

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ & ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΜΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ**

**ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΜΟΡΙΑΚΗ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ  
ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ**

**ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ  
ΚΟΜΠΟΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ  
ΕΚΚΟΚΚΙΣΜΟΥ ΒΑΜΒΑΚΟΣ**



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Γ. ΞΕΞΑΚΗΣ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΧΑΤΖΗΠΑΥΛΙΔΗΣ ΙΟΡΔΑΝΗΣ  
ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γ.Π.Α**

**Αθήνα, 2012**

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ & ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΜΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΜΟΡΙΑΚΗ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ  
ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ  
ΚΟΜΠΟΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ  
ΕΚΚΟΚΚΙΣΜΟΥ ΒΑΜΒΑΚΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Γ. ΞΕΞΑΚΗΣ

**Επιβλέπων**

Χατζηπαυλίδης Ιορδάνης, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

**Μέλη**

Κατινάκης Παναγιώτης, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Ταμπακάκη Αναστασία, Λέκτορας Γ.Π.Α.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μη ορθολογική διαχείριση των υποπροϊόντων που παράγονται από αγροτοβιομηχανικές δραστηριότητες αποτελούν μία σημαντική πηγή περιβαλλοντικών ρύπων που προκαλούν σημαντική επιβάρυνση στο ήδη εύθραυστο περιβάλλον μας.

Τα υπολείμματα εκκοκκισμού βάμβακος (YEB) είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιου υποπροϊόντος, το οποίο όμως εάν διαχειριστεί ορθολογικά μπορεί να δώσει λύσεις σε πολλά περιβαλλοντικά προβλήματα (π.χ. υποβάθμιση γεωργικών εδαφών, μόλυνση υδάτινων πόρων κ.α.). Η κομποστοποίηση αυτού του υποπροϊόντος είναι μια μέθοδος η οποία μπορεί να δώσει ένα προϊόν με σημαντικές εδαφοβελτιωτικές ιδιότητες.

Μελετήθηκε μια σειρά φυσικοχημικών παραμέτρων, μεταξύ των οποίων η θερμοκρασία, η υγρασία, το pH, η ηλεκτρική αγωγιμότητα, το ολικό άζωτο, το άζωτο των νιτρικών και αμμωνιακών ιόντων και την 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 το γονίδιο 16S rRNA, τριών καλλιεργήσιμων, απομονωμένων από το κόμποστ, στελεχών). Έγινε φυλογενετική ταξινόμηση τριών κυτταρινολυτικών στελεχών τα οποία φαίνεται ότι το ένα στο γένος *Serratia* και τα δύο ανήκουν στο γένος *Brevibacillus*.

## ABSTRACT

The non-rational management of by-products produced from agro-activities constitute an important source of environmental pollutants that cause significant burden on the already fragile environment.

Cotton ginning residues is a typical example of such a by-product, but if it is managed rationally, then they can provide solutions to many environmental problems (eg, agricultural land degradation, water contamination, etc.). Composting this by-product is a method that can give a product with significant soil improvement properties.

We studied a series of physicochemical parameters, including temperature, moisture, pH, electrical conductivity, total nitrogen, nitrate nitrogen and ammonium ions, and the respiratory rate. Microbial succession was studied using both classical (culture-dependent methods for estimating the Colony Forming Units-CFU of total, endospore-forming, cellulolytic, nitrogen-fixing bacteria, fungi and Actinomyces) and molecular techniques (Subcloning and phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene of three cultivars strains isolated from compost.). Phylogenetic classification of three cellulolytic strains showed that two of them belong in the genus *Brevibacillus* and one in the genus *Serratia*.



## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	3
ABSTRACT .....	4
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	9
Κεφάλαιο 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	10
1.1 Κομποστοποίηση .....	10
1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την κομποστοποίηση .....	12
1.2.1 Πρώτη ύλη .....	12
1.2.2 Λόγος C/N.....	15
1.2.3 Αερισμός .....	16
1.2.4 Υγρασία.....	17
1.2.5 Θερμοκρασία.....	18
1.2.6 pH.....	19
1.3 Πορεία της κομποστοποίησης και ο ρόλος των μικροοργανισμών .....	21
1.3.1 Στάδια κομποστοποίησης.....	22
1.3.2 Οι μικροοργανισμοί στην κομποστοποίηση .....	27
1.4 Μέθοδοι εκτίμησης μικροβιακής ποικιλότητας κατά την κομποστοποίηση .....	29
1.5 Συστήματα κομποστοποίησης.....	30
1.5.1 Συστήματα ανοιχτού τύπου (windrows) .....	31
1.5.2 Συστήματα κλειστού τύπου (aerostate static pile) .....	33
1.6 Κυτταρινολυτικά Βακτήρια .....	34
1.6.1 Κυτταρίνη.....	34
1.6.2 Υδρόλυση Κυτταρίνης .....	36
1.6.3 <i>Brevibacillus</i> .....	37
1.6.4 <i>Serratia</i> .....	38
1.6.5 Φυλογενετική ανάλυση με βάση το γονίδιο 16S rRNA.....	39
1.7 Χρήσεις του κόμποστ (compost).....	39
1.8 Τα Υπολείμματα Εκκοκκιστηρίου Βάμβακος ως υπόστρωμα κομποστοποίησης.....	40
1.9 Σκοπός της μελέτης.....	42
Κεφάλαιο 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	44
2.1 Υποστρώματα Κομποστοποίησης.....	44
2.2 Παρασκευή των Σωρών Κομποστοποίησης .....	44
2.3 Δειγματοληψίες.....	45
2.4 Μελέτη Φυσικοχημικών Παραμέτρων.....	46

2.4.1 Παρακολούθηση θερμοκρασίας.....	46
2.4.2 Προσδιορισμός υγρασίας.....	46
2.4.3 Προσδιορισμός pH και ηλεκτρικής αγωγιμότητας (Electrical Conductivity, EC) .	46
2.4.4 Προσδιορισμός του νιτρικού (N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) αζώτου με τη μέθοδο του καδμίου.....	46
2.4.5 Χρωματομετρικός προσδιορισμός του αμμωνιακού αζώτου (NH <sub>4</sub> -N) με τη μέθοδο της ινδοφαινόλης.....	48
2.4.6 Προσδιορισμός του ολικού αζώτου (μέθοδος Kjeldahl).....	49
2.4.7 Υπολογισμός της Μικροβιακής Βιομάζας.....	50
2.5 Μικροβιολογικές αναλύσεις με χρήση κλασσικών μεθόδων.....	50
2.5.1 Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων.....	51
2.5.2 Απομόνωση μικροοργανισμών σε καθαρή καλλιέργεια.....	56
2.5.3 Εκτίμηση της αναπνευστικής δραστηριότητας.....	57
2.6 Μοριακές τεχνικές.....	59
2.6.1 Επιλογή βακτηριακών στελεχών για ταυτοποίηση.....	59
2.6.2 Απομόνωση ολικού γενετικού υλικού (DNA).....	60
2.6.3 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊκών οξέων.....	61
2.6.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	62
2.6.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	64
2.6.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα <i>E. Coli</i> .....	68
2.6.8 Ανάλυση αλληλουχιών & Φυλογενετική ανάλυση.....	71
<b>Κεφάλαιο 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>72</b>
3.1 Φυσικοχημικές Παράμετροι.....	72
3.1.1 Θερμοκρασία.....	72
3.1.2 Υγρασία.....	73
3.1.3 Μεταβολή του pH.....	74
3.1.4 Μεταβολή της ηλεκτρικής αγωγιμότητας.....	74
3.1.5 Το νιτρικό άζωτο (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - N).....	75
3.1.6 Το αμμωνιακό άζωτο (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N).....	76
3.1.7 Ολικό άζωτο.....	77
3.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	78
3.2.1 Ολικά βακτήρια.....	78
3.2.2 Μύκητες.....	79
3.2.3 Ακτινομύκητες.....	80
3.2.4 Σποριογόνα βακτήρια.....	81
3.2.5 Αζωτοδεσμευτικά βακτήρια.....	81
3.2.6 Αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα δειγμάτων κόμποστ.....	83

3.2.7 Κυτταρινολυτικά Βακτήρια .....	83
3.2.8 Αναπνευστική δραστηριότητα .....	85
3.3 Μικροβιολογικές αναλύσεις με τη χρήση μοριακών τεχνικών .....	87
3.3.1 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου 16S rRNA .....	87
3.3.2 Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA.....	89
3.3.3 Φυλογενετική Ανάλυση 16S rRNA γονιδίου.....	90
<i>Κεφάλαιο 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</i> .....	92
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄. ΣΥΝΘΕΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ & ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ – ΧΡΩΣΕΙΣ ...	96
1. Φυσικοχημικές Παράμετροι.....	96
1.1 Προσδιορισμός του νιτρικού αζώτου (N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) .....	96
1.2 Προσδιορισμός του αμμωνιακού αζώτου (N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) .....	96
1.3 Προσδιορισμός του ολικού αζώτου (μέθοδος Kjeldahl).....	97
2. Κλασσικές Μικροβιολογικές Αναλύσεις .....	97
2.1 Διαδοχικές αραιώσεις.....	97
2.2 Ανάπτυξη - απομόνωση μικροοργανισμών.....	97
2.3 Χρώσεις.....	99
3. Μοριακές Τεχνικές.....	100
3.1 Υποστρώματα .....	100
3.2 Αντιβιοτικά .....	100
3.3 Διαλύματα ηλεκτροφόρησης.....	101
3.4 Διαλύματα για μετασχηματισμό κυττάρων E.coli .....	101
3.5 Διαλύματα για εκχύλιση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο βρασμού.....	101
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β΄ .....	102
1. Φυσικοχημικές παράμετροι .....	102
2. Μικροβιολογικές αναλύσεις με χρήση κλασσικών μεθόδων.....	102
2.1 Διακύμανση ABM μικροβιακών ομάδων στις φάσεις της κομποστοποίησης.....	102
3. Ταυτοποίηση βακτηρίων με χρήση μοριακών τεχνικών.....	103
3.1 Νουκλεοτιδική αλληλουχία 16S rRNA γονιδίου των στελεχών Cell2, Cell8, Cell9..	103
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	104
ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ .....	111



## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Είναι χαρά μου να εκφράσω τις ευχαριστίες μου, πρώτα απ' όλα, σ' έναν άνθρωπο που με βοήθησε και μου στάθηκε, τον καθηγητή μου κ. **Χατζηπαυλίδη Ιορδάνη** Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Γ. Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών που δέχθηκε την εποπτεία της μεταπτυχιακής μου μελέτης. Η ουσιαστική, διαρκής, εποικοδομητική και ευχάριστη συνεργασία μας, καθώς και το κριτικό πνεύμα του κατάφεραν να αλλάξουν το δικό μου τρόπο σκέψης.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. **Κατινάκη Παναγιώτη** Καθηγητή του τμήματος Γ. Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, του οποίου οι συμβουλές, η καθοδήγηση και η διάθεσή του για συνεργασία αποτέλεσαν πολύτιμη βοήθεια για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μελέτης καθώς και για τη συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή, όπως επίσης και την Λέκτορα του τμήματος Γ. Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. **Ταμπακάκη Αναστασία** για τις εύστοχες παρατηρήσεις της στην μεταπτυχιακή μελέτη και τη συμμετοχή της στην τριμελή εξεταστική 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, τη Διδάκτορα κ. **Βεζύρη Ελένη** και τη Διδάκτορα κ. **Βενιεράκη Αναστασία** για την ουσιαστική συμβολή τους στη διεξαγωγή των μοριακών τεχνικών και τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Ευχαριστώ, όμως, οφείλω και στο προσωπικό του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, το οποίο έδειξε ανοχή και κατανόηση. Ιδιαίτερες ευχαριστίες στις μεταπτυχιακές συμφοιτήτριες **Ευθυμίου Αικατερίνη** και **Σκιαδά Βασιλική** για την ευχάριστη, εποικοδομητική και εξαιρετική συνεργασία που είχαμε, η βοήθεια των οποίων ήταν καθοριστική στην περάτωση της παρούσας μελέτης.

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

Κι επειδή θεωρώ ότι το ξεκίνημα αλλά και η ολοκλήρωση των Μεταπτυχιακών μου σπουδών δεν οφείλεται μονάχα σε μένα αλλά και στην οικογένεια μου, τους ευχαριστώ θερμά γιατί με στήριξαν, με ενίσχυσαν, μα πάνω απ' όλα με πίστεψαν.

# Κεφάλαιο 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Κομποστοποίηση

Κομποστοποίηση (compost) είναι η βιολογική, οξειδωτική αποδόμηση και σταθεροποίηση οργανικών υλικών, φυτικής & ζωικής προέλευσης, υπό συνθήκες οι οποίες οδηγούν στην ανάπτυξη θερμοκρασιών της θερμοφιλης περιοχής. Το τελικό προϊόν της διαδικασίας είναι σταθερό και κατάλληλο για αποθήκευση και εφαρμογή στο έδαφος χωρίς δυσάρεστες περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Κατά συνέπεια η κομποστοποίηση αποτελεί εξειδικευμένη μορφή σταθεροποίησης αποβλήτων (Haug, 1986). Η κομποστοποίηση είναι μια μικρού κόστους φυσική μέθοδος ανακύκλωσης της οργανικής ύλης, η οποία πραγματοποιείται με τη συμμετοχή πλήθους μικροοργανισμών, την οποία ο άνθρωπος αντέγραψε και εφάρμοσε προκειμένου να εξυπηρετήσει ανάγκες που είχαν να κάνουν με τη συσσώρευση διαφόρων υπολειμμάτων προερχομένων από δραστηριότητες του (γεωργικά υπολείμματα, λάσπες βιολογικών καθαρισμών κ.α). Η κομποστοποίηση μετατρέπει τη βιοδιασπώμενη στερεά οργανική ύλη σε ένα οργανοχουμικό εδαφοβελτιωτικό υλικό, το οποίο μπορεί να υποστεί περαιτέρω επεξεργασία, να αποθηκευθεί ή/και να εφαρμοστεί στο έδαφος, χωρίς αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον όπως αναφέρεται στον Guo *et al.* (2007).

Κάτω από αερόβιες συνθήκες η διαλυτή οργανική ουσία οξειδώνεται σε CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>O. Ως αποτέλεσμα αυτής της αντίδρασης, παράγεται βιομάζα.

