κλασσικές μέθοδοι που απαιτούν καλλιέργεια των μικροοργανισμών, όσο και οι μοριακές μέθοδοι ανάλυσης (εξαρτώμενες ή ανεξάρτητες από καλλιέργεια) είναι πολυάριθμες, η αναλυτική παρουσίαση αυτών όμως ξεφεύγει από τα πλαίσια της παρούσας μελέτης.

## ***6. Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ) και Υπολείμματα Εκκοκκιστηρίου Βάμβακος (ΥΕΒ) ως υποστρώματα κομποστοποίησης***

---

### ***6.1 Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου***

Η διαχείριση των ΥΑΕ συνιστά ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα στο χώρο των γεωργικών βιομηχανιών, λόγω των επιπτώσεων που επιφέρει η αλόγιστη διάθεσή τους σε παρακείμενους υδάτινους φορείς, συνεχούς ή διαλειπούσης ροής. Τα κύρια εμπόδια στη διάδοση και εφαρμογή των διαφόρων θετικών αποτελεσμάτων της έρευνας στην πράξη είναι το κόστος εγκατάστασης και λειτουργίας των προτεινόμενων συστημάτων επεξεργασίας, η έλλειψη της απαιτούμενης υλικοτεχνικής υποδομής στα ελαιοτριβεία και η εκδηλούμενη μέχρι σήμερα νοοτροπία και διάθεση των περισσότερων ελαιοπαραγωγών να αναλάβουν την εγκατάσταση και στήριξη της λειτουργίας ενός συστήματος επεξεργασίας των αποβλήτων με τη σχετική

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

οικονομική επιβάρυνση και απασχόληση προσωπικού που συνεπάγεται αυτό (Γεωργακάκης, 1994).

Κατά την επεξεργασία του ελαιοκάρπου στα ελαιουργεία, παράλληλα με το ελαιόλαδο παράγεται και μία σειρά παραπροϊόντων. Αυτά είναι ο ελαιοπυρήνας, που αποτελείται από τα αλεσμένα στερεά συστατικά του καρπού (κυρίως του κουκουτσιού), τα ελαιόφυλλα, και μια σημαντική σε όγκο και οργανικό φορτίο ποσότητα υγρών αποβλήτων, που είναι γνωστά ως «λιοζούμι», «κατσίγαρος» ή «μούργα».

Τα ΥΑΕ είναι το κύριο υπόλειμμα από την εκχύλιση του λαδιού της ελιάς. Τα κυριότερα προβλήματα διαχείρισής τους οφείλονται στην εποχική απασχόληση (~3 μήνες το χρόνο), στα ισχυρά ρυπαντικά χαρακτηριστικά τους, και στη διασκορπισμένη γεωγραφική κατανομή των ελαιοτριβείων. Η Ισπανία, η Ιταλία και η Ελλάδα που προσφέρουν το 60 – 70 και 97% στην παγκόσμια και Ευρωπαϊκή παραγωγή λαδιού, αντίστοιχα, είναι οι χώρες που κυρίως πλήττονται από το πρόβλημα (Papadimitriou *et al.*, 1996). Το υψηλό οργανικό φορτίο του κατσίγαρου σε συνάρτηση με την παρουσία των πολυφαινολών δεν επιτρέπει την απευθείας διάθεση του στο περιβάλλον, αλλά καθιστά αναγκαία την πρότερη επεξεργασία του.

Οι Μπαλής *κ.α.* (1997) πρότειναν πως τα ΥΑΕ, λόγω της χαμηλής περιεκτικότητάς τους σε αζωτούχα οργανικά στοιχεία αλλά υψηλής περιεκτικότητας σε ανθρακούχες πηγές, προσφέρουν ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη ελεύθερα – διαβιούντων αζωτοδεσμευτικών οργανισμών. Έχει πραγματοποιηθεί και επιτυχής συγκομποστοποίηση αποβλήτων ελαιοτριβείου (φύλλα ελιάς με εκχυλισμένη ελαιοπυρήνα – μέσο ύγρανσης ΥΑΕ) (Papadimitriou *et al.*, 1996). Τα ΥΑΕ είναι σκουρόχρωμα, έχουν δυσάρεστη οσμή, υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα, όξινο pH και πολύ υψηλό φορτίο σε ολικά οργανικά, φαινολικά και ανόργανα άλατα. Στον **Πιν. 6.1** αναφέρεται η μέση σύσταση των ΥΑΕ.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

**Πίνακας 6.1** Κύρια χαρακτηριστικά των ΥΑΕ (Προσαρμοσμένο από Γεωργακάκη, 1994).

Παράμετρος	Τιμή
Νερό	83-94%
Οργανικά συστατικά	4-16%
Ανόργανα συστατικά	1-2%
Πυκνότητα	1.024 g/cm <sup>3</sup>
Αγωγιμότητα	8000 – 16000 μS/cm
pH	4.5 – 6.5
BOD <sub>5</sub>	14000 – 110000 mg/l
COD	41400 – 130000 mg/l

### 6.2 Υπολείμματα Εκκοκκιστηρίου Βάμβακος

Από τις καλλιεργούμενες εκτάσεις με βαμβάκι και από τον όγκο της παραγωγής προκύπτει και το πρόβλημα της διαχείρισης των υπολειμμάτων της καλλιέργειας αυτής, αφού κατά την εκκόκκιση του βάμβακος ένα ποσοστό που κυμαίνεται από 4 - 15% του βάρους της ολικής συγκομιδής αποτελείται από ξένες ύλες. Στις ξένες ύλες περιέχονται θρύμματα καψών, φύλων και ξυλωδών τμημάτων του φυτού μαζί με ινώδες κλάσμα. Έχουν υπάρξει αρκετές προσπάθειες αξιοποίησης των ΥΕΒ σε διάφορους τομείς, όπως για την καλλιέργεια μανιταριών, για την χρήση στην παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας μέσω συνδυασμένης καύσης με λιγνίτη, καθώς και για την χρησιμοποίησή τους σαν ζωοτροφή (βαμβακόπιτα).

Για όλους τους παραπάνω λόγους σαν ορθολογικός και περιβαλλοντικά φιλικός τρόπος αξιοποίησης των δύο ανωτέρω αποβλήτων προτείνεται, στην παρούσα μελέτη (α) η κομποστοποίηση των στερεών ΥΕΒ με μέσο ύγρανσης το νερό (β) η συγκομποστοποίηση των ΥΕΒ με τα ΥΑΕ.

Στον Πίν. 6.2 αναφέρονται τα κύρια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των υπολειμμάτων εκκοκκισμού βάμβακος.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

**Πίνακας 6.2** Κύρια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των υπολειμμάτων εκκοκκισμού βάμβακος (Προσαρμοσμένο από Μπαλή, 1994).

Παράμετρος	Τιμή		
	Ίνες	Ξυλώδη Τμήματα	Σύνολο
Ολικό N (%) κατά Kjehldahl	1.03	2.48	2.01
Οργανικός C (%)	40.94	33.40	35.81
pH			6.10
Φυσική Υγρασία (%)			10.00
Ηλ. Αγωγιμότητα (ds/m)			22.50
Υδατοϊκανότητα (%)			81.00
Πορώδες (%)			93.00
Πυκνότητα στερεών (g/cm <sup>3</sup> )	0.81	1.13	1.03

## 7. Σκοπός της μελέτης

Η παρούσα μελέτη έχει ως σκοπό τη μελέτη των φυσικοχημικών παραμέτρων και της μικροβιακής ποικιλότητας και διαδοχής κατά την κομποστοποίηση και τη συγκομποστοποίηση αγροτοβιομηχανικών υποπροϊόντων. Παρασκευάστηκαν δύο σωροί. Ο σωρός 1 προήλθε από την κομποστοποίηση YEB, ενώ ο σωρός 2 από τη συγκομποστοποίηση αυτών με ΥΑΕ. Πραγματοποιήθηκε μια σειρά μετρήσεων και χημικών αναλύσεων. Η μικροβιακή ποικιλότητα και διαδοχή μελετήθηκαν με τη χρήση τόσο κλασσικών όσο και μοριακών τεχνικών. Οι μοριακές τεχνικές εστίαστηκαν στη μελέτη των ελεύθερα – διαβιούντων καλλιεργούμενων αζωτοδεσμευτικών οργανισμών που απομονώθηκαν στις εκάστοτε φάσεις κομποστοποίησης και των δύο σωρών.

Η παρούσα μελέτη διεξήχθη στο εργαστήριο Γενικής & Γεωργικής Μικροβιολογίας του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.



## *Κεφάλαιο 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ*

---

### *1. Υποστρώματα Κομποστοποίησης*

---

Στο παρόν πείραμα κατασκευάστηκαν δύο σωροί. Ο ένας θεωρήθηκε ως μάρτυρας και για την κατασκευή του χρησιμοποιήθηκαν σαν υπόστρωμα κομποστοποίησης YEB (σωρός 1), ενώ ο δεύτερος σωρός ήταν το προϊόν συγκομποστοποίησης δύο αγροτοβιομηχανικών υπολειμμάτων (σωρός 2), YEB και YAE. Τα YEB προέρχονταν από Εκκοκκιστήριο της περιοχής των Θηβών ενώ τα YAE από το ελαιοτριβείο «Μεσογειακοί Ελαιώνες» στην Αττική (ποικιλία ελιάς Κορωνέικη).

### *2. Παρασκευή των Σωρών Κομποστοποίησης*

---

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε εντός του θερμοκηπίου του Εργαστηρίου Γενικής & Γεωργικής Μικροβιολογίας. Την πρώτη μέρα του πειράματος κατασκευάστηκαν οι δύο σωροί. Για το σωρό 1 χρησιμοποιήθηκαν περίπου 70 kg YEB και διαβρέχτηκαν με 200 l νερό. Για το σωρό 2 χρησιμοποιήθηκαν 70 kg YEB και διαβρέχτηκαν με 210 l YAE. Πριν τη διαβροχή τα YAE είχαν φιλτραριστεί για τη συγκράτηση των στερεών υπολειμμάτων. Παράλληλα με τη διαβροχή πραγματοποιείτο καλή ανάμιξη του υποστρώματος με το εκάστοτε μέσο ύγρανσης. Ο κάθε σωρός τοποθετήθηκε εντός κάδου κομποστοποίησης διαστάσεων 80 x 80 x 90 cm. Οι κάδοι, οι οποίοι τοποθετήθηκαν πάνω σε παλέτα, ήταν διάτρητοι μόνο στη βάση τους, όπου και τοποθετήθηκε σήτα για τη συγκράτηση του υλικού. Στα πλαϊνά τοιχώματα τοποθετήθηκε μονωτικό υλικό για τη διατήρηση της θερμοκρασίας.

Ο αερισμός του υλικού εξασφαλίστηκε με παθητική διάχυση, από τη βάση του κάδου, και από έναν αυτοσχέδιο σωλήνα κατασκευασμένο από διάτρητο πλέγμα, ο οποίος διαπερνούσε το υλικό κάθετα, και έφτανε έως την βάση του κάδου. Σχεδόν καθημερινά πραγματοποιείτο μέτρηση της θερμοκρασίας των δύο σωρών.

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3. Δειγματοληψία

Δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε τέσσερις φάσεις της διαδικασίας κομποστοποίησης, η σειρά των οποίων έχει ως εξής:

- I. Στην αρχή της κομποστοποίησης, αμέσως μετά τη διαβροχή και ανάμιξη του υποστρώματος με το μέσο ύγρανσης (νερό ή ΥΑΕ αντίστοιχα).
- II. Στην πρώτη θερμοφιλή φάση.
- III. Μετά την πτώση της θερμοκρασίας του κόμποστ, λίγο πριν την αναμόχλευση του υλικού με παράλληλη διαβροχή αυτού.
- IV. Στη δεύτερη θερμοφιλή φάση

Αναλυτικά το ημερολόγιο των δειγματοληψιών παρουσιάζονται στον **Πίν. 3.1**.

**Πίνακας 3.1** Ημερολόγιο δειγματοληψιών.

α/α	Ημερομηνία δειγματοληψίας	Χρόνος κομποστοποίησης (ημέρες)	Σχόλια
<b>Σωρός 1</b>			
1	20-Ιαν-2011	0	Εγκατάσταση
2	25-Ιαν-2011	5	-
3	22-Μαρ-2011	61	Γύρισμα & Διαβροχή
4	28-Μαρ-2011	67	-
<b>Σωρός 2</b>			
1	20-Ιαν-2011	0	Εγκατάσταση
2	26-Ιαν-2011	6	-
3	23-Μαρ-2011	62	Γύρισμα & Διαβροχή
4	29-Μαρ-2011	68	-

Κατά την τρίτη δειγματοληψία το δείγμα ελήφθη πριν το γύρισμα και τη διαβροχή του υλικού. Και οι δύο σωροί διαβρέχτηκαν με περίπου 200 l νερό.

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

### 4. Μελέτη Φυσικοχημικών Παραμέτρων

---

#### 4.1 Παρακολούθηση θερμοκρασίας

Καθ' όλη τη διάρκεια της κομποστοποίησης η θερμοκρασία παρακολουθείτο σχεδόν καθημερινά, με χρήση θερμομέτρου κλασσικού τύπου. Το θερμόμετρο τοποθετείτο έως τη μέση του σωρού και υπήρχε μια αναμονή περίπου 15 λεπτών έως ότου σημειωθεί η θερμοκρασία, για τη σταθεροποίηση αυτής. Επίσης με τη χρήση θερμομέτρου σταθερά τοποθετημένου στον εξωτερικό χώρο του θερμοκηπίου, σημειωνόταν και η θερμοκρασία του περιβάλλοντα χώρου.

#### 4.2 Προσδιορισμός υγρασίας

Νωπό δείγμα επώαστηκε 2 ημέρες στους 60 °C. Η % περιεκτικότητα σε υγρασία των δειγμάτων προσδιορίστηκε με βάση τη διαφορά βάρους του νωπού και ξηρού δείγματος.

#### 4.3 Προσδιορισμός pH και Ηλεκτρικής Αγωγιμότητας (Electrical Conductivity, EC)

Τόσο το pH όσο και η EC προσδιορίστηκαν ως εξής: δείγμα κόμποστ αναμίχθηκε με ποσότητα απιονισμένου νερού σε αναλογία 1:5. Το μίγμα αναδεύτηκε για 1:30 ώρα, στις 150 rev/min. Ποσότητα δείγματος φυγοκεντρήθηκε στις 1500 rpm για 5 min, και το υπερκείμενο διηθήθηκε υπό κενό. Στο διήθημα μετρήθηκε το pH με τη χρήση πεχάμετρου τύπου Corning-EEL, και η EC με τη χρήση αγωγιμόμετρου.

#### 4.4 Προσδιορισμός του νιτρικού αζώτου ( $N-NO_3^-$ ) με τη μέθοδο του καδμίου

##### Αρχή της μεθόδου

Τα  $NO_3^-$  του εκχυλίσματος από το δείγμα του κόμποστ προσδιορίζονται, μετά την αναγωγή τους σε  $NO_2^-$ , που πραγματοποιείται μετά τη διέλευσή τους από στήλη επιχαλωμένου καδμίου παρουσίας  $NH_4Cl$  και pH 5-10. Στη συνέχεια προσδιορίζονται χρωματομετρικά, μετρώντας την ένταση του αζω – χρωμοφόρου (azo – chromophore), η οποία είναι ανάλογη της ποσότητας των



## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> στο δείγμα και η οποία προέκυψε από την προσθήκη σουλφαναμιίνης, που αντιδρά με τα NO<sub>2</sub><sup>-</sup> και N-1-ναφθυλαιθυλενοδιαμίνης (N-(1-naphthyl)-ethylenediamine).

### Εκχύλιση του δείγματος

Ζυγίζεται ποσότητα κόμποστ που αντιστοιχεί σε 10 g ξηρού δείγματος και αναμιγνύεται με 100 ml διαλύματος KCl 2 M. Ακολουθεί ανάδευση για 1 ώρα σε αναδευτήρα. Φυγοκέντρηση του αιωρήματος δείγματος – KCl έως ότου το υπερκείμενο υγρό καταστεί διαυγές. Διήθηση υπερκειμένου με διηθητικό χαρτί Whatman No 42. Διατήρηση στο ψυγείο.

### Προετοιμασία αναγωγικής στήλης

Οι προχοΐδες που φέρουν ως 20 cm επιχαλκωμένο Cd, έχουν ξεπλυθεί διεξοδικά με αραιό διάλυμα NH<sub>4</sub>Cl, και όσο δεν χρησιμοποιούνται είναι καλυμμένες ως 1 cm πάνω από τη στήλη Cd με αραιό διάλυμα NH<sub>4</sub>Cl. Λίγο πριν τη χρήση προστίθεται 1 ml πυκνού NH<sub>4</sub>Cl και η στάθμη του υγρού στην προχοΐδα χαμηλώνεται ως το ύψος του Cd. Προστίθεται αραιό NH<sub>4</sub>Cl ως το στόμιο της προχοΐδας.

### Ανάλυση εκχυλίσματος

Η στάθμη του αραιού NH<sub>4</sub>Cl αφήνεται να χαμηλώσει, έως ότου το διάλυμα καλύπτει μόλις την κορυφή της στήλης Cd. Προστίθεται 1 ml πυκνού NH<sub>4</sub>Cl καθώς και 2 – 5 ml εκχυλίσματος. Το εκχύλισμα διέρχεται από τη στήλη και συλλέγεται σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml, ενώ προστίθεται συνεχώς διάλυμα αραιού NH<sub>4</sub>Cl από την κορυφή έως ότου συλλεχθούν 90 ml. Μετά τη χρήση ξεπλένεται πάλι η στήλη με 2 ml πυκνού NH<sub>4</sub>Cl και 75 ml αραιού NH<sub>4</sub>Cl, προσέχοντας το διάλυμα NH<sub>4</sub>Cl να είναι πάντα πάνω από τη στήλη. Στις ογκομετρικές φιάλες προστίθενται 2 ml αντιδραστήριο διαζωτικού, και μετά από 5 min 2 ml αντιδραστηρίου σύζευξης. Αναμονή 20 min και μέτρηση της έντασης του ροζ χρώματος (εκφραζόμενη σε mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> / ml διαλύματος) στο φασματοφωτόμετρο UV στα 540 nm.

### Υπολογισμοί

$$\text{Σκαμπ} = (bI - R) / 583,2 \text{ (}\mu\text{g / ml)},$$

Όπου bI = η ένδειξη του τυφλού (χρήση μόνο των αντιδραστηρίων) και

$$R = \text{η ένδειξη των δειγμάτων}$$

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

$$\mu\text{g (N - NO}_3\text{)/g δείγματος} = \frac{\text{Cκαμπ} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}\right) * V1 \text{ (ml)} * V3 \text{ (ml)} * a}{V2 \text{ (ml)} * B \text{ (g)}}$$

όπου V1 = όγκος του εκχυλιστικού (ml KCl)

V2 = όγκος (ml) που λήφθηκε από το εκχύλισμα για αναγωγή σε νιτρώδη

V3 = όγκος (ml) της ογκομετρικής φιάλης στην οποία αναπτύχθηκε το χρώμα

a = αραίωση (αν απαιτείται)

B = το βάρος του (ξηρού) δείγματος (g) που χρησιμοποιήθηκε (προσδιορίζεται από την υγρασία του νεπού δείγματος)

### 4.5 Χρωματομετρικός προσδιορισμός του αμμωνιακού αζώτου ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) με τη μέθοδο της ινδοφαινόλης

Η εκχύλιση γίνεται όπως και κατά τον προσδιορισμό των νιτρικών.

#### Προσδιορισμός των αμμωνιακών

Λήψη 5 ml εκχυλίσματος και τοποθέτηση εντός ογκομετρικής φιάλης των 50 ml (παράλληλα παρασκευάζεται και ο μάρτυρας, που περιέχει όλα τα παρακάτω αντιδραστήρια πλην του εκχυλίσματος). Προσθήκη 2 ml διαλύματος EDTA και ανάδευση. Αναμονή 1 min. Προσθήκη 4 ml διαλύματος phenol – nitroprusside. Προσθήκη 8 ml διαλύματος υποχλωριώδους νατρίου. Συμπλήρωση του όγκου με απεσταγμένο νερό ως τη χαραγή και ανάμιξη. Ανάπτυξη μπλε χρώματος αφού τα δείγματα αφεθούν σε ηρεμία για μία ώρα. Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων με φωτομέτρηση στα 636 nm με τη χρήση φασματοφωτόμετρου.

#### Υπολογισμοί

$$\text{Cκαμπ} = (b1 - R) / 145,3 \text{ (}\mu\text{g / ml)},$$

Όπου b1 = η ένδειξη του τυφλού (χρήση μόνο των αντιδραστηρίων) και

R = η ένδειξη των δειγμάτων

$$\text{Cαμμωνιακών [ppm (}\mu\text{g / g ξηρού βάρους)}] = \text{Cκαμπ} * V1 \text{ (ml)} * V3 \text{ (ml)} * a / V2 \text{ (ml)} * B \text{ (g)}$$

Όπου, V1 = όγκος του εκχυλιστικού (ml KCl)

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

$V_2$  = όγκος (ml) που λήφθηκε από το εκχύλισμα για ανάπτυξη χρώματος

$V_3$  = όγκος (ml) της ογκομετρικής φιάλης στην οποία αναπτύχθηκε το χρώμα

$a$  = αραίωση (αν απαιτείται)

$B$  = το βάρος του (ξηρού) δείγματος (g) που χρησιμοποιήθηκε (προσδιορίζεται από την υγρασία του νωπού δείγματος)

### 4.6 Προσδιορισμός του ολικού αζώτου (μέθοδος Kjeldahl)

Το ολικό άζωτο αναφέρεται στο ποσό του οργανικού αζώτου που περιέχεται στην οργανική ουσία του δείγματος, περιλαμβάνει όμως και ανόργανες μορφές αμμωνιακού αζώτου που περιέχονται στο δείγμα.

#### Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος Kjeldahl περιλαμβάνει δύο στάδια: την πέψη της οργανικής ουσίας με πυκνό και θερμό  $H_2SO_4$ , παρουσία καταλύτη, για τη μετατροπή του οργανικού αζώτου σε ανόργανο υπό τη μορφή  $(NH_4)_2SO_4$  (φάση καύσης ή πέψης). Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει τον προσδιορισμό της παραγόμενης  $NH_3$ , κατά το οποίο τα αμμωνιακά ιόντα ανάγονται με τη βοήθεια πυκνού αλκάλειου. Η ελευθερούμενη  $NH_3$  αποστάζεται και επαναδεσμεύεται (ως αμμωνιακά ιόντα) σε διάλυμα οξέως γνωστού όγκου και τίτλου (φάση απόσταξης). Η περίσσεια του οξέως τιτλοδοτείται με βάση, και από την τιτλοδότηση αυτή υπολογίζεται η ποσότητα της δεσμευμένης  $NH_3$  και συνεπώς του αζώτου που περιέχεται στο δείγμα.

#### Προσδιορισμός με χρήση της συσκευής Bucchi

Καύση: 0.5 g ξηρού δείγματος κόμποστ τοποθετείται στις ειδικές φιάλες καύσης. Προσθήκη 20 ml διαλύματος  $H_2SO_4$  και σαλικυλικού. Προσθήκη 1 g  $Na_2S_2O_3$  και μίας ταμπλέτας σεληνίου σε κάθε δείγμα.

Τοποθέτηση των φιαλών στη συσκευή χώνευσης Bucchi και έναρξη χώνευσης. Αφήνεται να ολοκληρωθεί η χώνευση ως ότου το δείγμα γίνει διαυγές (χρώμα ελαφρώς πράσινο).

Απόσταξη: Τίθεται σε λειτουργία η συσκευή απόσταξης Bucchi. Στο δείγμα, μετά την πέψη και αφού κρυώσει, προστίθενται 30 ml νερού και 130 ml NaOH 8N και η φιάλη τοποθετείται στη συσκευή. Παράλληλα σε κωνική φιάλη τοποθετούνται 100 ml βορικού οξέος 20%, για την

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

παραλαβή της αμμωνίας κατά την απόσταξη. Τοποθέτηση της κωνικής στη συσκευή απόσταξης. Απόσταξη για 3 min.

Προσθήκη δείκτη σε κάθε κωνική και τιτλοδότηση της αμμωνίας με 0,5N NaOH.

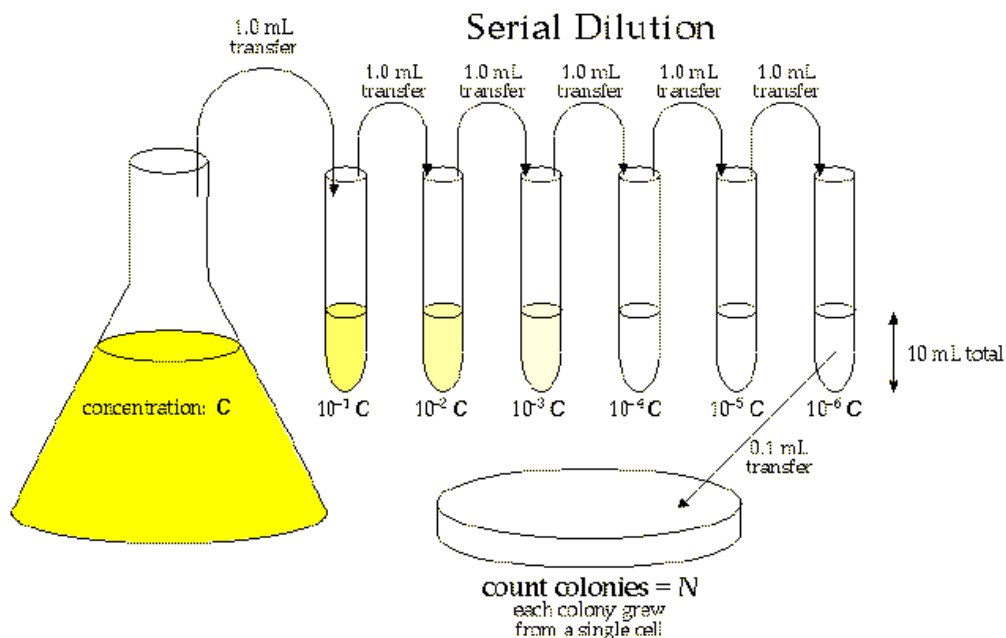
### Υπολογισμοί

$$N\% = [(ml\ HCl\ για\ κάθε\ δείγμα - 0.2) * 0.05 * 14 * 100] / (\text{βάρους\ δείγματος} * 1000)$$

### 5. Μικροβιολογικές αναλύσεις με χρήση κλασικών μεθόδων

Για τη διεξαγωγή των μικροβιολογικών κλασικών τεχνικών πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων ως εξής:

10 g νωπού δείγματος κόμποστ από κάθε δειγματοληψία και από κάθε σωρό, αναμίχθηκαν με 90 ml διαλύματος Ringer. Το διάλυμα ανακινήθηκε για ½ h στις 300 rev/min. Αυτή θεωρήθηκε ως η πρώτη αραιώση ( $10^{-1}$ ). Οι επόμενες αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν σε φιαλίδια (τύπου McCartney) τα οποία περιείχαν 9 ml διαλύματος Ringer, με αραιώση διαδοχικά σε αυτά 1 ml από την εκάστοτε προηγούμενη αραιώση. Έτσι πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις από  $10^{-2}$  –  $10^{-8}$ .



**Εικόνα 5.1** Η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων και η επίστρωση σε τρυβλίο (*plating method*).

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε με την επίστρωση (*plating method*) 0.1 ml από πέντε επιλεγμένες διαδοχικές αραιώσεις σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα, ανάλογα με την προς μελέτη μικροβιακή ομάδα. Για κάθε αραιώση πραγματοποιήθηκαν πέντε επαναλήψεις. Όλα τα τρυβλία επώαστηκαν στους 30 °C για 3 – 4 ημέρες.

### **5.1 Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων**

Όλα τα υλικά που παρασκευάστηκαν, αμέσως μετά την παρασκευή τους και πριν το μοίρασμα σε τρυβλία Petri, αποστειρώθηκαν στο αυστόκαυστο (121 °C για 15 min).

#### **5.1.1 Θρεπτικό Υλικό Ανάπτυξης Ολικών Βακτηρίων**

Προκειμένου να απομονωθούν τα ολικά αερόβια βακτήρια, ως θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε το Nutrient Agar (NA). Χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις  $10^{-4}$  –  $10^{-8}$ .

#### **5.1.2 Θρεπτικό Υλικό Ανάπτυξης Σποριογόνων Βακτηρίων**

Για τα σποριογόνα βακτήρια ως μέσο απομόνωσης χρησιμοποιήθηκε το NA. Πριν τον εμβολιασμό των τρυβλίων, η αρχική αραιώση ( $10^{-1}$ ) επώαστηκε 1 ημέρα σε υδατόλουτρο 70 °C. Χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις  $10^{-3}$  –  $10^{-7}$ .

#### **5.1.3 Θρεπτικό Υλικό Ανάπτυξης Μυκήτων**

Για την απομόνωση των μυκήτων χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υπόστρωμα Potato Dextrose Agar (PDA), στο οποίο προστέθηκε πριν την αποστείρωση η χρωστική Rose bengal (0.033 g/l). Το θρεπτικό υλικό πριν το μοίρασμα στα τρυβλία αφέθηκε να κρυώσει και στη συνέχεια προστέθηκε αντιβιοτικό (διάλυμα στρεπτομυκίνης 1 ml/l από αρχικό διάλυμα 0.03 g/ml). Χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις  $10^{-2}$  –  $10^{-6}$ .

#### **5.1.4 Θρεπτικό Υλικό Ανάπτυξης Ακτινομυκήτων**

Για την απομόνωση των ακτινομυκήτων χρησιμοποιήθηκε το εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Glycerol – Casein Agar (GCA). Χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις  $10^{-3}$  –  $10^{-7}$ .

#### **5.1.5 Θρεπτικό Υλικό Ανάπτυξης Κυτταρινολυτικών Βακτηρίων**

Για την απομόνωση των κυτταρινολυτικών βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε το εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα CMC Agar (από το συστατικό *CarboxyMethylCellulose*, μία διαλυτή μορφή της

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

κυτταρίνης). Το υλικό αυτό επειδή περιέχει κυτταρίνη χρειάστηκε θέρμανση κατά την παρασκευή του. Χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις  $10^{-4} - 10^{-8}$ .

Μετά την ανάπτυξη των οργανισμών, τα τρυβλία εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα ιωδίου της χρώσης Gram για 2 – 3 min, προκειμένου να παρατηρηθεί και να μετρηθεί, εάν υπάρχει, η διαυγής ζώνη γύρω από την κάθε αποικία. Η αποικοδόμηση της κυτταρίνης παρατηρείται μέσω αποχρωματισμού του υποστρώματος CMC Agar. Γύρω από τις αποικίες των κυτταρινολυτικών βακτηρίων παρατηρείται διαυγής ζώνη, ενώ το υπόστρωμα που δεν είχε υδρολυθεί χρωματιζόταν υποκίτρινο (Kasana *et al.*, 2008). Μικρή αναφορά εντούτοις θα γίνει στα κυτταρινολυτικά βακτήρια, καθώς στην παρούσα μελέτη μελετήθηκε μόνο η ικανότητα κυτταρινόλυσης κάποιων στελεχών. Ορισμένα βακτηριακά στελέχη διατηρήθηκαν στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  για εργαστηριακή μελέτη σε πιθανή μελλοντική έρευνα.

### 5.1.6 Αζωτοδεσμευτικά βακτήρια

Για την εκτίμηση του πληθυσμού των ελεύθερα διαβιούντων αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών καθώς και της φυσικής αζωτοδεσμευτικής χλωρίδας του κόμποστ, εφαρμόστηκε η μέθοδος του **πλέον πιθανού αριθμού** (Most Probable Number, MPN) (Alexander, 1965). Η μέθοδος αυτή αποτελεί μαθηματική προέκταση της βασικής μικροβιολογικής τεχνικής των διαδοχικών αραιώσεων, και επιτρέπει τη στατιστική εκτίμηση της πυκνότητας ενός μικροβιακού πληθυσμού με έμμεσο τρόπο, χωρίς δηλαδή να είναι απαραίτητη η άμεση καταμέτρηση κυττάρων ή αποικιών.