Η διαδικασία αυτή μπορεί να εκφραστεί με τον ακόλουθο γενικευμένο τύπο:

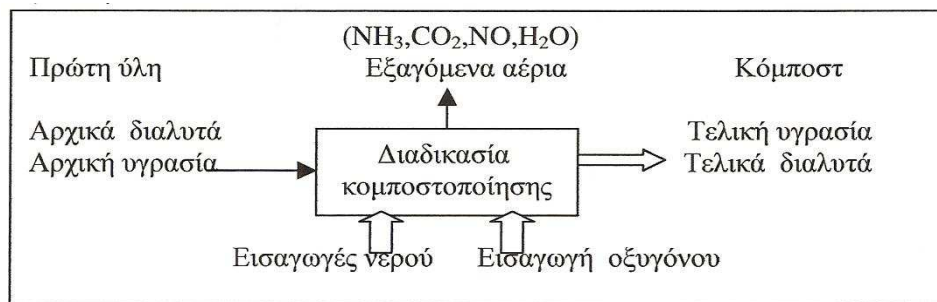
$Sum + aO_2 = CO_2 + \beta H_2O + \gamma Am$ , όπου

**Sum**=οργανική ουσία και

**Am**=βιομάζα (Haug, 1986)

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι κατά την διάρκεια της κομποστοποίησης, μικροοργανισμοί όπως βακτήρια, ακτινομύκητες και μύκητες είναι υπεύθυνοι για τη αποδόμηση της οργανικής ουσίας.

Μια ολοκληρωμένη εικόνα της διαδικασίας της κομποστοποίησης μπορούμε να δούμε στην **Εικόνα 1.1**



**Εικόνα 1.1:** Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας κομποστοποίησης

Στην **Εικόνα 1.1** δίδεται σχηματικά το ισοζύγιο μάζας της προς κομποστοποίηση ποσότητας. Η αρχική, ανεπεξέργαστη πρώτη ύλη, μέσω της κομποστοποίησης μετατρέπεται σε ένα υλικό με ορισμένα σταθερά χαρακτηριστικά. Η διαδικασία αυτή απαιτεί τη συνεχή τροφοδότηση της μάζας με υγρασία και οξυγόνο, στοιχεία απαραίτητα για τη συνέχιση της πορείας της. Επίσης παρατηρείται απώλεια μάζας, η οποία οφείλεται κυρίως στην απομάκρυνση αέριας αμμωνίας ( $\text{NH}_3$ ), διοξειδίου του άνθρακα ( $\text{CO}_2$ ), μονοξειδίου του αζώτου ( $\text{NO}$ ) καθώς και στην απώλεια νερού λόγω εξάτμισης (water vapor). Εμπειρικά έχει βρεθεί ότι κατά την κομποστοποίηση ενός τόνου πρώτης ύλης χάνονται 50 Kg ξηρής ουσίας, καταναλώνονται 53 Kg  $\text{O}_2$  και παράγονται 73,3 Kg  $\text{CO}_2$ . Το αποτέλεσμα της κομποστοποίησης είναι η παραγωγή ώριμου κόμποστ.

Τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της κομποστοποίησης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1.1**:

**Πίνακας 1.1** Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα κομποστοποίησης (Προσαρμοσμένο από Epstein, 1997).

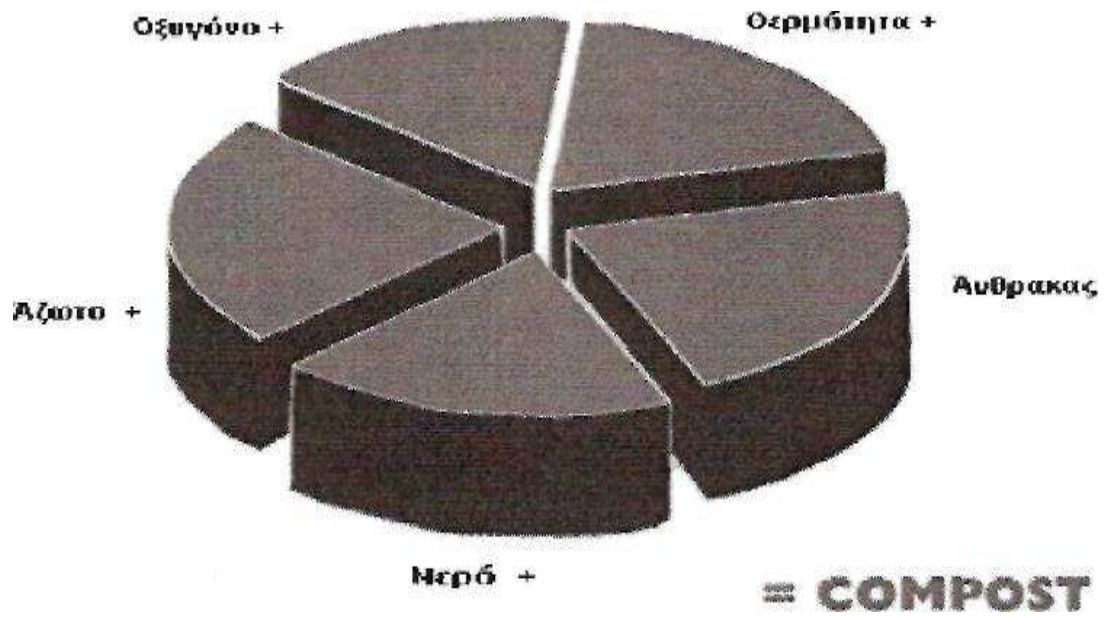
<b>Πλεονεκτήματα</b>	<b>Μειονεκτήματα</b>
Η πλειοψηφία των στερεών αποβλήτων μπορεί να κομποστοποιηθεί. Έτσι μία εγκατάσταση κομποστοποίησης μπορεί να επεξεργαστεί τόσο αστικά όσο και βιομηχανικά απόβλητα.	Δυσάρεστες οσμές και εκπομπές βιοαερίων μπορεί να συνυπάρχουν κατά την κομποστοποίηση. Απαιτείται 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.	

## **1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την κομποστοποίηση**

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 από αυτούς τους παράγοντες.

### **1.2.1 Πρώτη ύλη**

Η φύση και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της πρώτης ύλης πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη κάθε φορά που ξεκινά μία διαδικασία κομποστοποίησης (**Εικόνα 1.2**).



---

**Εικόνα 1.2:** Παρουσιάζονται σε διάγραμμα πίτας οι απαραίτητες πρώτες ύλες για μια επιτυχημένη κομποστοποίηση (νερό, οξυγόνο, άνθρακας, άζωτο)

---

Ουσιαστικά η πορεία της κομποστοποίησης εξαρτάται άμεσα από το αρχικό υλικό, καθώς η φύση και η δομή του αποτελούν κριτήριο για την επιλογή της καλύτερης μεθόδου, για γρήγορη και αποτελεσματικότερη κομποστοποίηση. Τέτοια υλικά αναφέρονται στον **Πίνακα 1.2**.

---

**Πίνακας 1.2:** Υλικά κατάλληλα για κομποστοποίηση

---

<i><b>Πηγές</b></i>	<i><b>Υλικά</b></i>
Βιομηχανίες ξύλου	Φλοιοί δένδρων
Απορρίμματα πόλεων	Κλαδιά, φύλλα, οργανικό κλάσμα σκουπιδιών, λάσπες βιολογικού καθαρισμού
Υφαντουργεία	Υπολείμματα βάμβακος, μαλλιού, λιναριού
Καπνοβιομηχανίες	Νεύρα φύλλων καπνού, τρίμματα καπνού
Χαρτοβιομηχανίες	Λάσπες
Βιομηχανίες τροφίμων	Υπολείμματα φρούτων, λαχανικών, στέμφυλα, απορρίμματα σφαγείων
Γεωργικές βιομηχανίες	Υπολείμματα εκκοκκισμού βάμβακος, ελαιοπυρήνας, πυρηνόξυλο, λιόφυλλα, άχυρο φλοιοί ρυζιού
Γεωργικές εκμεταλλεύσεις	Υπολείμματα καλλιεργειών, φύλλα, κλαδιά κληματίδες
Ζωοτεχνικές μονάδες	Κοπριά ορνιθοτροφείων, χοιροστασίων βουστασίων, στρωμνή
Φυσικές πηγές	Οργανικές αποθέσεις , λιγνίτης

Επιπλέον είναι απαραίτητο η πρώτη ύλη να πληρεί συγκεκριμένες προδιαγραφές π.χ. κατάλληλη αναλογία C/N, υγρασία κλπ., προκειμένου η διαδικασία της κομποστοποίησης να έχει μία πετυχημένη πορεία και να δώσει ένα τελικό προϊόν υψηλής ποιότητας.

Ένας άλλος παράγοντας που συμβάλλει αποτελεσματικά στην ποιότητα του τελικού κόμποστ αφορά τις δυνατότητες συνδυασμού της πρώτης ύλης. Ένας κατάλληλος συνδυασμός των πρώτων υλών μπορεί να εξασφαλίσει μία βέλτιστη πορεία κομποστοποίησης, ταχύτερη και ασφαλέστερη. Υλικά που από μόνα τους είναι προβληματικά, όταν συνδυαστούν με άλλα τότε υπάρχει ομαλοποίηση στον χειρισμό

τους και παραγωγή ασφαλούς προϊόντος. Για παράδειγμα, τα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων (κατσίγαρος), η διαχείριση των οποίων αποτελεί ένα μεγάλο περιβαλλοντικό πρόβλημα για τις ελαιοπαραγωγικές χώρες, μπορεί να συνδυαστεί σε ένα σύστημα συγκομποστοποίησης με τα υπόλοιπα υποπροϊόντα των ελαιοτριβείων (πυρηνόξυλο, φύλλα ελιάς). Το ίδιο συμβαίνει και με το οργανικό κλάσμα των αστικών απορριμάτων το οποίο συγκομποστοποιείται με κατάλληλη ποσότητα πρωτοβάθμιας βιολογικής ύλης βελτιώνοντας με αυτό τον τρόπο το λόγο C/N (30/1) και εξασφαλίζοντας επιτυχή αποδόμηση της οργανικής ουσίας καθώς και επωφελή λύση στην τελική διάθεση των υλικών αυτών.

### 1.2.2 Λόγος C/N

Ο λόγος C/N αποτελεί δείκτη χουμοποίησης αλλά και δείκτη δραστηριότητας των μικροοργανισμών. Η ιδανικότερη τιμή του λόγου C/N που πρέπει να έχει ένας κομποστοσωρός για μία επιτυχή κομποστοποίηση είναι 25/1 - 30/1. Βέβαια η τιμή αυτή μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ ενός εύρους τιμών από 25/1 μέχρι 50/1 (Golueke, 1972). Ο λόγος αυτός αναφέρεται στην ικανότητα των μικροβιακών πληθυσμών να αποδομούν την οργανική ύλη. Οι μικροοργανισμοί έχουν ανάγκη πηγές αζώτου και άνθρακα για να συντηρηθούν και να καλύψουν τις ενεργειακές τους ανάγκες. Ενώ το ποσοστό του άνθρακα είναι περίπου σταθερό (40%) για κάθε οργανικό σώμα η περιεκτικότητα του αζώτου ποικίλει από οργανισμό σε οργανισμό. Η παρουσία του αζώτου σε επαρκής ποσότητες στην οργανική ύλη λειτουργεί ως καταλύτης για τη αποδόμηση και εξασφαλίζει μία γρήγορη χωρίς προβλήματα αποδόμηση, διότι οι μικροοργανισμοί καλύπτουν τις ανάγκες τους ως προς το στοιχείο αυτό και ο μεταβολισμός τους πραγματοποιείται ανεμπόδιστα.

Όταν ο λόγος C/N είναι μεγαλύτερος του 25 σημαίνει ότι έχουμε μικρές ποσότητες αζώτου και οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν το άζωτο που περιέχεται στον κομποστοσωρό μόνο για τη συντήρησή τους και επομένως δεν υπάρχει ανοργανοποίηση. Στην περίπτωση αυτή οι μικροοργανισμοί θα δράσουν ανταγωνιστικά προς τα φυτά όσον αφορά το άζωτο κατά τη εφαρμογή του κόμποστ στο έδαφος. Όταν ο λόγος C/N είναι μικρότερος του 25 τότε υπάρχει αρκετό άζωτο για τους μικροοργανισμούς και πραγματοποιείται ανοργανοποίηση. Γενικά, όταν ο

λόγος είναι χαμηλός (<20) το άζωτο βρίσκεται σε περίσσεια και υπάρχει κίνδυνος ποσότητα αζώτου να χαθεί ως αμμωνία δημιουργώντας προβλήματα οσμών αλλά και μείωση των διαθέσιμων πηγών θρέψης των φυτών. Η συσσώρευση αμμωνίας συνδέεται με αναερόβιες διεργασίες και γενικά προκαλεί ποιοτική υποβάθμιση του σωρού και προβλήματα φυτοτοξικότητας.

Αν ο λόγος είναι πολύ μεγάλος (>50) υπάρχει μικρή ποσότητα αζώτου διαθέσιμη για τη μικροβιακή θρέψη. Η διαδικασία της κομποστοποίησης επιβραδύνεται όσο οι μικροοργανισμοί περιμένουν το άζωτο να γίνει διαθέσιμο. Το φαινόμενο είναι γνωστό ως ακινητοποίηση αζώτου.

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).

Ο λόγος C/N μπορεί να αποτελέσει έναν αξιόπιστο δείκτη μέτρησης της ωριμότητας και παρακολούθησης της κομποστοποίησης.

### **1.2.3 Αερισμός**

Όπως ήδη έχει αναφερθεί η κομποστοποίηση είναι αερόβια οξειδωτική αποδόμηση της οργανικής ύλης. Απαραίτητη λοιπόν θεωρείται η ύπαρξη επαρκούς ποσότητας οξυγόνου για τη συντήρηση της μικροπανίδας και για το συνεχή αποικισμό της μάζας του σωρού από αερόβιους ετερότροφους μικροοργανισμούς (μύκητες, ακτινομύκητες, βακτήρια). Επίσης είναι απαραίτητη η απρόσκοπτη κυκλοφορία αέρα διαμέσου της οργανικής ύλης προς αποφυγή επικράτησης αναερόβιων συνθηκών, οι οποίες είναι ανεπιθύμητες επειδή προκαλούν συσσώρευση τοξικών ουσιών ( CH<sub>4</sub>, αλκοόλες, πτητικά οξέα ) (Hoiting, 1980).

Οι παράγοντες που ελέγχουν τα επίπεδα του οξυγόνου είναι: ο ρυθμός κατανάλωσης του, η θερμοκρασία, το μέγεθος των πόρων καθώς και η περιεχόμενη υγρασία (Miller, 1993). Για να υπάρξει ικανοποιητικός αερισμός θα πρέπει η υγρασία του σωρού να μην είναι υψηλή (>60-70%) διότι τότε οι πόροι του σωρού είναι πληρωμένοι με νερό και η διακίνηση του οξυγόνου περιορίζεται αισθητά με αποτέλεσμα την ανάπτυξη αναερόβιων συνθηκών (ακινητοποίηση οξυγόνου).

Η διακίνηση του αέρα είτε είναι παθητική είτε εξαναγκασμένη (forced aeration), εξαρτάται κάθε φορά από το σύστημα κομποστοποίησης που έχει επιλεγεί καθώς και



από τις ιδιαιτερότητες του προς κομποστοποίηση υλικού. Τρεις βασικές μέθοδοι αερισμού παρέχουν  $O_2$  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  $O_2$  παρέχεται με χρήση αεριστήρων ή μεταφερόμενης ροής αέρα (Erstein, 1997).

Γεγονός είναι πάντως ότι όσο ιδανικές και να είναι οι επικρατούσες συνθήκες αερισμού ένα μέρος της κομποστοποίησης εκτελείται αναερόβια.

#### 1.2.4 Υγρασία

Η υγρασία είναι ένας καθοριστικός παράγοντας για την πορεία της κομποστοποίησης και θα πρέπει να δίνεται προσοχή στην τιμή της. Είναι αποδεκτό ότι η καλύτερη σταθεροποίηση της οργανικής ουσίας επιτυγχάνεται σε ποσοστό υγρασίας 90%. Όμως στην κομποστοποίηση το προτεινόμενο εύρος της υγρασίας είναι μεταξύ 45% και 60% τόσο για λεπτόκοκκα όσο και για χονδρόκοκκα υλικά (Manios and Balis, 1983). Η υγρασία πρέπει να κυμαίνεται σε αυτά τα επίπεδα ώστε να μην ευνοείται η ανάπτυξη και η επικράτηση αναερόβιων συνθηκών (ανοξία) ή μερικώς αναερόβιων συνθηκών (υποξία). Σαν ανώτατη τιμή υγρασίας έχει καθοριστεί αυτή του 75%. Εάν για οποιοδήποτε λόγο η τιμή της υγρασίας υπερβεί το ανώτερο όριο θα ακολουθήσει πλήρωση των κενών μεταξύ των σωματιδίων, και οι ποσότητες νερού σταδιακά θα εκτοπίσουν τον υπάρχοντα αέρα. Ένα μεγάλο μέρος της διαδικασίας κομποστοποίησης είναι η απώλεια νερού, σαν αποτέλεσμα της εξάτμισης του. Είναι ευρέως γνωστό ότι αναστολή της μικροβιακής δραστηριότητας συμβαίνει όταν οι τιμές υγρασίας πέσουν κάτω από 30 - 35 % (Stentiford, 1995).

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι το κατάλληλο επίπεδο υγρασίας για διαφορετική πρώτη ύλη θα πρέπει να καθορίζεται με βάση τα ιδιαίτερα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά διότι το κάθε υλικό έχει ιδιαίτερες απαιτήσεις σε υγρασία και επιπλέον φέρει από μόνο του ένα υδατικό φορτίο το οποίο πιθανόν να είναι ικανό να υποστηρίξει τη διαδικασία κομποστοποίησης. Σημαντικό είναι το διαθέσιμο υγρασιακό φορτίο να υπάρχει σε επάρκεια σε όλη τη διάρκεια της κομποστοποίησης. Η διόρθωση της

υγρασίας πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια των αναμοχλεύσεων (γυρισμάτων). Η επιφανειακή διαβροχή του σωρού δεν αποδίδει τα αναμενόμενα αφού μόνο η εξωτερική στοιβάδα του σωρού επωφελείται και αυτή μάλιστα κατά τόπους. Η διαβροχή θα πρέπει να είναι ομοιόμορφη και καθολική. Περισσότερη προσοχή στο υγρασιακό καθεστώς πρέπει να δοθεί στα στάδια της θερμόφιλης φάσης, διότι τη χρονική αυτή περίοδο παρατηρούνται και οι μεγαλύτερες απώλειες σε νερό λόγω της ανάπτυξης υψηλών θερμοκρασιών που ευνοούν την εξάτμιση του από τον σωρό. Κατά τη φάση αυτή η υγρασία πρέπει να κυμαίνεται σε ποσοστό 50-60% (McKinley et al., 1985).

### **1.2.5 Θερμοκρασία**

Η θερμοκρασία αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα για τη διαδικασία της κομποστοποίησης, καθώς σχετίζεται άμεσα με το ρυθμό αποδόμησης της οργανικής ύλης και τη διατήρηση της μικροχλωρίδας στη μάζα του υλικού. Η θερμοκρασία καθορίζεται από δύο παράγοντες, την επίδραση του περιβάλλοντος και την ένταση και τη διάρκεια της μικροβιακής δραστηριότητας. Η κομποστοποίηση ολοκληρώνεται αποτελεσματικότερα και γρηγορότερα όταν κυριαρχούν συνθήκες που ενθαρρύνουν τη θερμόφιλη αποδόμηση της οργανικής ύλης. Στη διατήρηση υψηλών θερμοκρασιών συμβάλει σημαντικά η μείωση των απωλειών θερμότητας προς το γύρω περιβάλλον. Αυτό σχετίζεται κυρίως με τα συστήματα ανοικτού τύπου τα οποία βρίσκονται έκθετα στο περιβάλλον. Η έκταση της ελεύθερης επιφάνειας του κόμποστ έχει σημαντική επίδραση στον ρυθμό απωλειών θερμότητας. Η χρονική διάρκεια της θερμόφιλης φάσης εξαρτάται από το μέγεθος και το σχήμα του σωρού (Handar, 1993).

Η θερμοκρασία που αναπτύσσεται κατά την πορεία της κομποστοποίησης είναι μικροβιακής προέλευσης και οφείλεται σε καύσεις που οφείλονται στον ενεργό μεταβολισμό της διαθέσιμης οργανικής ουσίας η οποία αποτελεί τροφή των μικροοργανισμών. Ένα μεγάλο ποσοστό (80-90%) της θερμότητας που παράγεται κατά τον τρόπο αυτό φεύγει μέσω της εξάτμισης και μόλις το 10% έως 20 % προορίζεται για τη αύξηση της θερμοκρασίας. Η διατήρηση και ο πολλαπλασιασμός των μικροοργανισμών αυτών εξαρτάται άμεσα από τη μεταβολική τους δραστηριότητα. Όταν πάντων να παράγουν θερμότητα λόγω έλλειψης ή

περιορισμένης διαθεσιμότητας θρεπτικών στοιχείων, οι χαμηλότερες θερμοκρασίες που επικρατούν δεν επιτρέπουν την παραπέρα επιβίωση τους.

Είναι καθολικά αποδεκτό ότι η μέγιστη δυνατή αποδόμηση λαμβάνει χώρα στο χαμηλότερο όριο της θερμοφίλης περιοχής (50-60°C), η ελάχιστη θερμοκρασία λειτουργίας είναι 35°C ενώ σε θερμοκρασίες άνω των 65°C οι μικροοργανισμοί ή θανατώνονται (θερμική λύση κυττάρων) ή επιβιώνουν με την λανθάνουσα μορφή τους (σπόρια). Η θερμοφίλη περιοχή είναι η περιοχή κύριας αποδόμησης, όπου οι κυτταρινούχες και οι λιγνινούχες ουσίες αποδομούνται αποτελεσματικότερα.

Οι Jeris & Regan (1973c) ανέφεραν πως η βέλτιστη θερμοκρασία αποικοδόμησης για τα αστικά στερεά απόβλητα ήταν κοντά στους 60 °C, ενώ ο Schultz (1961) τους 65-70 °C, όπως αναφέρεται στον Epstein (1997).

Η μεγιστοποίηση της εξυγίανσης πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες πάνω του 55°C, η μεγιστοποίηση της βιοαποδόμησης επιτυγχάνεται μεταξύ 45-55°C και τέλος η μεγιστοποίηση της μικροβιακής ποικιλομορφίας πραγματοποιείται μεταξύ 35 με 40°C (Stentiford, 1996).

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).

### **1.2.6 pH**

Το pH επηρεάζει έμμεσα την κομποστοποίηση και όχι άμεσα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης αποδόμησης της οργανικής ουσίας και προσδιορισμού της αποσάθρωσης της. Το pH συνδέεται στενά με τη ύπαρξη των μικροβιακών πληθυσμών στο κόμποστ διότι από την τιμή του εξαρτάται το μικροβιακό καθεστώς. Τα βακτήρια προτιμούν ουδέτερο pH, οι μύκητες αρέσκονται σε τιμές μεταξύ 4 και 6 και οι ακτινομύκητες περιορίζουν τη δράση τους σε ελαφρά αλκαλικά περιβάλλοντα. Θεωρητικά οποιαδήποτε ουσία έχει pH μεταξύ των τιμών 3 και 11 μπορεί να

κομποστοποιηθεί ενώ η άριστη τιμή κυμαίνεται μεταξύ 5,5 και 8 (De Bertoldi et al., 1982).

Στην αρχική φάση της αποδόμησης του κόμποστ το pH είναι χαμηλό (4,5-6,5) λόγω της παραγωγής οργανικών οξέων τα οποία προέρχονται από τις αποδομητικές διαδικασίες των μικροοργανισμών. Το όξινο περιβάλλον είναι ιδανικό για τη ανάπτυξη μυκήτων και για τη αποδόμηση της λιγνίνης και της κυτταρίνης. Στη συνέχεια καθώς τα οργανικά οξέα αποδομούνται και το pH στον κομποστοσωρό αυξάνει. Η αύξηση του pH συνδέεται πιθανόν με την αύξηση της αλατότητας στη μάζα του κόμποστ λόγω της εξάτμισης του νερού καθώς επίσης και με την απελευθέρωση της αμμωνίας κατά τα πρώτα στάδια . Η παραγωγή αμμωνίας τείνει να είναι μεγαλύτερη όταν επικρατούν αναερόβιες συνθήκες.

Άριστο pH θεωρείται εκείνο της ελαφρά αλκαλικής αντίδρασης (6,5-7,5) δεδομένου ότι ευνοεί τη δραστηριότητα των βακτηρίων χωρίς να περιορίζει σημαντικά εκείνη των μυκήτων (Stentiford, 2001).

---

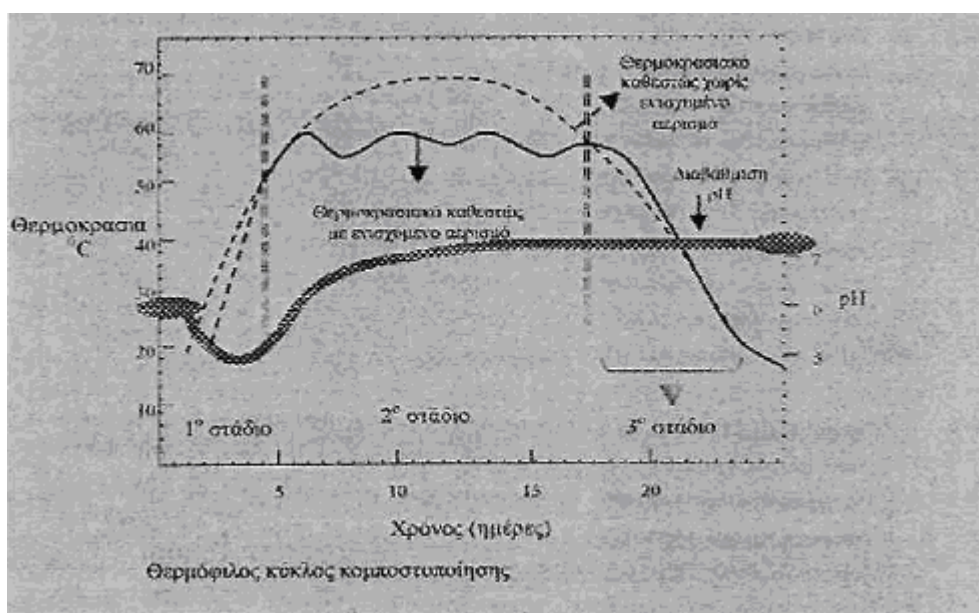
**Πίνακας 1.3** Συγκεντρωτική παρουσίαση των ιδανικών συνθηκών για ταχεία αερόβια αποικοδόμηση κατά την κομποστοποίηση (προσαρμοσμένο από Cooperband, 2002).

---

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

### 1.3 Πορεία της κομποστοποίησης και ο ρόλος των μικροοργανισμών

Η πορεία της κομποστοποίησης τυπικά είναι χωρισμένη σε δύο φάσεις. Στην ενεργή - θερμόφιλη φάση και στη φάση ωρίμανσης. Η πρώτη χαρακτηρίζεται από μια ένταση στη μικροβιακή δραστηριότητα η οποία οδηγεί στη αποσύνθεση των βιοαποδομήσιμων υλικών. Η δεύτερη φάση χουμοποίησης χαρακτηρίζεται από την μετατροπή των εναπομεινάντων οργανικών υλικών σε χουμικές ενώσεις (Chen and Indar, 1993).



**Εικόνα 1.3:** Τα στάδια κομποστοποίησης συναρτήσεως του χρόνου.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, πρωτεύοντα ρόλο στη διαδικασία της κομποστοποίησης κατέχουν οι μικροοργανισμοί. Η κομποστοποίηση είναι μια διαδοχή μικροβιακών δραστηριοτήτων, κατά τις οποίες το περιβάλλον που δημιουργείται από μια ομάδα μικροοργανισμών ενθαρρύνει τη δραστηριότητα των ομάδων που τους διαδέχονται. Διαφορετικά είδη μικροοργανισμών είναι ενεργά σε διαφορετικές στιγμές στο σωρό του κόμποστ. Τα βακτήρια έχουν τη μεγαλύτερη επίδραση στη διαδικασία της αποσύνθεσης και είναι τα πρώτα που αναλαμβάνουν δράση στο σωρό χρησιμοποιώντας γρηγορότερα από κάθε άλλο τύπο μικροοργανισμών τα εύκολα αφομοιώσιμα θρεπτικά συστατικά.