Σαν θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε το εκλεκτικό θρεπτικό διάλυμα Rennie, το οποίο είναι ελεύθερο αζώτου. Χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις  $10^{-2} - 10^{-6}$  (αραίωση 1 ml από τις αρχικές αραιώσεις του δείγματος σε 9 ml υγρό θρεπτικό Rennie). Για κάθε δείγμα έγιναν 2 επαναλήψεις. Οι σωλήνες (5 για κάθε αραιώση) επώαστηκαν 7 ημέρες στους  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  (ή και στους  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  όταν το δείγμα ήταν από τη θερμοφιλή φάση). Την 7<sup>η</sup> μέρα οι σωλήνες κλείστηκαν αεροστεγώς με αποστειρωμένα πώματα σιλικόνης, εμβολιάστηκαν με 1 ml αέριο ακετυλένιο και επώαστηκαν 1 ημέρα ακόμη. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε η δοκιμή του ακετυλενίου με λήψη 1 ml δείγματος από την αέρια φάση του κάθε σωλήνα. Η μέθοδος στηρίζεται στην αναγωγή του ακετυλενίου προς αιθυλένιο, η οποία καταλύεται από το ενζυμικό σύστημα της νιτρογενάσης την οποία διαθέτουν οι αζωτοδεσμευτικοί μικροοργανισμοί. Η αναγωγή αυτή μετρήθηκε στον αέριο χρωματογράφο τύπου Perkin – Elmer 8500 (GC) με ανιχνευτή φλόγας ιονισμού (FID),

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

κολώνα χρωματογραφίας Poropak- R 2m με τις εξής συνθήκες ανάλυσης: θερμοκρασία εισόδου 200 °C, θερμοκρασία ανιχνευτή 200° C, θερμοκρασία φούρνου 60 °C, φέρον αέριο He με ροή 20 ml/min.

Θετικοί ήταν οι σωλήνες στους οποίους ανιχνεύθηκε αιθυλένιο. Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο πληθυσμός των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων ανά g ξηρού βάρους κόμποστ με βάση τον Πίν. 5.1.

**Πίνακας 5.1** Πίνακας των πλέον πιθανών αριθμών για δεκαδικές αραιώσεις και 5 σωλήνες ανά αραιώση.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΩΝ ΠΛΕΟΝ ΠΙΘΑΝΩΝ ΑΡΙΘΜΩΝ ΓΙΑ ΔΕΚΑΔΙΚΕΣ ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΝΤΕ ΣΩΛΗΝΕΣ ΚΑΤΑ ΑΡΑΙΩΣΗ

P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	Πλέον πιθανός αριθμός για τις αντίστοιχες τιμές P <sub>3</sub>					
		0	1	2	3	4	5
0	0	—	0,018	0,036	0,054	0,072	0,09
0	1	0,018	0,036	0,055	0,073	0,091	0,11
0	2	0,037	0,055	0,074	0,092	0,11	0,13
0	3	0,056	0,074	0,093	0,11	0,13	0,15
0	4	0,075	0,094	0,11	0,13	0,15	0,17
0	5	0,094	0,11	0,13	0,15	0,17	0,19
1	0	0,020	0,040	0,060	0,080	0,10	0,12
1	1	0,040	0,061	0,081	0,101	0,12	0,14
1	2	0,061	0,082	0,10	0,12	0,15	0,17
1	3	0,083	0,10	0,13	0,15	0,17	0,19
1	4	0,11	0,13	0,15	0,17	0,19	0,22
1	5	0,13	0,15	0,17	0,19	0,22	0,24
2	0	0,045	0,068	0,091	0,12	0,14	0,16
2	1	0,068	0,092	0,12	0,14	0,17	0,19
2	2	0,093	0,12	0,14	0,17	0,19	0,22
2	3	0,12	0,14	0,17	0,20	0,22	0,25
2	4	0,15	0,17	0,20	0,23	0,25	0,28
2	5	0,17	0,20	0,23	0,26	0,29	0,32
3	0	0,078	0,11	0,13	0,16	0,20	0,23
3	1	0,11	0,14	0,17	0,20	0,23	0,27
3	2	0,14	0,17	0,20	0,24	0,27	0,31
3	3	0,17	0,21	0,24	0,28	0,31	0,35
3	4	0,21	0,24	0,28	0,32	0,36	0,40
3	5	0,25	0,29	0,32	0,37	0,41	0,45
4	0	0,13	0,17	0,21	0,25	0,30	0,36
4	1	0,17	0,21	0,26	0,31	0,36	0,42
4	2	0,22	0,26	0,32	0,38	0,44	0,50
4	3	0,27	0,33	0,39	0,45	0,52	0,59
4	4	0,34	0,40	0,47	0,54	0,62	0,69
4	5	0,41	0,48	0,56	0,64	0,72	0,81
5	0	0,23	0,31	0,43	0,58	0,76	0,93
5	1	0,33	0,46	0,64	0,84	1,1	1,3
5	2	0,49	0,70	0,95	1,2	1,5	1,8
5	3	0,79	1,1	1,4	1,8	2,1	2,5
5	4	1,3	1,7	2,2	2,8	3,5	4,3
5	5	2,4	3,5	5,4	9,2	16	—

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Επίσης ελέγχθηκε η δυνατότητα αζωτοδέσμευσης του ίδιου του κόμποστ. Συγκεκριμένα 10 g κόμποστ τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια τύπου McCartney (3 επαναλήψεις). Στα φιαλίδια, αφού κλείστηκαν αεροστεγώς, προστέθηκε 1 ml ακετυλένιο, και επώαστηκαν 24 ώρες στους 30 και στους 50 °C. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε η δοκιμή του ακετυλενίου με λήψη 1 ml δείγματος από την αέρια φάση του φιαλιδίου.

### 5.2 Απομόνωση μικροοργανισμών σε καθαρή καλλιέργεια

Μετά την επώαση, μεμονωμένες αποικίες από κάθε τρυβλίο, αφού ελέγχθηκαν ως προς την καθαρότητά τους (γραμμική διασπορά – *streaking*) και μελετήθηκε η αντίδρασή τους στη χρώση κατά Gram, φυλάχθηκαν σε διάλυμα γλυκερόλης 25% στους -80 °C.

Για τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια από θετικούς σωλήνες στη δοκιμή του ακετυλενίου, εμβολιάστηκαν τρυβλία με θρεπτικό υλικό Rennie. Από αυτά, μεμονωμένες αποικίες, αφού ελέγχθηκαν για την καθαρότητά τους καθώς και για την αζωτοδεσμευτική τους ικανότητα (δοκιμή ακετυλενίου) φυλάχθηκαν σε διάλυμα γλυκερόλης 25% στους -80 °C. Σε αυτές τις καθαρές καλλιέργειες επικεντρώθηκε στη συνέχεια η προσπάθεια μελέτης και ταυτοποίησής τους.

Στα σποριογόνα βακτήρια πραγματοποιήθηκε και η μέθοδος χρώσης του ενδοσπορίου (Schaeffer - Fulton spore stain method).

### 5.3 Εκτίμηση της αναπνευστικής δραστηριότητας

Η ένταση της αναπνευστικής δραστηριότητας του εδάφους μπορεί να εκτιμηθεί με τη βοήθεια μιας παραλλαγής του ηλεκτρολυτικού αναπνευσίμετρου των Birch & Friend (Manios & Balis, 1983). Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ποσοτική αναπλήρωση του οξυγόνου που καταναλίσκεται από το κόμποστ, με οξυγόνο το οποίο παράγεται ηλεκτρολυτικά. Η ποσότητα επομένως του καταναλισκόμενου οξυγόνου μπορεί να εκτιμηθεί από τον όγκο του υδρογόνου που παράγεται κατά την ηλεκτρόλυση, το οποίο μπορεί εύκολα να συλλεχθεί και να ογκομετρηθεί.



## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

### Πειραματική διαδικασία:

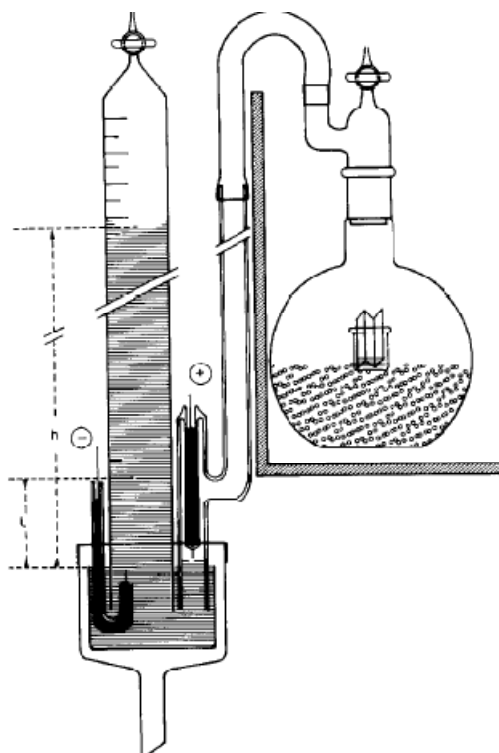
Δείγμα κόμποστ μεταφέρεται σε σφαιρικές φιάλες και επωάζεται σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας (30 °C και 50 °C για την θερμοφιλή φάση). Στο εσωτερικό της φιάλης και πάνω στην επιφάνεια του εδάφους τοποθετείται σωληνίσκος με 2 ml διαλύματος KOH 4N. Εντός του σωληνίσκου τοποθετείται πτυχωτό τεμάχιο διηθητικού χαρτιού, ώστε να αυξάνεται η επιφάνεια του διαλύματος KOH και επομένως και η ικανότητα δέσμευσης CO<sub>2</sub>.

Στη φιάλη προσαρμόζεται αεροστεγώς, με τη βοήθεια λίπους σιλικόνης το ειδικά διαμορφωμένο πώμα, το οποίο φέρει στρόφιγγα και πλάγιο σωλήνα που είναι συνδεδεμένος μέσω ελαστικού σωλήνα με το ηλεκτρόδιο παραγωγής οξυγόνου στο ποτήρι (εντός του ποτηριού βρίσκεται ανεστραμμένη προχοΐδα - τόσο η προχοΐδα όσο και το ποτήρι έχουν ήδη πληρωθεί με διάλυμα H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2 N). Στο εσωτερικό άνοιγμα της προχοΐδας που βρίσκεται βυθισμένο στο ποτήρι, υπάρχει προσαρμοσμένο το ηλεκτρόδιο παραγωγής υδρογόνου. Οι ακίδες Pt των δύο ηλεκτροδίων συνδέονται με ηλεκτρική πηγή συνεχούς ρεύματος (12 – 24 V, 10 A) μέσω γεφυρών Hg. Το διάλυμα του H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> στην προχοΐδα που εκτοπίζεται από το εκλυόμενο υδρογόνο, υπερχειλίζει μέσω του ποτηριού στο χωνί και παροχετεύεται σε φιάλη συλλογής για να επαναχρησιμοποιηθεί.

Χαμηλώνεται το ηλεκτρόδιο οξυγόνου, έχοντας τη στρόφιγγα ανοιχτή, μέχρις ότου η ακίδα Pt βυθιστεί στο διάλυμα του H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, οπότε και ξεκινά η ηλεκτρόλυση. Κλείσιμο της στρόφιγγας.

Ανυψώνεται το ηλεκτρόδιο μέχρις ότου διακοπεί το ηλεκτρικό κύκλωμα. Η στιγμή αυτή θεωρείται χρόνος μηδέν. Σε τακτά χρονικά διαστήματα σημειώνεται ο όγκος του υδρογόνου που συλλέγεται στην προχοΐδα.

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ



**Εικόνα 5.2** Σχηματική αναπαράσταση μιας μονάδας αναπνευσίμετρου (Προσαρμοσμένο από Manios & Balis, 1983).

Οι όγκοι υδρογόνου στην προχοΐδα, επηρεάζονται από τη βαρομετρική πίεση  $B$  (mmHg), τη θερμοκρασία του χώρου  $\Theta$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) και το ύψος  $h$  (cm) του διαλύματος  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Κατά συνέπεια για να είναι συγκρίσιμοι θα πρέπει να διορθωθούν και να αναχθούν σε όγκους κανονικών συνθηκών θερμοκρασίας και πίεσης ( $0^{\circ}\text{C}$  και  $760$  mmHg).

Οι διορθώσεις αυτές γίνονται εφαρμόζοντας τον τύπο:

$$V_0 = [(B - \delta - 10 hq/d) * V] / P_0 (1 + \alpha\theta)$$

Όπου:  $V_0$  = Διορθωμένος όγκος  $\text{H}_2$  ( $0^{\circ}\text{C}$ ,  $760$  mmHg)

$V$  = Όγκος  $\text{H}_2$  στην προχοΐδα (ml) στο χρόνο  $t$ .

$B$  = Βαρομετρική πίεση τη στιγμή της ανάγνωσης του  $V$ .

$\delta$  = Τάση ατμών του διαλύματος  $0.2$  N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (=  $17$  mmHg).

$h$  = Ύψος της στήλης του  $\text{H}_2\text{SO}_4$  στην προχοΐδα τη στιγμή της ανάγνωσης του  $V$ .

$q$  = Πυκνότητα του διαλύματος  $0.2$  N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (=  $1,012$  g/cm<sup>3</sup>).

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

$d$  = Πυκνότητα Hg ( $13.596 \text{ g/cm}^3$ ).

$P_0$  = Κανονική ατμοσφαιρική πίεση (760 mm Hg)

$\alpha = 1/273=0.00367$

$\Theta$  = Θερμοκρασία του χώρου τη στιγμή της ανάγνωσης του  $V$ .

Ο ανωτέρω τύπος μετά από σχετικές αντικαταστάσεις και λαμβάνοντας υπ' όψη τη διατομή των προχοΐδων και τον όγκο τους μετασχηματίζεται και λαμβάνεται ο ακόλουθος απλούστερος τύπος:

$$v_0 = [(B-17-0,7815x)(50-x)] / [760*(1+0.00367\Theta)]$$

Όπου  $x$  είναι η ανάγνωση της στήλης στο ύψος του μηνίσκου στην προχοΐδα.

## 6. Μοριακές Τεχνικές

### 6.1 Επιλογή βακτηριακών στελεχών για ταυτοποίηση

Τα βακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν, απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης. Από τις 18 απομονώσεις αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, μελετήθηκαν τρία στελέχη, τα οποία προέρχονται από διαφορετικές φάσεις της διαδικασίας κομποστοποίησης, και από τους δύο σωρούς και η αζωτοδεσμευτική τους ικανότητα ήταν αδιαμφισβήτητη.

**Πίνακας 6.1** Κωδικοποίηση και περιγραφή των υπό μελέτη στελεχών.

α/α	Στέλεχος	Κωδικοποίηση	Περιγραφή
1	1 (αποικία 2)	RIK/10 <sup>-3</sup> (γ)	Υλικό απομόνωσης: Rennie 1 <sup>η</sup> δειγματοληψία – Σωρός 2 Αραίωση: 10 <sup>-3</sup> (γ)
2	2	RIIK/10 <sup>-2</sup> (ε)	Υλικό απομόνωσης: Rennie 2 <sup>η</sup> δειγματοληψία – Σωρός 2 Αραίωση: 10 <sup>-2</sup> (ε)
3	5	RIIM/10 <sup>-5</sup> (α)	Υλικό απομόνωσης: Rennie 2 <sup>η</sup> δειγματοληψία – Σωρός 1 Αραίωση: 10 <sup>-5</sup> (α)

Τα βακτηριακά αυτά στελέχη μετά τη μοριακή τους ανάλυση ονομάστηκαν Co1, Co2, Co5 για λόγους διευκόλυνσης κατά τη διεξαγωγή και ανάγνωση των φυλογενετικών δενδρογραμμάτων.

### 6.2 Απομόνωση ολικού γενετικού υλικού (DNA)

#### 6.2.1 Συλλογή βακτηριακών κυττάρων (pellet)

5ml LB θρεπτικού μέσου εμβολιάστηκαν με λούπα από στοκ γλυκερόλης της εκάστοτε βακτηριακής καλλιέργειας. Ακολούθησε επώαση με ανακίνηση στους 30 °C για 24 ώρες.

5ml θρεπτικού υλικού LB εμβολιάστηκαν με ποσότητα από την ανωτέρω καλλιέργεια (λόγος εμβόλιο:θρεπτικό = 1:500). Ακολούθησε επώαση υπό ανάδευση στους 30 °C. Σε αυτή την καλλιέργεια μελετήθηκε η κινητική της μικροβιακής ανάπτυξης, με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600 nm, κάθε 1:30 h. Μόλις η καλλιέργεια έφτασε στην εκθετική της

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

φάση ( $OD_{600}=0.5-0.6$ ), εμβολιάστηκε κωνική φιάλη που έφερε 50 ml LB θρεπτικό, (εμβόλιο:θρεπτικό = 1:500). Ακολούθησε επώαση υπό ανάδευση στους 30 °C.

Βάσει της καμπύλης μικροβιακής ανάπτυξης, την ώρα που η καλλιέργεια θα έφτανε την εκθετική φάση, φυγοκεντρήθηκαν διαδοχικά 10 ml καλλιέργειας στις 11.000 rpm, με σκοπό τη συλλογή των βακτηριακών κυττάρων (*pellet*). Η *pellet* επαναιωρήθηκε σε διάλυμα NaCl 100 mM, εις διπλούν, με σκοπό την απομάκρυνση υπολειμμάτων θρεπτικού μέσου τα οποία θα λειτουργούσαν ανασταλτικά στις επόμενες αντιδράσεις, και διατηρήθηκε στους -20 °C έως την απομόνωση ολικού γενετικού υλικού - DNA (genomic DNA extraction).

### 6.2.2 Απομόνωση DNA (*genomic extraction*)

Και τα τρία βακτηριακά στελέχη βρέθηκαν αρνητικά στην χρώση κατά Gram, οπότε ακολουθήθηκε το αντίστοιχο πρωτόκολλο που αφορά Gram<sup>-</sup> βακτήρια. Για την απομόνωση του γενετικού υλικού χρησιμοποιήθηκε το kit Genomic DNA from Tissue (Macherey Nagel) (πρωτόκολλο που αφορά τα βακτηριακά κύτταρα):

#### I. Δείγμα πριν τη λύση των κυττάρων

Σε erpendorf που έφερε την *pellet* προστέθηκαν 180 μl διαλύματος T1 και 25 μl διαλύματος Proteinase K. Ακολούθησε καλή ανάδευση με vortex.

Επώαση του δείγματος στους 56 °C για 1 h, έως ότου επιτευχθεί πλήρης λύση. Περιοδική ανάδευση κάθε 10 min. Προσθήκη 20 μl RNase A (20 mg/ml) μετά την επώαση. Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 5-6 min.

#### II. Λύση

Καλή ανάδευση του δείγματος. Προσθήκη 200 μl διαλύματος B3, ανάδευση και επώαση στους 70 °C για 10 min. Σύντομη ανάδευση.

#### III. Ρύθμιση συνθηκών δέσμησης DNA.

Προσθήκη 210 μl αιθανόλης (96-100%) στο δείγμα, καλή ανάδευση.

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

### IV. Δέσμευση DNA

Για κάθε δείγμα τοποθετήθηκε μία στήλη σε ένα σωλήνα συλλογής. Όλο το δείγμα μεταφέρθηκε στη στήλη. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 1 min. Απόρριψη του διηθήματος και επανατοποθέτηση της στήλης στο σωλήνα συλλογής.

### V. Ξέπλυμα της μεμβράνης

1<sup>η</sup> πλύση: Προσθήκη 500 μl διαλύματος BW. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 1 min. Απόρριψη του διηθήματος και επανατοποθέτηση της στήλης στο σωλήνα συλλογής.

2<sup>η</sup> πλύση: Προσθήκη 600 μl διαλύματος B5. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 1 min. Απόρριψη του διηθήματος και επανατοποθέτηση της στήλης στο σωλήνα συλλογής.

### VI. Στέγνωμα της μεμβράνης

Απομάκρυνση της εναπομείνουσας αιθανόλης με φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 1 min.

### VII. Εκχύλιση DNA

Τοποθέτηση της στήλης σε eppendorf των 1.5 ml και προσθήκη 100 μl προθερμασμένου διαλύματος BE (70 °C). Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 min. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 1 min.

Διατήρηση του γενετικού υλικού στους -20 °C για μετέπειτα χρήση.

### **6.3 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊκών οξέων**

Η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων (ng/μl) στο εκάστοτε διάλυμα έκλουσης (Elution Buffer) αυτών προσδιορίστηκε μέσω φωτομέτρησης στα 260 nm με τη χρήση σπεκτροφωτόμετρου (Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer). Για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα έκλουσης του DNA, απουσία γενετικού υλικού.

Η καθαρότητα των νουκλεϊκών οξέων προσδιορίζεται από τον λόγο  $OD_{260}/OD_{280}$ . Ένα δείγμα DNA θεωρείται καθαρό όταν ισχύει:  $OD_{260}/OD_{280} \geq 1.8$ .

$OD_{260}/OD_{280} < 1.8$  σημαίνει ότι το δείγμα μας είναι μολυσμένο με πρωτεΐνες και αρωματικές ουσίες (π.χ. φαινόλη).

$OD_{260}/OD_{280} > 2$  σημαίνει πιθανή μόλυνση με RNA.

### 6.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (*Polymerase Chain Reaction, PCR*)

#### Αρχή της μεθόδου:

Η ανακάλυψη των εξειδικευμένων ενδονουκλεασών περιορισμού (Smith & Wilcox, 1970) κατέστησε δυνατή την απομόνωση διακριτών μοριακών τεμαχίων DNA φυσικής προέλευσης. Οι Mullis *et al.* (1986) μελέτησαν μια εναλλακτική μέθοδο σύνθεσης ειδικών αλληλουχιών DNA. Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει την αμφίδρομη αλληλεπίδραση μεταξύ δύο ολιγονουκλεοτιδίων (primers) και των προϊόντων επιμήκυνσης της DNA πολυμεράσης, των οποίων τη σύνθεση προωθούν, όταν υβριδοποιούνται σε διαφορετικές αλυσίδες ενός DNA εκμαγείου (template). Αυτή η μέθοδος συνίσταται από επαναλαμβανόμενους κύκλους αποδιάταξης, υβριδοποίησης, και επιμήκυνσης με τη βοήθεια της πολυμεράσης. Αυτή η διαδικασία καταλύει σε κάθε κύκλο τον διπλασιασμό της ποσότητας του DNA θραύσματος το οποίο είναι ορισμένο από τις θέσεις των 5' άκρων των δύο εκκινητών πάνω στο DNA εκμαγείο.

Το αρχικό DNA εκμαγείο μπορεί να είναι μια πολύ μικρή ποσότητα της αλληλουχίας που θέλουμε να συνθέσουμε (σε καθαρή μορφή ή σαν διακριτό μόριο), ή μπορεί να πρόκειται για την ίδια αλληλουχία η οποία υπάρχει σαν ένθετο σε ένα μεγαλύτερο μόριο. Μπορεί να είναι μονόκλωνο DNA μόριο ή, με μια μικρή τροποποίηση στην τεχνική, μόριο RNA. Σε κάθε περίπτωση, το προϊόν της αντίδρασης θα είναι ένα διακριτό δίκλωνο μόριο DNA με τα άκρα του να αντιστοιχούν στα 5' άκρα των ολιγονουκλεοτιδίων που έχουν εκάστοτε χρησιμοποιηθεί. (Mullis *et al.*, 1986).

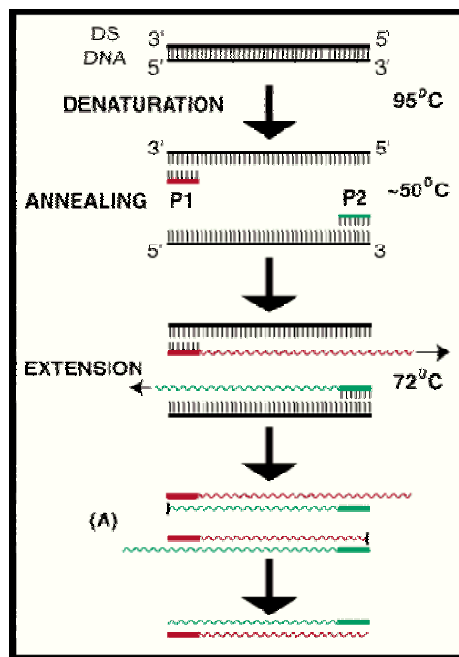
Ο αριθμός των αλληλουχιών DNA, με τα δύο τους άκρα ορισμένα από τους εκκινητές, αυξάνεται εκθετικά κατά τη διάρκεια των επακόλουθων κύκλων. Όλα τα υπόλοιπα προϊόντα της αντίδρασης αυξάνονται με γραμμικό τρόπο. Επομένως, η αντίδραση επιτυχώς ενισχύει μόνο την αλληλουχία DNA που έχει στοχευθεί από το ζεύγος των εκκινητών (Mullis *et al.*, 1986).

Σύμφωνα με την αρχή της μεθόδου, περίσσεια ολιγονουκλεοτιδίων προστίθεται στο αποδιαταγμένο DNA σε θερμοκρασία 50-60 °C. Οι εξειδικευμένοι εκκινητές υβριδοποιούνται στις σωστές θέσεις πάνω στο αποδιαταγμένο DNA, λειτουργώντας έτσι σαν πρωταρχικά τμήματα για τη σύνθεση του DNA, η οποία ξεκινά με την προσθήκη δεοξυνουκλεοτιδίων και μιας DNA πολυμεράσης, η οποία είναι ανθεκτική στις υψηλές θερμοκρασίες (*Taq polymerase*). Η πολυμεράση επιμηκώνει τα πρωταρχικά τμήματα σε θερμοκρασία μέχρι 72 °C. Στη συνέχεια όλο το μείγμα θερμαίνεται στους 95 °C ώστε να αποδιαταχθούν τα δίκλινα μόρια που έχουν

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

μόλις συντεθεί. Όταν χαμηλώσουμε τη θερμοκρασία, έχουμε ένα νέο κύκλο σύνθεσης, εφόσον τα ολιγονουκλεοτίδια βρίσκονται σε περίσσεια. Αυτός ο κύκλος σύνθεσης και αποδιάταξης μπορεί να επαναληφθεί όσες φορές θέλουμε ώστε να συνθέσουμε μεγάλες ποσότητες της αλληλουχίας – στόχου. Σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται ο αριθμός αντιγράφων της αλληλουχίας – στόχου, η οποία ορίζεται από τις θέσεις υβριδοποίησης των δύο ολιγονουκλεοτιδίων, με αποτέλεσμα η αλληλουχία που μας ενδιαφέρει να πολλαπλασιάζεται εκθετικά (Λεκανίδου κ.α., 2004).

Στην πραγματικότητα η αντίδραση δεν χρειάζεται τίποτα παραπάνω από ένα δοκιμαστικό σωλήνα, μερικά αντιδραστήρια, και μια πηγή θερμότητας (Mullis, 1990), επιτρέποντας την ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανού κυττάρου.



Εικόνα 6.1 Τα στάδια της PCR.

### Απαραίτητα συστατικά της PCR

Μια PCR χρειάζεται έξι απαραίτητα συστατικά:

- I. Μια DNA πολυμεράση ανθεκτική στις υψηλές θερμοκρασίες για την κατάλυση της σύνθεσης του DNA. Χρησιμοποιείται ευρέως η *Taq* πολυμεράση η οποία έχει απομονωθεί από το βακτήριο θερμών πηγών *Thermus aquaticus*.



## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

- II. Ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (primers) για την εκκίνηση της σύνθεσης του DNA.
- III. Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοσίδια (dNTPs). Προσθήκη ισομοριακών ποσοτήτων από dATP, dTTP, dCTP, dGTP σε περίσσεια.
- IV. Δισθενή κατιόντα. Όλες οι ανθεκτικές σε υψηλή θερμοκρασία πολυμεράσες απαιτούν δισθενή κατιόντα για τη δράση τους. Συνήθως χρησιμοποιούνται ιόντα  $Mg^{2+}$ . Τα ιόντα  $Mg^{2+}$  σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs και το εκμαγείο DNA, προς παραγωγή του πραγματικού υποστρώματος που αναγνωρίζει η πολυμεράση.
- V. Διάλυμα για τη ρύθμιση του pH. Η διατήρηση του pH μεταξύ 8.3 – 9.0 δίνει συνήθως τα βέλτιστα αποτελέσματα σε μία αντίδραση PCR.
- VI. Εκμαγείο DNA, το οποίο περιέχει τις αλληλουχίες – στόχους, προστίθεται στην αντίδραση PCR σε μονόκλωνη ή δίκλωνη μορφή. Όταν η PCR λειτουργεί σε ιδανικές συνθήκες χρειάζεται μόνο ένα αντίγραφο της αλληλουχίας – στόχου σαν εκμαγείο (Sambrook *et al.*, 1989).

### Πειραματικές συνθήκες

Με τη χρήση της PCR ενισχύθηκαν δύο περιοχές του ολικού γενετικού υλικού των υπό μελέτη στελεχών, με τη χρήση συγκεκριμένων ολιγονουκλεοτιδίων – εκκινήτων. Η μία περιοχή αφορά στο γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση του 16S rRNA και η άλλη στο γονίδιο *nifH*. Για τη μελέτη του *nifH* γονιδίου πραγματοποιήθηκε ενίσχυση τμήματος ~330 βάσεων, ενώ για τη μελέτη του γονιδίου που κωδικοποιεί για το 16S rRNA πραγματοποιήθηκε ενίσχυση τμήματος ~1450 βάσεων (97% του συνολικού 16S rRNA γονιδίου).

Οι αλληλουχίες των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον **Πίν. 6.2**:

**Πίνακας 6.2** Αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για ενίσχυση τμήματος 16S rRNA και *nifH*.

		Όνομα	Αλληλουχία (5' – 3')
<b>16S rRNA</b>	Forward	fD1	5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3
	Reverse	rD1	5'- CAAGTCGTA AAAAGGTAGCCGT -3'
<b>nifH</b>	Forward	PolF	5'- TGCGAYCCSAARGCBGACTC -3'
	Reverse	PolR:	5'- ATSGCCATCATYTTCRCCGGA -3'

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Όπου κατά IUPAC ισχύει (ambiguity codes):

Mixed Bases	Electronic Ordering Code
A+C+G	V
A+T+G	D
T+C+G	B
A+T+C	H
A+T	W
C+G	S
T+G	K
A+C	M
C+T	Y
A+G	R
A+G+C+T	N

Οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για τα δύο αυτά γονίδια φαίνονται στον **Πίν. 6.3**:

**Πίνακας 6.3** Συνθήκες πραγματοποίησης PCR για ενίσχυση τμήματος 16S rRNA και *nifH*.

Στάδιο	Γονίδιο 16S rRNA	Γονίδιο <i>nifH</i>	
Αρχική αποδιάταξη (initial denaturation)	94 °C για 4 min	94 °C για 3 min	
Αποδιάταξη (denaturation)	94 °C για 1 min	94 °C για 1 min	34 κύκλοι
Υβριδισμός εκκινητών* (annealing)	48 °C για 1 min	55 °C για 1 min	
Επιμήκυνση (extention)	72 °C για 1:30 min	72 °C για 1:30 min	
Τελική επιμήκυνση (final extention)	72 °C για 10 min	72 °C για 10 min	
Διατήρηση (hold)	4 °C	4 °C	

\* Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται κάθε φορά από τη θερμοκρασία τήξεως τους ( $T_m$ ).

Ο υπολογισμός της θερμοκρασίας τήξεως γίνεται από τη σχέση:

$$T_m = [2 \text{ }^\circ\text{C} \times (\text{αριθμός βάσεων A και T})] + [4 \text{ }^\circ\text{C} \times (\text{αριθμός βάσεων C και G})]$$

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Η βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών είναι περίπου 5-10 °C χαμηλότερη της  $T_m$ .

Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε εντός ειδικού σωλήνα erpendorf. Τα αντιδραστήρια και η ποσότητα αυτών ανά αντίδραση PCR παρουσιάζονται στον Πίν. 6.4:

**Πίνακας 6.4** Ποσότητες αντιδραστηρίων ανά αντίδραση PCR για ενίσχυση τμήματος 16S rRNA και *nifH*.

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (μl)
Γονιδιωματικό DNA (50-60 ng/αντίδραση)*	1
10x PCR ρυθμιστικό διάλυμα	5
dNTPs (10 mM το καθένα)	1
Εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης (forward) (10 μM)	1
Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης (reverse) (10 μM)	1
DMSO	2
Taq πολυμεράση (2U/μl)	0.5
ddH <sub>2</sub> O (έως τελικό όγκο)*	38.5
<b>Τελικός όγκος</b>	<b>50</b>

Χρησιμοποιήθηκε το kit DyNAzyme™ EXT DNA Polymerase (FINNZYMES).

\*Η ποσότητα του DNA που χρησιμοποιήθηκε προσαρμόστηκε κατάλληλα, με βάση τη συγκέντρωση DNA (σε ng/μl) που προσδιορίστηκε φωτομετρικά με τη χρήση σπεκτροφωτόμετρου (Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer), μετά την απομόνωση του ολικού γονιδιωματικού DNA από κάθε βακτηριακό στέλεχος. Αναλόγως προσαρμόστηκε και ο όγκος του χρησιμοποιούμενου ddH<sub>2</sub>O (βλ. Κεφάλαιο 2, § 6.3).

### 6.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Μετά την PCR ακολούθησε ηλεκτροφόρηση όλου του PCR – προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης. Αυτή η μέθοδος είναι η πιο κοινή για τον διαχωρισμό και την ανάλυση του DNA. Στόχος της ηλεκτροφόρησης είναι η απομόνωση της προς μελέτη ζώνης DNA.

#### Αρχή της μεθόδου

Όταν φορτισμένα μόρια βρεθούν εντός ηλεκτρικού πεδίου, μετακινούνται προς τον αρνητικό ή θετικό πόλο ανάλογα με το φορτίο τους. Τα νουκλεϊκά οξέα (σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες που μπορεί να είναι θετικά ή αρνητικά φορτισμένες), έχουν ένα μόνιμο αρνητικό φορτίο λόγω του

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

φωσφοδιεστερικού δεσμού στο 5' άκρο τους, και επομένως ταξιδεύουν προς την άνοδο. Τα γραμμικά μόρια DNA διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους. Τα μικρά μόρια ταξιδεύουν γρήγορα στο πήκτωμα, ενώ τα μεγαλύτερου μεγέθους μόρια ταξιδεύουν πιο αργά και αναμένεται να είναι ορατά σε ψηλότερο σημείο του πηκτώματος. Το εύρος μεγεθών που μπορεί να διαχωριστούν με αυτή την τεχνική εξαρτάται από τη συγκέντρωση αγαρόζης.

Για όλες τις ηλεκτροφορήσεις χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Για την παρασκευή του ζυγίστηκαν 0.5 g αγαρόζης και διαλύθηκαν σε 50 ml διαλύματος TAE (1%), υπό θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι πλήρους ομογενοποίησής τους. Το διάλυμα αφέθηκε να κρυώσει, και προστέθηκαν 5 ml διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml). Ακολούθησε ανάδευση και το διάλυμα αφέθηκε να στερεοποιηθεί στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, αφού πρώτα προσαρμόστηκε η κατάλληλη «χτένα» ώστε να σχηματιστούν τα βοηθία φόρτωσης. Όταν το πήκτωμα στερεοποιήθηκε φορτώθηκαν τα δείγματα, αφού πρώτα προστέθηκε σε αυτά 2 ml χρωστικής φόρτωσης (loading dye). Δίπλα στα δείγματα φορτώθηκε μικρή ποσότητα μοριακού μάρτυρα για να είναι δυνατή η εύρεση του αριθμού των ζευγών βάσεων που αντιστοιχούν στην επιθυμητή ζώνη. Εφαρμόστηκε τέλος ηλεκτρική τάση (80 – 90 V) στη συσκευή, για την εκκίνηση ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων.

### **6.6 Απομόνωση – ανάκτηση DNA από πήκτωμα αγαρόζης.**

Μετά την ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε ανάκτηση της επιθυμητής ζώνης του κλάσματος DNA με τη χρήση του PCR clean-up Gel Extraction kit (Nucleospin Extract II- Macherey Nagel). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ίδια με αυτή που περιγράφεται στο εγχειρίδιο του kit (Protocol for DNA extraction from agarose gels).

### **6.7 Κλωνοποίηση σε πλασμιδιακούς φορείς**

#### Αρχή της μεθόδου

Το κυκλικό κλειστό πλασμίδιο DNA έχει υποστεί πέψη με ένα ή περισσότερα ένζυμα περιορισμού και συνδέεται τεχνητά in vitro με ένα ξένο DNA το οποίο φέρει συμπληρωματικά άκρα. Τα προϊόντα της αντίδρασης τεχνητής σύνδεσης (ligation) χρησιμοποιούνται για να μετασηματίσουν ένα κατάλληλο στέλεχος *E. coli*. Οι μετασηματισμένες αποικίες υπόκεινται

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

πραιτέρω σε πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού, για ανεύρεση εκείνων που φέρουν τις επιθυμητές DNA αλληλουχίες (Sambrook *et al.*, 1989).

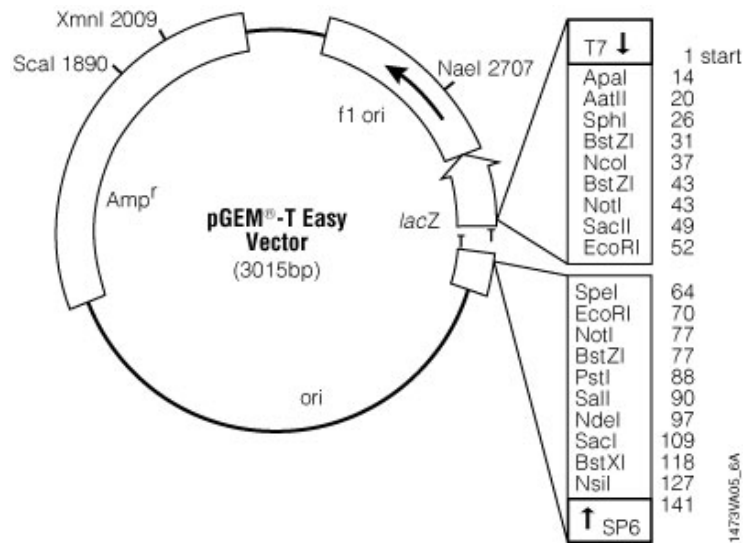
### Χαρακτηριστικά πλασμιδιακού φορέα

Για την κλωνοποίηση των τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pGEM-T Easy (Promega). Ο συγκεκριμένος φορέας είναι ευθυγραμμισμένος και έχει μονόκλιωνα 3' άκρα που φέρουν και τα δύο βάσεις θυμίνης. Αυτό εμποδίζει την επανακυκλοποίηση του πλασμιδίου και βελτιώνει την ενσωμάτωση του ένθετου DNA στον φορέα.

Ο πλασμιδιακός φορέας περιέχει τους T7 και SP6 προαγωγείς της RNA πολυμεράσης, οι οποίοι πλαισιώνουν την πολυκλωνική θέση εντός της κωδικής περιοχής του α-πεπτιδίου του ενζύμου της β-γαλακτοσιδάσης. Απενεργοποίηση του α-πεπτιδίου με ενσωμάτωση του ένθετου DNA επιτρέπει την αναγνώριση των ανασυνδυασμένων κλώνων με βάση το χρώμα των αποικιών (οι λευκές αποικίες φέρουν το επιθυμητό γονίδιο). Επίσης ο φορέας φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, επιτρέποντας έτσι την επιλογή μόνο των ανασυνδυασμένων κλώνων. Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης Pgem-T Easy φαίνεται στην εικόνα 6.2.

Πολλοί πλασμιδιακοί φορείς φέρουν ένα τμήμα του DNA της *E. coli* το οποίο περιέχει τις ρυθμιστικές αλληλουχίες και την κωδική πληροφορία για τα πρώτα 146 αμινοξέα της β-γαλακτοσιδάσης. Εντός της κωδικής περιοχής βρίσκεται μια πολυκλωνική θέση που διατηρεί το πλαίσιο ανάγνωσης και οδηγεί στην παρεμβολή ενός μικρού αριθμού αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο της β-γαλακτοσιδάσης. Αυτά τα πλασμίδια χρησιμοποιούνται σε κύτταρα ξενιστές που εκφράζουν το καρβοξυτελικό τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης. Τα τμήματα που κωδικοποιούνται από τον ξενιστή και από το πλασμίδιο, ενώ μόνα τους δεν είναι ενεργά, συσχετίζονται για το σχηματισμό μιας ενζυμικά ενεργής πρωτεΐνης. Αυτός ο τύπος συμπληρωματικότητας καλείται α – συμπληρωματικότητα. Τα βακτήρια  $lac^+$  που προκύπτουν από την α – συμπληρωματικότητα αναγνωρίζονται εύκολα επειδή σχηματίζουν μπλε αποικίες παρουσία του χρωμογενούς υποστρώματος X-gal. Εντούτοις η εισαγωγή ενός ένθετου DNA εντός της πολυκλωνικής περιοχής του πλασμιδίου, σχεδόν κατά κανόνα οδηγεί στην παραγωγή ενός αμινοτελικού τμήματος το οποίο δεν είναι πλέον ικανό για α – συμπληρωματικότητα. Επομένως βακτήρια που φέρουν ανασυνδυασμένα πλασμίδια σχηματίζουν λευκές αποικίες (Sambrook *et al.*, 1989).

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ



**Εικόνα 6.2** Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης Pgem-T Easy (Promega).

### 6.7.1 Τεχνητή σύνδεση δύο μορίων DNA (Ligation Reaction)

Η αντίδραση ligation πραγματοποιήθηκε εντός σωλήνα erppendorf. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και η ποσότητα αυτών ανά αντίδραση, περιγράφονται στον **Πίν. 6.5**:

**Πίνακας 6.5** Ποσότητες αντιδραστηρίων ανά αντίδραση ligation.

Αντιδραστήρια ligation	Όγκος ανά αντίδραση (μl)
Ένθετο τμήμα DNA (Insert)*	1
Πλασμιδιακός φορέας (Vector)	0,5
Ένζυμο T4 λιγάση (1U/μl)	0,5
2x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης	5
ddH <sub>2</sub> O (έως τελικό όγκο 10 μl)	3
<b>Total</b>	<b>10</b>

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

\*Στην αντίδραση ligation, η αναλογία των μορίων του πλασμιδίου και του ένθετου DNA ρυθμίστηκε στο 1:3 ώστε να εξασφαλιστεί η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη πιθανότητα ενσωμάτωσης του insert στο πλασμίδιο. Ο υπολογισμός των ng του ένθετου DNA που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση έγινε από τον τύπο:

$$\frac{ng \text{ of vector} * kb \text{ size of insert}}{kb \text{ size of vector}} * \frac{insert}{vector} \text{ molar ratio} = ng \text{ of insert}$$

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με παραμονή στους 4 °C overnight (παραμονή όλο το βράδυ).

### 6.7.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* (Transformation)

Ως δεκτικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από το βακτηριακό στέλεχος *E. coli* XL-Blue.

- Προσθήκη 100 μl δεκτικών κυττάρων XL-Blue Competent στα 10 μl της αντίδρασης ligation (εντός eppendorf). Παραμονή στον πάγο για 10 min.
- Τοποθέτηση στους 42 °C για 1' και 10'' (με το θερμικό αυτό σοκ ανοίγουν οι βακτηριακές μεμβράνες και τα πλασμίδια εισέρχονται εντός του κυττάρου).
- Ξανά παραμονή στον πάγο για 1 min.
- Προσθήκη 200 μl LB θρεπτικού. Ήπια ανάδευση.
- Παραμονή σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 50 λεπτά - 1 h.
- Προσθήκη 2 μl IPTG (0.5M) και 50 μl X-gal. (Η β-γαλακτοσιδάση μεταβολίζει την οργανική ένωση X-gal, παράγοντας μια αδρανή μπλε ουσία. Το IPTG είναι επαγωγέας του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη β-γαλακτοσιδάση.)
- Επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλίο με LB θρεπτικό υλικό με αμπικιλίνη, για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων. Παραμονή των τρυβλίων για 15 λεπτά στον πάγο εργασίας. Τοποθέτηση σε επωαστικό θάλαμο στους 37 °C το πολύ για 18 ώρες.

Με αυτή την τεχνική, οι αποικίες που έχουν δεχτεί το πλασμίδιο που φέρει το insert, λόγω διακοπής της συνέχειας του γονιδίου που κωδικοποιεί τη β-γαλακτοσιδάση, δε μεταβολίζουν το X-gal και επομένως εμφανίζονται λευκές πάνω στο τρυβλίο. Αντιθέτως οι αποικίες με τα μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια, παράγουν κανονικά τη β-γαλακτοσιδάση και εμφανίζονται μπλε.

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

### Παρασκευή δεκτικών κυττάρων *E. coli*

- Εμβολιασμός 5 ml LB με λούπα από στοκ γλυκερόλης *E. coli* XL-Blue. Παραμονή overnight στους 37 °C.
- Εμβολιασμός 50 ml LB με 1 ml από την παραπάνω καλλιέργεια. Στους 37 °C για ~2 h ( $OD_{600}=0.7$ ).
- Στον πάγο για 5 min. Μοίρασμα της καλλιέργειας και φυγοκέντρωση στις 4.500 rpm για 15 min στους 4 °C.
- Τοποθέτηση στον πάγο και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 50 ml  $CaCl_2$  80mM.
- Τοποθέτηση στον πάγο για 45 min. Φυγοκέντρωση για 15 min.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 5 ml  $CaCl_2$  80mM.
- Στον πάγο για 45 min. Προσθήκη 15% γλυκερόλης (900 μl glycerol στα 5 ml κυττάρων).
- Μοίρασμα σε σωλήνες erpendorf (100 μl). Παραμονή στον πάγο έως ότου καταστούν λευκά. Φύλαξη στους -80 °C.

### **6.7.3 Επιλογή μοναδικής αποικίας**

Επιλογή μοναδικής λευκής αποικίας (συνήθως επιλέγονται 2 – 4 αποικίες). Οι επιλεγμένες αποικίες εμβολιάζονται σε LB θρεπτικό μέσο παρουσία αμπικιλίνης. Επώαση των αποικιών με ανακίνηση στους 37 °C για το πολύ 18 ώρες.

### **6.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli***

Τελικό βήμα όλης της διαδικασίας υπο-κλωνοποίησης είναι η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA που φέρει το ένθετο γονίδιο. Αυτό γίνεται με δύο τρόπους. Ο πρώτος τρόπος ακολουθείται κυρίως για επιβεβαίωση της ενσωμάτωσης του insert στο πλασμίδιο, ο δεύτερος ακολουθείται για την απομόνωση του πλασμιδίου και τον καθαρισμό αυτού, προκειμένου δείγμα αυτού να σταλεί προς αλληλούχιση, για εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του προς μελέτη γονιδίου.



## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

### 6.8.1 Μέθοδος βρασμού (*Boiling Preparation*), (*Holmes & Quigley, 1981*)

- Σε eppendorf φυγοκεντρήθηκαν στις 13.000 rpm για 3 min, 1400 µl από την καλλιέργεια που έφερε την αποικία με τα μετασχηματισμένα βακτήρια. Απομάκρυνση όσο το δυνατόν μεγαλύτερης ποσότητας του υπερκειμένου.
- Επαναδιάλυση της pellet των κυττάρων σε 150 µl διαλύματος STET, παρουσία 2 µl λυσοζύμης (25 mg/ml). Ανακίνηση για πλήρη διαλυτοποίηση της pellet.
- Βρασμός του δείγματος για 45'.
- Φυγοκέντρηση για 20 min στις 13.000 rpm.
- Απομάκρυνση του σχηματισθέντος ιζήματος με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα (σε αυτή τη φάση η λυσοζύμη έχει διασπάσει τις κυτταρικές μεμβράνες, το απορρυπαντικό έχει κατακρημνίσει τις πρωτεΐνες, ο βρασμός έχει προκαλέσει κροκκίδωση των πρωτεϊνών, και με τη φυγοκέντρηση κατακρημνίζονται οι κροκκιδωμένες πρωτεΐνες, με τις αποδιαταγμένες μεμβράνες και το DNA προσκολλημένο πάνω σε αυτές – το πλασμιδιακό DNA που μας ενδιαφέρει έχει παραμείνει στο υπερκείμενο).
- Προσθήκη 180 µl ισοπροπανόλης. Ήπια ανακίνηση για ανάμιξη των δύο φάσεων που σχηματίζονται.
- Κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA με φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 min.
- Καλή απομάκρυνση του υπερκειμένου και στέγνωμα των eppendorf.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος με 20 µl διαλύματος TE.

Ακολουθεί πέψη με ενδονουκλεάση περιορισμού (*EcoRI*). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και η ποσότητα αυτών ανά αντίδραση περιγράφονται στον **Πίν. 6.6**.

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

**Πίνακας 6.6** Ποσότητες αντιδραστηρίων ανά αντίδραση πέψης με ενδονουκλεάση περιορισμού.

Αντιδραστήρια πέψης	Όγκος ανά αντίδραση (μl)
Πλασμιδιακό DNA	3
EcoRI enzyme	0,5
10x buffer	2
RNase	0,2
ddH <sub>2</sub> O (έως τελικό όγκο 20 μl)	14,3
<b>Total</b>	<b>20</b>

Επώαση στους 37 °C για 1:30 h.

Ηλεκτροφόρηση όλου του προϊόντος πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης (1%), και επιλογή των αποικιών που έδωσαν την καλύτερη εικόνα μετά την πέψη.

### 6.8.2 *QIAPrep Miniprep*

Χρησιμοποιήθηκε το Plasmid DNA Purification kit (Qiagen), Protocols for plasmid DNA preparation.

Ακολουθεί πέψη με ενδονουκλεάση περιορισμού (EcoRI).

**Πίνακας 6.7** Ποσότητες αντιδραστηρίων ανά αντίδραση πέψης με ενδονουκλεάση περιορισμού.

Αντιδραστήρια πέψης	Όγκος ανά αντίδραση (μl)
Πλασμιδιακό DNA	2,5
EcoRI enzyme	0,5
10x buffer	2
ddH <sub>2</sub> O (έως τελικό όγκο 20 μl)	15
<b>Total</b>	<b>20</b>

Επώαση στους 37 °C για 1:30 h.

Ηλεκτροφόρηση όλου του προϊόντος πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης (1%) για επιβεβαίωση της πέψης. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του πλασμιδιακού DNA με φωτομέτρηση στο σπεκτροφωτόμετρο. Στέγνωμα 1000 ng πλασμιδιακού DNA για χρήση στις επακόλουθες αντιδράσεις αλληλούχισης.

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

### **6.9 Ανάλυση αλληλουχιών & Φυλογενετική ανάλυση**

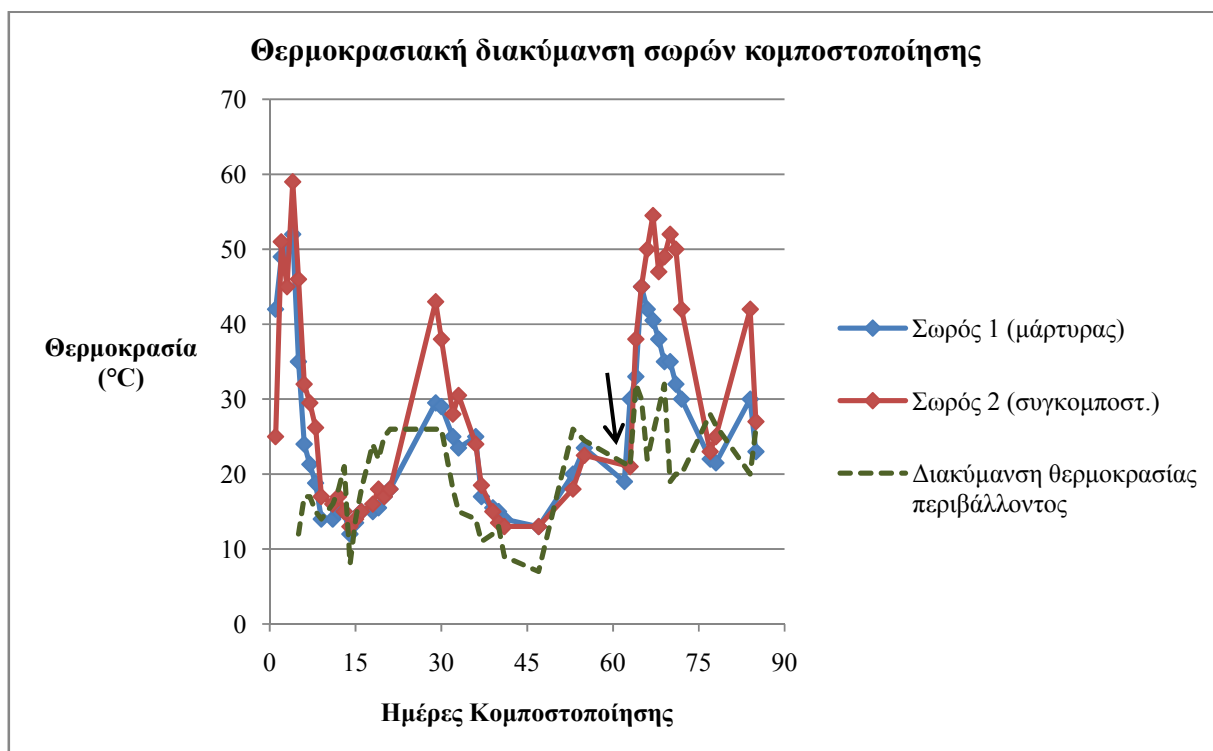
Τα δείγματα εστάλησαν σε αναλυτικό εργαστήριο για ανάγνωση των αλληλουχιών (*sequencing*). Ο προσδιορισμός των αλληλουχιών έγινε με σύγκριση αυτών με ήδη καταχωρημένες αλληλουχίες της GenBank, με χρήση του αλγόριθμου BLAST, μέσω της βάσης δεδομένων NCBI. Οι ακολουθίες ευθυγραμμίστηκαν με χρήση του αλγόριθμου ClustalW μέσω του προγράμματος Mega 5.0. Το φυλογενετικό δένδρο πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Neighbor Joining (Saitou & Nei, 1987). Τα προγράμματα αυτά καθώς και οι βάσεις δεδομένων θα επεξηγηθούν αναλυτικά στο *Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα*.



## Κεφάλαιο 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1. Φυσικοχημικές Παράμετροι

#### 1.1 Θερμοκρασία



**Διάγραμμα 1.1** Διακύμανση της θερμοκρασίας στους δύο σωρούς συναρτήσει του χρόνου. Με βέλος σημειώνεται η ημέρα γυρίσματος και διαβροχής.

Η θερμοκρασία μετρήθηκε σε καθημερινή βάση. Η 1<sup>η</sup> θερμοφιλική φάση ήταν ίδιας διάρκειας και για τους δύο σωρούς (4 ημέρες). Η 2<sup>η</sup> θερμοφιλική φάση διήρκησε περισσότερο στο σωρό 2 (7 ημέρες), σε σχέση με το σωρό 1 (3 ημέρες). Τα ΥΑΕ αποτελούν ένα αρκετά πλούσιο σε οργανικές ουσίες υπόστρωμα. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την πιθανή βιοαποικοδόμηση των αντιμικροβιακών ουσιών των ΥΑΕ αιτιολογούν την παρατεταμένη 2<sup>η</sup> θερμοφιλική φάση στο σωρό 2.

Η μέγιστη θερμοκρασία και για τους δύο σωρούς πραγματοποιήθηκε την 4<sup>η</sup> ημέρα της κομποστοποίησης (1<sup>η</sup> θερμοφιλική φάση) και ήταν 52 και 59° C για το σωρό 1 και 2 αντίστοιχα. Η

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ελάχιστη θερμοκρασία για το σωρό 1 πραγματοποιήθηκε τη 14<sup>η</sup> ημέρα (2<sup>η</sup> μεσόφιλη φάση) και ήταν 12° C, ενώ για το σωρό 2 την 41<sup>η</sup> και 47<sup>η</sup> ημέρα (2<sup>η</sup> μεσόφιλη) και ήταν 13 °C.

Σχεδόν σε όλη τη διάρκεια της κομποστοποίησης ο σωρός 2 ανέπτυξε υψηλότερες θερμοκρασίες σε σχέση με το σωρό 1.

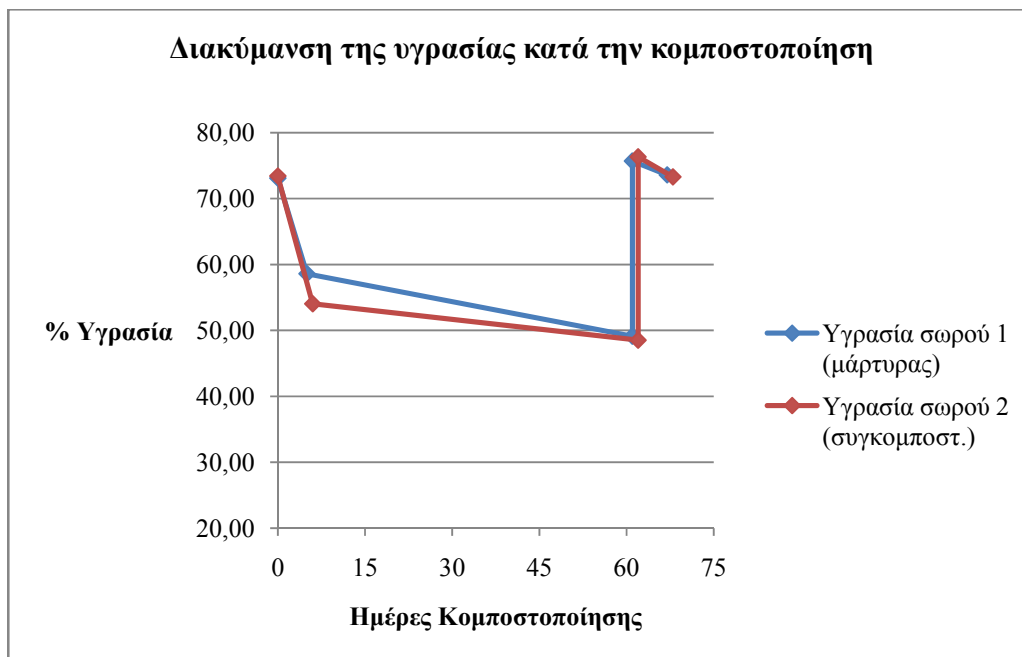
Αξιοσημείωτη είναι η αύξηση θερμοκρασίας που παρατηρήθηκε στο σωρό 2 κατά τη διάρκεια της 2<sup>ης</sup> μεσόφιλης φάσης. Το φαινόμενο μπορεί να αποδοθεί στην αποικοδόμηση των αντιμικροβιακών ουσιών των ΥΑΕ, γεγονός που έδωσε τη δυνατότητα στους μικροοργανισμούς να δραστηριοποιηθούν. Στον Πίν. 1.1 παρουσιάζεται η χρονική διάρκεια των σταδίων κομποστοποίησης στους δύο σωρούς.

**Πίνακας 1.1** Διάρκεια των φάσεων κομποστοποίησης στους δύο σωρούς, σε ημέρες.

Φάσεις Κομποστοποίησης	Διάρκεια φάσεων κομποστοποίησης (ημέρες)	
	Σωρός 1	Σωρός 2
Αρχική Μεσόφιλη	0 (εγκατάσταση)	0 – 1 <sup>η</sup>
1 <sup>η</sup> Θερμόφιλη	1 <sup>η</sup> – 4 <sup>η</sup>	2 <sup>η</sup> – 5 <sup>η</sup>
2 <sup>η</sup> Μεσόφιλη	5 <sup>η</sup> – 64 <sup>η</sup>	6 <sup>η</sup> – 64 <sup>η</sup> (θερμοκρασιακό μέγιστο 43 °C την 29 <sup>η</sup> ημέρα)
2 <sup>η</sup> Θερμόφιλη	65 <sup>η</sup> – 67 <sup>η</sup>	65 <sup>η</sup> – 71 <sup>η</sup>
3 <sup>η</sup> Μεσόφιλη - Ωρίμανση	Μετά την 68 <sup>η</sup>	Μετά την 72 <sup>η</sup>

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 1.2 Υγρασία



**Διάγραμμα 1.2** Διακύμανση του ποσοστού υγρασίας (%) στους δύο σωρούς συναρτήσει του χρόνου. Με βέλος σημειώνεται η ημέρα γυρίσματος και διαβροχής.

Ίδια ποσοστά υγρασίας εμφανίζουν και οι δύο σωροί την ημέρα εγκατάστασής τους.

Η διακύμανση της υγρασίας μετά το τέλος της 1<sup>ης</sup> θερμοφιλης φάσης και στους δύο σωρούς μειώνεται, λόγω εξάτμισης, και παραμένει σχεδόν σταθερή έως την ημέρα της διαβροχής (61<sup>η</sup>, 62<sup>η</sup> ημέρα).

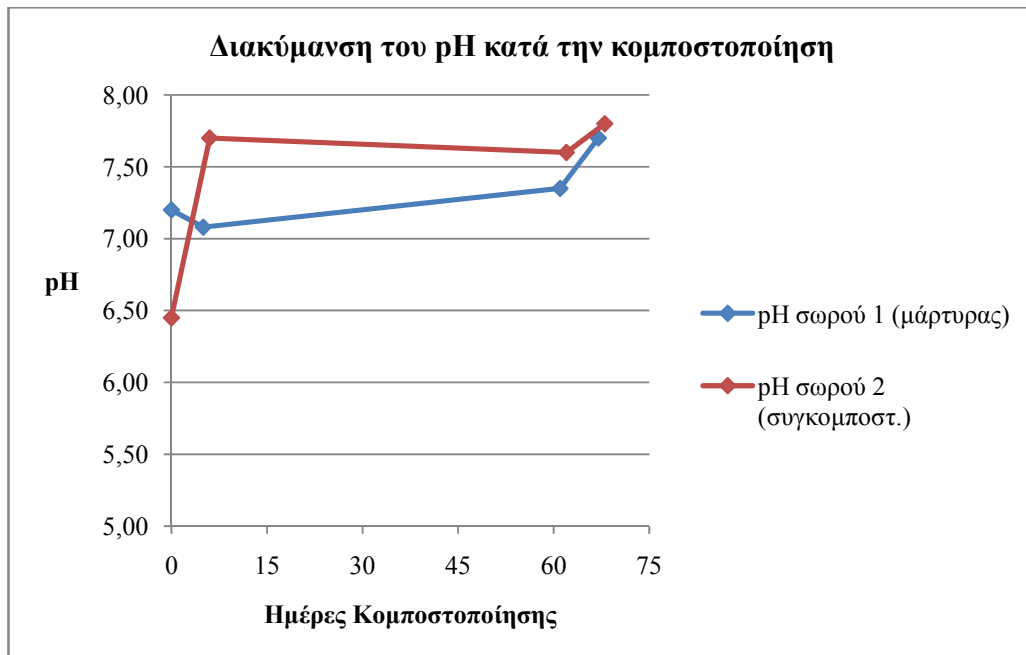
Τα δείγματα του σωρού 1 την ημέρα του γυρίσματος, πριν τη διαβροχή, είχαν υγρασία 49.13%, ενώ μετά τη διαβροχή 75.70%.

Τα δείγματα του σωρού 2 την ημέρα του γυρίσματος, πριν τη διαβροχή, είχαν υγρασία 48.53%, ενώ μετά τη διαβροχή 76.34%.