Σύμφωνα με τον Stentiford (1996) σε θερμοκρασίες 45 - 55° C μεγιστοποιείται ο ρυθμός βιοαποδόμησης, σε θερμοκρασίες 35 - 40° C μεγιστοποιείται η μικροβιακή

ποικιλότητα, ενώ θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 55° C συμβάλουν στην εξυγίανση του υποστρώματος καθώς θανατώνονται οι παθογόνοι μικροοργανισμοί.

Σε όλη τη διάρκεια της πρώτης φάσης παρατηρείται μια συνεχής αλλαγή στο θερμοκρασιακό καθεστώς του υλικού κομποστοποίησης. Οι αλλαγές αυτές σηματοδοτούν τόσο τη χρονική όσο και την τοπική αποίκιση του κομποστοσφρού από πλήθος μικροβιακών πληθυσμών. Η θερμοκρασία δηλαδή ασκεί μία επιλεκτική πίεση ως προς τη διαδοχή των μικροβιακών πληθυσμών. Οι οικολογικές έρευνες που έχουν γίνει για την περιγραφή της πορείας της κομποστοποίησης θα μπορούσαν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες: τις αυτοοικολογικές (auto ecological) και τις συνοικολογικές (synecological) (Miller,1993). Στην πρώτη περίπτωση οι έρευνες αναφέρονται στην ταυτοποίηση και καταμέτρηση συγκεκριμένων πληθυσμών, ενώ στη δεύτερη οι μετρήσεις αφορούν στη εκτίμηση της μικροβιακής δραστηριότητας μέσω της έκλυσης θερμότητας ή μέσω της αναπνευστικής δραστηριότητας. Η πορεία κομποστοποίησης αποτελείται από τρία τουλάχιστον εμφανή στάδια, τα οποία παρατηρούνται σχεδόν πάντοτε (**Εικόνα 1.3**).

### **1.3.1 Στάδια κομποστοποίησης**

#### **Πρώτο στάδιο**

Το στάδιο αυτό διαρκεί από μία μέχρι 2-3 ημέρες. Κατά το στάδιο αυτό παρατηρείται αύξηση της θερμοκρασίας του υλικού από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος σε θερμοκρασίες που χαρακτηρίζουν τη μεσόφιλη φάση ( $T < 40^{\circ}\text{C}$ ). Στις πρώτες αυτές ημέρες της κομποστοποίησης η έκλυση θερμότητας γενικεύεται και η θερμοκρασία εμφανίζει απότομη άνοδο για να φτάσει στο ανώτερο σημείο λίγες ημέρες αργότερα. Πολλές φορές η θερμοκρασία δεν μπορεί να φτάσει στο ανώτερο επίπεδο που απαιτείται για την παραγωγή ασφαλούς κόμποστ κάτι που είναι αναμενόμενο εάν η προς κομποστοποίηση ποσότητα είναι μικρή και η επιρροή της εξωτερικής θερμοκρασίας δεν είναι ευνοϊκή για το ξεκίνημα της κομποστοποίησης (Haug, 1986).

Κατά το στάδιο αυτό πραγματοποιείται η βιοαποδόμηση των εύκολα αποδομήσιμων από τους μικροοργανισμούς ουσιών, όπως πρωτεϊνών και σακχάρων. Οι μικροοργανισμοί που κυριαρχούν κατά τη φάση αυτή είναι τα μεσόφιλα βακτήρια, όπου αναπτύσσονται καλύτερα σε θερμοκρασίες μεταξύ 25 °C και 45 °C. Το γεγονός

της επικράτησης των βακτηρίων, οφείλεται στους γρήγορους ρυθμούς πολλαπλασιασμού τους καθώς και στην υψηλή αρχική υγρασία του υλικού (Strom, 1985). Όταν η θερμοκρασία φθάσει στους 45° C οι μεσόφιλοι πληθυσμοί πεθαίνουν και κυριαρχούν τα θερμοφιλα βακτήρια όπως το γένος *Bacillus*. Οι ακτινομύκητες και οι μύκητες δεν μπορούν να αντέξουν τόσο υψηλές θερμοκρασίες για αυτό και απουσιάζουν από το στάδιο αυτό. Η γρήγορη αποδόμηση που παρατηρείται στο στάδιο αυτό εκτός από την αύξηση της θερμοκρασίας έχει σαν αποτέλεσμα και την μείωση του pH (λόγω της παραγωγής οργανικών οξέων από την αποδόμηση των σακχάρων και των πρωτεϊνών). Το αρχικό αυτό στάδιο είναι πολύ κρίσιμο για την περαιτέρω εξέλιξη της κομποστοποίησης, διότι αν η θερμοκρασία δεν κατορθώσει να προσεγγίσει τα επιθυμητά όρια της μεσόφιλης - θερμοφιλης φάσης τότε το τελικό προϊόν της κομποστοποίησης θα είναι πιθανότατα ακατάλληλο για εφαρμογή (φαινόμενο ατελούς κομποστοποίησης).

### **Δεύτερο στάδιο**

Στο στάδιο αυτό οι μεσόφιλοι μικροοργανισμοί δίνουν τη θέση τους στους θερμοφίλους οι οποίοι προτιμούν θερμοκρασίες μεταξύ 45 και 70° C και παράγουν ακόμα μεγαλύτερες ποσότητες θερμότητας, έτσι ώστε η θερμοκρασία που παρατηρείται αρκεί για να θανατώσει τα περισσότερα παθογόνα και ζιζάνια. Η θερμοκρασία σε αυτό το στάδιο κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 40-80°C (θερμοφιλη φάση). Οι πληθυσμοί των βακτηρίων λόγω της αδυναμίας τους να επιβιώσουν σε αυτές τις συνθήκες είτε εξαφανίζονται είτε εγκαθίστανται στην εξωτερική επιφάνεια του υλικού, στην περιφερειακή ζώνη, όπου εκεί οι θερμοκρασίες είναι πιο χαμηλές και επιτρέπουν τη επιβίωση τους. Γενικά, η ποικιλότητα των ειδών των οργανισμών στο θερμοφιλο στάδιο της κομποστοποίησης μειώνεται έντονα σε θερμοκρασίες πάνω από 60 °C (Strom, 1985). Επίσης όταν η θερμοκρασία υπερβεί τους 60 °C και η μικροβιακή δραστηριότητα μειώνεται δραματικά (Strom, 1985 ,McKilney and Vestal, 1985).

Φυλογενετικές αναλύσεις βασισμένες σε 16s rRNA αναγνώσεις έδειξαν ότι τα δύο συνηθέστερα γένη βακτηρίων στη θερμοφιλη φάση είναι αυτά των *Aneurinibacillus* και *Brevibacillus* (Dees and Chiorse , 2001)

Κατά το στάδιο αυτό τα σάκχαρα και οι πρωτεΐνες έχουν αποδομηθεί από τα βακτήρια. Οι κυρίαρχοι πληθυσμοί τώρα είναι οι θερμοφιλοι μύκητες οι οποίοι είναι ικανοί να διασπούν πολυπλοκότερες ουσίες, όπως πολυσακχαρίτες (κυτταρίνες και

ημικυτταρίνες). Επίσης απαντώνται και ορισμένα είδη ακτινομυκήτων καθώς και ορισμένα είδη βακτηρίων της θερμοφιλης περιοχής, τα οποία έχουν τη ικανότητα να χρησιμοποιούν την κυτταρίνη ως πηγή άνθρακα (κυτταρινολυτικά βακτήρια).

Η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών αυτών στις υψηλές θερμοκρασίες βασίζεται στη αντοχή των ενζυμικών τους συστημάτων σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες. Επιπλέον στη φάση αυτή το pH αυξάνει, αρχικά λόγω της αποδόμησης των οργανικών οξέων που έχουν παραχθεί κατά το πρώτο στάδιο και στην συνέχεια λόγω της συσσώρευσης των αλάτων που οφείλεται στην εξάτμιση του νερού.

Πολλές φορές η θερμοκρασία κατά το στάδιο αυτό μπορεί να πλησιάσει σε απαγορευτικά για την κομποστοποίηση επίπεδα. Αν η θερμοκρασία ξεπεράσει κάποια οριακή τιμή, τότε οι μικροβιακοί πληθυσμοί θανατώνονται ή εξακολουθούν να υπάρχουν σε λανθάνουσα μορφή ως σπόρια, σκληρώτια κ.λ.π.. Το θερμοκρασιακό αυτό κατώφλι εντοπίζεται γύρω στους 70°C, μία θερμοκρασία η οποία είναι εφικτή στην πράξη κατά τη διαδικασία της κομποστοποίησης γεωργικών υπολειμμάτων. Ο κίνδυνος αυτός αντιμετωπίζεται εν μέρει με διάφορα συστήματα αερισμού του κομποστοσωρού, τα οποία επάγουν τη θερμότητα και επιπλέον τροφοδοτούν το υλικό με επαρκείς ποσότητες αέρα εξασφαλίζοντας τις απαιτούμενες αερόβιες συνθήκες. Τέλος κατά το στάδιο αυτό είναι αναγκαία η διαβροχή του υλικού ώστε να ικανοποιούνται οι ανάγκες των μικροοργανισμών σε υγρασία καθώς και να γίνεται αναπλήρωση του φυσικά εξατμιζόμενου νερού. Η διάρκεια του εν λόγω σταδίου κυμαίνεται από μερικές μέρες μέχρι μήνες, ενώ κριτήριο λήξης της παρούσας φάσης αποτελεί η βαθμιαία μείωση της θερμοκρασίας.

### **Τρίτο στάδιο**

Το στάδιο αυτό έπεται των δύο προηγούμενων και χαρακτηρίζεται από πολλές ποιοτικές και ποσοτικές αλλαγές. Η ενέργεια που παράγεται από τη μικροβιακή δραστηριότητα είναι χαμηλή και αδυνατεί να καλύψει τις απώλειες θερμότητας από το υλικό προς τον περιβάλλοντα χώρο. Αυτό συμβαίνει λόγω της μείωσης των πηγών ενέργειας που αδυνατούν πλέον να καλύψουν τις διατροφικές ανάγκες και τις απαιτήσεις των μικροοργανισμών σε άνθρακα. Η υγρασία κατά το στάδιο αυτό βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα αν όχι τη εξαφάνιση των βακτηρίων, τουλάχιστον τον περιορισμό τους σε πολύ μικρούς πληθυσμούς.

Στο στάδιο αυτό οι θερμοφιλοι μικροοργανισμοί περιορίζονται, και τη θέση τους την καταλαμβάνουν μεσόφιλοι λιγνιολυτικοί μύκητες και ακτινομύκητες. Οι μικρο-



οργανισμοί αυτοί δραστηριοποιούνται στην αποδόμηση δύσκολα αποδομήσιμων υλικών π.χ. κυτταρίνης, ημικυτταρίνης, και λιγνίνης τα οποία στην πραγματικότητα είναι και τα μόνα διαθέσιμα υλικά για θρέψη. Η αύξηση του πληθυσμού των μυκήτων κατά το τελευταίο στάδιο της κομποστοποίησης μπορεί να οφείλεται στην παρουσία κυτταρίνης και λιγνίνης. Επίσης και οι ακτινομύκητες κατά την φάση της πτώσης της θερμοκρασίας αποδομούν την κυτταρίνη. Οι λόγοι που δικαιολογούν την εγκατάσταση μυκήτων και ακτινομυκήτων στην φάση αυτή είναι το γεγονός ότι οι οργανισμοί αυτοί είναι λιγότερο απαιτητικοί σε υγρασία, προτιμούν τις έντονα αναερόβιες συνθήκες και το ουδέτερο έως ελαφρά αλκαλικό pH.

Τα γένη των ακτινομυκήτων που έχουν ταυτοποιηθεί σε κόμποστ είναι *Streptomyces sp.*, *Thermomonosora sp.*, *Thermoactinomyces vulgaris*. Ο αριθμός τους ορισμένες φορές είναι τόσο μεγάλος ώστε να είναι ορατοί στην επιφάνεια του κόμποστ με γυμνό μάτι δίνοντας ένα ελαφρώς ωχροκίτρινο χρώμα.

Στη φάση αυτή ενδείκνυται η επαναδιαβροχή του υλικού με ταυτόχρονη μηχανική αναμόχλευση του. Η πρακτική αυτή κρίνεται αναγκαία εάν σκοπός μας είναι η παραγωγή ενός όσο πιο σταθερού τελικού προϊόντος. Η αναμόχλευση εξασφαλίζει στους μικροοργανισμούς καινούργιες επιφάνειες αποδόμησης σπάζοντας τυχόν υπάρχοντα συσσωματώματα και κάνοντας αυτά διαθέσιμα στους γύρω πληθυσμούς. Επίσης η αναμόχλευση δίνει ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα στην τελική δομή του κόμποστ. Ομοιογενοποιεί το υλικό (ιδίως αν το υλικό είναι ετερογενές ή αμιγώς ομογενές) δίνοντας του την ίδια δομή και πυκνότητα σε όλη του τη έκταση. Ακόμα η αναμόχλευση εξασφαλίζει σε μεγάλο βαθμό τη ανταλλαγή αερίων, αφού οξυγόνο διεισδύει στον κομποστοσωρό εξασφαλίζοντας τη διατήρηση αερόβιων συνθηκών, ενώ συγχρόνως επιτρέπει στα τυχόν παγιδευμένα αέρια προϊόντα της κομποστοποίησης (CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, NO) να βρουν διέξοδο προς το περιβάλλον συμβάλλοντας έτσι στην επιτάχυνση της όλης διαδικασίας. Η διαβροχή εξασφαλίζει την αναγκαία ποσότητα νερού στο υλικό ώστε να ικανοποιούνται οι απαιτήσεις των μικροοργανισμών σε υγρασία. Με τον τρόπο αυτό παρέχεται η δυνατότητα να ξεκινήσει ένας ακόμα θερμοφίλος κύκλος καθώς ανανεώνονται οι πηγές ενέργειας και κυριαρχούν συνθήκες οι οποίες ευνοούν την αύξηση της θερμοκρασίας για μία ακόμα φορά.

Μετά από κάθε αναμόχλευση παρατηρείται αύξηση της αναπνευστικής δραστηριότητας, γεγονός το οποίο είναι αναμενόμενο καθώς ο κύκλος επαναλαμβάνεται. Μετά το "γύρισμα" του κομποστοσωρού η θερμοκρασία αυξάνει

και σε διάστημα 2-3 ημερών πλησιάζει τα όρια της θερμοφιλης περιοχής. Ακολουθεί η θερμοφιλη φάση, η διάρκεια της οποίας είναι μικρότερη από ότι ήταν στον πρώτο κύκλο (λόγω των μειωμένων αποθεμάτων σε θρεπτικά συστατικά) και τελικά επικρατεί μία νέα μεσόφιλη φάση.

Σε κάθε κύκλο η διάρκεια της κάθε φάσης καθώς και τα ανώτερα όρια των θερμοκρασιών μειώνονται βαθμιαία ακόμα και αν επικρατούν ευνοϊκές συνθήκες υγρασίας και αερισμού. Το φαινόμενο αυτό δικαιολογείται λόγω της έλλειψης άμεσα αποδομήσιμων υλικών, τα οποία σε κάθε γύρισμα είναι λιγότερα. Στην πράξη ο σωρός μετά από 3-4 "γυρίσματα" αδυνατεί να ακολουθήσει ακόμα έναν θερμοφιλο κύκλο (κοινώς "να ανεβάσει θερμοκρασία") και θεωρείται ότι στο σημείο αυτό το εξώθερμο μέρος της κομποστοποίησης έχει τελειώσει.

Καθώς η θερμοκρασία πέφτει κάτω από τους 35° C, οι ενώσεις που δεν έχουν ήδη διασπαστεί εμφανίζουν μια αντοχή στην αποσύνθεση, ενώ κυριαρχούν οι μύκητες με την ικανότητα τους να αποικοδομούν τις πιο δύσκολες ενώσεις. Η συνολική μικροβιακή δραστηριότητα μειώνεται σταδιακά με πολύ αργούς ρυθμούς όταν οι ενώσεις που απομένουν είναι ανθεκτικές στην αποσύνθεση.

Στον **Πίνακα 1.4** παρουσιάζονται συνοπτικά μικροοργανισμοί που έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορες φάσεις της κομποστοποίησης.

**Πίνακας 1.4** Συνοπτική παρουσίαση μικροοργανισμών που κατά καιρούς έχουν ταυτοποιηθεί κατά την κομποστοποίηση (Προσαρμοσμένο από Epstein, 1997).

Βακτήρια		Ακτινομύκητες	
<i>Aerobacter (aerogenes)</i>	<i>Sarcina sp.</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Pseudonocardia</i>
<i>Bacillus megathirium</i>	<i>Cellomonas folia</i>	<i>Thermomonospora viridis</i>	<i>S. thermoviolaceus</i>
<i>B. stearothermophilus</i>	<i>Chondrococcus exiguus</i>	<i>Micromonospora parva</i>	<i>S. rectus</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Mycococcus virescens</i>	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	<i>S. thermofuscus</i>
<i>B. mycoides</i>	<i>M. fulvus</i>	<i>Actinoplanes sp.</i>	<i>S. thermovulgaris</i>
<i>Pseudomonad sp.</i>	<i>Thibacillus thiooxidans</i>	<i>Thermopolyspor polyspora</i>	<i>T. glaucus</i>
<i>Flavobacterium sp.</i>	<i>T. denitrificans</i>	<i>Thermomonospora fusca</i>	<i>T. curvata</i>
<i>Micrococcus sp.</i>	<i>Proteus sp.</i>	<i>Streptomyces violaceoruber</i>	<i>M. vulgaris</i>

<b>Μύκητες</b>			
<i>Rhizopus nigricans</i>	<i>Hanisenula sp.</i>	<i>Aspergillus tamarii</i>	
<i>Rhizoctonia sp.</i>	<i>Trichoderma koningi</i>	<i>Zygorhynchus vuilleminii</i>	
<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Talaromyces (Penicillium) duponti</i>	<i>Trichosporon cutaneum</i>	
<i>Mucor pusillus</i>	<i>Stysanus stemonitis</i>	<i>Verticillium sp.</i>	
<i>Penicillium digitatum</i>	<i>Glibotrys (alaboviridis)</i>	<i>Synecephalastrum sp.</i>	
<i>Mucor racemosus</i>	<i>Humicola insolens</i>	<i>Pichia sp.</i>	
<i>Torulopsis sp.</i>	<i>Humicola griseus var. thermoideus</i>	<i>Cylindrocara sp.</i>	
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Absidis orchidis</i>	<i>Chaetomium (thermophile)</i>	
<i>Absidia (ramosa)</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>	<i>Lipomyces sp.</i>	
<i>Saccharomyces sp.</i>	<i>Candida (parapsilosis)</i>	<i>Sporotrichium thermophile</i>	
<i>Pulluloria sp.</i>	<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>	
<b>Πρωτόζωα</b>	<b>Φύκη</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>	

### 1.3.2 Οι μικροοργανισμοί στην κομποστοποίηση

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 σε κόμποστ υψηλής θερμοκρασίας. 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 (2001) 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) για τρία λεπτά οδήγησε στην αδρανοποίηση ευαίσθητων βακτηρίων (όπως Gram<sup>-</sup>).

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 – κέντρο – επιφάνεια) όταν η θερμοκρασία στο κέντρο 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 (διαδικασία κομποστοποίησης οργανικών αποβλήτων με την επιπρόσθετη δράση σκουληκιών στη μάζα του σωρού), 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 *Gamma**proteobacteria* και στην κλάση *Alphaproteobacteria*. Επίσης βρέθηκαν αλληλουχίες από τα φύλα *Actinobacteria*, *Firmicutes* και *Acidobacteria*.

#### **1.4 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. 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 σε θρεπτικό υλικό 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 (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 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 μικροσυστοιχιών (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.

### **1.5 Συστήματα κομποστοποίησης**

Για την επιτυχή παραγωγή ώριμου κόμποστ, κατάλληλου για γεωργική ασφαλή χρήση και απαλλαγμένου παθογόνων, είναι απαραίτητη η σωστή επιλογή της μεθόδου κομποστοποίησης. Υπάρχουν διάφορα συστήματα κομποστοποίησης, άλλα

δαπανηρά και πολύπλοκα και άλλα απλούστερα και οικονομικότερα. Τα συστήματα που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη διάδοση είναι τα συστήματα ανοικτού τύπου και τα συστήματα κλειστού τύπου. Τα τελευταία είναι γνωστά ως εγκιβωτισμένα συστήματα.

Η επιλογή του καταλληλότερου συστήματος κομποστοποίησης εξαρτάται και καθορίζεται από τα εξής :

α) Από τη φύση και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της πρώτης ύλης που θα υποστεί κομποστοποίηση.

β) Από το αν η πρώτη ύλη είναι διαθέσιμη όλο το έτος ή εποχιακά.

γ) Από την απόσταση του σημείου παραγωγής της πρώτης ύλης και του τόπου επεξεργασίας της.

δ) Από την επιλογή της τοποθεσίας εγκατάστασης της μονάδος κομποστοποίησης (κατοικημένη ή όχι περιοχή ).

ε) Από το δίκτυο διανομής του τελικού προϊόντος.

στ) Από τα κριτήρια ποιότητας του τελικού προϊόντος που έχει θεσπίσει ο σχετικός φορέας του κράτους,

ζ) Από το οικονομικό κέρδος της όλης διαδικασίας .

η) Από το ύψος του κεφαλαίου που είναι διαθέσιμο για αγορά εξοπλισμού και κάλυψη αναγκών σε ανθρώπινο δυναμικό. Όλοι οι παραπάνω λόγοι πρέπει να ληφθούν σοβαρά υπόψη κατά την διαδικασία επιλογής της μεθόδου κομποστοποίησης.

### **1.5.1 Συστήματα ανοικτού τύπου (windrows)**

Η πρώτη ύλη συνήθως διαμορφώνεται σε κωνικούς σωρούς, τα σειράδια. Η μέθοδος αυτή είναι η πλέον διαδεδομένη λόγω του χαμηλού κατασκευαστικού κόστους, της απλότητας των χειρισμών που απαιτούνται και του πλεονεκτήματος της ότι είναι κατάλληλη για τη διαχείριση μεγάλων ποσοτήτων πρώτης ύλης. Διακρίνουμε την παραδοσιακή και την εντατική μορφή της .



**Εικόνα 1.4:** Παραδοσιακή μορφή συστήματος ανοιχτού τύπου

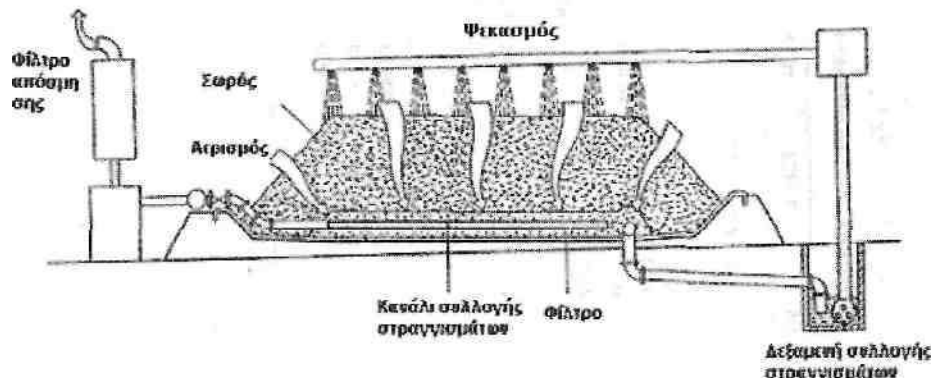
Κατά την παραδοσιακή μορφή η πρώτη ύλη στοιβάζεται σε σωρούς (piles), 2-2.5 m ύψος και 4-6 m πλάτος (**Εικόνα 1.4**). Οι σωροί είναι αμορφοποίητοι και δεν δέχονται ιδιαίτερους χειρισμούς από τους παρασκευαστές για αρκετούς μήνες

Ο αερισμός πραγματοποιείται παθητικά με φυσική διάχυση διαμέσου των πόρων, και η υγρασία καθορίζεται αποκλειστικά από τις εξωτερικές συνθήκες. Δεν υπάρχει η δυνατότητα ελέγχου της θερμοκρασίας, της υγρασίας και του αερισμού.

Τα εντατικά ανοιχτά συστήματα κομποστοποίησης βασίζονται στη δημιουργία σωρών που πληρούν ορισμένες προϋποθέσεις και δομούνται σε καθορισμένα σχήματα. Οι κομποστοσωροί μπορεί να πάρουν την μορφή τριγωνικού τύπου (Windrow system) ή τραπεζοειδούς τύπου (σωροί τύπου UNI 4000). Οι διαστάσεις των σωρών εντατικής κομποστοποίησης είναι σωροί πλάτους 3-4 μέτρων και ύψους 1,5-1,8 μέτρων και θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη κατά τη διαδικασία σχηματισμού τους. Το μήκος του σωρού εξαρτάται κάθε φορά από το διαθέσιμο χώρο της μονάδας. Οι σωροί αυτού του τύπου καλούνται "σειράδια" και αποτελούν την κύρια μέθοδο κομποστοποίησης ανοικτού τύπου. Το σύστημα θεωρείται εντατικό καθώς ενσωματώνει πρακτικές επεξεργασίας που αποσκοπούν στην επιτάχυνση της διαδικασίας αποδόμησης της οργανικής ύλης και ενεργητικούς μηχανισμούς αερισμού και αναμόχλευσης. Οι συνθήκες αερισμού και υγρασίας κατά τη διάρκεια της κομποστοποίησης είναι ελεγχόμενες και γίνονται επεμβάσεις όποτε κριθεί απαραίτητο (διόρθωση του λόγου C/N) για την εξάλειψη ενοχλητικών οσμών (**Εικόνα 1.5**). Λόγω των μεγάλων προς επεξεργασία ποσοτήτων η αναμόχλευση γίνεται μηχανικά με αναστροφείς ή ακόμα και με κοινούς φορτωτές. Κατά τη μηχανική αναμόχλευση είναι δυνατόν να γίνεται και ταυτόχρονη διαβροχή του σωρού από ψεκαστήρες οι οποίοι φέρονται επί των αναστροφέων εξασφαλίζοντας με αυτό



τον τρόπο τα κατάλληλα επίπεδα υγρασίας. Επίσης οι ψεκαστές αυτοί χρησιμοποιούνται για τη διασπορά εμβολίου, αν αυτό κριθεί απαραίτητο.



**Εικόνα 1.5:** Σύστημα εντατικής κομποστοποίησης με αναρρόφηση αέρα

Ένας άλλος παράγοντας που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη πριν τη δημιουργία των σειραδίων είναι η δομή της πρώτης ύλης η οποία θα πρέπει να υποστεί ομογενοποίηση. Η ομογενοποίηση πραγματοποιείται με τους θρυμματιστές οι οποίοι εξασφαλίζουν την ομοιομορφία της μάζας καθώς τα τεμαχίδια που εξέρχονται από αυτούς έχουν συγκεκριμένες διαστάσεις γεγονός που βοηθάει την αποίκιση τους από μικροοργανισμούς. Ο αερισμός μπορεί να γίνεται και με ενεργητικό τρόπο με την παροχή ή την αναρρόφηση αέρα μέσω διάτρητων σωληνώσεων που βρίσκονται στη βάση των σωρών με τη βοήθεια κατάλληλου μηχανισμού. Η πρακτική αυτή μπορεί να χρησιμεύσει για τον έλεγχο της υγρασίας και της θερμοκρασίας στο εσωτερικό των σωρών (απαγωγή θερμότητας μέσω αέρα).

Πολλές φορές συνίσταται η κάλυψη των σωρών με πλαστικό ειδικού τύπου πρακτική που εξασφαλίζει αρκετά πλεονεκτήματα όπως: προστασία από την υπερβολική υγρασία και από τυχόν καταρακτώδη βροχή, ελαχιστοποίηση της απώλειας θρεπτικών στοιχείων, ταχύτερη άνοδο της θερμοκρασίας από την πρώτη κιόλας αναστροφή και μείωση τόσο των στραγγισμάτων όσο και των αναγκών διαβροχής έως και 100%.