Μετά τη 2<sup>η</sup> θερμοφιλη φάση η πορεία της υγρασίας ακολουθεί ανάλογη πτωτική τάση.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 1.3 Οξύτητα (pH)



**Διάγραμμα 1.3** Διακύμανση της οξύτητας στους δύο σωρούς συναρτήσει του χρόνου. Με βέλος σημειώνεται η ημέρα γυρίσματος και διαβροχής.

Στο διάγραμμα 1.3 φαίνεται ότι το pH του σωρού 1 είναι αλκαλικό σε όλη την διάρκεια της κομποστοποίησης. Δεν παρατηρείται μεγάλη διακύμανση ως τη 2<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση. Μετά τη 2<sup>η</sup> θερμοφιλή παρατηρείται τάση αύξησης του pH.

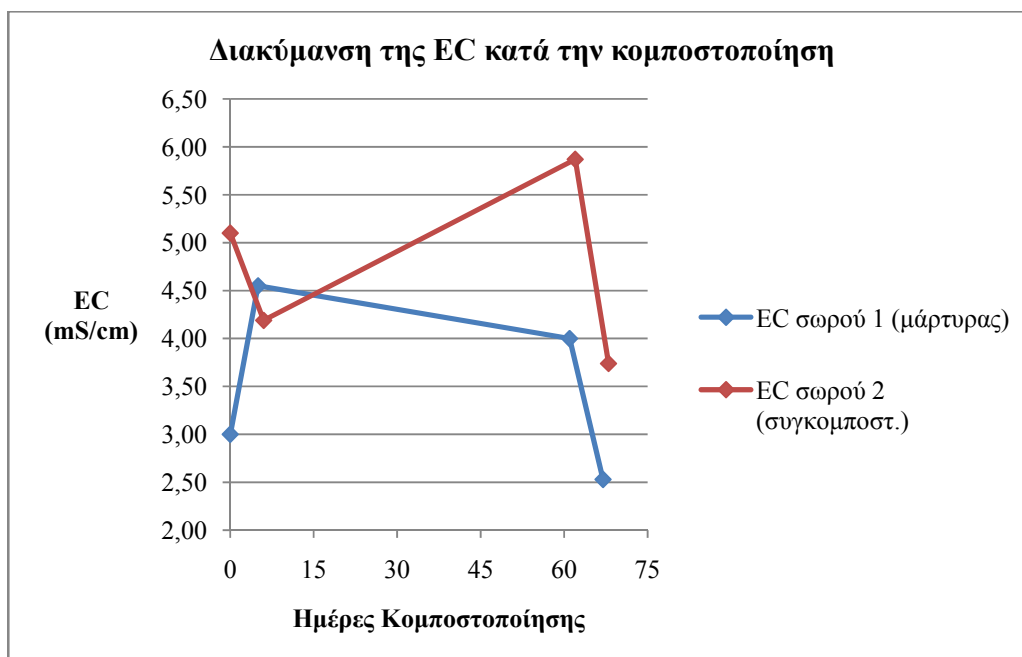
Ο σωρός 2 ξεκινά με όξινο pH (6.45), λόγω του όξινου χαρακτήρα των ΥΑΕ (pH ~5.5). Στη συνέχεια, το pH γίνεται αλκαλικό, και διατηρείται σχεδόν σταθερό.

Οι παρατηρηθείσες μεταβολές του pH είναι αναμενόμενες. Σε ένα τυπικό σωρό κομποστοποίησης οι τιμές του pH στην εκκίνηση της διαδικασίας είναι χαμηλές, λόγω παρουσίας των οργανικών οξέων, ενώ στη συνέχεια οι μικροοργανισμοί αποικοδομούν τις πρωτεΐνες και τα πεπτίδια, με παράλληλη απελευθέρωση αμμωνίας και αύξηση του pH.



### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 1.4 Ηλεκτρική αγωγιμότητα (EC)



**Διάγραμμα 1.4** Διακύμανση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στους δύο σωρούς συναρτήσει του χρόνου. Με βέλος σημειώνεται η ημέρα γυρίσματος και διαβροχής.

Η ηλεκτρική αγωγιμότητα διαλύματος είναι μια μαθηματική έκφραση της ικανότητας ενός υδατικού διαλύματος να άγει το ηλεκτρικό ρεύμα. Η μονάδα μέτρησής της είναι  $\text{Sm}^{-1}$  (Siemens/m).

Η EC του σωρού 1 ακολουθεί μια αυξητική τάση από την εγκατάσταση του σωρού ως την 1<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση και στη συνέχεια διατηρείται σχεδόν σταθερή ως την ημέρα διαβροχής. Στη 2<sup>η</sup> θερμοφιλή παρατηρείται μικρή τάση μείωσης της EC.

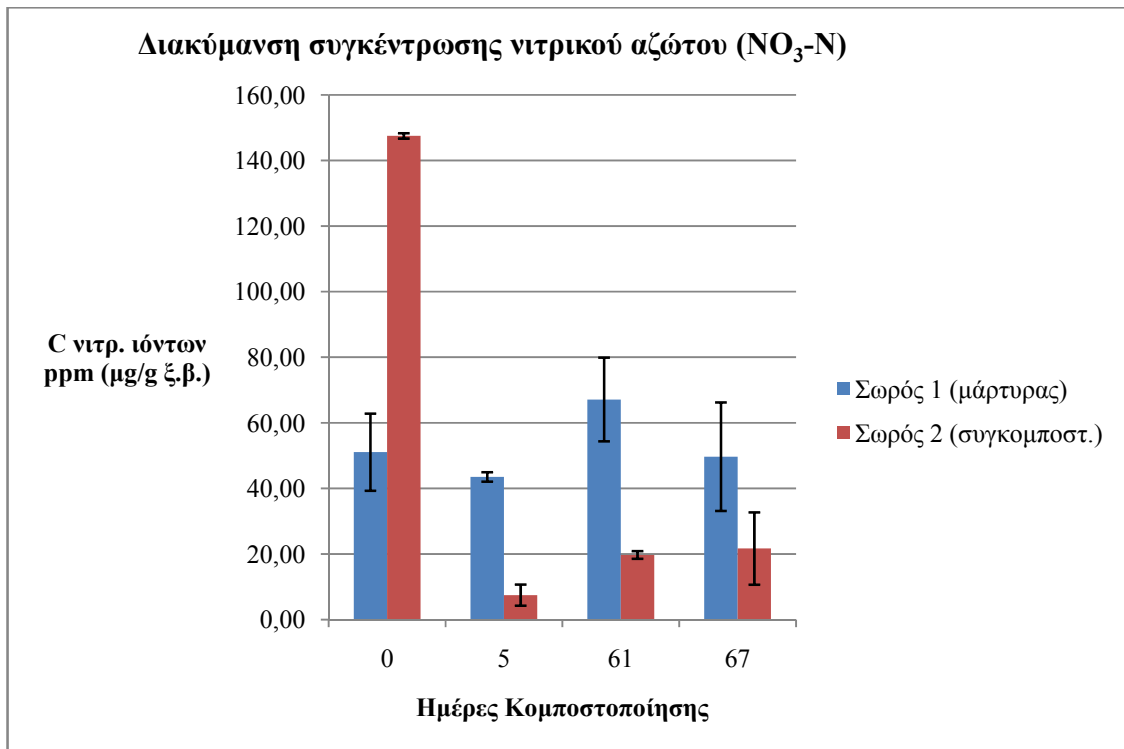
*Εύρος EC σωρού 1: 2.53 - 4.55 mS/cm.*

Η EC του σωρού 2 παρουσιάζει μικρή πτωτική τάση από τη στιγμή εγκατάστασης ως την 1<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση και εμφανίζει μέγιστο στη 2<sup>η</sup> μεσόφιλη φάση (πριν τη διαβροχή). Στη 2<sup>η</sup> θερμοφιλή παρατηρείται τάση μείωσης της EC. Οι τιμές της EC είναι μεγαλύτερες στο σωρό 2, λόγω προσθήκης των ΥΑΕ τα οποία παρέχουν στο σωρό διαλυτά άλατα.

*Εύρος EC σωρού 2: 3.74 - 5.87 mS/cm.*

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 1.5 Το νιτρικό άζωτο ( $\text{NO}_3^- - \text{N}$ )



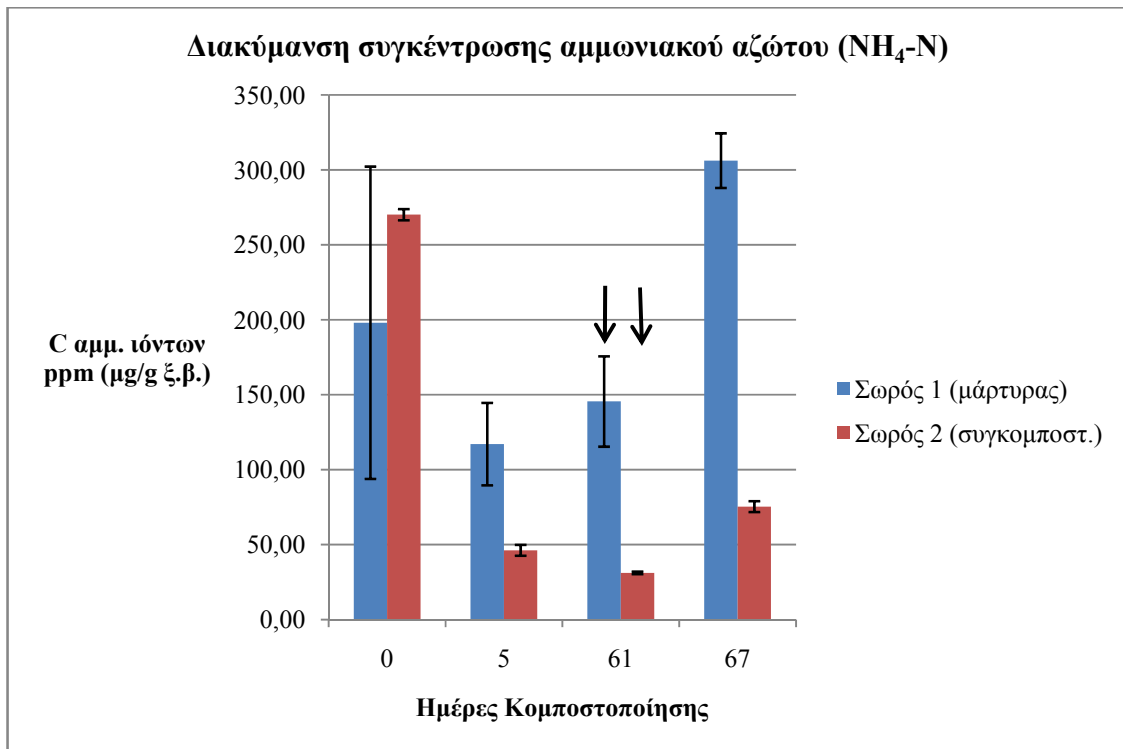
**Διάγραμμα 1.5** Η διακύμανση της συγκέντρωσης του νιτρικού αζώτου συναρτήσει του χρόνου. Με βέλος σημειώνεται η ημέρα γυρίσματος και διαβροχής.

Στο σωρό 1 το νιτρικό άζωτο διατηρείται σχεδόν σταθερό έως και την 1<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση. Στη 2<sup>η</sup> μεσόφιλη φάση ελαφρώς αυξάνεται. Μικρή πτωτική τάση παρατηρείται στη 2<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση.

Στο σωρό 2 το νιτρικό άζωτο παρουσιάζει μεγάλη πτωτική τάση από την ημέρα εγκατάστασης ως την 1<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση. Στη συνέχεια διατηρείται σχεδόν σταθερό ως και τη 2<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 1.6 Το αμμωνιακό άζωτο ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ )



**Διάγραμμα 1.6** Η διακύμανση της συγκέντρωσης του αμμωνιακού αζώτου συναρτήσει του χρόνου. Με βέλος σημειώνεται η ημέρα γυρίσματος και διαβροχής.

Στο σωρό 1 η συγκέντρωση του αμμωνιακού αζώτου παρουσιάζει πτωτική τάση ως την 1<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση. Στη συνέχεια, παρουσιάζει αυξητική τάση ως και τη 2<sup>η</sup> θερμοφιλή, υποδεικνύοντας ότι η διαδικασία της κομποστοποίησης δεν έχει ολοκληρωθεί.

Στο σωρό 2 η συγκέντρωση του αμμωνιακού αζώτου παρουσιάζει πτωτική τάση ως την 1<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση. Από την 1<sup>η</sup> θερμοφιλή και μετά διατηρείται σε σχεδόν σταθερά επίπεδα.

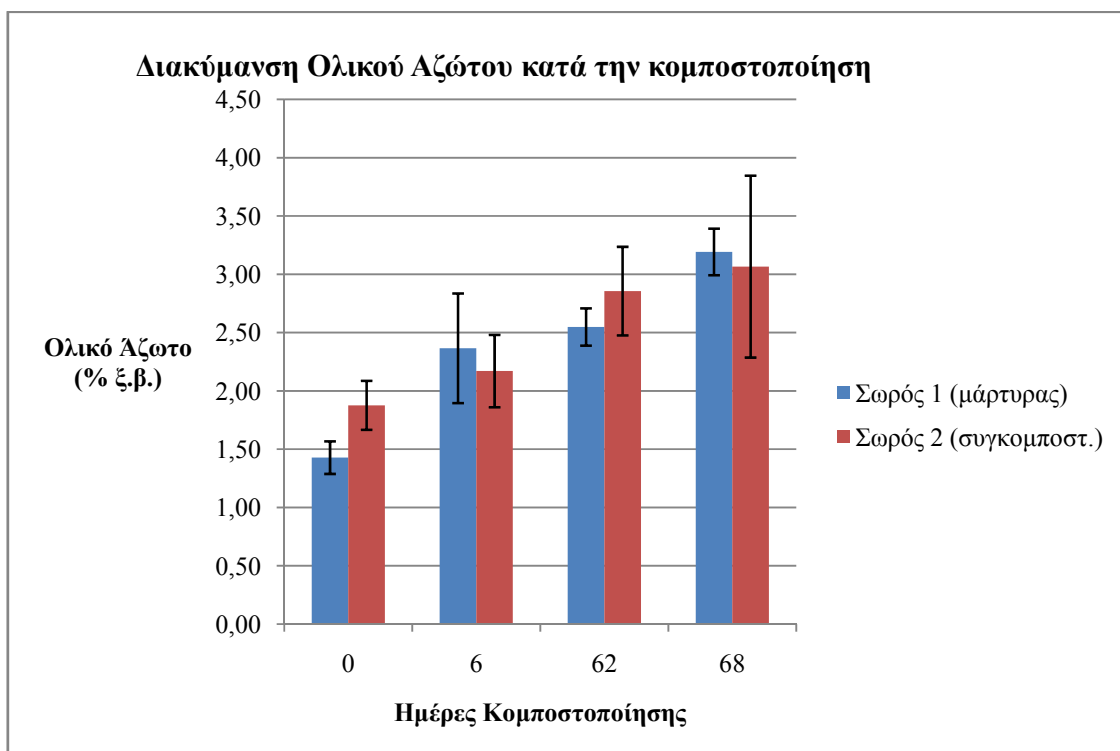
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 1.7 Ολικό Άζωτο

Το ολικό άζωτο και στους δύο σωρούς αυξάνεται σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας κομποστοποίησης.

Εύρος %N σωρού 1: 1.43 – 3.19

Εύρος %N σωρού 2: 1.88 – 3.07

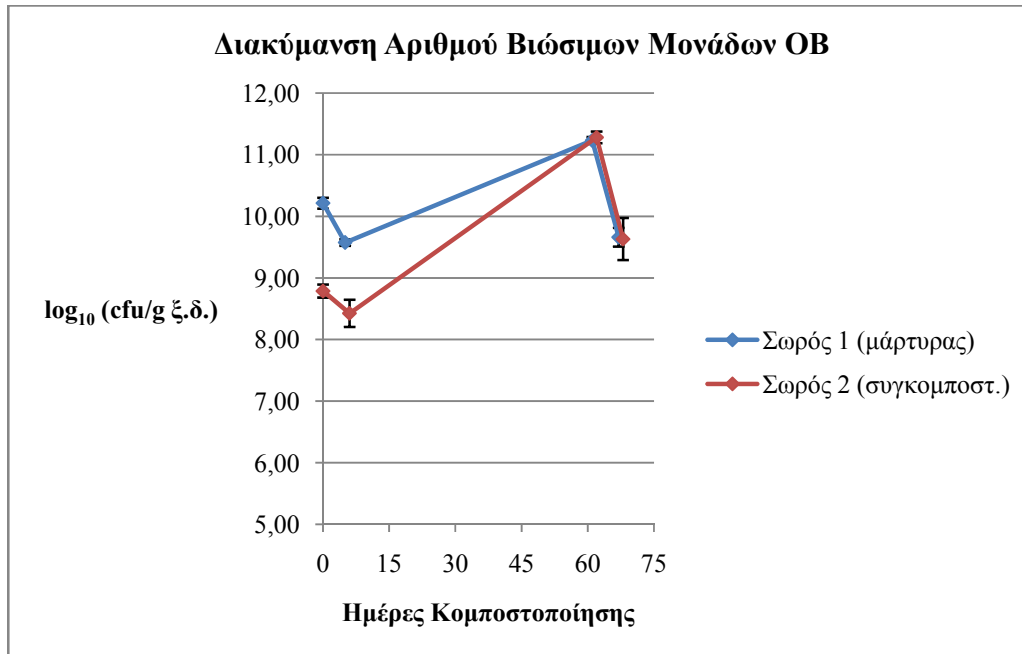


**Διάγραμμα 1.7** Η διακύμανση του ολικού αζώτου (%) συναρτήσει του χρόνου. Με βέλος σημειώνεται η ημέρα γυρίσματος και διαβροχής.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 2. Μικροβιολογικές αναλύσεις με χρήση κλασικών μεθόδων

##### 2.1 Ολικά βακτήρια



**Διάγραμμα 2.1** Διακύμανση του ABM των ολικών βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου. Με βέλος σημειώνεται η ημέρα γυρίσματος και διαβροχής.

Στο σωρό 1 ο ABM των ολικών βακτηρίων παρουσιάζει μικρή μείωση από την αρχική μεσόφιλη ως την 1<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση, η οποία είναι αναμενόμενη λόγω της δυσμενούς επίδρασης της υψηλής θερμοκρασίας, της μείωσης των μεσόφιλων μικροοργανισμών, και της σταδιακής αντικατάστασης αυτών από θερμοφίλους μικροοργανισμούς. Η ίδια εικόνα παρατηρείται και κατά τη μετάβαση από τη 2<sup>η</sup> μεσόφιλη στη 2<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση.

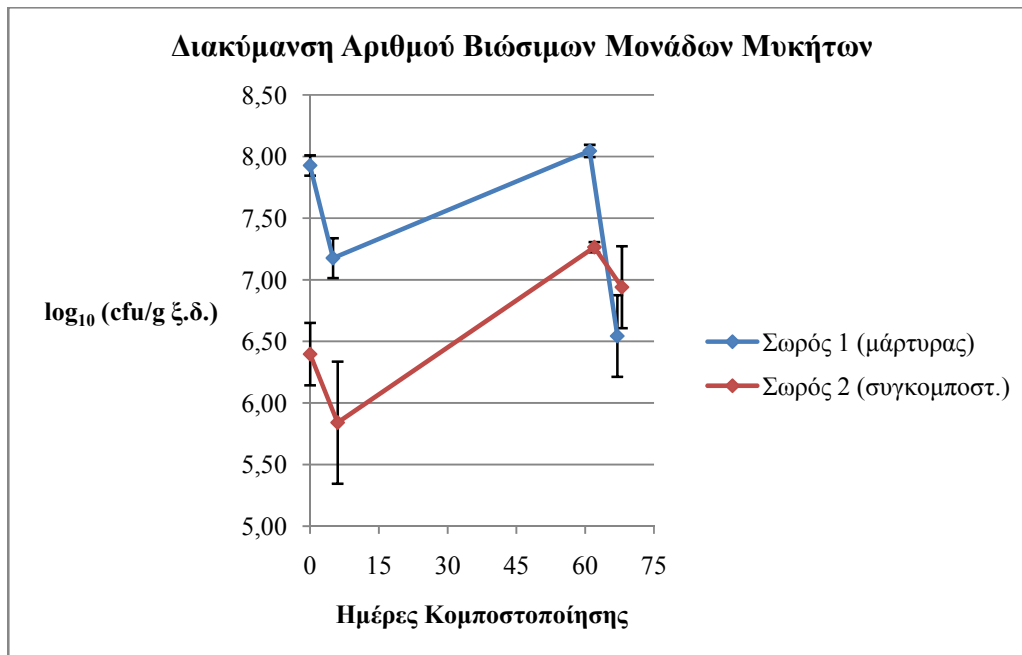
*Εύρος πληθυσμού ΟΒ σωρού 1:*  $3.76 \times 10^9 - 1.71 \times 10^{11}$  cfu/g ξ.δ.

Τα πληθυσμιακά επίπεδα των ολικών βακτηρίων στο σωρό 2 από την ημέρα εγκατάστασης ως και τη 2<sup>η</sup> μεσόφιλη φάση είναι χαμηλότερα, σε σχέση με το σωρό 1, πιθανόν λόγω αντιμικροβιακής δράσης των ΥΑΕ. Εντούτοις το πρότυπο μεταβολής του ABM των ολικών βακτηρίων στις φάσεις της κομποστοποίησης, είναι παρόμοιο στους δύο σωρούς.

*Εύρος πληθυσμού ΟΒ σωρού 2:*  $2.68 \times 10^8 - 1.91 \times 10^{11}$  cfu/g ξ.δ.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 2.2 Μύκητες



**Διάγραμμα 2.2** Διακύμανση του ABM των μυκήτων συναρτήσει του χρόνου. Με βέλος σημειώνεται η ημέρα γυρίσματος και διαβροχής.

Στο σωρό 1 ο ABM των μυκήτων μειώνεται στην 1<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση. Οι μύκητες είναι μεσόφιλοι οργανισμοί, οπότε η μείωση είναι αναμενόμενη, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που επικρατούν στο συγκεκριμένο στάδιο κομποστοποίησης. Η ίδια εικόνα παρατηρείται και κατά τη μετάβαση από τη 2<sup>η</sup> μεσόφιλη στη 2<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση.

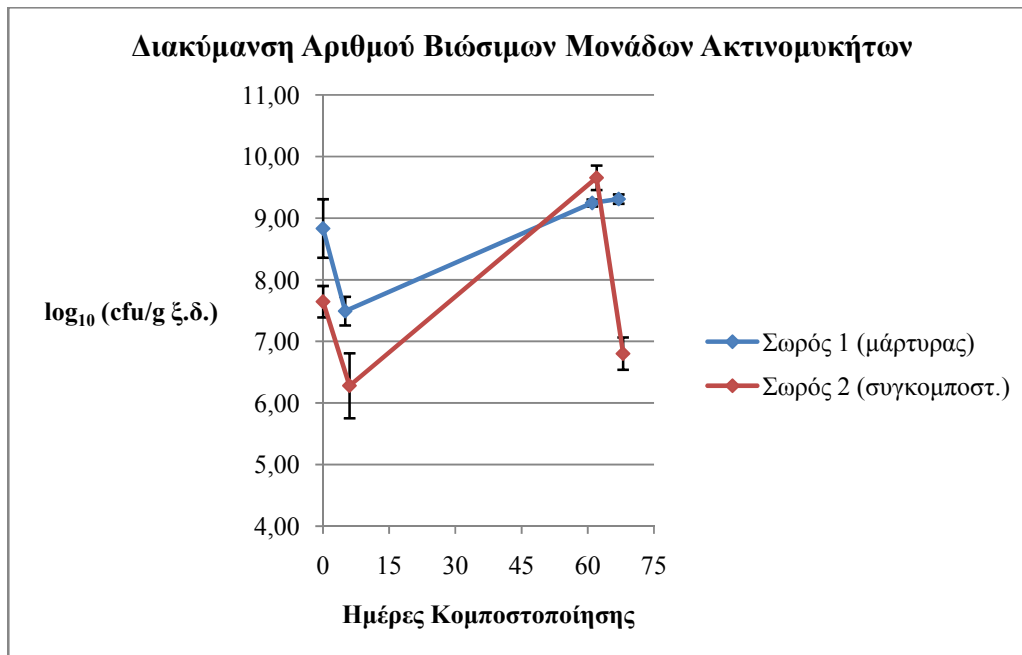
Στο σωρό 2 επίσης παρατηρείται πληθυσμιακή αύξηση στις μεσόφιλες φάσεις η οποία ακολουθείται από μείωση στις θερμοφίλες. Στη 2<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση ο ABM των μυκήτων του σωρού 1 είναι χαμηλότερος σε σχέση με το σωρό 2.

*Εύρος πληθυσμού μυκήτων σωρού 1:*  $3.50 \times 10^6 - 1.11 \times 10^8$  cfu/g ξ.δ.

*Εύρος πληθυσμού μυκήτων σωρού 2:*  $6.93 \times 10^5 - 1.84 \times 10^7$  cfu/g ξ.δ.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 2.3 Ακτινομύκητες



**Διάγραμμα 2.3** Διακύμανση του ABM των ακτινομυκήτων συναρτήσει του χρόνου. Με βέλος σημειώνεται η ημέρα γυρίσματος και διαβροχής.

Σωρός 1: Μείωση παρατηρείται στον πληθυσμό από τη στιγμή εγκατάστασης έως την 1<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση. Στη συνέχεια ο πληθυσμός παρουσιάζει αυξητική τάση ως και τη 2<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση κομποστοποίησης. Η αύξηση αυτή είναι αναμενόμενη, δεδομένου ότι οι ακτινομύκητες είναι ανταγωνιστικοί σε αντίξοες συνθήκες, και όταν τα θρεπτικά αποτελούν περιοριστικό παράγοντα.

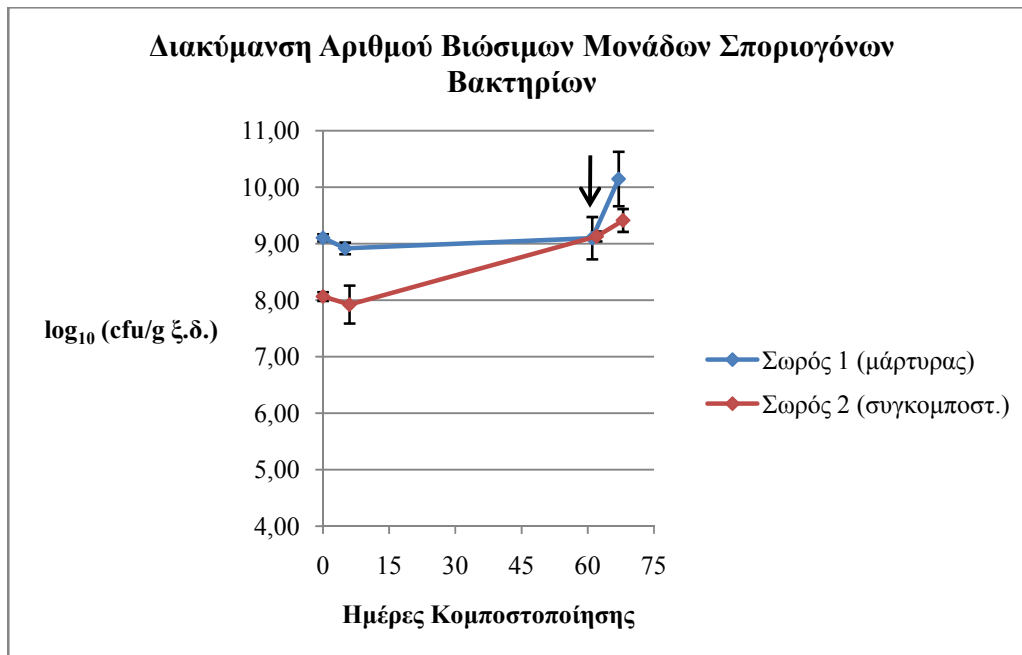
Σωρός 2: Μείωση παρατηρείται από την εγκατάσταση του σωρού ως την 1<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση. Ακολουθεί αύξηση του ABM στη 2<sup>η</sup> μεσόφιλη φάση όπου και παρατηρείται πληθυσμιακό μέγιστο. Έκτοτε παρατηρείται πτωτική τάση ως και τη 2<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση, πιθανόν λόγω εξάντλησης των διαθέσιμων θρεπτικών του υποστρώματος.

Εύρος πληθυσμού ακτινομυκήτων σωρού 1:  $3.10 \times 10^7 - 2.04 \times 10^9$  cfu/g ξ.δ.

Εύρος πληθυσμού ακτινομυκήτων σωρού 2:  $1.91 \times 10^6 - 4.53 \times 10^9$  cfu/g ξ.δ.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 2.4 Σποριογόνα Βακτήρια



**Διάγραμμα 2.4** Διακύμανση του ABM των σποριογόνων βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου. Με βέλος σημειώνεται η ημέρα γυρίσματος και διαβροχής.

Σωρός 1: Ο ABM των σποριογόνων βακτηρίων διατηρείται σχεδόν σταθερός ως και τη 2<sup>η</sup> μεσόφιλη φάση. Στη συνέχεια παρατηρείται αυξητική τάση, η οποία είναι αναμενόμενη, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών και της εξάντλησης των θρεπτικών. Σε αυτές τις συνθήκες, μέρος του πληθυσμού των βακτηρίων που διαθέτει την ικανότητα σχηματισμού σπορίων επιβιώνει υπό αυτή τη μορφή.

Σωρός 2: Παρατηρείται αυξητική τάση στον πληθυσμό των σποριογόνων βακτηρίων από την 1<sup>η</sup> θερμόφιλη φάση ως και τη 2<sup>η</sup> θερμόφιλη.

Εύρος πληθυσμού σποριογόνων βακτηρίων σωρού 1:  $8.28 \times 10^8 - 1.40 \times 10^{10}$  cfu/g ξ.δ.

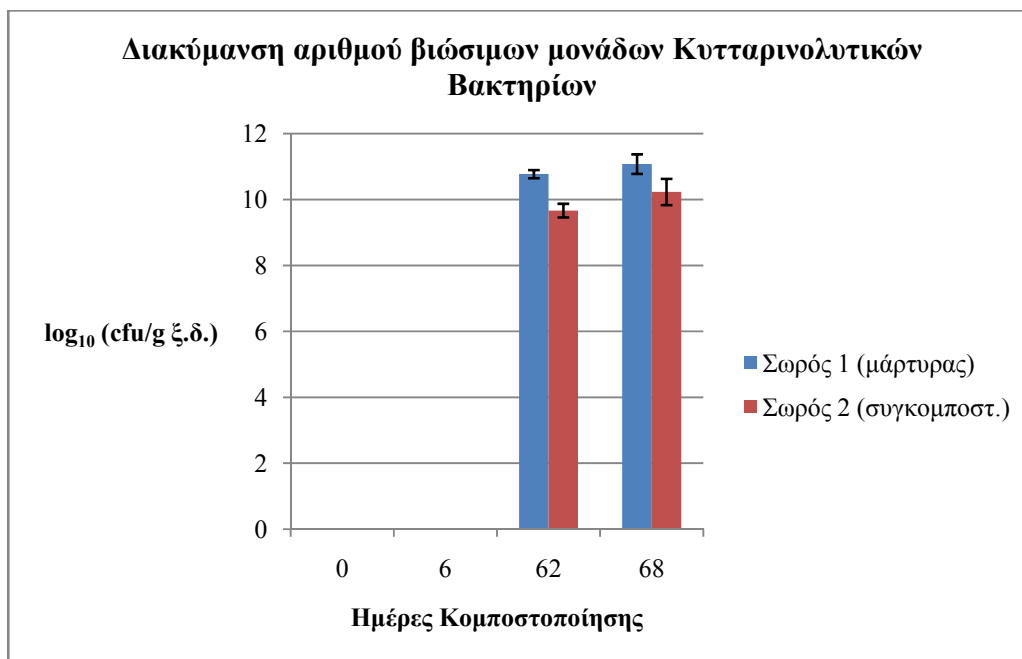
Εύρος πληθυσμού σποριογόνων βακτηρίων σωρού 2:  $8.38 \times 10^7 - 2.58 \times 10^9$  cfu/g ξ.δ.



### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 2.5 Κυτταρινολυτικά βακτήρια

Για την καταγραφή του ABM των κυτταρινολυτικών βακτηρίων μετρήθηκαν οι αποικίες βάσει της ζώνης διάχυσης που δημιουργήθηκε με χρήση ιωδιούχου καλίου.



**Διάγραμμα 2.5** Διακύμανση του ABM των κυτταρινολυτικών βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου. Με βέλος σημειώνεται η ημέρα γυρίσματος και διαβροχής.

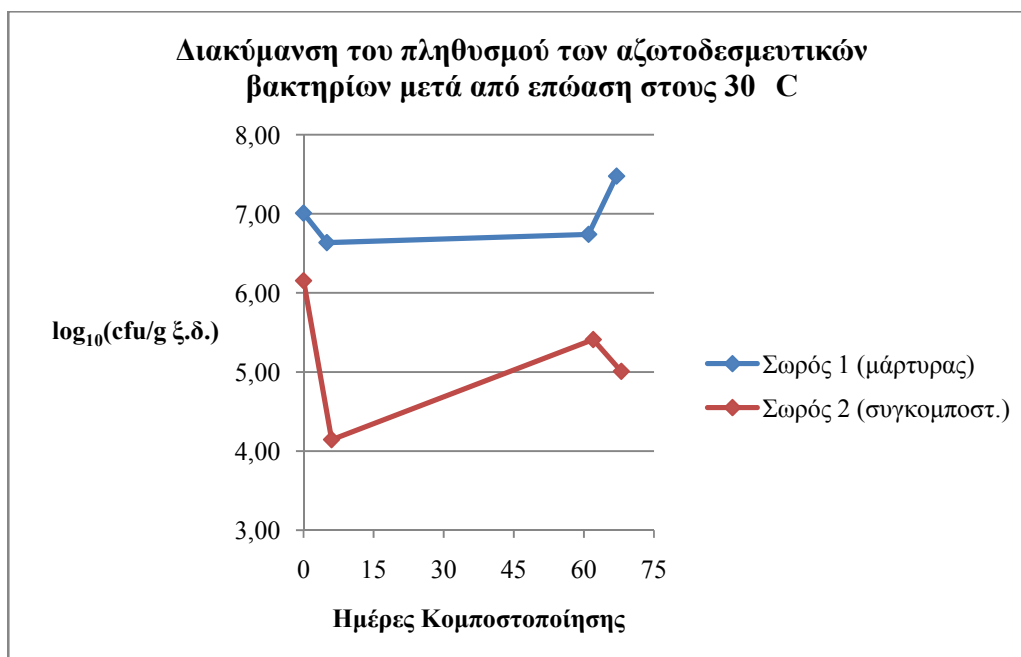
Τόσο στην εγκατάσταση του σωρού, όσο και στην 1<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση δεν παρατηρήθηκαν πληθυσμοί κυτταρινολυτικών βακτηρίων και στους δύο σωρούς. Κυτταρινολυτικά βακτήρια πρωτοεμφανίστηκαν και στους δύο σωρούς στη 2<sup>η</sup> μεσόφιλη φάση και παρουσίασαν μια μικρή αύξηση στη 2<sup>η</sup> θερμοφιλή. Η αύξηση είναι αναμενόμενη λόγω της εξάντλησης των εύκολα αποικοδομήσιμων ουσιών στα τελευταία στάδια της κομποστοποίησης, και την παραμονή σύνθετων οργανικών ουσιών, όπως η κυτταρίνη και η λιγνίνη.

*Εύρος πληθυσμού κυτταρινολυτικών βακτηρίων σωρού 1:*  $5.95 \times 10^{10} - 1.20 \times 10^{11}$  cfu/g ξ.δ.

*Εύρος πληθυσμού κυτταρινολυτικών βακτηρίων σωρού 2:*  $4.65 \times 10^9 - 1.71 \times 10^{10}$  cfu/g ξ.δ.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 2.6 Αζωτοδεσμευτικά Βακτήρια



**Διάγραμμα 2.6** Διακύμανση του πληθυσμού των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου, μετά από επώαση των σωλήνων στους 30 °C. Με βέλος σημειώνεται η ημέρα γυρίσματος και διαβροχής.

Σωρός 1: Μικρή πτωτική τάση παρατηρείται στον πληθυσμό των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων ως την 1<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση. Στη συνέχεια ο πληθυσμός διατηρείται σχεδόν σταθερός ως τη 2<sup>η</sup> μεσόφιλη φάση, ακολουθεί όμως αυξητική πορεία ως τη 2<sup>η</sup> θερμοφιλή.

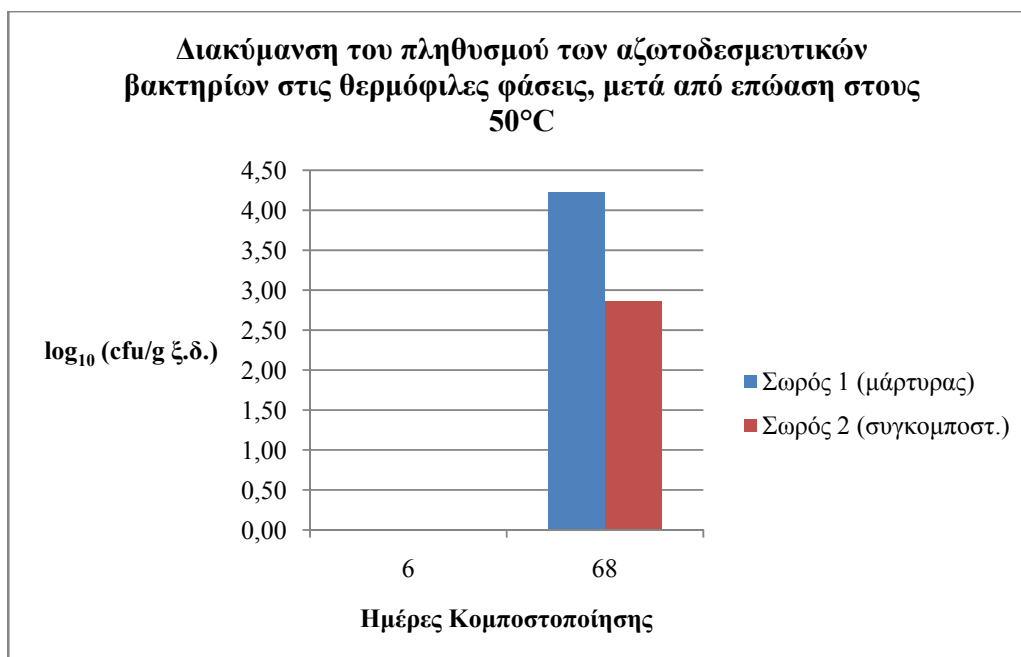
Σε όλες τις φάσεις κομποστοποίησης ο πληθυσμός των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων του σωρού 1 παρουσιάζει υψηλότερες τιμές σε σχέση με το σωρό 2.

Σωρός 2: Σημαντική μείωση του πληθυσμού παρατηρείται κατά τη μετάβαση από την αρχική μεσόφιλη φάση στην 1<sup>η</sup> θερμοφιλή. Μικρότερη μείωση παρατηρείται κατά τη μετάβαση από τη 2<sup>η</sup> μεσόφιλη στη 2<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση.

Εύρος πληθυσμού αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων σωρού 1:  $4.33 \times 10^6 - 3.00 \times 10^7$  cfu/g ξ.δ.

Εύρος πληθυσμού αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων σωρού 2:  $1.40 \times 10^4 - 1.43 \times 10^6$  cfu/g ξ.δ.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



**Διάγραμμα 2.7** Διακύμανση του πληθυσμού των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου, μετά από επώαση των σωλήνων στους 50 °C.

Στο διάγραμμα 2.7 παρατηρείται ότι στην 1<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση ο πληθυσμός των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, όταν επώαστηκε στους 50 °C, ήταν μηδενικός. Στη 2<sup>η</sup> θερμοφιλή όμως παρατηρείται πληθυσμιακή αύξηση των θερμοφίλων ή/και θερμοανθεκτικών αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων και στους δύο σωρούς. Ο σωρός 1 εμφανίζει υψηλότερα πληθυσμιακά επίπεδα ( $1.66 \times 10^4$  cfu/g ξ.δ.) σε σχέση με το σωρό 2 ( $0.07 \times 10^4$  cfu/g ξ.δ.).

Μέρος του αρχικού πληθυσμού των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων έχει προσαρμοστεί στην υψηλή θερμοκρασία και παραμένει ενεργό.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 2.7 Αζωτοδεσμευτική Ικανότητα Δειγμάτων Κόμποστ

Η ικανότητα αζωτοδέσμευσης ελέγχθηκε στα δείγματα κόμποστ (όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2. § 5.1.6). Τα αποτελέσματα της δοκιμής ακετυλενίου παρουσιάζονται στον Πίν. 2.1.

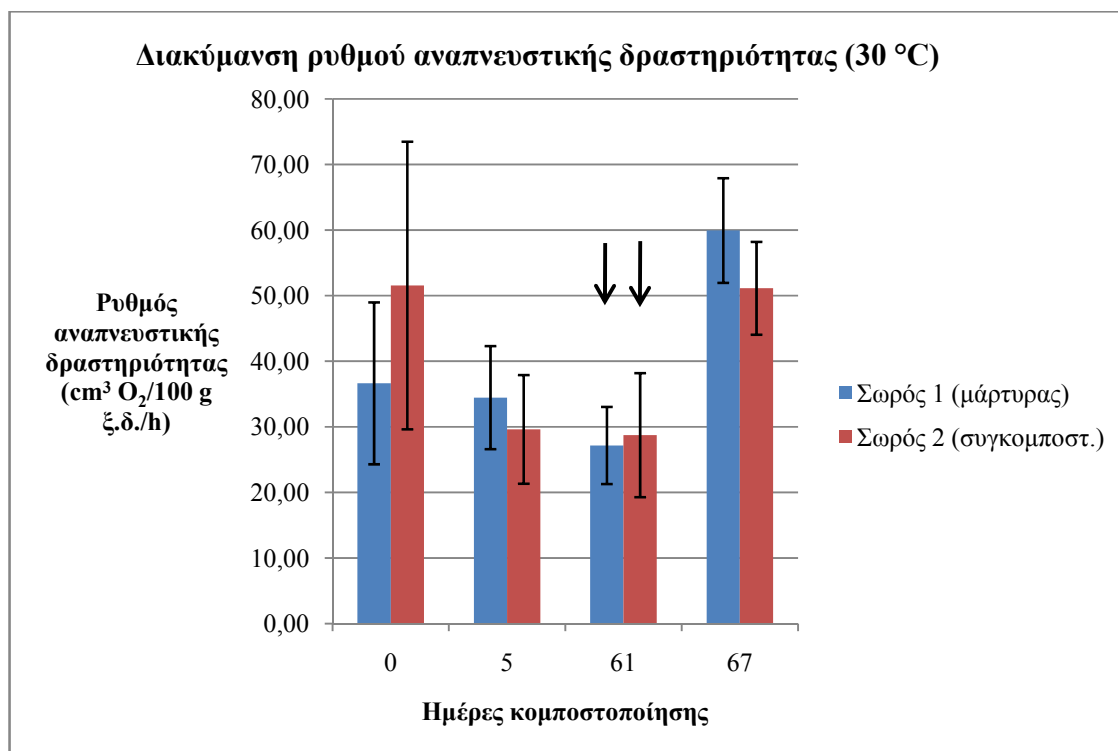
Αξιοσημείωτο είναι πως μόνο ο σωρός 1 και μόνο μετά από επώαση στους 50 °C έδειξε θετική ένδειξη στη δοκιμή αναγωγής του ακετυλενίου, και στις δύο θερμοφιλικές φάσεις της κομποστοποίησης. Περισσότερα nmoles αιθυλενίου/g ξηρού δείγματος/ημέρα παράγονται από το δείγμα κόμποστ του σωρού 1 της 4<sup>ης</sup> δειγματοληψίας.

**Πίνακας 2.1** Αποτελέσματα της δοκιμής ακετυλενίου στα δείγματα κόμποστ, στις θερμοφιλικές φάσεις (2<sup>η</sup>, 4<sup>η</sup> δειγματοληψία). Οι σωλίνες επώαστηκαν στους 30 και στους 50 °C. Με (+) σημειώνονται οι σωλίνες με θετική ένδειξη αναγωγής ακετυλενίου.

Σωρός 1									
Θερμοκρασία επώασης σωλίνων		30 °C				50 °C			
Δειγματοληψία		2η		4η		2η		4η	
		Ένδειξη σωλήνα	nmoles Eth/g ξ.δ./day	Ένδειξη σωλήνα	nmoles Eth/g ξ.δ./day	Ένδειξη σωλήνα	nmoles Eth/g ξ.δ./day	Ένδειξη σωλήνα	nmoles Eth/g ξ.δ./day
Επανάληψη	1	-	-	-	-	-	-	+	0.88
	2	-	-	-	-	-	-	+	0.84
	3	-	-	-	-	+	0.29	-	-
Σωρός 2									
Θερμοκρασία επώασης σωλίνων		30 °C				50 °C			
Δειγματοληψία		2η		4η		2η		4η	
		Ένδειξη σωλήνα	nmoles Eth/g ξ.δ./day	Ένδειξη σωλήνα	nmoles Eth/g ξ.δ./day	Ένδειξη σωλήνα	nmoles Eth/g ξ.δ./day	Ένδειξη σωλήνα	nmoles Eth/g ξ.δ./day
Επανάληψη	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 2.8 Αναπνευστική δραστηριότητα



**Διάγραμμα 2.8** Διακύμανση του ρυθμού αναπνευστικής δραστηριότητας στους δύο σωρούς συναρτήσει του χρόνου. Με βέλος σημειώνεται η ημέρα γυρίσματος και διαβροχής.

Η εκτίμηση της αναπνευστικής δραστηριότητας του κόμποστ αποτελεί μια ένδειξη της ολικής ενεργής μικροβιακής χλωρίδας στα διάφορα στάδια κομποστοποίησης. Σε όλα τα στάδια η αναπνευστική δραστηριότητα εκτιμήθηκε σε θερμοκρασία 30 °C, εκτός από τα θερμοφιλά στάδια όπου η αναπνευστική δραστηριότητα εκτιμήθηκε και στους 50 °C.

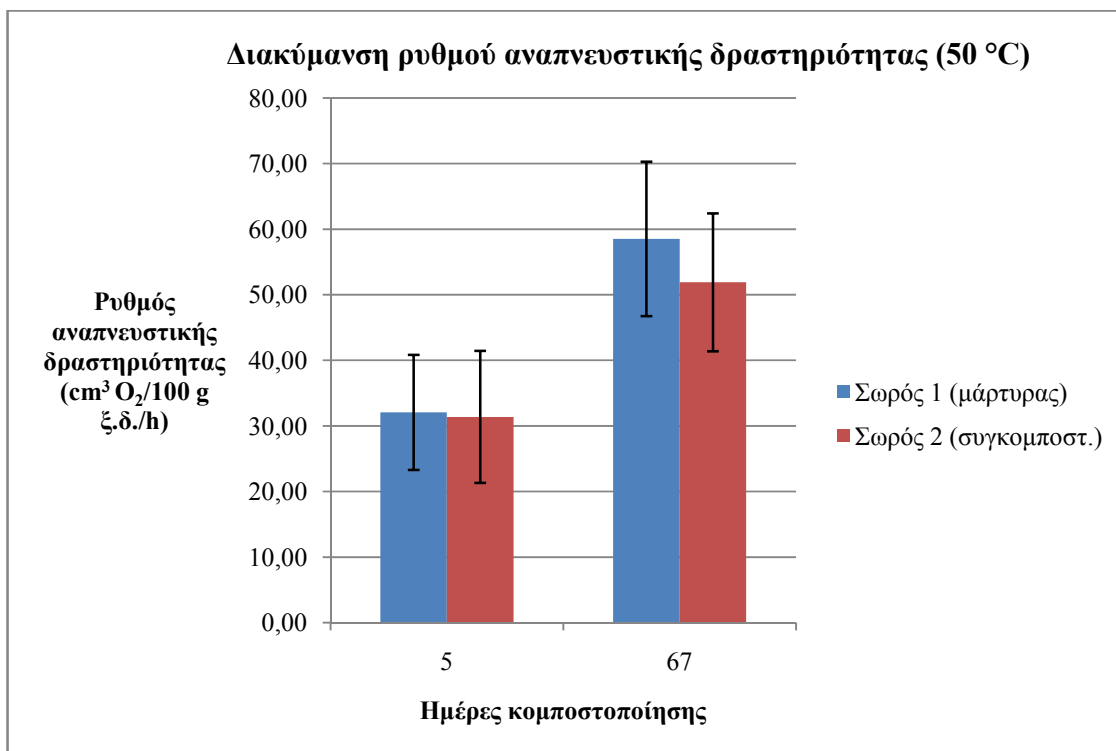
Στο διάγραμμα 2.8 παρουσιάζεται η διακύμανση της αναπνευστικής δραστηριότητας μετά από επώαση των δειγμάτων κόμποστ στους 30 °C.

Στο σωρό 1 παρατηρείται μικρή μείωση του ρυθμού αναπνευστικής δραστηριότητας στην 1<sup>η</sup> θερμοφιλή και 2<sup>η</sup> μεσόφιλη φάση. Ακολουθεί μεγάλη αύξηση του ρυθμού στη 2<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση, πιθανόν λόγω ανάπτυξης θερμοανθεκτικότητας σε μέρος του πληθυσμού των μικροβιακών ομάδων.

Στο σωρό 2 αν και ο μικροβιακός πληθυσμός μειώθηκε λόγω της αντιμικροβιακής δραστηριότητας των ΥΑΕ, εντούτοις παρατηρείται αυξημένη ένταση μικροβιακής

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

δραστηριότητας στα αρχικά στάδια κομποστοποίησης, εξαιτίας της ενδογενούς χλωρίδας των επιμέρους υλικών κομποστοποίησης. Μεγάλη μείωση του ρυθμού αναπνευστικής δραστηριότητας παρατηρείται στην 1<sup>η</sup> θερμοφιλή, και διατηρείται σχεδόν σταθερός ως τη 2<sup>η</sup> μεσόφιλη φάση. Στη συνέχεια παρατηρείται αυξητική τάση ως και τη 2<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση.



**Διάγραμμα 2.9** Διακύμανση του ρυθμού αναπνευστικής δραστηριότητας στους δύο σωρούς συναρτήσει του χρόνου, μετά από επώαση των δειγμάτων στους 50 °C.

Στο διάγραμμα 2.9 παρουσιάζεται η διακύμανση της αναπνευστικής δραστηριότητας μετά από επώαση των δειγμάτων στους 50 °C. Και στους δύο σωρούς το πρότυπο διακύμανσης είναι παρόμοιο. Αυξημένη αναπνευστική δραστηριότητα παρατηρείται στη 2<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση.

Σχεδόν ίδια επίπεδα αναπνευστικής δραστηριότητας παρατηρούνται στις δύο θερμοκρασίες επώασης (30 °C, 50 °C). Η μικρή παρατηρηθείσα διαφορά είναι αναμενόμενη, εφόσον ο μικροβιακός πληθυσμός είναι προσαρμοσμένος και στις δύο θερμοκρασίες.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

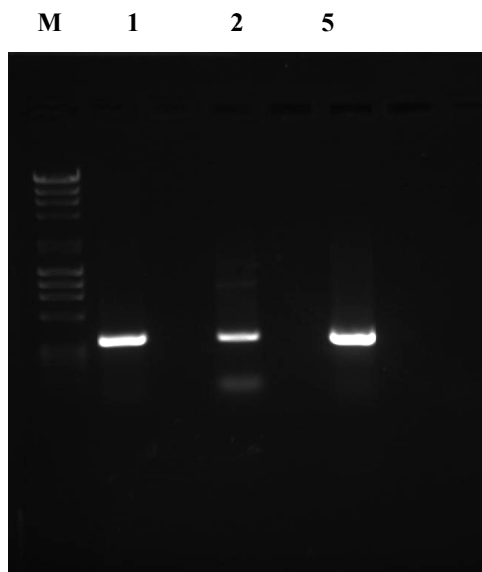
#### 3. Μικροβιολογικές Αναλύσεις με τη χρήση μοριακών τεχνικών

---

##### 3.1 Ενίσχυση τμήματος 16S rRNA και *nifH* γονιδίου - υποκλωνοποίηση

Τρία από τα αζωτοδεσμευτικά στελέχη τα οποία είχαν απομονωθεί σε θρεπτικό υπόστρωμα Rennie (εκλεκτικό για αζωτοδεσμευτικά βακτήρια) και έδιναν θετικό αποτέλεσμα στη δοκιμή αναγωγής ακετυλενίου ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση μοριακών τεχνικών (Co1, Co2, Co5). Το Co1 και το Co2 απομονώθηκαν από το σωρό 2 (1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> δειγματοληψία αντίστοιχα). Το Co5 απομονώθηκε από τη 2<sup>η</sup> δειγματοληψία, από το σωρό 1.

Και στα τρία στελέχη πραγματοποιήθηκε μοριακή ανάλυση για το συντηρημένο γονίδιο 16S rRNA καθώς και για το γονίδιο *nifH* (οι αλληλουχίες των εκκινητών καθώς και οι συνθήκες της PCR περιγράφονται στο *Κεφάλαιο 2, §6.4*). Στη συνέχεια τα προϊόντα της PCR υποκλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα PGEM – T easy (Promega) και εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε ανάλυση της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας (*sequencing*).

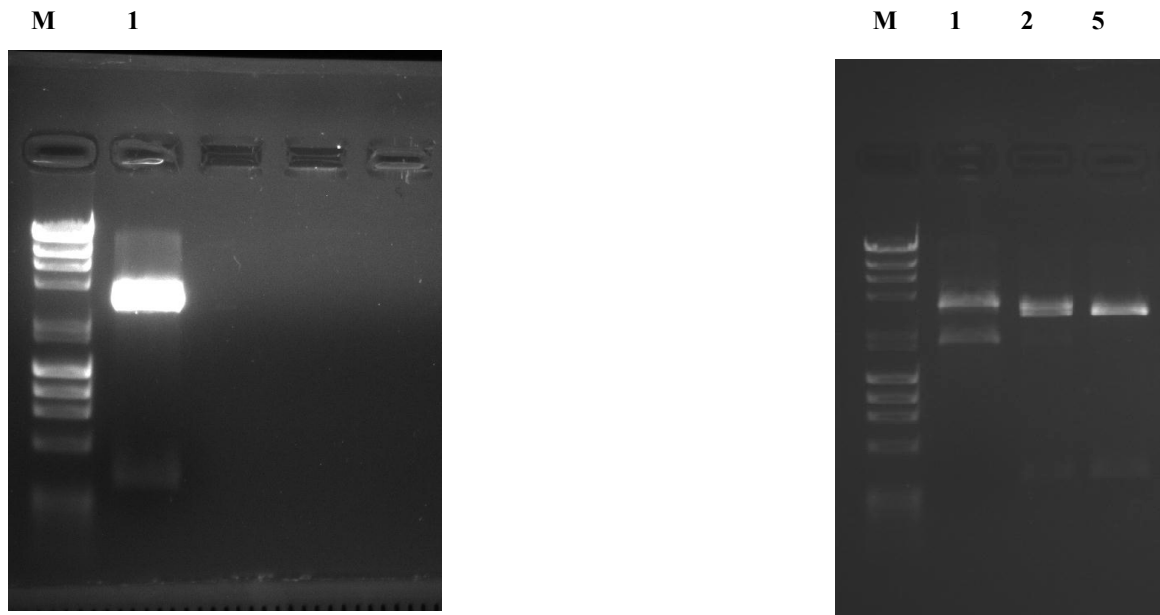


---

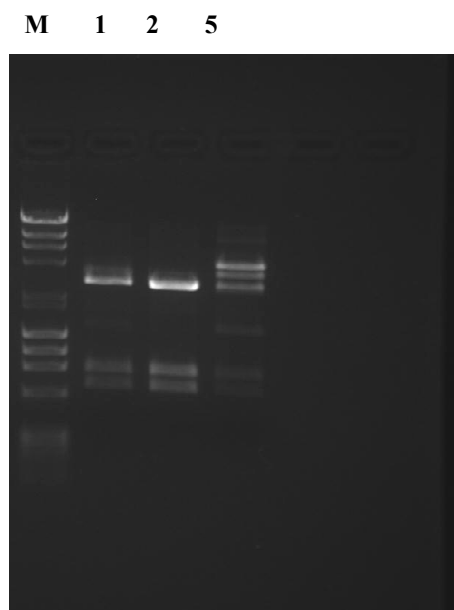
**Εικόνα 3.1** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1%) του προϊόντος της αντίδρασης PCR που πραγματοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου *nifH* (~330 bp) επί του ολικού γενετικού υλικού (DNA) των δειγμάτων Co1, Co2, Co5. Με M σημειώνεται ο μάρτυρας των μοριακών μεγεθών ( $\lambda$  DNA *Hind*III και φX174 *Hae*III).

---

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



**Εικόνα 3.2** Πέψη των πλασμιδίων με *EcoRI* περιοριστική ενδονουκλεάση (κλώνοι *nifH* – Co1, Co2, Co5). Το ένθετο (insert) είναι μεγέθους ~330 bp.



**Εικόνα 3.3** Πέψη των πλασμιδίων με *EcoRI* περιοριστική ενδονουκλεάση (κλώνοι 16S rRNA – Co1, Co2, Co5). Παρατηρείται η ύπαρξη θέσης αναγνώρισης από την περιοριστική ενδονουκλεάση εντός του γονιδίου 16S rRNA, για αυτό και είναι ορατές δύο ζώνες (μία ~870 bp και μία ~ 600 bp) στη θέση που αναμένεται το insert.



### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.2 Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας 16S rRNA γονιδίου

Τα γονίδια εστάλησαν σε αναλυτικό εργαστήριο, όπου και πραγματοποιήθηκε ανάγνωση της νουκλεοτιδικής του ακολουθίας (*sequencing*). Κατόπιν η ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA πραγματοποιήθηκε μέσω της βάσης δεδομένων NCBI (National Centre for Biotechnology Information, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το διαδικτυακό πρόγραμμα BLAST<sup>13</sup> (Basic Local Alignment Search Tool). Το αποτέλεσμα της ανάλυσης ήταν ο εντοπισμός γονιδίων που κωδικοποιούν για το ριβοσωμικό RNA, και εμφανίζουν υψηλή ομολογία με αντίστοιχα γονίδια κοινών αζωτοδεσμευτικών οργανισμών, τα οποία έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από άλλους οργανισμούς και είναι καταχωρημένα σε διεθνείς βάσεις δεδομένων. Συγκεκριμένα βρέθηκε υψηλή ομολογία με είδη του γένους *Klebsiella* και *Burkholderia*. Η νουκλεοτιδική ακολουθία του 16S rRNA γονιδίου των εξεταζόμενων υποκλώνων παρουσιάζεται στο παράρτημα Β'.

#### 3.3 Φυλογενετική Ανάλυση 16S rRNA γονιδίου

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου των Co1, Co2, Co5 γονιδίου ευθυγραμμίστηκε, χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο ClustalW<sup>14</sup>, με αντίστοιχα γονίδια συγγενών μικροοργανισμών, των οποίων οι αλληλουχίες είναι διαθέσιμες στο διαδίκτυο (όπως προέκυψαν από τον αλγόριθμο BLAST), μέσω του λογισμικού Mega 5.0. Στη συνέχεια κατασκευάστηκε φυλογενετικό δενδρόγραμμα με χρήση της μεθόδου Neighbor Joining<sup>15</sup>. Το φυλογενετικό δενδρόγραμμα των τριών αλληλουχιών 16S rRNA και των αλληλουχιών αναφοράς παρουσιάζεται παρακάτω:

---

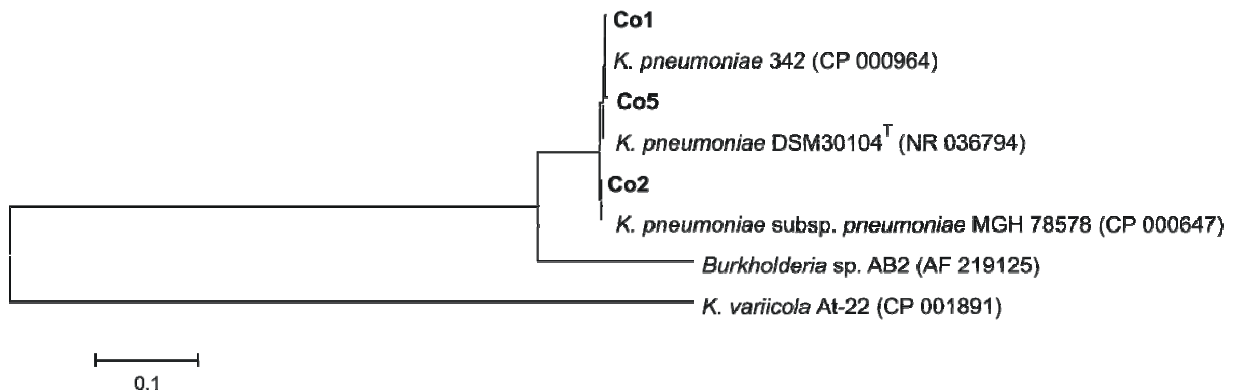
<sup>13</sup> **BLAST**: Ένας αλγόριθμος για σύγκριση αμινοξικών ή νουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Μία αναζήτηση BLAST επιτρέπει στον ερευνητή να συγκρίνει μία εξεταζόμενη αλληλουχία με μία βάση δεδομένων αλληλουχιών και να ταυτοποιεί τις καταχωρημένες αλληλουχίες που μοιάζουν με την εξεταζόμενη αλληλουχία, πάνω από ένα κατώτατο όριο.

<sup>14</sup> **ClustalW**: Πρόγραμμα ευρείας χρήσης για πολλαπλή ευθυγράμμιση αμινοξικών ή νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (DNA).

<sup>15</sup> **Neighbor Joining Method**: Μέθοδος ανοικοδόμησης φυλογενετικών δέντρων από δεδομένα εξελικτικών αποστάσεων. Η αρχή της μεθόδου έγκειται στην ανεύρεση εκείνων των ζευγών των λειτουργικών ταξονομικών ομάδων (operational taxonomic units – OTUs = neighbors) τα οποία ελαχιστοποιούν το ολικό μήκος ενός κλάδου σε κάθε στάδιο διακλάδωσης των OTUs, ξεκινώντας με ένα δενδρόγραμμα που μοιάζει με αστέρι. Το μήκος των κλάδων καθώς και η τοπολογία αυτού του «φειδωλού» δενδρογράμματος αποκτώνται γρήγορα με αυτή τη μέθοδο (Saitou & Nei, 1987).

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

➤ 16S rRNA γονίδιο:



**Εικόνα 3.4** Εξελικτικές σχέσεις 8 taxa. Η απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το βέλτιστο δενδρόγραμμα με συνολικό μήκος κλάδων = 1.40926898. Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με το μήκος των κλάδων να έχει τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν για να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004), και εκφράζονται σε μονάδες οι οποίες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Σύνολο 1364 θέσεων συμπεριλήφθηκαν στα τελικά δεδομένα. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2007).

Επίσης ευθυγραμμίστηκαν και οι αλληλουχίες 16S rRNA των τριών στελεχών μεταξύ τους, προκειμένου να εντοπιστούν οι εξελικτικές τους ομοιότητες. Η ευθυγράμμιση έγινε μέσω του λογισμικού Mega 5.0. Τα αποτελέσματα της ευθυγράμμισης των τριών στελεχών μεταξύ τους παρουσιάζεται αναλυτικά στο παράρτημα Β'.