### 1.5.2 Συστήματα κλειστού τύπου (aerostate static pile)

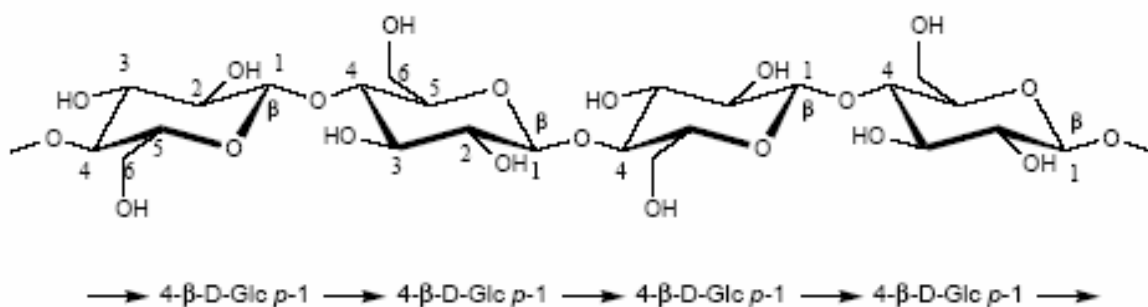
Τα συστήματα κλειστού τύπου βασίζονται στις ίδιες αρχές λειτουργίας. Το αρχικό υλικό εγκιβωτίζεται σε κατάλληλα βυτία διαφορετικών τύπων και χωρητικότητας. Ο

όρος «εγκιβωτισμένα» χρησιμοποιείται εδώ με τη έννοια ότι αναφέρεται στα συστήματα εκείνα όπου το υλικό κομποστοποιείται μέσα σε κάποιο τύπο αντιδραστήρα, ασχέτως αν αυτός είναι ανοικτός ή κλειστός, και αν διαθέτει ή όχι σύστημα μηχανικής ανάμιξης. Τα συστήματα αυτά μπορεί να είναι καθέτου ροής (Earp-Thomas, Frazer-Eweson) ή συστήματα οριζοντίου ροής (Fairfield-Hardy). Τα τοιχώματα των βυτίων κατασκευάζονται έτσι ώστε να ελαχιστοποιούν τη θερμοδυναμική ανταλλαγή μεταξύ του υλικού και του περιβάλλοντος, εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο αποτελεσματικότερο έλεγχο των συνθηκών κομποστοποίησης. Επίσης τα συστήματα αυτά παρέχουν τη δυνατότητα αποτελεσματικότερης ρύθμισης της θερμοκρασίας μέσω ενός ηλεκτρικού συστήματος το οποίο αποτελείται από μία φτερωτή που τροφοδοτεί με αέρα το σωρό μέσω σωληνώσεων (σύστημα Rutgers, forced aeration). Έτσι επιτυγχάνεται τόσο ο αερισμός του κομποστοσωρού και η ενίσχυση της αερόβιας ζύμωσης όσο και η μείωση της θερμοκρασίας όταν αυτή ξεπεράσει κάποιο απαγορευτικό για την ύπαρξη των μικροβιακών πληθυσμών κατώφλι.

## 1.6 Κυτταρινολογικά Βακτήρια

### 1.6.1 Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη είναι ένας πολυσακχαρίτης που αποτελείται από μονάδες D-γλυκόζης ενωμένες με β-1,4- γλυκοζιτικούς δεσμούς. Έτσι, δημιουργούνται μακριές αλυσίδες που συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου και δυνάμεις van der Waals (Εικόνα 1.6). Η κυτταρίνη απαντάται σε κρυσταλλική μορφή και λόγω των δεσμών υδρογόνου σημειώνονται άμορφες περιοχές στις ίνες της. Εξαιτίας της διαμόρφωσης αυτής, η κυτταρίνη είναι περισσότερο επιρρεπής στην ενζυμική αποικοδόμηση (Ζήκου, 2010).



**Εικόνα 1.6:** Δομή γραμμικού μορίου κυτταρίνης

Η κυτταρίνη αποτελεί το κύριο δομικό συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων. Ένα μόριο κυτταρίνης μπορεί να αποτελείται ακόμα και από 10.000 μόρια γλυκόζης με συνολικό μήκος 5 μm. Στα κυτταρικά τοιχώματα ομάδες από περίπου 2.000 αλυσίδες κυτταρίνης, σχηματίζουν ένα μικροϊνίδιο διαμέτρου 10-30 nm (Αϊβαλάκης, 2005). Κάθε μικροϊνίδιο περιέχει 80 περίπου μόρια κυτταρίνης. Τα μικροϊνίδια λειτουργούν ως ισχυρά καλώδια και δομικά υλικά για τα φυτά. Μόνο ορισμένοι οργανισμοί διαθέτουν τα ειδικά ένζυμα για υδρόλυση της κυτταρίνης, η οποία είναι βέβαια, μια εξαιρετική πηγή γλυκόζης, αφού αποτελείται από μονομερή γλυκόζης. Στον άνθρωπο, η κυτταρίνη απλώς περνά μέσα από το πεπτικό σύστημα χωρίς να υποστεί υδρόλυση και αποβάλλεται με τα κόπρανα. Όμως, η παρουσία της κυτταρίνης στο πεπτικό σύστημα είναι εξαιρετικά σημαντική, γιατί ο βλεννογόνος του εντέρου διεγείρεται από την κυτταρίνη για να παραχθεί βλέννα η οποία βοηθά στην ομαλή λειτουργία του εντέρου. Κατά συνέπεια, η κυτταρίνη δεν έχει θρεπτική αξία αλλά είναι απαραίτητη στην υγιεινή διατροφή. Υπάρχει άφθονη στα φρέσκα φρούτα και στα λαχανικά. Ορισμένα βακτήρια έχουν την ικανότητα να υδρολύουν την κυτταρίνη σε γλυκόζη. Πολλά φυτοφάγα θηλαστικά συμβιώνουν με τέτοια βακτήρια τα οποία ζουν σε διάφορα μέρη του γαστρεντερικού σωλήνα. Τα βακτήρια προσφέρουν τα κατάλληλα ένζυμα (κυτταρινάσες) για την υδρόλυση της κυτταρίνης και τα θηλαστικά προσφέρουν στα βακτήρια τροφή και προστασία. Ορισμένοι μύκητες διαθέτουν επίσης τα κατάλληλα ένζυμα και λειτουργούν ως αποικοδομητές, συμβάλλοντας στην ανακύκλωση των χημικών στοιχείων στα οικοσυστήματα.

Έχει υπολογιστεί ότι τα φυτά παράγουν 100 δισεκατομμύρια τόνους κυτταρίνης το χρόνο με αποτέλεσμα να είναι ο πολυσακχαρίτης αυτός η πιο διαδομένη από όλες τις οργανικές ουσίες. Η κυτταρίνη αποτελεί την πρώτη ύλη πολλών εμπορικά σημαντικών προϊόντων όπως το χαρτί, τα cellophane, cellulid, rayon και πολλά άλλα είδη πλαστικών υλικών. Με πρώτη ύλη την κυτταρίνη παράγονται επίσης διάφορα βερνίκια, φωτογραφικά films και εκρηκτικά. Το βαμβάκι αποτελείται από κυτταρίνη σε ποσοστό που φτάνει το 100% και χρειάζεται σχετικά μικρή επεξεργασία για να χρησιμοποιηθεί για ύφανση (Αϊβαλάκης, 2005).

---

**Πίνακας 1.5** Περιεκτικότητα σε κυτταρίνη στα διάφορα είδη φυτικών υλικών.

---

<i>Είδος Φυτικού Υλικού</i>	<i>Κυτταρίνη %</i>
Βαμβάκι	95-99
Μπαμπού	40-50
Ξύλο	40-50
Φλοιός	20-30
Βρύα	25-30

### **1.6.2 Υδρόλυση Κυτταρίνης**

Η ενζυμική υδρόλυση κυτταρίνης αντιπροσωπεύει πάντα μια ειδική περίπτωση ενζυμολογίας, επειδή το υπόστρωμα είναι στερεό και έτσι η υδρόλυση λαμβάνει χώρα στη στερεά φάση. Η πλήρης υδρόλυση κυτταρίνης απαιτεί την δράση ενός αριθμού εξειδικευμένων ενζύμων, που ονομάζονται κυτταρινάσες.

Οι κυτταρινάσες διακρίνονται σε τρεις τύπους ανάλογα με την δραστικότητα τους: σε ένδο-β-γλυκανάσες ή ενδοκυτταρινάσες (EC3.2.1.4)1 οι οποίες υδρολύουν τους εσωτερικούς β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς της κυτταρινικής αλυσίδας και αποικοδομούν την άμορφη περιοχή της κυτταρίνης, σε έξω-β-γλυκανάσες ή κελλοβιοϋδρολάσες (EC 3.2.91) οι οποίες υδρολύουν τα μη αναγωγικά άκρα της αλυσίδας της κυτταρίνης, παράγοντας κυρίως κελλοβιόζη και αποικοδομούν την κρυσταλλική περιοχή της κυτταρίνης και σε β-γλυκοσιδάσες (EC 3.2.1.21), οι οποίες υδρολύουν την κελλοβιόζη σε γλυκόζη (Liang *et al.*, 2009). Παρόλο που οι τρεις αυτοί τύποι κυτταρινασών εμφανίζονται ως διαφορετικά ένζυμα, συνεργάζονται για τη διάσπαση της κρυσταλλικής κυτταρίνης. Σε αρκετές περιπτώσεις η δομή των κυτταρινασών αποτελείται από δυο περιοχές. Η μια ονομάζεται καταλυτική περιοχή (CD, Catalytic Domain) και είναι υπεύθυνη για την υδρολυτική αντίδραση και η άλλη ονομάζεται περιοχή σύνδεσης (CBD, Cellulose Binding Domain) και αποτελεί το μέσο με το οποίο το ένζυμο προσκολλάται στην κυτταρίνη. Η ύπαρξη των CBDs είναι ιδιαίτερα σημαντική για την εκκίνηση και την πορεία δράσης της εξωγλυκανάσης (Teeri *et al.* 1998).

Έχει αποδειχθεί ότι τα περισσότερα κυτταρινολυτικά βακτήρια παράγουν εξωκυτταρικές κυτταρινάσες (Yu *et al.*, 1979). Οι κυτταρινάσες εντοπίζονται στο θρεπτικό διάλυμα και μετά την απομάκρυνση των κυττάρων, διατηρώντας την ενεργότητα τους, και παράγονται ακόμη κι όταν ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται σε υπόστρωμα κελλοβιόζης. Η παρουσία κελλοβιόζης φαίνεται πως παρεμποδίζει την δράση του ενζύμου αλλά όχι την παραγωγή του. Η έκθεση του ενζύμου σε οξυγόνο μειώνει την δραστηριότητα του στο μισό, αλλά δεν το καταστρέφει. Ενώ η δράση των ενδογλυκανασών και εξωγλυκανασών είναι εξωκυτταρική, η β-γλυκοσιδάση φαίνεται να δρα εσωκυτταρικά, ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι μεγάλο ποσοστό της παραγόμενης κελλοβιόζης δεν μεταβολίζεται περαιτέρω μέσω διάσπασης αλλά μέσω φωσφορυλίωσης (Hungate, 1963, Thurston *et al.*, 1993, Lou *et al.*, 1997).

Η προσθήκη διαλυτών σακχάρων, όπως γλυκόζη και κελλοβιόζη, σε καλλιέργειες με κυτταρίνη δεν επηρεάζει το ρυθμό υδρόλυσης, ούτε το ποσοστό κυτταρίνης που τελικά διασπάται. Οι παρατηρήσεις αυτές αποδόθηκαν σε επίδραση της πτώσης του pH κατά την ζύμωση των σακχάρων, που είναι πολύ πιο γρήγορη από την υδρόλυση της κυτταρίνης. Ωστόσο, εικάζεται ότι μηχανισμοί εκλεκτικότητας που ευνοούν την ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων ενδεχομένως να διαδραματίζουν επίσης ρόλο (Thurston *et al.*, 1993, Lynd *et al.* 2002).

### **1.6.3 *Brevibacillus***

Το γένος *Brevibacillus* αναφέρθηκε πρώτη φορά από τους Shida *et al.* (1996) με την αναταξινόμηση δέκα ειδών του γένους *Bacillus*. Τα είδη *Brevibacillus* είναι τα ακόλουθα: α) *Brevibacillus invocatus* (Logan *et al.*, 2002), που απομονώθηκε από απόβλητα βιομηχανικής διεργασίας ζύμωσης, β) *Brevibacillus limnophilus* (Goto *et al.*, 2004) προτάθηκε με βάση την αναταξινόμηση του στελέχους *Brevibacillus brevis*, γ) *Brevibacillus levickii* (Allan *et al.*, 2005) απομονώθηκε από την πλαγιά βουνού της Μελβούρνης, δ) *Brevibacillus ginsengisoli* (Baek *et al.*, 2006) απομονώθηκε από το έδαφος καλλιέργειας ginseng, ε) *Brevibacillus agri* (Shida *et al.*, 1996), στ) *Brevibacillus aydinogluensis* (Inan *et al.*, 2012), ζ) *Brevibacillus borstelensis* (Shida *et al.*, 1996), η) *Brevibacillus centrosporus* (Shida *et al.*, 1996), θ) *Brevibacillus choshinensis* (Shida *et al.*, 1996), ια) *Brevibacillus fluminis* (Choi *et al.*, 2010), ιβ) *Brevibacillus formosus* (Shida *et al.*, 1996), ιγ) *Brevibacillus laterosporus* (Shida *et al.*, 1996), ιδ) *Brevibacillus panacihumi* (Kim *et al.*, 2009), ιε) *Brevibacillus*

*parabrevis* (Shida *et al.*, 1996), ιστ) *Brevibacillus reuszeri* (Shida *et al.*, 1996) και ιζ) *Brevibacillus thermoruber* (Shida *et al.*, 1996).

Παρά το γεγονός ότι έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες για την αξιοποίηση της χρήσης της κυτταρίνης, στη βιβλιογραφία έχουν καταγραφεί μόλις 75 στελέχη βακτηριακών ειδών που μπορούν να αναπτυχθούν σε κρυσταλλική κυτταρίνη και να την χρησιμοποιήσουν ως αποκλειστική πηγή άνθρακα και ενέργειας. Οι Liang *et al.* (2009) μετά από έρευνα στα απόβλητα των χοίρων κατάφεραν και απομόνωσαν ένα δυνητικά νέο θερμόφιλο κυτταρινολυτικό βακτήριο που χαρακτηρίστηκε ως το στέλεχος *Brevibacillus*.