Percent Identity					
	1	2	3		
1	■	99.3	99.1	1	16S Co1
2	0.7	■	99.3	2	16S Co2
3	0.9	0.7	■	3	16S Co5
	1	2	3		

**Εικόνα 3.5** Αποτελέσματα ευθυγράμμισης των 16S rRNA γονιδίων των Co1, Co2, Co5 μεταξύ τους. Το Co1 παρουσιάζει κατά 99.3% ομοιότητα με το Co2, ενώ κατά 99.1% ομοιότητα με το Co5. Το Co2 παρουσιάζει κατά 99.3% ομοιότητα με το Co5.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.4 Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας *nifH* γονιδίου

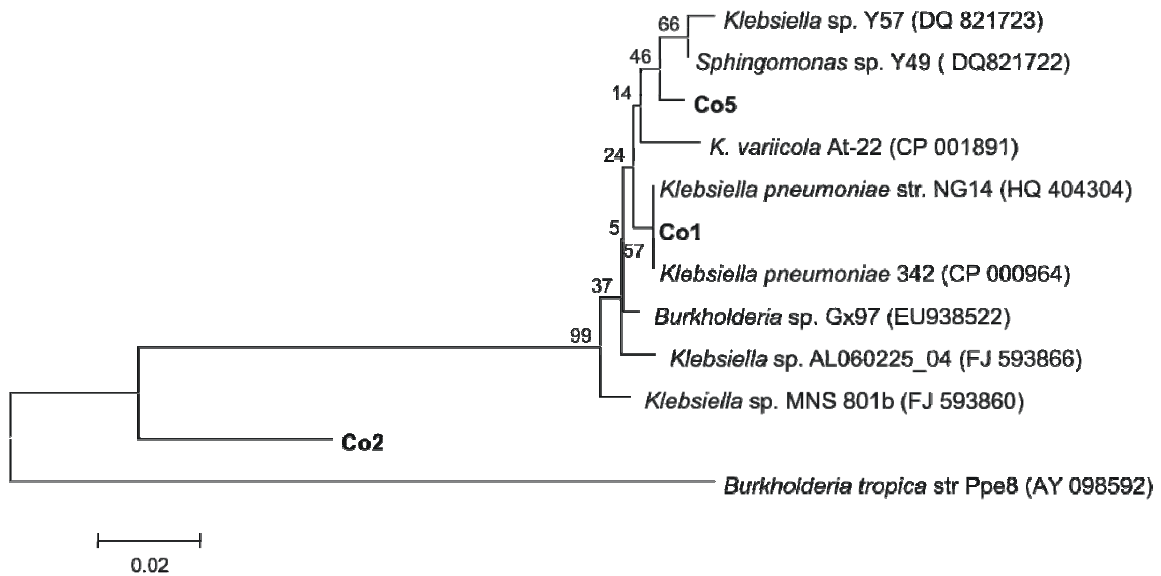
Τα γονίδια εστάλησαν σε αναλυτικό εργαστήριο, όπου και πραγματοποιήθηκε ανάγνωση της νουκλεοτιδικής του ακολουθίας (*sequencing*). Κατόπιν η ανάλυση του γονιδίου *nifH* πραγματοποιήθηκε μέσω της βάσης δεδομένων NCBI (National Centre for Biotechnology Information, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το διαδικτυακό πρόγραμμα BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Το αποτέλεσμα της ανάλυσης ήταν ο εντοπισμός γονιδίων και στα τρία στελέχη που παρουσίαζαν πολύ υψηλή ομολογία με γονίδια που κωδικοποιούν για την αναγωγή της δινιτρογενάσης, τα οποία έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από άλλους οργανισμούς και είναι καταχωρημένα σε διεθνείς βάσεις δεδομένων. Συγκεκριμένα βρέθηκε υψηλή ομολογία με είδη του γένους *Klebsiella*, *Sphingomonas* και *Burkholderia*. Η νουκλεοτιδική ακολουθία του *nifH* γονιδίου των εξεταζόμενων υποκλώνων παρουσιάζεται στο παράρτημα Β'.

#### 3.5 Φυλογενετική Ανάλυση *nifH* γονιδίου

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του *nifH* γονιδίου των Co1, Co2, Co5 ευθυγραμμίστηκε, χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο ClustalW, με αντίστοιχα γονίδια συγγενών μικροοργανισμών, των οποίων οι αλληλουχίες είναι διαθέσιμες στο διαδίκτυο (όπως προέκυψαν από τον αλγόριθμο BLAST), μέσω του λογισμικού Mega 5.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, software version 4.0) (Tamura *et al.*, 2007). Στη συνέχεια κατασκευάστηκε φυλογενετικό δένδρογραμμα με χρήση της μεθόδου Neighbor Joining. Το φυλογενετικό δένδρογραμμα των τριών αλληλουχιών *nifH* και των αλληλουχιών αναφοράς παρουσιάζεται παρακάτω:

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

➤ *nifH* γονίδιο:



**Εικόνα 3.6** Εξελικτικές σχέσεις 12 taxa. Η απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το βέλτιστο δενδρόγραμμα με συνολικό μήκος κλάδων = 0.34816781. Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μία ομάδα, μέσω της δοκιμής bootstrap (1000 αντίγραφα) (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με το μήκος των κλάδων να έχει τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν για να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004), και εκφράζονται σε μονάδες οι οποίες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Οι θέσεις κωδικονίων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 1<sup>n</sup>+2<sup>n</sup>+3<sup>n</sup>+μη-κωδική. Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Σύνολο 198 θέσεων συμπεριλήφθηκαν στα τελικά δεδομένα. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2007).

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Επίσης ευθυγραμμίστηκαν και οι αλληλουχίες *nifH* των τριών στελεχών μεταξύ τους, προκειμένου να εντοπιστούν οι εξελικτικές τους ομοιότητες. Η ευθυγράμμιση έγινε μέσω του λογισμικού Mega 5.0. Τα αποτελέσματα της ευθυγράμμισης των τριών στελεχών μεταξύ τους παρουσιάζεται αναλυτικά στο παράρτημα Β'.

Percent Identity				
	1	2	3	
1		89.7	98.8	1
2	11.2		89.7	2
3	1.2	11.2		3
	1	2	3	

nifH Co1  
nifH Co2  
nifH Co5

**Εικόνα 3.7** Αποτελέσματα ευθυγράμμισης των *nifH* γονιδίων των Co1, Co2, Co5 μεταξύ τους. Το Co1 παρουσιάζει κατά 89.7% ομοιότητα με το Co2, ενώ κατά 98.8% ομοιότητα με το Co5. Το Co2 παρουσιάζει κατά 89.7% ομοιότητα με το Co5.



#### Κεφάλαιο 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

---

Οι φυσικοχημικές παράμετροι που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι δείκτες της πορείας της κομποστοποίησης και της ποιότητας του παραγόμενου κόμποστ.

Η θερμοκρασία είναι μια πολύ σημαντική παράμετρος μελέτης της διαδικασίας κομποστοποίησης. Η θερμοκρασιακή διακύμανση των σταδίων κομποστοποίησης και στους δύο σωρούς συμφωνεί σε γενικές γραμμές με τον Miller (1996), όπως αναφέρεται στον Bonito *et al.* (2010). Οι υψηλότερες θερμοκρασίες του σωρού 2 σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας, καθώς και η παρατεταμένη 2<sup>η</sup> θερμόφιλη φάση, αποδίδονται στην προσθήκη των ΥΑΕ, τα οποία αποτελούν ένα πλούσιο σε άνθρακα υπόστρωμα, κατάλληλο για έντονη μικροβιακή δραστηριότητα. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Mari *et al.* (2005), οι οποίοι παρατήρησαν επαναλαμβανόμενη αυτο-θέρμανση του σωρού έπειτα από κάθε προσθήκη ΥΑΕ, καθώς και παρατεταμένες θερμόφιλες φάσεις.

Όσον αφορά στην υγρασία, σχεδόν ίδια επίπεδα παρουσίασαν και οι δύο σωροί σε όλη τη διάρκεια της κομποστοποίησης. Παρ' ότι η υγρασία και στο σωρό 1 αλλά και στο σωρό 2, την 61<sup>η</sup> ημέρα κομποστοποίησης μειώθηκε σε ποσοστά 49.13% και 48.53% αντίστοιχα, εντούτοις δεν έπεσε σε κανένα στάδιο κάτω από το επιτρεπτό όριο του 30 – 35%, όπου και παρατηρείται αναστολή της μικροβιακής δραστηριότητας, σύμφωνα με τον Stentiford (1995). Όμως η μείωση της υγρασίας συνέβαλε στην αναστολή της έντονης μικροβιακής δραστηριότητας η οποία είχε ως αποτέλεσμα την πτώση της θερμοκρασίας.

Όσο αφορά στη διακύμανση του pH δεν υπήρχαν έντονες διαφοροποιήσεις με αυτά που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία. Το όξινο pH του σωρού 2 την ημέρα εγκατάστασης, αποδίδεται στον όξινο χαρακτήρα των ΥΑΕ. Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγουν και οι Mari *et al.* (2005). Όπως ήταν αναμενόμενο, η τιμή του pH αυξάνεται σε όλη τη διάρκεια της κομποστοποίησης και στους δύο σωρούς, λόγω αποικοδόμησης των πρωτεϊνών με την παράλληλη απελευθέρωση αμμωνίας. Επίσης η αύξηση του pH αποδίδεται στην αμμωνιοποίηση και στην ανοργανοποίηση του οργανικού αζώτου. Αυτό υποστηρίζεται από πολλούς ερευνητές (Abid & Sayadi 2005, Zhang *et al.* 2011, Brewer & Sullivan 2003).

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ανάλογη διακύμανση με τα αναφερόμενα στη διεθνή βιβλιογραφία παρατηρήθηκε και για την ηλεκτρική αγωγιμότητα. Υψηλότερες τιμές ηλεκτρικής αγωγιμότητας παρατηρούνται στο σωρό 2, λόγω προσθήκης των ΥΑΕ, τα οποία παρέχουν διαλυτά άλατα στο σωρό. Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγουν και οι Abid & Sayadi (2005) καθώς και οι Paredes *et al.* (2000).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασαν τα αποτελέσματα που αφορούσαν τη διακύμανση του αζώτου (αμμωνιακού, νιτρικού, ολικού) κατά τη διάρκεια της κομποστοποίησης. Η αυξητική τάση του αμμωνιακού αζώτου στο σωρό 1 από την 1<sup>η</sup> θερμόφιλη φάση και μετά υποδηλώνει ενεργή αποικοδόμηση της οργανικής ουσίας, και ότι το προϊόν την 67<sup>η</sup> ημέρα κομποστοποίησης δεν είχε σταθεροποιηθεί. Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγουν και οι Brewer & Sullivan (2003), καθώς και οι Bernal *et al.* (1997). Και οι Μπαλής *κ.α.* (1994) παρατήρησαν σημαντικές αυξομειώσεις στα επίπεδα του αμμωνιακού αζώτου κατά την κομποστοποίηση υπολειμμάτων εκκοκκισμού βάμβακος. Η πτωτική τάση του αμμωνιακού αζώτου στο σωρό 2 αποδίδεται στην απομάκρυνσή του σε αέρια μορφή, ή και στην ακινητοποίησή του από τους μικροοργανισμούς. Σε ανάλογο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Zhang *et al.* (2011). Τα χαμηλότερα επίπεδα αμμωνιακού αζώτου στο σωρό 2 στις τελευταίες φάσεις της κομποστοποίησης, πιθανόν υποδηλώνουν ότι ο σωρός 2 οδηγείται ταχύτερα στη σταθεροποίηση.

Οι χαμηλές τιμές νιτρικού αζώτου στις θερμόφιλες φάσεις και των δύο σωρών, είναι αναμενόμενες, δεδομένου ότι θερμοκρασίες >40 °C είναι ανασταλτικές για τα νιτροποιά βακτήρια, σύμφωνα με τους Brewer & Sullivan (2003). Εντονότερη νιτροποίηση παρατηρείται στο σωρό 1. Η αντιμικροβιακή δράση των ΥΑΕ στο σωρό 2 πιθανόν δρα ανασταλτικά στα νιτροποιά βακτήρια. Μια άλλη πιθανή εξήγηση είναι η απουσία υποστρώματος για νιτροποίηση, λόγω ταχείας ακινητοποίησης της αμμωνίας από τη μικροβιακή βιομάζα, ή λόγω απομάκρυνσης της αμμωνίας σε αέρια μορφή, στο σωρό 2. Ανάλογα αποτελέσματα παρατήρησαν και οι Paredes *et al.* (2000). Ο Tiquia (2002) αποδίδει τη μικρή αύξηση του νιτρικού αζώτου κατά τη διάρκεια της κομποστοποίησης στην απομάκρυνση μέρους του αμμωνιακού αζώτου σε αέρια μορφή ή / και στη μικροβιακή απονιτροποίηση.

Ο σωρός 2 ακολουθεί καλύτερα τα πρότυπα μεταβολής του λόγου  $\text{NH}_4^+ / \text{NO}_3^-$ , και επομένως ίσως οδηγείται στη σταθεροποίηση και ωρίμανση ταχύτερα. Οι Bernal *et al.* (1997) αναφέρουν ότι τελικός λόγος  $\text{NH}_4^+ / \text{NO}_3^-$  υπέρ του  $\text{NO}_3^-$ , είναι ένδειξη ωρίμανσης του κόμποστ.



#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το ολικό άζωτο αυξάνεται σε όλη τη διάρκεια της κομποστοποίησης, και στους δύο σωρούς, ως αποτέλεσμα αυξημένης συγκέντρωσης αυτού λόγω ελάττωσης του βάρους των σωρών. Αυτό υποστηρίζεται και από πολλούς ερευνητές (Paredes *et al.*, 2000; Paredes *et al.*, 2002). Η αύξηση του ολικού αζώτου αποδίδεται και στα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, τα οποία είναι ενεργά ως και τη 2<sup>η</sup> θερμόφιλη φάση. Και οι Paradimitriou *et al.* (1997) παρατήρησαν αύξηση ολικού αζώτου ως την 5<sup>η</sup> εβδομάδα κομποστοποίησης ελαιοπυρήνα και ελαιόφυλλων με μέσο ύγρανσης ΥΑΕ.

Όσον αφορά στην αναπνευστική δραστηριότητα, παρά το ότι πληθυσμός των μικροβιακών ομάδων στο σωρό 2 είναι μικρότερος, ο ρυθμός της στα αρχικά στάδια της συγκομποστοποίησης είναι αυξημένος και οφείλεται στα θρεπτικά του αρχικού υποστρώματος. Μικρή διαφορά παρατηρείται στο ρυθμό αναπνευστικής δραστηριότητας στους 30 και στους 50 °C, εφόσον οι μικροβιακές ομάδες είναι προσαρμοσμένες και στις δύο θερμοκρασίες.

Η μη ολοκληρωμένη κομποστοποίηση του σωρού 1 την 67<sup>η</sup> ημέρα της διαδικασίας κομποστοποίησης, ενισχύεται και από την έντονη αναπνευστική δραστηριότητα του σωρού.

Από τη μελέτη της διαδοχής του μικροβιακού πληθυσμού που συμμετείχε στην αποδόμηση της οργανικής ύλης διαπιστώνονται τα εξής:

Τα ολικά βακτήρια επικράτησαν πληθυσμιακά στις πρώτες φάσεις της κομποστοποίησης. Οι Ryskeboer *et al.* (2003) αναφέρουν ότι τα βακτήρια είναι η πιο ποικιλόμορφη ομάδα μικροοργανισμών που απαντώνται σε κόμποστ, αποικοδομώντας μια μεγάλη ποικιλία οργανικών ουσιών, επομένως είναι αναμενόμενη η πληθυσμιακή τους επικράτηση στην αρχή της κομποστοποίησης. Ο πληθυσμός τους αυξανόταν στις μεσόφιλες και μειωνόταν στις θερμόφιλες φάσεις και στους δύο σωρούς. Αυτό ήταν αποτέλεσμα της απενεργοποίησης ή θανάτωσης των μεσόφιλων μικροοργανισμών στην αρχή της θερμόφιλης φάσης (Beffa *et al.*, 1996b).

Οι μύκητες είναι μεσόφιλοι μικροοργανισμοί, με θερμοκρασιακό άριστο τους 25 – 30 °C (Ryskeboer *et al.*, 2003). Όπως ήταν αναμενόμενο, αυξάνονταν πληθυσμιακά στις μεσόφιλες φάσεις και μειώνονταν στις θερμόφιλες και στους δύο σωρούς.

Οι ακτινομύκητες στο σωρό 1 ακολούθησαν αυξητική τάση στα τελευταία στάδια της κομποστοποίησης, εφόσον είναι ισχυροί ανταγωνιστές σε αντίξοες συνθήκες και όταν τα θρεπτικά αποτελούν περιοριστικό παράγοντα (Beffa *et al.*, 1996b).

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα σποριογόνα βακτήρια, όπως ήταν αναμενόμενο, αυξήθηκαν πληθυσμιακά στη 2<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση, καθώς είναι ανθεκτικά στην υψηλή θερμοκρασία.

Τα κυτταρινολυτικά βακτήρια, δεν εμφανίστηκαν στις αρχικές δειγματοληψίες, όπου υπήρχαν εύκολα αφομοιώσιμες οργανικές ουσίες, όπως ήταν αναμενόμενο, αλλά πρωτοεμφανίστηκαν σε μεταγενέστερα στάδια (2<sup>η</sup> μεσόφιλη, 2<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση), όταν αυτές οι ουσίες είχαν αποικοδομηθεί σε μεγάλο βαθμό και στο υπόστρωμα παρέμεναν δύσκολα αφομοιώσιμες ουσίες όπως η κυτταρίνη αλλά και η λιγνίνη.

Όσον αφορά στα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, τα αποτελέσματα που λήφθηκαν, είναι ιδιαίτερα σημαντικά, δεδομένου ότι περιορισμένα ανάλογα αποτελέσματα αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία. Ο πληθυσμός των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων ήταν υψηλός σε όλες τις φάσεις της κομποστοποίησης. Στο σωρό 1 τα πληθυσμιακά επίπεδα των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων διατηρούνται σχεδόν σταθερά ως και τη 2<sup>η</sup> μεσόφιλη φάση, ενώ αυξάνονται στη 2<sup>η</sup> θερμοφιλή ( $29.98 \cdot 10^6$  cfu/g ξ.δ.). Στο σωρό 2 τα πληθυσμιακά επίπεδα μειώνονται στη 2<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση ( $10.21 \cdot 10^4$  cfu/g ξ.δ.). Ο σωρός 2 εμφανίζει πολύ χαμηλότερα πληθυσμιακά επίπεδα αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων σε σχέση με το σωρό 1, σε όλες τις φάσεις της κομποστοποίησης. Ιδιαίτερα σημαντικός ήταν ο εντοπισμός ενεργού θερμοανθεκτικής μικροχλωρίδας κατά το στάδιο της 2<sup>ης</sup> θερμοφιλής φάσης και στους δύο σωρούς, γεγονός που υποδηλώνει ότι μέρος του αρχικού πληθυσμού αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων έχει προσαρμοστεί στην υψηλή θερμοκρασία και παραμένει ενεργό. Δυστυχώς δεν κατέστη δυνατό να απομονωθούν αζωτοδεσμευτικά βακτήρια σε καθαρή καλλιέργεια από τη θερμοφιλή φάση. Είναι ολοφάνερο ότι η αντιμικροβιακή δράση των ΥΑΕ είχε δυσμενή επίδραση και στους αζωτοδεσμευτικούς πληθυσμούς, οι οποίοι εμφανίστηκαν μειωμένοι σε όλες τις φάσεις της κομποστοποίησης στο σωρό 2.

Ιδιαίτερα σημαντική ήταν η παρατήρηση της αζωτοδεσμευτικής δραστηριότητας των δειγμάτων του κόμποστ στο σωρό 1, τόσο στην 1<sup>η</sup> όσο και στη 2<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση. Το αποτέλεσμα αυτό συμβαδίζει με την υψηλή αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα του πληθυσμού των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων στους 50 °C.

Αξιοσημείωτο είναι ότι σχεδόν σε όλες τις φάσεις της κομποστοποίησης, όλες οι μικροβιακές ομάδες εμφανίζονται σε χαμηλότερα πληθυσμιακά επίπεδα στο σωρό 2 (συγκομποστοποίηση

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΥΕΒ και ΥΑΕ). Οι Abid & Sayadi (2006) υποστηρίζουν ότι η ύπαρξη υδατοδιαλυτών φαινολών στα ΥΑΕ αυξάνει τη μικροβιακή τοξικότητα αυτών των αποβλήτων.

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, έγινε προσπάθεια ταυτοποίησης τριών αζωτοδεσμευτικών βακτηριακών στελεχών από τα 18 συνολικά στελέχη που απομονώθηκαν. Η ταυτοποίηση έγινε με τη χρήση μοριακών τεχνικών. Μελετήθηκαν δύο γονίδια, το 16S rRNA και το *nifH*. Το γονίδιο 16S rRNA χρησιμοποιείται ευρέως στη διεξαγωγή φυλογενετικών δένδρογραμμάτων, καθώς αποτελεί εξαιρετικό μόριο για την εξακρίβωση των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των προκαρυωτικών οργανισμών, για τους λόγους που έχουν προαναφερθεί στο *Κεφάλαιο 1, §4.4.8*. Το γονίδιο *nifH* μελετάται τόσο για την πιστοποίηση της αζωτοδεσμευτικής ικανότητας των βακτηρίων, όσο και για τη μελέτη της εξελικτικής απόστασης αυτών. Το ένζυμο νιτρογενάση είναι υψηλά συντηρημένο κατά την εξέλιξη, και για αυτό η κλωνοποίηση και αλληλούχιση ενός από τα δομικά γονίδια της νιτρογενάσης, του *nifH*, έχει οδηγήσει στη δημιουργία μια μεγάλης και ταχέως επεκτεινόμενης βάσης δεδομένων από αλληλουχίες προερχόμενες από ποικίλα εδαφικά και υδατικά ενδιαίτηματα (Zehr *et al.*, 2003).

Οι αλληλουχίες 16S rRNA και *nifH* των τριών στελεχών (Co1, Co2, Co5) συγκρίθηκαν με αλληλουχίες ήδη ταυτοποιημένων οργανισμών οι οποίες είναι καταχωρημένες σε διεθνείς βάσεις δεδομένων και βρέθηκε υψηλή ομολογία, τόσο μέσω 16S rRNA όσο και μέσω *nifH*, με αζωτοδεσμευτικούς οργανισμούς των γενών *Klebsiella*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*.

Το γένος *Klebsiella* ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Πήρε το όνομά του από τον μικροβιολόγο Edwin Klebs και χαρακτηρίζεται από ραβδόμορφα, αρνητικά κατά Gram, γ-*Proteobacteria*, τα οποία διαβιούν στο νερό, στο έδαφος και στα φυτά, και είναι παθογόνα για τα ζώα και τους ανθρώπους. Το γένος *Klebsiella* περιλαμβάνει μη κινητά βακτήρια (εκτός του *K. mobilis*). Στα φυτά, στελέχη της *K. pneumoniae* που είναι ικανά να διαβιούν ως ενδόφυτα, είναι εξαιρετικής σημασίας, καθώς προωθούν τη φυτική ανάπτυξη και παρέχουν διαθέσιμο άζωτο στο έδαφος. Μελέτες με χρήση μοριακών τεχνικών, πρότειναν την παρουσία *Klebsiella* σε γλυκοπατάτα, ενώ στελέχη έχουν απομονωθεί από το εσωτερικό του ρυζιού, του αραβόσιτου, του ζαχαροκάλαμου, και της μπανάνας. Στελέχη *Klebsiella* επίσης αποτελούν ανθρώπινα παθογόνα, μολύνοντας τα τρόφιμα. Στους ανθρώπους ορισμένα στελέχη της *K. pneumoniae* προκαλούν λοιμώξεις του ουροποιητικού, καθώς και πνευμονία, οδηγώντας σε σηψαιμία και σε θάνατο. Στελέχη *Klebsiella* απαντώνται συχνά σε μια ποικιλία φυτών – ξενιστών. Το στέλεχος

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

*K. pneumoniae* 342 είναι ένα συμβιωτικό, αζωτοδεσμευτικό ενδόφυτο, το οποίο είναι ικανό να παρέχει μικρές αλλά ικανές ποσότητες διαθέσιμου αζώτου υπό τη μορφή αμμωνίας, αποικώντας το εσωτερικό των φυτών – ξενιστών και λαμβάνοντας ζωτικά θρεπτικά και προστασία, χωρίς το σχηματισμό συμβιωτικών δομών ή την πρόκληση συμπτωμάτων ασθενειών (Fouts *et al.*, 2008). Τα είδη *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* και *K. planticola* έχουν την ικανότητα να αζωτοδεσμεύουν, και ταξινομούνται σαν αζωτοδεσμευτικά (Brisse *et al.*, 2006).

Το γένος *Sphingomonas* ανήκει στην οικογένεια *Sphingomonadaceae* και περιλαμβάνει ραβδόμορφα βακτήρια, αρνητικά κατά Gram, αυστηρά αερόβια, χημειολιθότροφα, τα οποία σχηματίζουν τυπικές αποικίες κίτρινου χρώματος. Έχουν απομονωθεί από μια ποικιλία υδατικών και εδαφικών ενδιαιτημάτων, σε ριζικά συστήματα, κλινικά δείγματα και αλλού. Τα περισσότερα είναι μεσόφιλα και αυξάνονται στους 30 °C. Πολλά είδη αποικοδομούν μονο-, δι- και πολυσακχαρίτες. Επίσης έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν ένα μεγάλο εύρος μολυσματικών ουσιών του περιβάλλοντος, καθώς και να αναπτύσσονται σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών (Balkwill *et al.*, 2006). Το γένος *Sphingomonas* περιλαμβάνει περισσότερα από 55 είδη. Το *S. azotifigens* είναι γνωστό για την αζωτοδεσμευτική του ικανότητα (Videira *et al.*, 2009).

Το γένος *Burkholderia* ανήκει στην οικογένεια *Burkholderiaceae*, και περιλαμβάνει βακτήρια που απαντώνται πολύ συχνά στο περιβάλλον. Επίσης αποτελούν ανθρώπινα και φυτικά παθογόνα. Είναι βακτήρια κινητά, ραβδόμορφα, αρνητικά κατά Gram και υποχρεωτικά αερόβια. Απαντώνται πολύ συχνά στο έδαφος. Το είδος *B. vietnamiensis* έχει απομονωθεί από τη ριζόσφαιρα του ρυζιού, ως αζωτοδεσμευτικός οργανισμός (Woods *et al.*, 2006).

Σύμφωνα με το φυλογενετικό δενδρόγραμμα του 16S rRNA τα Co1 και Co5 εμφανίζουν μεγάλη ομολογία με το στέλεχος *K. pneumoniae* 342 και όλα μαζί ομαδοποιούνται σε κλάδο. Μετά από ευθυγράμμιση των υπό μελέτη στελεχών μεταξύ τους προέκυψε ότι το Co1 εμφανίζει κατά 99.1% ομοιότητα με το Co5.

Το Co2 εμφανίζεται να έχει μεγαλύτερη εξελικτική απόσταση στο φυλογενετικό δενδρόγραμμα του 16S rRNA, σε σχέση με τα άλλα δύο στελέχη. Το στέλεχος αυτό ομαδοποιείται σε κλάδο με το στέλεχος *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* MGH 78578. Το Co2, μετά από ευθυγράμμιση των στελεχών, προκύπτει ότι εμφανίζει 99.3% ομοιότητα με το Co1 και 99.3% ομοιότητα με το Co5.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με το φυλογενετικό δένδρόγραμμα του *nifH* το Co5 εμφανίζει μεγάλη ομοιότητα με τα στελέχη *Klebsiella sp.* Y57 και *Sphingomonas sp.* Y49 και μαζί αποτελούν ένα κλάδο. Το Co1 ομαδοποιείται σχηματίζοντας κλάδο με τα στελέχη *K. pneumoniae* 342 και *K. pneumoniae* strain NG14. Μετά από ευθυγράμμιση των υπό μελέτη στελεχών μεταξύ τους προέκυψε ότι το Co1 εμφανίζει κατά 98.8% ομοιότητα με το Co5.

Το Co2 εμφανίζεται να έχει μεγαλύτερη εξελικτική απόσταση από τα άλλα δύο στελέχη στο φυλογενετικό δένδρόγραμμα του *nifH*, σε σχέση με το φυλογενετικό δένδρόγραμμα του 16S rRNA. Το στέλεχος αυτό φαίνεται να ομαδοποιείται σε κλάδο με το στέλεχος *Klebsiella sp.* MNS 801b. Το Co2 εμφανίζει 89.7% ομοιότητα με το Co1 και 89.7% ομοιότητα με το Co5. Αξιοσημείωτο είναι ότι μοιάζουν περισσότερο εξελικτικά, στελέχη που απομονώθηκαν από διαφορετικούς σωρούς (**Co1**: σωρός 2, 1<sup>η</sup> δειγματοληψία; **Co5**: σωρός 1, 2<sup>η</sup> δειγματοληψία).

Επομένως και τα δύο γονίδια παρέχουν παραπλήσιες (εντούτοις όχι όμοιες) πληροφορίες εξελικτικών αποστάσεων μεταξύ των αζωτοδεσμευτικών οργανισμών, οπότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν ασφαλώς, κυρίως συνδυαστικά. Σίγουρα χρειάζεται και η μελέτη επιπλέον γονιδίων για τη διεξαγωγή ακριβέστερων εξελικτικών σχέσεων αυτών των στελεχών, το οποίο μπορεί να αποτελέσει αντικείμενο μελλοντικών ερευνών.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι αρκετά από τα απομονωθέντα αζωτοδεσμευτικά στελέχη (εξαιρουμένων αυτών που μελετήθηκαν με μοριακές τεχνικές), έδωσαν θετική ένδειξη στη δοκιμή αναγωγής ακετυλενίου προς αιθυλένιο, μόνο όταν αυτά βρίσκονταν σε μικτές καλλιέργειες. Όταν όμως αυτά τα στελέχη απομονώθηκαν σε καθαρές καλλιέργειες, έδωσαν αρνητική ένδειξη στη δοκιμή του ακετυλενίου. Μελλοντικά, θα παρουσίαζε ενδιαφέρον η μελέτη των εν λόγω στελεχών με τη χρήση μοριακών τεχνικών, για την ύπαρξη ή όχι σε αυτά, του γονιδίου *nifH*.

Συμπερασματικά, παρατηρείται ότι η συγκομποστοποίηση YEB με YAE επέφερε τις εξής αλλαγές στο σωρό 2, σε σχέση με το σωρό 1:

1. Υψηλότερες θερμοκρασίες και παρατεταμένη 2<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση.
2. Επαναλαμβανόμενη αύξηση της θερμοκρασίας του σωρού σε τιμές μεγαλύτερες των 40 °C, και εκτός των θερμοφίλων φάσεων (ημέρες 29<sup>η</sup>, 84<sup>η</sup>). Ο σωρός συμπερασματικά ανέπτυξε ευνοϊκότερες θερμοκρασίες μικροβιακής ζύμωσης, γεγονός που βελτίωσε τη

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

διαδικασία κομποστοποίησης, οδηγώντας έτσι σε ταχύτερη σταθεροποίηση του προϊόντος.

3. Όξινο pH κατά την εγκατάσταση, εντούτοις αλκαλικό στα επόμενα στάδια.
4. Υψηλότερες τιμές ηλεκτρικής αγωγιμότητας.
5. Χαμηλότερη περιεκτικότητα σε αμμωνιακό και νιτρικό άζωτο.
6. Καλύτερο πρότυπο μεταβολής του λόγου  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ , ένδειξη ταχύτερης πορείας προς την ωρίμανση.
7. Μικρότερη αύξηση στην περιεκτικότητα σε ολικό N.
8. Χαμηλότερα πληθυσμιακά επίπεδα για όλες τις μικροβιακές κοινότητες, σε όλες τις φάσεις της κομποστοποίησης.

Η πορεία της κομποστοποίησης προχώρησε ικανοποιητικά και για τους δύο σωρούς, τουλάχιστον ως την 68<sup>η</sup> ημέρα (ημέρα τελευταίας δειγματοληψίας). Επομένως η συγκομποστοποίηση των δύο αυτών αγροτοβιομηχανικών υποπροϊόντων (YEB & YAE) αποτελεί μια περιβαλλοντικά ορθή πρακτική, η οποία μπορεί να δώσει λύση στο πρόβλημα διαχείρισης των YAE. Απαιτείται όμως και μελέτη του τελικού προϊόντος, καθώς η σημασία της κομποστοποίησης έγκειται στην ικανότητα χρήσης του τελικού προϊόντος, το οποίο αναμένεται να είναι ένα σταθεροποιημένο, ελεύθερο από οσμές, οργανοχουμικό προϊόν, ικανό να χρησιμοποιηθεί ως εδαφοβελτιωτικό μέσο. Μελλοντικά, ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των ποσοτήτων YAE που μπορεί να αφομοιώσει η μέθοδος της συγκομποστοποίησης, σαν σύστημα ορθολογικής διαχείρισης των YAE και στερεών αγροτοβιομηχανικών υποπροϊόντων.

Σε αυτό το σημείο χρήζει ιδιαίτερης αναφοράς η εύρεση της απαιτούμενης ποσότητας των YEB που δύναται να αφομοιώσει με συγκομποστοποίηση, την ετήσια παραγωγή YAE ενός μέσου ελαιοτριβείου. Τα υγρά απόβλητα τα οποία παράγονται ετησίως από ένα τυπικό ελαιοτριβείο υπολογίζονται σε 1200 τόνους, εκ των οποίων 1000 τόνοι είναι καθαρά υγρά, εάν αφαιρεθούν τα στερεά υπολείμματα. Στην παρούσα μελέτη 210 l YAE χρησιμοποιήθηκαν για τη διαβροχή 70 kg YEB. Εύκολα λοιπόν συμπεραίνεται ότι για να διατεθούν 1000 τόνοι YAE προς συγκομποστοποίηση με YEB, πραγματοποιώντας μία μόνο διαβροχή, απαιτούνται περίπου 350 τόνοι YEB. Εάν φυσικά πραγματοποιηθούν περισσότερες διαβροχές με YAE ανά σωρό κομποστοποίησης, η απαιτούμενη ποσότητα YEB μειώνεται σημαντικά. Πρέπει όμως να ληφθεί

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

υπόψη η επικείμενη αύξηση στο pH που θα προκύψει από τις επαναλαμβανόμενες διαβροχές με ΥΑΕ. Προκειμένου το τελικό προϊόν να διατεθεί ως εδαφοβελτιωτικό, θα ήταν ορθό το pH να διορθωθεί, πιθανόν με την προσθήκη θείου ( $S^0$ ), όπως προτείνεται από τους Mari *et al.* (2005). Οι τελευταίοι παρατήρησαν μείωση της τιμής του pH σε σωρό κομποστοποίησης ελαιόπαστας χωρίς κουκούτσια (olive press cake) με επαναλαμβανόμενη διαβροχή αυτού με ΥΑΕ, μετά την προσθήκη θείου.





## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄. ΣΥΝΘΕΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ & ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ - ΧΡΩΣΕΙΣ

---

### 1. Φυσικοχημικές Παράμετροι

---

#### 1.1 Προσδιορισμός του νιτρικού αζώτου ( $N-NO_3^-$ )

Διάλυμα KCl 2M: Σε τελικό όγκο 1l απιονισμένο  $H_2O$  διαλύονται 149.1026 g χλωριούχου καλίου (KCl).

Πυκνό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου ( $NH_4Cl$ ): 100 g  $NH_4Cl$  διαλύονται σε 500 ml απιονισμένου νερού και διατηρείται σε γυάλινο ή πλαστικό δοχείο.

Αραιό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου ( $NH_4Cl$ ): 50 g  $NH_4Cl$  διαλύονται σε 2 l απιονισμένου νερού και διατηρείται σε γυάλινο ή πλαστικό δοχείο.

Αντιδραστήριο diazoting: 0.5 g σουλφανιλαμίνης διαλύονται σε 100 ml HCl 2.4M. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.

Αντιδραστήριο σύζευξης (coupling): 0.3 g (N-(1-naphthyl)-ethylenediamine)hydrochloride διαλύονται σε 100 ml HCl 0.12M. Το διάλυμα διατηρείται στο ψυγείο σε αδιαφανή φιαλίδια.

#### 1.2 Προσδιορισμός του αμμωνιακού αζώτου ( $N-NH_4^+$ )

Διάλυμα phenol-nitroprusside: 7 g φαινόλης και 34 mg νιτροπρωσσικού νατρίου (sodium nitroprusside) διαλύονται σε 100 ml απιονισμένου νερού, εντός ογκομετρικής φιάλης των 100 ml. Φυλάσσεται στο ψυγείο σε φιάλη σκούρου χρώματος.

Αντιδραστήριο ρυθμισμένου (buffered) υποχλωριώδους νατρίου: σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml διαλύονται 1.48 g NaOH σε 70 ml απιονισμένου νερού, προστίθενται 4.98 g  $Na_2HPO_4$  και 20 ml υποχλωριώδους νατρίου. Τελικό pH 11.4 – 12.2. Αραίωση μέχρι τελικό όγκο 100 ml.

EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid): σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml διαλύονται 6 g δινατρικού-EDTA σε 80 ml απεσταγμένου νερού. Ρύθμιση σε pH=7, ανάμιξη και αραίωση σε τελικό όγκο 100 ml.

### **1.3 Προσδιορισμός του ολικού αζώτου (μέθοδος Kjeldahl)**

Διάλυμα H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> & σαλικυλικού: προσθήκη 25 g σαλικυλικού σε 1 l πυκνού H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Διάλυμα βορικού οξέος 20%: διάλυση 20 ml βορικού σε 1 l νερό.

Δείκτης: 0.35 g bromcresol green προστίθενται σε ογκομετρική φιάλη των 250 ml, στην οποία έχουν προστεθεί 10 ml αλκοόλης. Προσθήκη 10 ml NaOH 0.1N. Προσθήκη 150 ml απιονισμένου νερού, 22 ml 1% roncean 4R και 0.75 g nitrophenol μετά από διάλυση σε 5 ml αλκοόλης. Συμπλήρωση του όγκου μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό και ανάδευση.

## **2. Κλασσικές Μικροβιολογικές Αναλύσεις**

---

### **2.1 Διαδοχικές αραιώσεις**

Διάλυμα Ringer: Σε τελικό όγκο 1l απιονισμένο H<sub>2</sub>O διαλύονται 9 g NaCl, 0.42 g KCl, 0.48 g CaCl<sub>2</sub>, 0.2 g NaHCO<sub>3</sub>. Το διάλυμα αποστειρώνεται στους 121 °C για 15 min και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

### **2.2 Ανάπτυξη - απομόνωση μικροοργανισμών**

Nutrient Θρεπτικό μέσο: Σε τελικό όγκο 1l απιονισμένο H<sub>2</sub>O διαλύεται Nutrient Broth. Για την παρασκευή στερεού μέσου προστίθεται στο τελικό διάλυμα 1,8% (w/v) άγαρ. Το διάλυμα αποστειρώνεται στους 121 °C για 15 min και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου για άμεση χρήση, ή στους 4 °C.

Potato Dextrose Θρεπτικό μέσο: Σε τελικό όγκο 1l απιονισμένο H<sub>2</sub>O διαλύεται PD Broth και προστίθενται 0.033 g χρωστικής Rose bengal. Για την παρασκευή στερεού μέσου προστίθεται στο τελικό διάλυμα 1,8% (w/v) άγαρ. Το διάλυμα αποστειρώνεται στους 121 °C για 15 min και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου για άμεση χρήση, ή στους 4 °C. Το θρεπτικό υλικό πριν το μοίρασμα στα τρυβλία αφήνεται να κρυώσει, και προστίθεται αντιβιοτικό διάλυμα στρεπτομυκίνης (1 ml/l από διάλυμα 0.03 g/ml).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄

Glycerol – Casein Θρεπτικό μέσο: Σε τελικό όγκο 1l απιονισμένο H<sub>2</sub>O διαλύονται:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα (g/l)
Glycerol	10 (8.5 ml)
Casein vitamin free	0.3
KNO <sub>3</sub>	2
NaCl	2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.05
CaCO <sub>3</sub>	0.02
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.01
Agar	18
Cycloheximide heat stable	0.05
Adjust PH to 7.0 with HCl	

Το διάλυμα αποστειρώνεται στους 121 °C για 15 min και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου για άμεση χρήση, ή στους 4 °C.

CMC Θρεπτικό μέσο: Σε τελικό όγκο 1l απιονισμένο H<sub>2</sub>O διαλύονται:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα (g/l)
Carboxymethylcellulose sodium salt	10
L-asparagine	0.5
Yeast extract	0.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1
KCl	0.5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2
CaCl <sub>2</sub>	0.1
Agar	18

Το συγκεκριμένο θρεπτικό απαιτεί θέρμανση κατά την παρασκευή για την πλήρη διάλυση της κυτταρίνης. Το διάλυμα αποστειρώνεται στους 121 °C για 15 min και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου για άμεση χρήση, ή στους 4 °C.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄

Rennie Θρεπτικό μέσο: Σε τελικό όγκο 1l απιονισμένο H<sub>2</sub>O διαλύονται:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα (g/l)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2
NaCl	0,1
Na <sub>2</sub> FeEDTA	0,028
Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,025
Yeast Extract	0,1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub>	0,06
Mannitol	5,0
Sucrose	5,0
Sodium Lactate (60% v/v)	0,5 ml
Biotin (0,1 g/l)	5*10 <sup>-6</sup>
PABA (0,2 g/l)	10*10 <sup>-6</sup>

Για την παρασκευή στερεού μέσου προστίθεται στο τελικό διάλυμα 1,8% (w/v) άγαρ, ενώ για την παρασκευή ημιστερεού μέσου προστίθεται 0,18% άγαρ. Το διάλυμα αποστειρώνεται στους 121 °C για 15 min και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου για άμεση χρήση, ή στους 4 °C.

### Αντιβιοτικά

Διάλυμα στρεπτομυκίνης: Ανά 1 ml αποστειρωμένου ddH<sub>2</sub>O διαλύονται 30 mg στρεπτομυκίνης. Αποστείρωση του διαλύματος με φιλτράρισμα αυτού μέσα από διηθητικό φίλτρο (0,22 μm). Διατήρηση στους -20 °C.

## 2.3 Χρώσεις

### Τεχνική χρώσης ενδοσπορίου

1. Μικρή ποσότητα καλλιέργειας μεταφέρεται με το μικροβιολογικό κρίκο σε μία καθαρή αντικειμενοφόρο, όπου απλώνεται καλά (αν χρειάζεται αραιώνεται πρώτα σε μία σταγόνα νερού).

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄

2. Ξήρανση του δείγματος με ελαφρή θέρμανση της αντικειμενοφόρου στη φλόγα ενός λύχνου, ώστε τα βακτηριακά κύτταρα να προσηλωθούν πάνω στην αντικειμενοφόρο.
3. Κάλυψη του δείγματος με μικρό κομμάτι απορροφητικού χαρτιού, το οποίο διαποτίζουμε με χρωστική «πράσινο του μαλαχίτη». Άτμισμα του δείγματος πάνω από νερό που βράζει για 5 min. Προσθήκη επιπλέον χρωστικής εάν η τελευταία εξατμιστεί.
4. Αφήνεται η αντικειμενοφόρος να κρυώσει, αφαίρεση του χαρτιού και ξέπλυμα με νερό για 30 sec.
5. Κάλυψη του παρασκευάσματος με σαφρανίνη για 20 sec.
6. Ξέπλυμα με νερό για απομάκρυνση της σαφρανίνης.
7. Στέγνωμα με διηθητικό χαρτί και παρατήρηση του δείγματος με χρήση ελαιοκαταδυτικού φακού.

### **3. Μοριακές Τεχνικές**

---

#### **3.1 Υποστρώματα**

LB θρεπτικό μέσο: Σε τελικό όγκο 1l απιονισμένο H<sub>2</sub>O διαλύονται 10 g Tryptone ή Peptone, 10 g NaCl, 5 g yeast extract. Για την παρασκευή στερεού μέσου προστίθεται στο τελικό διάλυμα 1,6% άγαρ. Το διάλυμα αποστειρώνεται στους 121 °C για 15 min και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου για άμεση χρήση, ή στους 4 °C.

LB θρεπτικό μέσο με αμικιλίνη: Παρασκευή του στερεού LB όπως παραπάνω. Μετά την αποστείρωση του υλικού, το θρεπτικό αφήνεται να κρυώσει, και μετά προστίθεται αντιβιοτικό αμικιλίνης (100 mg/ml) σε αναλογία 1:1000. Διατήρηση των τρυβλίων στους 4 °C.

#### **3.2 Αντιβιοτικά**

Διάλυμα αμικιλίνης (100 mg/ml): Ανά 1 ml αποστειρωμένου ddH<sub>2</sub>O διαλύονται 100 mg αμικιλίνης. Αποστείρωση του διαλύματος με φιλτράρισμα αυτού μέσα από διηθητικό φίλτρο (0.22 μm). Διατήρηση στους -20 °C.

### **3.3 Διαλύματα ηλεκτροφόρησης**

Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml): Ανά 1 ml αποστειρωμένου ddH<sub>2</sub>O διαλύονται 10 mg EthBr. Διατήρηση στους 4 °C.

### **3.4 Διαλύματα για Transformation**

IPTG 1M (Μοριακό Βάρος: 238.31): Ανά 1 ml αποστειρωμένου ddH<sub>2</sub>O διαλύονται 0,23831 g IPTG. Αποστείρωση του διαλύματος με φιλτράρισμα αυτού μέσα από διηθητικό φίλτρο (0.22 μm). Διατήρηση στους -20 °C.

X-Gal (20 mg/ml): Ανά 1 ml διμεθυλ-φορμαμίδιου διαλύονται 20 mg X-Gal. Πραγματοποίηση της αντίδρασης εντός απαγωγού. Διατήρηση στους -20 °C.

### **3.5 Διαλύματα για Boiling Preparation**

STET Medium: Σακχαρόζη 8%, Triton-X 100 5%, 50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA pH 8. Διατήρηση στους 4 °C.

Διάλυμα λυσοζύμης: Ανά 1 ml αποστειρωμένου ddH<sub>2</sub>O διαλύονται 50 mg λυσοζύμης. Διατήρηση στους -20 °C.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β΄.

**1. Φυσικοχημικές Παράμετροι****Πίνακας 1.1** Συγκεντρωτική παρουσίαση της εξέλιξης των κυριότερων παραμέτρων κατά την αρχική (Α), 1<sup>η</sup> θερμοφιλή (Θ1), μεσόφιλη (Μ), 2<sup>η</sup> θερμοφιλή (Θ2) φάση της κομποστοποίησης.

Δείγμα	Ημέρες Κομποστ.	Υγρασία (%)	pH	EC (mS/cm)	Ολικό N (%)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> - N (μg/g)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - N (μg/g)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	cm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> /100g/h
<b>Σωρός 1 (YEB)</b>									
A	0	73.10	7.20	3.00	1.43	198.03	51.06	3.88	36.64
Θ1	5	58.60	7.08	4.55	2.37	117.07	43.52	2.69	34.46 (30 °C) 32.07 (50 °C)
M	61	49.13	7.35	4.00	2.55	145.52	67.12	2.17	27.16
Θ2	67	73.60	7.70	2.53	3.19	306.18	49.69	6.16	59.95 (30 °C) 58.52 (50 °C)
<b>Σωρός 2 (YAE + YEB)</b>									
A	0	73.43	6.45	5.10	1.88	270.13	147.53	1.83	51.56
Θ1	6	54.05	7.70	4.19	2.17	46.24	7.47	6.19	29.62 (30 °C) 31.38 (50 °C)
M	62	48.53	7.60	5.87	2.86	31.17	19.71	1.58	28.74
Θ2	68	73.30	7.80	3.74	3.07	75.40	21.67	3.48	51.13 (30 °C) 51.90 (50 °C)

## 2. Μικροβιολογικές αναλύσεις με χρήση κλασσικών μεθόδων

### 2.1 Διακύμανση ABM μικροβιακών ομάδων στις φάσεις της κομποστοποίησης

**Πίνακας 2.1** Συγκεντρωτική παρουσίαση της διακύμανσης του ABM των μικροβιακών ομάδων ανά g ξηρού δείγματος, κατά την αρχική (A), 1<sup>η</sup> θερμοφίλη (Θ1), μεσόφιλη (M), 2<sup>η</sup> θερμοφίλη (Θ2) φάση της κομποστοποίησης.

Δείγμα	Ολικά Βακτήρια	Μύκητες	Ακτινομύκητες	Σποριογόνα Βακτήρια	Κυτταρινολυτικά Βακτήρια	Αζωτοδεσμευτικά Βακτήρια
<b>Σωρός 1 (YEB)</b>						
A	1.64*10 <sup>10</sup>	8.46*10 <sup>7</sup>	6.80*10 <sup>8</sup>	1.27*10 <sup>9</sup>		10.2*10 <sup>6</sup>
Θ1	3.76*10 <sup>9</sup>	1.50*10 <sup>7</sup>	3.10*10 <sup>7</sup>	8.28*10 <sup>8</sup>		4.33*10 <sup>6</sup>
M	1.71*10 <sup>11</sup>	1.11*10 <sup>8</sup>	1.77*10 <sup>9</sup>	1.26*10 <sup>9</sup>	5.95*10 <sup>10</sup>	5.50*10 <sup>6</sup>
Θ2	4.58*10 <sup>9</sup>	3.50*10 <sup>6</sup>	2.04*10 <sup>9</sup>	1.40*10 <sup>10</sup>	1.20*10 <sup>11</sup>	29.98*10 <sup>6</sup>
<b>Σωρός 2 (YEB +YAE)</b>						
A	6.13*10 <sup>8</sup>	2.50*10 <sup>6</sup>	4.41*10 <sup>7</sup>	1.17*10 <sup>8</sup>		1.43*10 <sup>6</sup>
Θ1	2.66*10 <sup>8</sup>	6.93*10 <sup>5</sup>	1.91*10 <sup>6</sup>	8.38*10 <sup>7</sup>		13.96*10 <sup>3</sup>
M	1.91*10 <sup>11</sup>	1.84*10 <sup>7</sup>	4.53*10 <sup>9</sup>	1.35*10 <sup>9</sup>	4.65*10 <sup>9</sup>	25.71*10 <sup>4</sup>
Θ2	4.28*10 <sup>9</sup>	8.72*10 <sup>6</sup>	6.34*10 <sup>6</sup>	2.58*10 <sup>9</sup>	1.71*10 <sup>10</sup>	10.20*10 <sup>4</sup>

### 2.2 Κυτταρινόλυση σε CMC Άγαρ

**Πίνακας 2.2** Δείκτης υδρόλυσης θρεπτικού κυτταρίνης από κυτταρινολυτικά βακτήρια 3<sup>ης</sup> & 4<sup>ης</sup> δειγματοληψίας σωρού 1 και 2. Με κόκκινο σημειώνονται στελέχη με το μεγαλύτερο δείκτη κυτταρινόλυσης. Απαιτείται περαιτέρω μελέτη μεμονωμένης αποικίας του εκάστοτε στελέχους για πληρέστερη εικόνα της κυτταρινόλυσης.

3η δειγματοληψία (2η μεσόφιλη)				4η δειγματοληψία (2η θερμοφίλη)		
α/α	Διάμετρος Ζώνης (cm)	Διάμετρος αποικίας (cm)	Δείκτης Κυτταρινόλυσης [(δ.ζ./δ.α.)*100]	Διάμετρος Ζώνης (cm)	Διάμετρος αποικίας (cm)	Δείκτης Κυτταρινόλυσης [(δ.ζ./δ.α.)*100]
<b>Σωρός 1 (YEB)</b>						
1	0.7	0.4	175.00	2.5	0.1	<b>2500.00</b>
2	0.8	0.4	200.00	3.3	1.2	275.00
3	2.2	0.1	2200.00	3.2	1.3	246.15
4	3.4	0.5	680.00	3.1	1.5	206.67
5	4	0.6	666.67	3.9	1.3	300.00
6	3	0.1	3000.00	2.9	0.7	414.29
7	3.7	0.4	925.00	3.3	0.8	412.50
8	3	0.9	333.33	3.4	0.9	377.78
9	4	0.7	571.43	2.2	0.1	2200.00



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β΄

10	3.2	0.3	1066.67	3	1	300.00
11	1.9	0.1	1900.00	2.7	0.7	385.71
12	0.9	0.2	450.00	2.8	0.8	350.00
13	0.9	0.4	225.00	1.7	0.2	850.00
14	1.4	0.4	350.00	3.4	0.7	485.71
15	3.5	0.1	3500.00	3	0.7	428.57
16	3.1	0.2	1550.00	4	2	200.00
17	3	0.3	1000.00	3.5	1	350.00
18	2.5	0.2	1250.00	2.7	1.9	142.11
19	3.1	0.1	3100.00	3.3	1.4	235.71
20	2.6	0.2	1300.00	5	0.4	1250.00
				3	0.3	1000.00
<b>Σωρός 2 (YEB+YAE)</b>						
1	2	0.5	400.00	1.7	0.3	566.67
2	1.9	6.2	30.65	2.6	0.1	2600.00
3	1.2	0.2	600.00	1.2	0.1	1200.00
4	2.2	0.5	440.00	2	0.2	1000.00
5	2	0.3	666.67	3	0.3	1000.00
6	2.6	0.2	1300.00	2	0.1	2000.00
7	3.4	0.4	850.00	2.1	0.1	2100.00
8	3.3	0.6	550.00	2.2	1.2	183.33
9	1.7	0.3	566.67	2.4	0.5	480.00
10	4	0.5	800.00	2.5	0.5	500.00
11	2.1	0.2	1050.00	2.1	0.5	420.00
12	1.7	0.2	850.00	1	0.1	1000.00
13	1.3	0.1	1300.00	1.3	0.1	1300.00
14	2.4	0.5	480.00	1.6	0.4	400.00
15	2.6	0.1	2600.00	2.3	0.3	766.67
16	0.6	0.3	200.00	2.5	1	250.00
17	1.8	0.2	900.00	2.5	0.6	416.67
18	0.8	0.2	400.00	2.2	0.3	733.33
19	1.1	0.2	550.00	3	0.1	3000.00
20	3.1	0.1	3100.00	3	1	300.00
21	2	0.1	2000.00	3.5	0.3	1166.67
22				2.67	0.9	296.67
23				2.87	1	287.00
24				1.6	0.2	800.00
25				2.6	0.8	325.00

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β'

26				1.4	0.1	1400.00
27				2.3	0.1	2300.00
28				2.5	0.8	312.50
29				2.5	0.3	833.33
30				1.5	0.2	750.00
31				2.9	0.3	966.67
32				1.8	0.3	600.00
33				1.8	0.2	900.00
34				2.5	0.7	357.14
35				2.5	1	250.00
36				2.6	0.2	1300.00
37				3	1.1	272.73

### *3. Μικροβιολογικές αναλύσεις με χρήση μοριακών τεχνικών*

---

#### *3.1 Νουκλεοτιδική ακολουθία *nifH* γονιδίου των στελεχών Co1, Co2, Co5.*

---

>Co1

ATCCTTCACGCTAAAGCCCAGAACACCATCATGGAGATGGCGGCGGAAGTGGGCTCGGTTCGAGGATCT  
GGAGCTCGAAGACGTTCTGCAAATCGGCTATGGCGATGTCCGTTGCGCCGAATCCGGCGGCCCGGAGC  
CAGGCGTCGGCTGCGCCGGACGCGGGGTGATCACCGCCATCAACTTCCTCGAGGAAGAAGGCGCCTAT  
GAAGAAGATTTGGATTTTCGTCTTCTATGACGTCCTCGGCGACGTGGTCTGCGGCGGCTTCGCTATGCCG  
ATCCGCGAAAACAAAGCCCAGGAGATCTACATCGTCTGCTCCGGCGAAATGATGGC

---

>Co2

ATCCTGCACGCCAAAGCACAGAACACCATTATGGAGATGGCCGCGGAAGTCGGCTCGGTTCGAGGACC  
TCGAACTCGAAGACGTGCTGCAAATTGGCTACGGCGACGTGCGCTGCGCGGAATCCGGCGGCCCGGA  
GCCGGGCGTCGGCTGCGCGGGACGCGGCGTGATCACGGCGATCAACTTTCTTGAAGAAGAAGGCGCC  
TACGAGGACGATCTCGATTTTCGTGTTCTATGACGTGCTCGGCGACGTGGTCTGCGGCGGCTTCGCCATG  
CCGATCCGCGAAAACAAAGCCCAGGAGATCTGCATCGTCTGCTCCGGTGAAATGATGGC

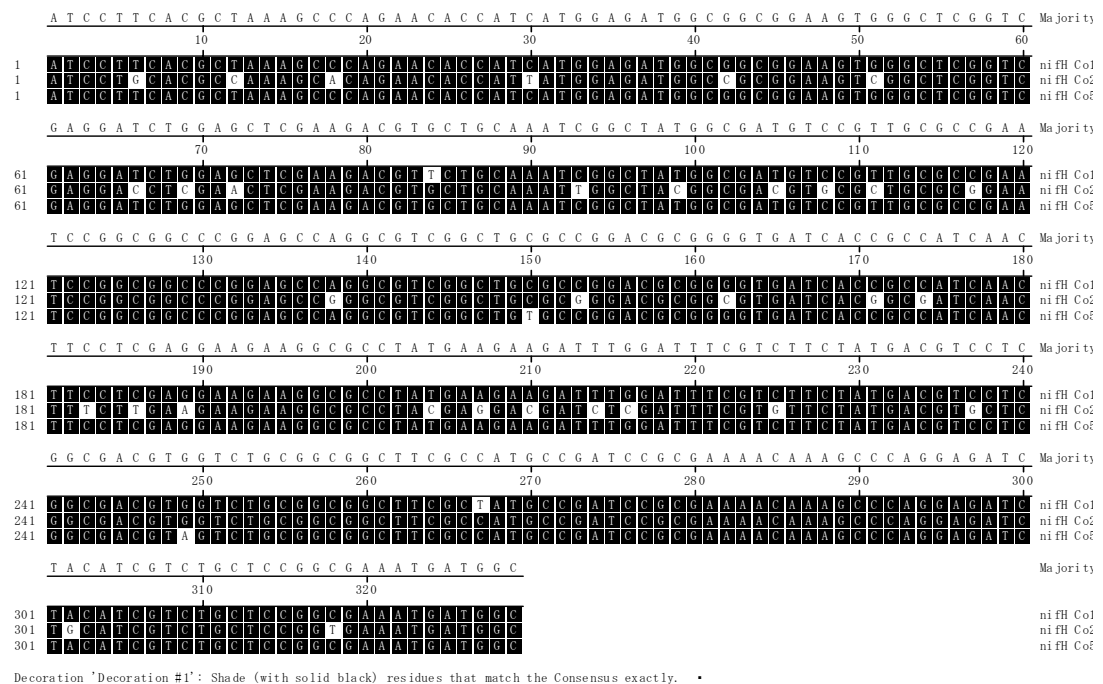
---

>Co5

ATCCTTCACGCTAAAGCCCAGAACACCATCATGGAGATGGCGGCGGAAGTGGGCTCGGTTCGAGGATCT  
GGAGCTCGAAGACGTGCTGCAAATCGGCTATGGCGATGTCCGTTGCGCCGAATCCGGCGGCCCGGAGC  
CAGGCGTCGGCTGTGCCGGACGCGGGGTGATCACCGCCATCAACTTCCTCGAGGAAGAAGGCGCCTAT  
GAAGAAGATTTGGATTTTCGTCTTCTATGACGTCCTCGGCGACGTAGTCTGCGGCGGCTTCGCCATGCC  
ATCCGCGAAAACAAAGCCCAGGAGATCTACATCGTCTGCTCCGGCGAAATGATG

---

### 3.2 Ευθυγράμμιση των αλληλουχιών *nifH* των στελεχών *Co1*, *Co2*, *Co5*.



**Εικόνα 3.1** Ευθυγράμμιση των αλληλουχιών *nifH* των *Co1*, *Co2*, *Co5* μεταξύ τους με τη χρήση του αλγόριθμου ClustalW του προγράμματος Lasergene 7.0. Με λευκή σκίαση παρουσιάζεται η ύπαρξη διαφορετικής βάσης.