Λίγα στελέχη του γένους *Brevibacillus* φαίνεται να είναι κυτταρινολυτικά. Το στέλεχος *Brevibacillus* JXL που απομονώθηκε από τα απόβλητα χοίρων φαίνεται να είναι το πρώτο στέλεχος του γένους *Brevibacillus* που μπορεί να καλλιεργηθεί σε κυτταρίνη και να την χρησιμοποιεί ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας (Schwarz, 2001) Το γεγονός αυτό καθιστά το στέλεχος JXL ως ένα κυτταρινολυτικό βακτήριο. Το στέλεχος *Brevibacillus* JXL προσκολλάται ισχυρά στην κυτταρίνη. Η ιδιότητα αυτή είναι πολύ σημαντική δεδομένου ότι η προσκόλληση ή η απορρόφηση κυτταρίνης αποτελεί προϋπόθεση για την υδρόλυση της. Το στέλεχος *Brevibacillus* JXL είναι ένα Gram+, αερόβιο, θερμόφιλο, ραβδοειδές και σποριογόνο βακτήριο που αποικοδομεί την κυτταρίνη (Liang *et al.*, 2009).

#### **1.6.4 *Serratia***

Το γένος *Serratia* είναι Gram- βακτήρια, τα οποία μπορούν να απομονωθούν από το νερό, το έδαφος, τα φυτά και τον αέρα. (Grimont and Grimont, 1978). Ενώ το *Serratia spp.* εκκρίνει ένα αριθμό τοξικών στοιχείων, (Hejazi and Falkiner, 1997), ικανά να βλάψουν τα ανθρώπινα κύτταρα και τους ιστούς, ορισμένα στελέχη συνθέτουν χρήσιμους δευτερογενής μεταβολίτες, οι οποίοι έχουν εφαρμογή στην φαρμακευτική βιομηχανία και στην περιβαλλοντική βιοαποκατάσταση.

Το 1823 ο Bartolomeo Bizio, ένας φαρμακοποιός από την Πάντοβα της Ιταλίας ανακάλυψε και ονόμασε το *Serratia marcescens*. Το γένος *Serratia* ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Εκτός από το *S. marcescens* το γένος *Serratia* περιλαμβάνει και τα *Serratia liquefaciens*, *Serratia plymuthica*, *Serratia rubidaea*, *Serratia fonticola*, *Serratia marmorubra*, *Serratia proteamaculans*, και *Serratia*

*odorifera* (Skerman *et al.*, 1980). Στελέχη του γένους *Serratia* παράγουν DNase, λιπάση και ζελατινάση όπου τα διαχωρίζει από τα άλλα γένη που ανήκουν στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. (Anahory *et al.*, 1998; Kawai *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1995; Nestle and Roberts, 1969).

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

Η ανάλυση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του 16S ριβοσωμικού RNA (rRNA) είναι ο χρυσός κανόνας για τις ταξινομικές διακρίσεις μεταξύ των βακτηρίων. Το rRNA των προκαρυωτικών αποτελείται από τρία μόρια, τα 5S, 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 λόγω του μεγέθους του, για αυτό και έχει χρησιμοποιηθεί κατά κόρον (Madigan *et al.*, 2005).

Το κλειδί για την ταξινόμηση αυτή είναι το 16S ριβοσωμικό RNA (rRNA), το οποίο είναι καθολικό και συντηρημένο σε λειτουργία (Young, 1992). 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 κατανομημένα 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.

### **1.7 Χρήσεις του κόμποστ (compost)**

Το κόμποστ ανάλογα με το βαθμό ωριμότητας του μπορεί να έχει διάφορες χρήσεις. Οι σημαντικότερες είναι:

- Βελτιωτικό εδάφους
- Συστατικό υποστρωμάτων για την ανάπτυξη καλλωπιστικών φυτών, κηπευτικών, ανθοκομικών φυτών και σε φυτώρια.
- Υπόστρωμα στις καλλιέργειες μανιταριών
- Αποκατάσταση εδάφους σε άγονες και φτωχές σε θρεπτικά συστατικά εκτάσεις, που προέρχονται είτε από εντατική καλλιέργεια είτε από πυρκαγιές
- Σε ΧΥΤΑ ως υλικό κάλυψης
- Σε παλιά λατομεία ως επιφανειακό βελτιωτικό εδάφους κατά το στάδιο της αποκατάστασης
- Σε κοινόχρηστους χώρους πρασίνου στις πόλεις καθώς και στα πρανή των εθνικών οδών για έλεγχο των διαβρωτικών φαινομένων
- Σε γήπεδα ποδοσφαίρου και γκολφ
- Σε αναδασώσεις
- Σε απολυμάνσεις - εξυγιάνσεις εδαφών
- Για την καταπολέμηση μυκήτων εδάφους, νηματωδών κ.α.

### ***1.8 Τα Υπολείμματα Εκκοκκιστηρίου Βάμβακος ως υπόστρωμα κομποστοποίησης***

Το βαμβάκι είναι φυτό δικότυλο, αγγειόσπερμο που ανήκει στην τάξη στυλοφόρα και στην οικογένεια Μαλβίδες και καλλιεργείται από το 3000 π.Χ. Η καλλιέργεια του βάμβακος στην Ελλάδα καταλαμβάνει πάνω από δύο εκατομμύρια στρέμματα, ενώ το σύνολο σχεδόν της καλλιεργούμενης έκτασης βρίσκεται στις περιοχές της Θεσσαλίας, της Μακεδονίας και της Στερεάς Ελλάδας.

Η ετήσια παραγωγή σε σύσπορο βαμβάκι κυμαίνεται στις 500.000 τόνους συμβάλλοντας σημαντικά στην εισροή συναλλάγματος στη χώρα μας, μιας και αποτελεί κύριο εξαγωγίμο γεωργικό προϊόν.

Από την καλλιεργούμενη με βαμβάκι έκταση και από τον όγκο της παραγωγής προκύπτει και το πρόβλημα της διαχείρισης των υπολειμμάτων της καλλιέργειας αυτής.

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, φύλλων και ξυλωδών τμημάτων του φυτού μαζί με ινώδες κλάσμα (ίνες μικρού μήκους). Η συνήθης πρακτική διαχείρισης του υποπροϊόντος αυτού είναι α) η συνδυασμένη καύση του με λιγνίτη για παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας, β) η χρήση του για την καλλιέργεια μανιταριών των γενών *Pleurotus*, *Agrocybe* & *Volvariella*, γ) η χρησιμοποίησή του ως ζωοτροφή (βαμβακόπιτα) και τέλος δ) η χρήση του ως πρώτη ύλη για δημιουργία κόμποστ.

Η πρώτη ύλη αποτελεί το 14,5% περίπου του συγκομιζόμενου σύσπορου βάμβακος. Από πλευράς μηχανικής σύστασης μπορεί να διαχωριστεί σε δύο κύρια κλάσματα:

- 1) στο κλάσμα των ινών που αποτελεί το 33,3% κατά βάρος του συνόλου και
- 2) στο κλάσμα των θρυμμάτων των φύλλων, των ξυλωδών τμημάτων και καψών μαζί με τη σκόνη εδάφους που έχουν συμπεριληφθεί κατά τη συγκομιδή. Το κλάσμα αυτό αποτελεί το 66,2% του συνόλου και ανάλογα με το βαθμό θρυμματισμού μπορεί να διαχωριστεί σε μικρότερα μηχανικά κλάσματα.

Το κλάσμα των ινών μολονότι αποτελεί το 1/3 μόνο του ολικού βάρους κυριαρχεί ποιοτικά και προσδίδει όγκο και συμπιεστικότητα συνολικά στο υλικό. Αποτελεί δηλαδή το στερεό μέσο διασποράς (matrix) στο χώρο των υπολοίπων τεμαχιδίων, οργανικών και μη.

Στον Πίνακα που ακολουθεί (**Πίνακας 1.6**) αναφέρονται τα κύρια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των υπολειμμάτων εκκοκκισμού βάμβακος.

**Πίνακας 1.6** Κύρια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των υπολειμμάτων εκκοκκισμού βάμβακος (Προσαρμοσμένο από Μπαλή και συν., 1994).

Παράμετρος	Τιμή		
	Ύνες	Ευλώδη Τμήματα	Σύνολο
<b>Ολικό N (%) κατά Kjehldahl</b>	1,03	2,48	2,01
<b>Οργανικός C (%)</b>	40,94	33,40	35,81
<b>pH</b>			6,10
<b>Φυσική Υγρασία (%)</b>			10,00
<b>Ηλ. Αγωγιμότητα (ds/m)</b>			22,50
<b>Υδατοϊκανότητα (%)</b>			81,00
<b>Πορώδες (%)</b>			93,00
<b>Ποκνότητα στερεών (g/cm<sup>3</sup>)</b>	0,81	1,13	1,03

### **1.9 Σκοπός της μελέτης**

Στην εποχή μας ο παγκόσμιος πληθυσμός συνεχώς αυξάνει και μαζί με αυτόν αυξάνουν και οι ανάγκες για την σίτιση του ενώ η καλλιεργούμενη έκταση παραμένει σταθερή, η μόλυνση του περιβάλλοντος, οι περιβαλλοντικές αλλαγές οι οποίες είναι περισσότερο εμφανείς από ποτέ και η ερημοποίηση απειλεί ολοένα και μεγαλύτερες περιοχές του πλανήτη. Γι' αυτό το λόγο είναι ζωτικής σημασίας η εξεύρεση νέων τρόπων καλλιέργειας της γης με λιγότερες εισροές και χαμηλότερες απαιτήσεις σε ενέργεια.

Νέες στρατηγικές σχεδιάζονται και παλιές τίθενται προς μελέτη ξανά. Μια από τις πολλά υποσχόμενες τεχνικές που υπάρχουν εδώ και σχεδόν ένα αιώνα τώρα είναι η τεχνική της κομποστοποίησης των αστικών αλλά και των γεωργικών υπολειμμάτων. Με την ανάπτυξη των νέων τεχνολογιών αυτές οι «παλιές» τεχνικές μπορούν να διεκδικήσουν δυναμικά ένα πρωταγωνιστικό ρολό για την αντιμετώπιση των νέων προκλήσεων οι οποίες έρχονται ταχύτατα.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης ήταν η μελέτη των φυσικοχημικών παραμέτρων και της μικροβιακής ποικιλότητας και διαδοχής κατά την κομποστοποίηση αγροτοβιομηχανικών υποπροϊόντων. Πραγματοποιήθηκαν μια σειρά μετρήσεων και χημικών αναλύσεων. Η μικροβιακή ποικιλότητα και διαδοχή μελετήθηκαν με τη χρήση τόσο κλασσικών όσο και μοριακών τεχνικών. Οι μοριακές τεχνικές εστιάστηκαν στη μελέτη των κυτταρινολυτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν στις εκάστοτε φάσεις της κομποστοποίησης.

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

## **Κεφάλαιο 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1 Υποστρώματα Κομποστοποίησης**

Στην παρούσα μελέτη ως υπόστρωμα κομποστοποίησης χρησιμοποιήθηκαν Υπολείμματα Εκκοκκιστηρίων Βάμβακος (ΥΕΒ) τα οποία προέρχονταν από εκκοκκιστήριο της περιοχής των Θηβών.

### **2.2 Παρασκευή των Σωρών Κομποστοποίησης**

Την πρώτη μέρα της διαδικασίας κατασκευάστηκε ένας σωρός από 70 Kg ΥΕΒ όπου διαβρέχτηκαν με 200 l νερό. Παράλληλα με τη διαβροχή του υποστρώματος έγινε ανάμιξη με τη χρήση κατάλληλων εργαλείων. Ο σωρός τοποθετήθηκε εντός κάδου κομποστοποίησης διαστάσεων 80 x 80 x 90 cm. Ο κάδος, ο οποίος τοποθετήθηκε πάνω σε παλέτα, ήταν διάτρητος μόνο στη βάση του, 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 τοποθετήθηκε κάθετα στον κάδο κομποστοποίησης και έφτανε έως την βάση του. Σχεδόν καθημερινά πραγματοποιείται μέτρηση της θερμοκρασίας των δύο σωρών.



**Εικόνα 2.1** Αριστερά τα υπολείμματα βάμβακος πριν την διαβροχή, δεξιά μετά το πέρας της.

### 2.3 Δειγματοληψίες

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 νερό.
- 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 **Πίνακα 2.1**.

**Πίνακας 2.1** Ημερολόγιο δειγματοληψιών.

α/α	Ημερομηνία δειγματοληψίας	Χρόνος κομποστοποίησης (ημέρες)	Σχόλια
1	20-Ιαν-2011	0	Εγκατάσταση
2	25-Ιαν-2011	5	-
3	22-Μαρ-2011	61	Γύρισμα & Διαβροχή
4	28-Μαρ-2011	67	-

Στην τρίτη δειγματοληψία το δείγμα ελήφθη πριν το γύρισμα και τη διαβροχή του υλικού. Ο σωρός διαβρέχτηκε με περίπου 200 l νερό.

## **2.4 Μελέτη Φυσικοχημικών Παραμέτρων**

### **2.4.1 Παρακολούθηση θερμοκρασίας**

Καθ' όλη τη διάρκεια της κομποστοποίησης η θερμοκρασία παρακολουθείτο σχεδόν καθημερινά, με χρήση συμβατικού θερμομέτρου. Το θερμόμετρο τοποθετούταν έως τη μέση του σωρού και η καταγραφή της θερμοκρασίας γινόταν μετά από 15 λεπτά. Επίσης με τη χρήση θερμομέτρου σταθερά τοποθετημένου στον εξωτερικό χώρο του θερμοκηπίου, σημειωνόταν και η θερμοκρασία του περιβάλλοντος χώρου.

### **2.4.2 Προσδιορισμός υγρασίας**

Νωπό δείγμα 30g επώαστηκε για 48 ώρες στους 60 °C. Η % περιεκτικότητα σε υγρασία των δειγμάτων προσδιορίστηκε με βάση τη διαφορά βάρους του νωπού και ξηρού δείγματος.

### **2.4.3 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. Σε γυάλινη φιάλη προστέθηκαν 40g δείγματος και 200ml απεσταγμένο νερό. Το μίγμα αναδεύτηκε για 90 λεπτά, στις 150 rev/min. 50ml διαλύματος φυγοκεντρήθηκαν 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.