### 3.3 Νουκλεοτιδική ακολουθία 16S rRNA γονιδίου των στελεχών *Co1*, *Co2*, *Co5*.

>Co1

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCAC  
 AGAGAGCTTGTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAG  
 GGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCG  
 GGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTGGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGA  
 CGATCCCTAGCTGGTGTGAGAGGATGACGAGACACGCACTGGAAGTGTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGG  
 GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTGTGAAG  
 AGGCCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGGTGAGGTTAATAACCTCACCGATTGA  
 CGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGC  
 GTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGG  
 CTCAACCTGGGAACTGCATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTG  
 TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTG  
 ACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGA  
 TGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAAGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGG  
 GAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCACGTGG  
 TTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGCATCCACAGAACTTCCAGAGATGGATT  
 GGTGCCCTTCGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGT

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β'

TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGAC  
TGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGGCTA  
CACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTA  
TGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCA  
GAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCA  
AAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTC  
GTAACAAGGTAGCCGTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCCGCCTG

---

>Co2

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCAC  
AGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAG  
GGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCGAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCG  
GGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAAACGGCTCACCTAGGCGA  
CGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGG  
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGA  
AGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGGTGAGGTTAATAACCTCATCGATTGA  
CGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGC  
GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGG  
CTCAACCTGGGAACTGCATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTG  
TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGCGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTG  
ACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGAT  
GTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAAGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGG  
AGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT  
TTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTAGCAGAGATGCTTTG  
GTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTT  
AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGGAACTCAAAGGAGACT  
GCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGGCTAC  
ACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTAT  
GTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAG  
AATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCA  
AAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCG  
TAACAAGGTAGCCGTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCCGCCTG

---

>Co5

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCAC  
AGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAG  
GGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCGAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCG  
GGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTGGTAGGTGGGGTAAACGGCTCACCTAGGCGA  
CGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGG  
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGA  
AGGGCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATAAAGTTAATAACCTTGTGATTGA  
CGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGC  
GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGG  
CTCAACCTGGGAACTGCATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTG  
TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTG  
ACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGA  
TGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAAGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGG  
GAGTACGGCCGCAAGGTTAAAGCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGG  
TTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTCCAGAGATGGATT  
GGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTT  
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGGAACTCAAAGGAGAC  
TGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGGCTA

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β΄

CACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTA  
TGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCA  
GAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCA  
AAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTC  
GTAACAAGGTAGCCGTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCCGCCTG

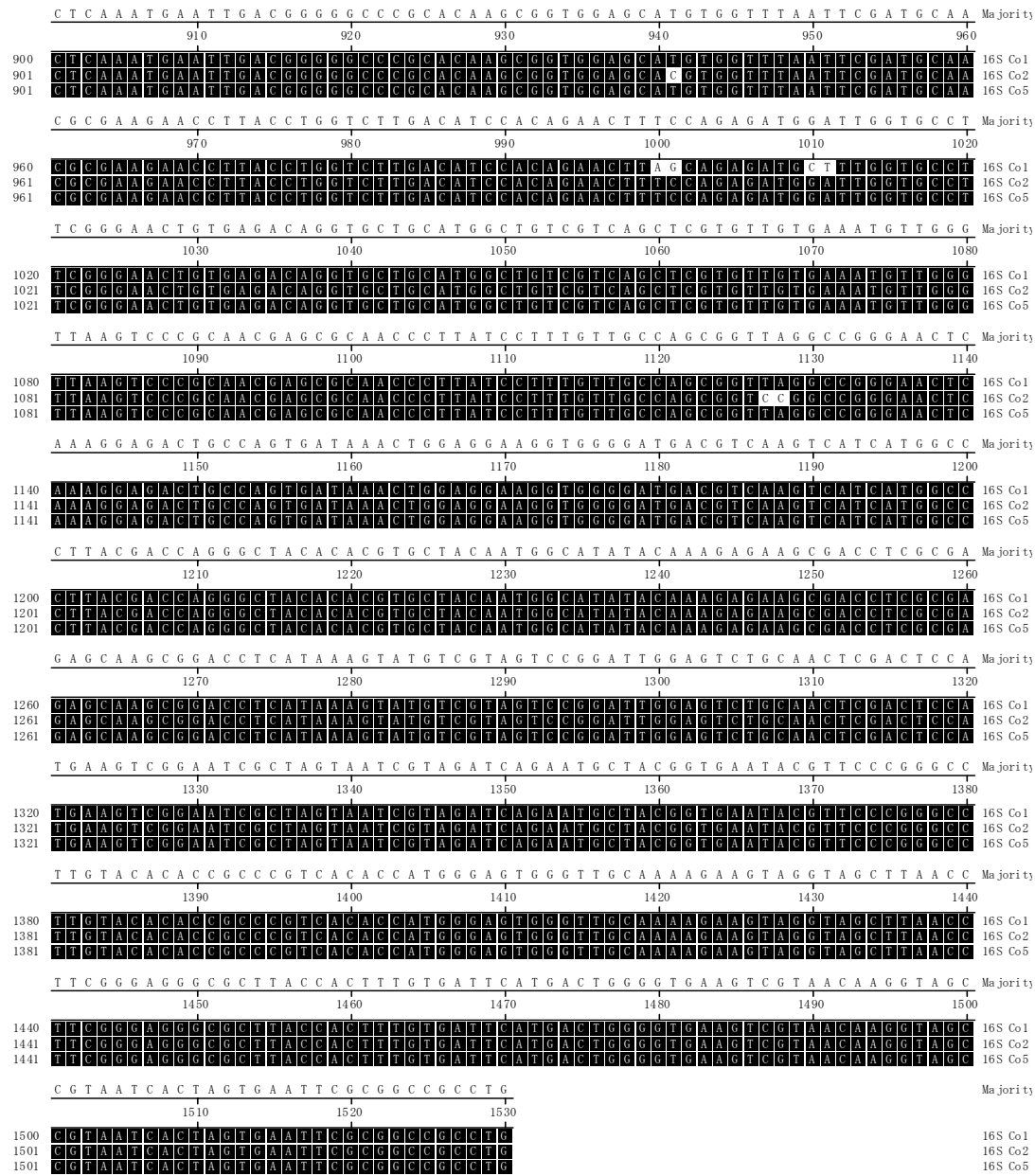
---

### 3.4 Ευθυγράμμιση των αλληλουχιών 16S rRNA των στελεχών Co1, Co2, Co5

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β΄

	A G A G T T T T G A T C C T T G G C T C A G A T T G A A C C G T T G G C G G C A G G C C T A A C A C A T G C A A G T C G A G C	Ma jority
	10 20 30 40 50 60	
1	A G A G T T T T G A T C C T T G G C T C A G A T T G A A C C G T T G G C G G C A G G C C T A A C A C A T G C A A G T C G A G C	16S Co1
1	A G A G T T T T G A T C C T T G G C T C A G A T T G A A C C G T T G G C G G C A G G C C T A A C A C A T G C A A G T C G A G C	16S Co2
1	A G A G T T T T G A T C C T T G G C T C A G A T T G A A C C G T T G G C G G C A G G C C T A A C A C A T G C A A G T C G A G C	16S Co5
	G G T A G C A C A G A G A G C T T G C T C T C G G G T G A C G A G C G G C G G A C G G G T G A G T A A T G T C T G G G A	Ma jority
	70 80 90 100 110 120	
61	G C T A G C A C A G A G A G C T T T G C T C T C G G G T G A C G A G C G G C G G A C G G G T G A G T A A T G T C T G G G A	16S Co1
61	G C T A G C A C A G A G A G C T T T G C T C T C G G G T G A C G A G C G G C G G A C G G G T G A G T A A T G T C T G G G A	16S Co2
61	G C T A G C A C A G A G A G C T T T G C T C T C G G G T G A C G A G C G G C G G A C G G G T G A G T A A T G T C T G G G A	16S Co5
	A A C T G C C T G A T T G G A G G G G G A T A A C T A C T G G A A A C G G T A G C T A A T A C C G C A T A A C G T C G C A	Ma jority
	130 140 150 160 170 180	
121	A A C T G C C T G A T T G G A G G G G G A T A A C T A C T G G A A A O G G T A G C T A A T A C C G C A T A A C G T C G C A	16S Co1
121	A A C T G C C T G A T T G G A G G G G G A T A A C T A C T G G A A A O G G T A G C T A A T A C C G C A T A A C G T C G C A	16S Co2
121	A A C T G C C T G A T T G G A G G G G G A T A A C T A C T G G A A A O G G T A G C T A A T A C C G C A T A A C G T C G C A	16S Co5
	A G A C C A A A G T G G G G G A C C T T C G G G C C T C A T G C C A T C A G A T G T G C C C A G A T G G G A T T A G C T	Ma jority
	190 200 210 220 230 240	
181	A G A C C A A A G T G G G G G A C C T T C G G G C C T C A T G C C A T C A G A T G T G C C C A G A T G G G A T T A G C T	16S Co1
181	A G A C C A A A G T G G G G G A C C T T C G G G C C T C A T G C C A T C A G A T G T G C C C A G A T G G G A T T A G C T	16S Co2
181	A G A C C A A A G T G G G G G A C C T T C G G G C C T C A T G C C A T C A G A T G T G C C C A G A T G G G A T T A G C T	16S Co5
	G G T A G G T G G G G T A A C G G G C T C A C C T A G G C G A C G A T C C C T A G C T G G T C T G A G A G G A T G A C C A	Ma jority
	250 260 270 280 290 300	
241	A C T A G C T T G G C T A A C C G G C T C A C C T A G G C G A C G A T C C C T A G C T G G T C T G A G A G G A T G A C C A	16S Co1
241	A C T A G C T T G G C T A A C C G G C T C A C C T A G G C G A C G A T C C C T A G C T G G T C T G A G A G G A T G A C C A	16S Co2
241	A C T A G C T T G G C T A A C C G G C T C A C C T A G G C G A C G A T C C C T A G C T G G T C T G A G A G G A T G A C C A	16S Co5
	G C C A C A C T G G A A C T G A G A C A C G G T C C A G A C T C C T A C G G A G G C A G C A G T G G G G A A T A T T G	Ma jority
	310 320 330 340 350 360	
301	G C C A C A C T G G A A C T G A G A C A C G G T C C A G A C T C C T A C G G A G G C A G C A G T G G G G A A T A T T G	16S Co1
301	G C C A C A C T G G A A C T G A G A C A C G G T C C A G A C T C C T A C G G A G G C A G C A G T G G G G A A T A T T G	16S Co2
301	G C C A C A C T G G A A C T G A G A C A C G G T C C A G A C T C C T A C G G A G G C A G C A G T G G G G A A T A T T G	16S Co5
	C A C A A T G G G C G C A A G C C T G A T G C A G C C A T G C C G G C G T G T G T G A A G A A G G C C T T C G G G T T G T	Ma jority
	370 380 390 400 410 420	
361	C A C A A T G G G C G C A A G C C T G A T G C A G C C A T G C C G G C G T G T G T G A A G A A G G C C T T C G G G T T G T	16S Co1
361	C A C A A T G G G C G C A A G C C T G A T G C A G C C A T G C C G G C G T G T G T G A A G A A G G C C T T C G G G T T G T	16S Co2
361	C A C A A T G G G C G C A A G C C T G A T G C A G C C A T G C C G G C G T G T G T G A A G A A G G C C T T C G G G T T G T	16S Co5
	A A A G C A C T T T C A G C G G G G A G G A A G G C G G T G A G G T T A A T A A C C T C A T C G A T T G A C G T T A C C	Ma jority
	430 440 450 460 470 480	
421	A A A G C A C T T T C A G C G G G G A G G A A G G C G G T G A G G T T A A T A A C C T C A T C G A T T G A C G T T A C C	16S Co1
421	A A A G C A C T T T C A G C G G G G A G G A A G G C G G T G A G G T T A A T A A C C T C A T C G A T T G A C G T T A C C	16S Co2
421	A A A G C A C T T T C A G C G G G G A G G A A G G C G G T G A G G T T A A T A A C C T C A T C G A T T G A C G T T A C C	16S Co5
	C G C A G A A G A A G C A C C G G C T A A C T C C G T G C C A G C A G C C G G T A A T A C G G A G G G T G C A A G C	Ma jority
	490 500 510 520 530 540	
481	C G C A G A A G A A G C A C C G G C T A A C T C C G T G C C A G C A G C C G G T A A T A C G G A G G G T G C A A G C	16S Co1
481	C G C A G A A G A A G C A C C G G C T A A C T C C G T G C C A G C A G C C G G T A A T A C G G A G G G T G C A A G C	16S Co2
481	C G C A G A A G A A G C A C C G G C T A A C T C C G T G C C A G C A G C C G G T A A T A C G G A G G G T G C A A G C	16S Co5
	G T T A A T C G G A A T T A C T T G G G C G T A A A G C G C A C G C A G G C G G T C T G T C A A G T C G G A T G T G A A	Ma jority
	550 560 570 580 590 600	
541	G T T A A T C G G A A T T A C T T G G G C G T A A A G C G C A C G C A G G C G G T C T G T C A A G T C G G A T G T G A A	16S Co1
541	G T T A A T C G G A A T T A C T T G G G C G T A A A G C G C A C G C A G G C G G T C T G T C A A G T C G G A T G T G A A	16S Co2
541	G T T A A T C G G A A T T A C T T G G G C G T A A A G C G C A C G C A G G C G G T C T G T C A A G T C G G A T G T G A A	16S Co5
	T C C C G G G C T C A A C C T G G G A A C T T G C A T T C G A A A C T G G C A G G C T A G A G T C T T G T A G A G G G	Ma jority
	610 620 630 640 650 660	
601	T C C C G G G C T C A A C C T G G G A A C T T G C A T T C G A A A C T G G C A G G C T A G A G T C T T G T A G A G G G	16S Co1
601	T C C C G G G C T C A A C C T G G G A A C T T G C A T T C G A A A C T G G C A G G C T A G A G T C T T G T A G A G G G	16S Co2
601	T C C C G G G C T C A A C C T G G G A A C T T G C A T T C G A A A C T G G C A G G C T A G A G T C T T G T A G A G G G	16S Co5
	G G T A G A A T T C A G G T G T A G C G G T G A A A T G C G T A G A G A T C T G G A G G A A T A C C G G T G G C G A	Ma jority
	670 680 690 700 710 720	
661	G G T A G A A T T C A G G T G T A G C G G T G A A A T G C G T A G A G A T C T G G A G G A A T A C C G G T G G C G A	16S Co1
661	G G T A G A A T T C A G G T G T A G C G G T G A A A T G C G T A G A G A T C T G G A G G A A T A C C G G T G G C G A	16S Co2
661	G G T A G A A T T C A G G T G T A G C G G T G A A A T G C G T A G A G A T C T G G A G G A A T A C C G G T G G C G A	16S Co5
	G G C G G C C C C T G G A C A A A G A C T G A C G C T C A G G T G C G A A A G C G T G G G G A G C A A A C A G G A T T	Ma jority
	730 740 750 760 770 780	
721	G G C G G C C C C T G G A C A A A G A C T G A C G C T C A G G T G C G A A A G C G T G G G G A G C A A A C A G G A T T	16S Co1
721	G G C G G C C C C T G G A C A A A G A C T G A C G C T C A G G T G C G A A A G C G T G G G G A G C A A A C A G G A T T	16S Co2
721	G G C G G C C C C T G G A C A A A G A C T G A C G C T C A G G T G C G A A A G C G T G G G G A G C A A A C A G G A T T	16S Co5
	A G A T A C C C T G G T A G T C C A C G C T G T A A A C G A T G T C G A T T T G G A G G T T G T G C C C T T G A G G C G	Ma jority
	790 800 810 820 830 840	
780	A G A T A C C C T G G T A G T C C A C G C T G T A A A C G A T G T C G A T T T G G A G G T T G T G C C C T T G A G G C G	16S Co1
781	A G A T A C C C T G G T A G T C C A C G C T G T A A A C G A T G T C G A T T T G G A G G T T G T G C C C T T G A G G C G	16S Co2
781	A G A T A C C C T G G T A G T C C A C G C T G T A A A C G A T G T C G A T T T G G A G G T T G T G C C C T T G A G G C G	16S Co5
	T G G C T T C C G G A G C T A A C G C G T T A A A T C G A C C G C C T G G G G A G T A C G G C C G C A A G G T T A A A	Ma jority
	850 860 870 880 890 900	
840	T G G C T T C C G G A G C T A A C G C G T T A A A T C G A C C G C C T G G G G A G T A C G G C C G C A A G G T T A A A	16S Co1
841	T G G C T T C C G G A G C T A A C G C G T T A A A T C G A C C G C C T G G G G A G T A C G G C C G C A A G G T T A A A	16S Co2
841	T G G C T T C C G G A G C T A A C G C G T T A A A T C G A C C G C C T G G G G A G T A C G G C C G C A A G G T T A A A	16S Co5

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β'



Decoration 'Decoration #1': Shade (with solid black) residues that match the Consensus exactly. •

**Εικόνα 3.2** Ευθυγράμμιση των αλληλουχιών 16S rRNA των Co1, Co2, Co5 μεταξύ τους με τη χρήση του αλγόριθμου ClustalW του προγράμματος Lasergene 7.0. Με λευκή σκίαση παρουσιάζεται η ύπαρξη διαφορετικής βάσης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

**Abid N., Sayadi S.** (2006). Detrimental effects of olive mill wastewater on the composting process of agricultural wastes. *Waste Management*. **26**: 1099 – 1107.

**Abu Bakar N. K., Abd-Aziz S., Hassan M. A., Ghazali F. M.** (2010). Isolation and selection of appropriate cellulolytic mixed microbial cultures for cellulases production from oil palm empty fruit bunch. *Biotechnology* **9**(1): 73 – 78.

**Balis C., Chatjipavlidis J., Flouri F.** (1996). Olive mill waste as a substrate for nitrogen fixation. *International Biodeterioration & Biodegradation*. p. 169 – 178.

**Balkwill D., Fredrickson J., Romine M.** (2006). Spingomonas and related Genera. *Prokaryotes*. **7**: 605 – 629.

**Beffa T., Blanc M., Aragno M.** (1996). Obligately and facultatively autotrophic, sulfur- and hydrogen-oxidizing thermophilic bacteria isolated from hot composts. *Arch Microbiol*. **165**: 34 – 40.

**Beffa T., Blanc M., Lyon P.-F., Vogt G., Marchiani M., Fischer Lott J., Aragno M.** (1996). Isolation of Thermus strains from hot composts (60 to 80 °C). *Applied and Environmental Microbiology*. **62**: 1723 – 1727.

**Beffa T., Blanc M., Marilley L., Lott Fischer J., Lyon P.-F., Aragno M.** (1995). Taxonomic and metabolic microbial diversity during composting. In *“The Science of Composting”* (Eds: de Bertoldi M., Sequi P., Lemmes B., Papi T.). Blackies Academic and Professional. Glasgow. Scotland. **1**: 149 – 161.

**Beguin P. & Aubert J.-P.** (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews*. **13**: 25 – 58.

**Bernal M. P., Paredes C., Sanchez – Monedero M. A., Cegarra J.** (1997). Maturity and stability parameters of composts prepared with a wide range of organic wastes. *Bioresource Technology*. **63**: 91 – 99.

**Bonito G., Isikhuemhen O., Vilgalys R.** (2010). Identification of fungi associated with municipal compost using DNA-based techniques. *Bioresource Technology* **101**: 1021 – 1027.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

**Brewer L. J., Sullivan D. M.** (2003). Maturity and stability evaluation of composted yard trimmings. *Compost Science & Utilization*. **11**(2): 96 – 112.

**Brisse S., Grimont F., Grimont P.** (2006). The genus *Klebsiella*. *Prokaryotes*. **6**: 159 – 196.

**Cooperband L.** (2002). The art and science of composting. A resource for farmers and compost producers. University of Wisconsin-Madison.

**Daniel J. Arp.** (2000). The Nitrogen Cycle. In “*Prokaryotic Nitrogen Fixation*” (Ed: Triplett E.W.). Horizon Scientific Press. Madison. Wisconsin. **1**: 1 – 13.

**Dees P. & Ghiorse W.** (2001). Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA. *FEMS Microbial Ecology* **35**: 207 – 216.

**Epstein, E.** 1997. The science of composting. CRC Press. Boca Raton. Florida.

**Evans, G. & Furlong, J.** 2003. Environmental Biotechnology. Theory and Application. John Wiley and Sons, LTD.

**Felsenstein J.** (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. **39**(4): 783 – 791.

**Fouts D., Tyler H., DeBoy R., Daugherty S., Ren Q., Badger J., Durkin A., Huot H., Shrivastava S., Kothari S., Dodson R., Mohamoud Y., Khouri H., Roesch L., Krogfelt K., Struve C., Triplett E., Methe B.** (2008). Complete genome sequence of the N<sub>2</sub>-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. *PLoS Genetics*. **4**(7): 1 – 18.

**Fracchia L., Dohrmann A. B., Martinotti M. G., Tebbe C.** (2006). Bacterial diversity in a finished compost and vermicompost: differences revealed by cultivation – independent analyses of PCR – amplified 16S rRNA genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**: 942 – 952.

**Georgakakis D., Tsavdaris A., Bakouli J., Simeonidis S.** (1995). Composting solid swine manure and lignite mixtures with selected plant residues. *Bioresource Technology*. **56**: 195 – 200.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

**Guo Y., Zhu N., Zhu S., Deng C.** (2007). Molecular phylogenetic diversity of bacteria and its spatial distribution in composts. *Journal of Applied Microbiology*. **103**: 1344 – 1354.

**Halbleil C. M. & Ludden P. W.** (2000). Regulation of Biological Nitrogen Fixation. *The Journal of Nutrition*. **130**: 1081 – 1084.

**Hassen A., Belguith K., Jedidi N.** (2002). Microbial characterization during composting of municipal solid waste. *Proceedings of International Symposium on Environmental Pollution Control and Waste Management*. 7-10 January 2002. p. 357 – 368.

**Holmes D. S., Quigley M.** (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical biochemistry*. **114**: 193 – 197.

**Hubbell D. H. & Kidder G.** (2003). Biological Nitrogen Fixation. IFAS Extension. University of Florida.

**Hultman J., Vasara T., Partanen P., Kurola J., Kontro M.H., Paulin L., Auvinen. P., Romantschuk M.** (2010). Determination of fungal succession during municipal solid waste composting using a cloning-based analysis. *Journal of Applied Microbiology*. **108**: 472 – 487.

**Insam H. & de Bertoldi M.** (2007). Microbiology of the composting process. In “*Compost science and technology*”. (Eds: Diaz L. F., de Bertoldi M., Bidlingmaier W., Stentiford E.). Elsevier. **3**: 26 – 45.

**Kasana R. C., Salwan R., Dhar H., Dutt S., Gulati A.** (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram’s iodine. *Current Microbiology*. **57**(5): 503 – 507.

**Leege P. B.** (1995). Compost facility operating guide. In “*The Science of Composting*” (Eds: de Bertoldi M., Sequi P., Lemmes B., Papi T.). Blackie Academic and Professional. Glasgow. Scotland. **1**: 126 – 136.

**Madigan M., Martinko J., Parker J.** (2005). Brock Βιολογία των Μικροοργανισμών. Τόμος Ι, ΙΙ. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. Ηράκλειο. Κρήτη.

**Manios V., Balis C.** (1983). Respirometry to determine optimum conditions for the biodegradation of extracted olive press-cake. *Soil Biol. Biochem.* **15**(1): 75 – 83.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

**Mari I., Ehaliotis C., Kotsou M., Chatzipavlidis I., Georgakakis D.** (2005). Use of sulfur to control pH in composts derived from olive processing by-products. *Compost Science & Utilization*. **13**(4): 281 – 287.

**Mullis K.** (1990). The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*. **262**: 56 – 65.

**Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Bioogy*. **51**(1): 263 – 273.

**Olsen G. J. & Woese C.** (1993). Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J*. **7**: 113 – 123.

**Papadimitriou E. K., Chatjipavlidis J., Balis C.** (1996). Application of composting to olive mill wastewater treatment. *Environmental Technology*. **18**: 101 – 107.

**Paredes C., Bernal M. P., Cegarra J., Roig A.** (2002). Bio-degradation of olive mill wastewater sludge by its co-composting with agricultural wastes. *Bioresource Technology*. **85**: 1 – 8.

**Paredes C., Roig A., Bernal M.P., Sánchez-Monedero M.A., Cegarra J.** (2000). Evolution of organic matter and nitrogen during co-composting of olive-mill wastewater with solid organic wastes. *Biol Fertil Soils*. **32**: 222 – 227.

**Pickup R. W.** (1991). Development of molecular methods for the detection of specific bacteria in the environment. *Journal of General Microbiology*. **137**: 1009 – 1019.

**Postgate J. R.** (1982). The fundamentals of nitrogen fixation. Cambridge University Press.

**Rangaraj P., Rütimann – Johnson C., Shah V., Ludden P.** (2000). Biosynthesis of the Iron-Molybdenum and Iron-Vanadium Cofactors of the *nif*- and *vnf*-Encoded Nitrogenases. In “*Prokaryotic Nitrogen Fixation*” (Ed: Triplett E.W.). Horizon Scientific Press. Madison. Wisconsin. **1**: 55 – 79.

**Raymond J., Siefert J. L., Staples C. R., Blankenship R. E.** (2003). The Natural History of Nitrogen Fixation. *Mol. Biol. Evol.* **21**(3): 541 – 554.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

**Ryckeboer J., Mergaert J., Vaes K., Klammer S., De Clercq D., Coosemans J., Insam H., Swings J.** (2003). A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating process. *Annals of Microbiology*. **53**(4): 349 – 410.

**Rynk R.** 1992. On – Farm Composting Handbook. Northeast Regional Agricultural Engineering Service. Ithaca, NY.

**Saitou N., Masatoshi N.** (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**(4): 406 – 425.

**Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

**Schulze K. L.** (1962). Continuous thermophilic composting. *Applied Microbiology* **10**(2): 108 – 122.

**Stentiford E. I.** (1995). Composting control: principles and practice. In “*The Science of Composting*” (Eds: de Bertoldi M., Sequi P., Lemmes B., Papi T.). Blackie Academic and Professional. Glasgow. Scotland. **1**: 49 – 59.

**Tamura K., Dudley J., Masatoshi N., Kumar S.** (2007). MEGA4. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**(8): 1596 – 1599.

**Tamura K., Masatoshi N., Kumar S.** (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor – joining method. *PNAS*. **101**(30): 11030 – 11035.

**Tiquia S. M.** (2002). Microbial transformation of nitrogen during composting. In: “*Microbiology of Composting*” (Eds: Insam H., Riddech N., Klammer S.). Springer Verlag Berlin Heidelberg. pp. 237–246

**Venieraki A., Dimou M., Pergalis P., Kefalogianni I., Chatzipavlidis I., Katinakis P.** (2011). The genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat. *Microb Ecol.* **61**: 277 – 285.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

**Videira S., Jean Luiz Simoes de Araujo, Luciana da Silva Rodrigues, Vera Lucia Divan Baldani, Jose Ivo Baldani.** (2009). Occurrence and diversity of nitrogen – fixing *Sphingomonas* bacteria associated with rice plants grown in Brazil. *FEMS Microbiol. Lett.* **293**: 11 – 19.

**Vivas A., Moreno B., Garcia-Rodriguez S., Benitez E.** (2009). Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste. *Bioresource Technology.* **100**: 1319 – 1326.

**Woods D. & Sokol P.** (2006). The genus Burkholderia. *Prokaryotes.* **5**: 846 – 860.

**Young J. P. W.** (1992). Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In “*Biological Nitrogen Fixation*”. (Eds: Stacey J., Burris R.H., Evans H.J.). Chapman and Hall. New York. **1**: 43 – 86.

**Zehr J. P., Jenkins B. D., Short S. M., Steward G. F.** (2003). Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environmental Microbiology.* **5**(7): 539 – 554.

**Zhang J., Zeng G., Chen Y., Yu M., Yu Z., Li H., Yu Y., Huang H.** (2011). Effects of physico – chemical parameters on the bacterial and fungal communities during agricultural waste composting. *Bioresource Technology.* **102**: 2950 – 2956.

**Ανώνυμος** (2005). Ένα βήμα μπροστά για την αειφόρο χρήση των πόρων: Θεματική Στρατηγική για την πρόληψη της δημιουργίας και την ανακύκλωση των αποβλήτων. COM [2005] 666 τελ., {SEC(2005) 1681, SEC(1682)}, 21.12.2005, Ανακοίνωση της Επιτροπής στο Συμβούλιο, την Ευρωπαϊκή Οικονομική & Κοινωνική Επιτροπή και την Επιτροπή των Περιφερειών, 37 σελ., Βρυξέλλες.

**Αριανούτσου - Φαραγγιτάκη Μ., Οικονόμου - Αμίλλη Α., Κουμπλή - Σοβαντζή Λ., Ρουσομουστακάκη Μ.** 2003. Γενική Οικολογία. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

**Ασημακόπουλος Ι., Οιχαλιώτης Κ.** 2010. Εργαστηριακές ασκήσεις των μαθημάτων: Γονιμότητα Εδάφους, Αναλύσεις Φυτών και Εδαφών – Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων, Λιπάσματα – Λιπάνσεις. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

**Γεωργακάκης Δ., Τζίγα Φ., Ζόγκζας Μ., Νικολάρου Χ., Τσαβδάρης Α.** (1994). Ερευνητικό πρόγραμμα: Διαχείριση υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων πριν από τη βιολογική τους επεξεργασία. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

**Γεωργακάκης, Δ.** 2003. Διαχείριση Στερεών Αποβλήτων. Τόμος Γ'. Στερεά Γεωργικά Απόβλητα. Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο.

**Γεωργακάκης, Δ.** 2009. Διαχείριση Αποβλήτων. Τεύχος 3<sup>ο</sup>. Δευτεροβάθμια (Βιολογική) Επεξεργασία Γεωργο – Βιομηχανικών Αποβλήτων. Μέρος Β'. Αερόβιες Διεργασίες. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

**Εφημερίδα της Κυβερνήσεως (τεύχος δεύτερο).** 2003. Μέτρα και Όροι για τη Διαχείριση Στερεών Αποβλήτων. Εθνικός και Περιφερειακός Σχεδιασμός Διαχείρισης. ΚΥΑ - 50910/2727, ΦΕΚ Β' 1909/22.12.2003.

**Λεκανίδου Ρ., Τσιτήλου Σ., Ροδάκης Γ.** 2004. Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία. Πανεπιστήμιο Αθηνών.

**Μπαλής Κ., Φλουρή Φ., Σέρβης Δ., Κλειδωνά Α.** 1994. Κομποστοποίηση υπολειμμάτων βάμβακος για την παραγωγή οργανικού λιπάσματος. Ερευνητικό Πρόγραμμα Γ.Γ.Ε.Τ. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

**Μπουρτσάλας Α., Θέμελης Ν., Καλογήρου Ε.** (2011). Περιγραφή της υφιστάμενης κατάστασης διαχείρισης Αστικών Στερεών Αποβλήτων (Α.Σ.Α.) για τις Περιφέρειες της Ελλάδος. Earth Engineering Center. Columbia University.

**Οδηγία 2008/98/ΕΚ** του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 19<sup>ης</sup> Νοεμβρίου 2008 για τα απόβλητα και την κατάργηση ορισμένων οδηγιών. Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

---



---

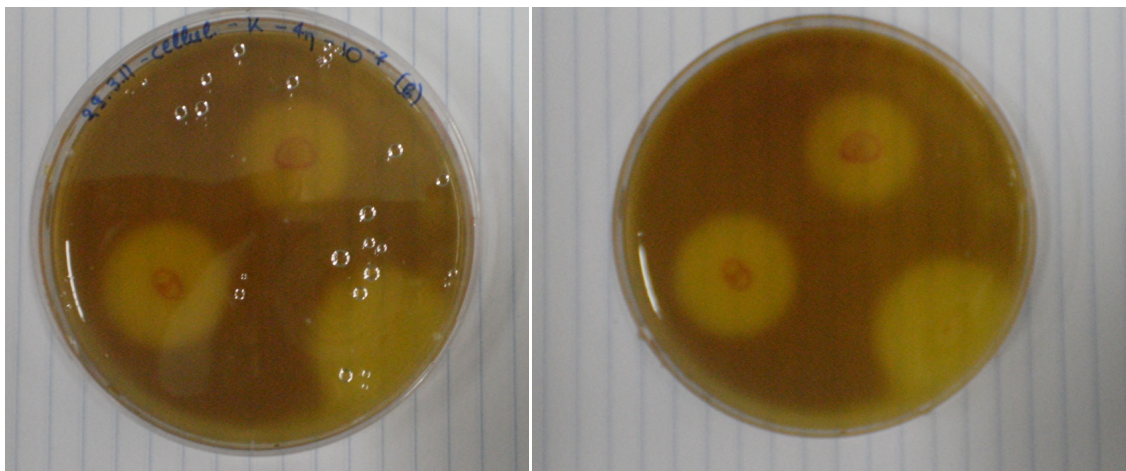
**Εικόνα 1** Αναμόλεση σωρού με παράλληλη διαβροχή.

---

ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ



**Εικόνα 2** Οι δύο σωροί κομποστοποίησης. Αριστερά φαίνεται ο σωρός 1, δεξιά ο σωρός 2.



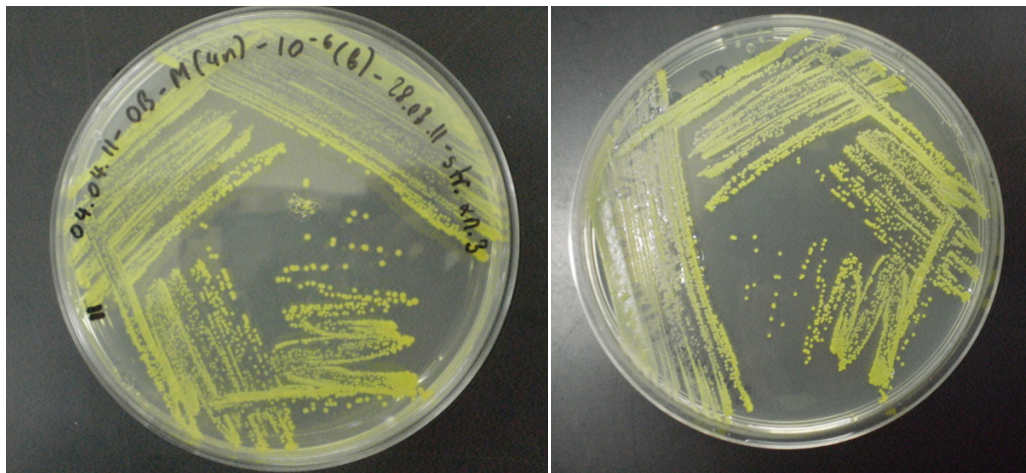
**Εικόνα 3** Δακτύλιος κυτταρινόλυσης σε CMC άγαρ, μετά από χρώση με διάλυμα ιωδίου της χρώσης Gram.



## ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ



**Εικόνα 4** Σωλήνες με θρεπτικό διάλυμα Rennie για ανάπτυξη αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων.



**Εικόνα 5** Απομόνωση μικροοργανισμού σε αξενική καλλιέργεια. Θρεπτικό μέσο ΝΑ.