### **2.4.4 Προσδιορισμός του νιτρικού (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) αζώτου με τη μέθοδο του καδμίου**

#### Αρχή της μεθόδου

Τα NO<sub>3</sub><sup>-</sup> του εκχυλίσματος από το δείγμα του κόμποστ προσδιορίζονται, μετά την αναγωγή τους σε NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, που πραγματοποιείται μετά τη διέλευσή τους από στήλη επιχαλκωμένου καδμίου παρουσίας NH<sub>4</sub>Cl και pH 5-10. Στη συνέχεια προσδιορίζονται χρωματομετρικά, μετρώντας την ένταση του αζω – χρωμοφόρου

(azo – chromophore), η οποία είναι ανάλογη της ποσότητας των  $\text{NO}_3^-$  στο δείγμα και η οποία προέκυψε από την προσθήκη σουλφαναμιίνης, που αντιδρά με τα  $\text{NO}_2^-$  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  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , και όσο δεν χρησιμοποιούνται είναι καλυμμένες ως 1 cm πάνω από τη στήλη Cd με αραιό διάλυμα  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Λίγο πριν τη χρήση προστίθεται 1 ml πυκνού  $\text{NH}_4\text{Cl}$  και η στάθμη του υγρού στην προχοΐδα χαμηλώνεται ως το ύψος του Cd. Προστίθεται αραιό  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ως το στόμιο της προχοΐδας.

#### Ανάλυση εκχυλίσματος

Η στάθμη του αραιού  $\text{NH}_4\text{Cl}$  αφήνεται να χαμηλώσει, έως ότου το διάλυμα καλύπτει μόλις την κορυφή της στήλης Cd. Προστίθεται 1 ml πυκνού  $\text{NH}_4\text{Cl}$  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  $\text{NH}_4\text{Cl}$  από την κορυφή έως ότου συλλεχθούν 90 ml. Μετά τη χρήση ξεπλένουμε πάλι τη στήλη με 2 ml πυκνού  $\text{NH}_4\text{Cl}$  και 75 ml αραιού  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , προσέχοντας το διάλυμα  $\text{NH}_4\text{Cl}$  να είναι πάντα πάνω από τη στήλη. Στις ογκομετρικές φιάλες προσθέτουμε 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  $\text{mg N-NO}_3^- / \text{ml}$  διαλύματος) στο φασματοφωτόμετρο UV στα 540 nm.

#### Υπολογισμοί

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

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

R = η ένδειξη των δειγμάτων

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

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)

#### 2.4.5 Χρωματομετρικός προσδιορισμός του αμμωνιακού αζώτου (NH<sub>4</sub>-N) με τη μέθοδο της ινδοφαινόλης

Η εκχύλιση γίνεται όπως και κατά τον προσδιορισμό των νιτρικών.

##### Προσδιορισμός των αμμωνιακών

Λήψη 5 ml εκχυλίσματος δείγματος με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω και τοποθέτηση εντός ογκομετρικής φιάλης των 50 ml. Προσθήκη 2 ml διαλύματος EDTA και ανάδευση. Μετά από 1 λεπτό, προσθέτουμε 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 αφήσουμε 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)

V2 = όγκος (ml) που λήφθηκε από το εκχύλισμα για ανάπτυξη χρώματος

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 νωπού δείγματος)

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

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

##### Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος Kjeldahl περιλαμβάνει δύο στάδια: **στάδιο καύσης ή 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 (**στάδιο απόσταξης**) 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 Buchi

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 Buchi και έναρξη χώνευσης. Αφήνεται να ολοκληρωθεί η χώνευση ως ότου το δείγμα γίνει διαυγές (χρώμα ελαφρώς πράσινο).

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

βορικού οξέος 20%, για την 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

$$N\% = [(ml\ HCl\ για\ κάθε\ δείγμα - 0,2) * 0,05 * 14 * 100] / (\text{βάρους δείγματος} * 1000)$$

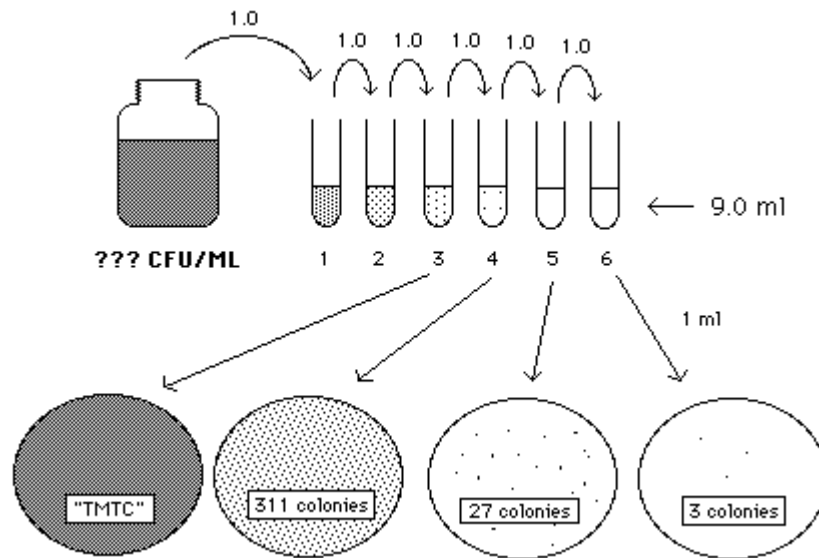
### **2.4.7 Υπολογισμός της Μικροβιακής Βιομάζας**

Η μικροβιακή βιομάζα του κόμποστ είναι η μάζα όλων των μικροοργανισμών του κόμποστ και είναι ένα μέτρο μέτρησης της ποσότητας της ζώσας μικροβιακή βιομάζας του κόμποστ. Οι πληροφορίες που αποκτώνται από τη μελέτη της μικροβιακής βιομάζας του κόμποστ, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση των μεταβλητών του εδάφους σε οργανική ουσία. Η μικροβιακή βιομάζα είναι ένα από τα πλέον διακριτά και ευπροσδιόριστα συστατικά της οργανικής ουσίας του κόμποστ, έτσι οι μετρήσεις τόσο του άνθρακα όσο και των άλλων θρεπτικών συστατικών της παρέχουν μία βάση για τις μελέτες των μετασχηματισμών και των κύκλων αυτής στο κόμποστ.

### **2.5 Μικροβιολογικές αναλύσεις με χρήση κλασσικών μεθόδων**

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

10g νοπού 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 2.2** Η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων και η επίστρωση σε τρυβλίο (*plating method*).

Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε με την επίστρωση (*plating method*) 100 μl 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 επωάστηκαν στους 30 °C για 3 – 4 ημέρες.

## 2.5.1 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).

### 2.5.1.1 Θρεπτικό Υλικό Ανάπτυξης Ολικών αερόβιων Βακτηρίων

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

### 2.5.1.2 Θρεπτικό Υλικό Ανάπτυξης Σποριογόνων Βακτηρίων

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

### 2.5.1.3 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** ( $0,033\text{ g/l}$ ). Επίσης, μετά την αποστείρωση και αφού το υλικό είχε κρυώσει επαρκώς, προστέθηκε σε αυτό το αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη ( $1\text{ ml/l}$  από αρχικό διάλυμα  $0,03\text{ g/l}$ ). Χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις  $10^{-2} - 10^{-6}$ .

### 2.5.1.4 Θρεπτικό Υλικό Ανάπτυξης Ακτινομυκήτων

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

### 2.5.1.5 Αζωτοδεσμευτικά βακτήρια

Η εκτίμηση του πληθυσμού των ελεύθερα διαβιούντων αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών καθώς και της φυσικής αζωτοδεσμευτικής χλωρίδας του κόμποστ, έγινε με τη μέθοδο του **πλέον πιθανού αριθμού** (Most Probable Number, MPN). 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 δεν περιέχει πηγή αζώτου. Χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις  $10^{-2} - 10^{-6}$  (αραιώση  $1\text{ ml}$  από τις αρχικές αραιώσεις του δείγματος σε  $9\text{ ml}$  υγρό θρεπτικό **Rennie**). Για κάθε αραιώση έγιναν εμβολιασμοί σε 5 δοκιμαστικούς σωλήνες και πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις. Οι σωλήνες επώαστηκαν 7 ημέρες στους  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  και στους  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  (όταν το δείγμα ήταν από τη θερμοφιλή φάση). Μετά την πάροδο 7 ημερών 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), 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.

Ως θετικοί λαμβάνονται οι σωλήνες στους οποίους ανιχνεύθηκε αιθυλένιο. Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο πληθυσμός των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων ανά g ξηρού βάρους κόμποστ με βάση τον **Πίνακα 2.2**.

**Πίνακας 2.2** 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	0,10
1	0	0,020	0,040	0,060	0,080	0,10	0,12
1	1	0,040	0,061	0,081	0,10	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	0,95
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	---

Η γενική εξίσωση για τον υπολογισμό του πλέον πιθανού αριθμού (MPN) των Halvorson & Ziegler βάση των θετικών και των αρνητικών σωλήνων σε τρεις διαδοχικές αραιώσεις είναι :

$$a_1n_1+a_2n_2+a_3n_3 = [(a_1p_1/1-e^{-a_1x})+(a_2p_2/1-e^{-a_2x})+(a_3p_3/1-e^{-a_3x})]$$

όπου:

- Οι δείκτες 1,2,3 αναφέρονται στην πρώτη, δεύτερη και τρίτη αραιώση
- Τα a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub>, a<sub>3</sub> είναι οι ποσότητες του αρχικού δείγματος στην ποσότητα του εμβολίου που χρησιμοποιήθηκε

- Τα  $n_1$ ,  $n_2$ ,  $n_3$  οι αριθμοί των σωλήνων που εμβολιάστηκαν
- Τα  $p_1$ ,  $p_2$ ,  $p_3$  οι σωλήνες με θετική ένδειξη
- Το  $x$  εκφράζει τον πλέον πιθανό αριθμό μικροοργανισμών που υπήρχε στην ποσότητα του εμβολίου που προστέθηκε στη μεσαία αραιώση. Πολλαπλασιάζοντας το  $x$  με τον συντελεστή αραιώσης έχουμε τον πλέον πιθανό αριθμό μικροοργανισμών στο αρχικό δείγμα.

Επίσης ελέγχθηκε η δυνατότητα αζωτοδέσμευσης του ίδιου του κόμποστ. Συγκεκριμένα 10 g κόμποστ τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια τύπου McCartney (3 επαναλήψεις). Στα φιαλίδια, αφού κλείστηκαν αεροαστεγώς, 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.

#### **2.5.1.6 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 κυτταρίνης), όπου η κυτταρίνη ήταν η μοναδική πηγή άνθρακα. Το υλικό αυτό επειδή περιέχει κυτταρίνη χρειάστηκε θέρμανση κατά την παρασκευή του. Χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις  $10^{-4}$  –  $10^{-8}$ .

Μετά την επώαση των τρυβλίων και 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 καθαρή 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 υποκόανο (Kasana *et al.*, 2008).

## 2.5.2 Απομόνωση μικροοργανισμών σε καθαρή καλλιέργεια

Μετά την επώαση, μεμονωμένες αποικίες από κάθε τρυβλίο, αφού ελέγχθηκαν ως προς την καθαρότητά τους (γραμμική επίστρωση – *streaking*) και μελετήθηκε η αντίδρασή τους στη χρώση κατά Gram, φυλάχθηκαν σε διάλυμα γλυκερόλης 25% στους -80 °C. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την απομόνωση αερόβιων μικροοργανισμών (όχι όμως για νηματοειδείς, όπως οι μύκητες) και επιτρέπει την προοδευτική αραίωση του εμβολίου, ώστε τελικά να διαχωριστούν τα κύτταρα μεταξύ τους και καθένα να δώσει μια αποικία. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε για την απομόνωση των ολικών, σποριογόνων, κυτταρινολυτικών και αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων και ακτινομυκήτων. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 30°C.

Για την απομόνωση των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, από τους θετικούς σωλήνες της δοκιμής του ακετυλενίου, εμβολιάστηκαν τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Rennie (με τη μέθοδο της γραμμικής επίστρωσης - *streaking*). Οι μεμονωμένες αποικίες που προέκυψαν, ελέγχθηκαν για την καθαρότητά τους και επαληθεύτηκε η αζωτοδεσμευτική τους ικανότητα (δοκιμή ακετυλενίου).

Στις αποικίες των βακτηρίων (ολικών, σποριογόνων, κυτταρινολυτικών, αζωτοδεσμευτικών) που απομονώθηκαν σε καθαρή καλλιέργεια έγινε καταγραφή της μορφολογίας της αποικίας στο στερεό υπόστρωμα και χρώση κατά Gram των κυττάρων.

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

Για την απομόνωση καθαρών καλλιεργειών μυκήτων ένα τμήμα της αρχικής αποικίας (από το τρυβλίο για την καταμέτρηση του ολικού αριθμού) μεταφέρθηκε σε τρυβλίο με το αντίστοιχο θρεπτικό. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Τα στελέχη που απομονώθηκαν σε καθαρή καλλιέργεια μεταφέρθηκαν σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες, που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα PDA υπό κλίση, για τη συντήρησή τους.



### 2.5.3 Εκτίμηση της αναπνευστικής δραστηριότητας

Για την εκτίμηση της αναπνευστικής δραστηριότητας των δειγμάτων κόμποστ χρησιμοποιήθηκε το ηλεκτρολυτικό αναπνευσόμετρο, όπως αυτό περιγράφεται από τους Manios and 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.

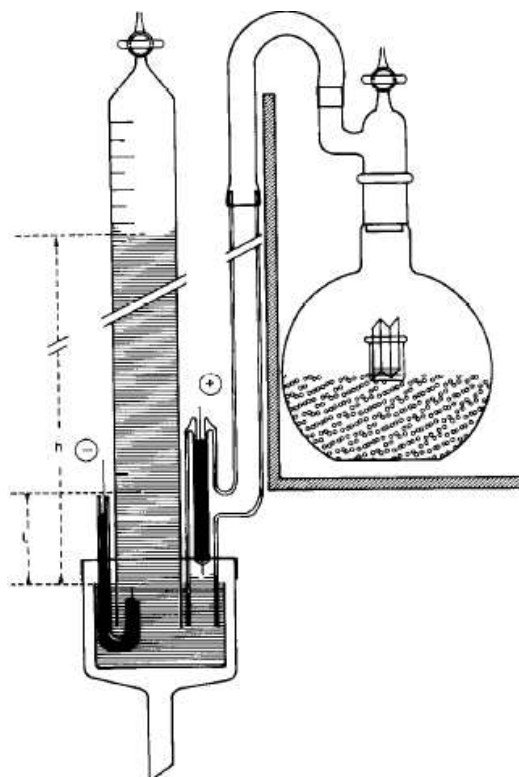
#### Πειραματική διαδικασία:

50g δείγματος κόμποστ τοποθετείται σε σφαιρικές φιάλες και επωάζεται σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας στους 30 °C και στους 50°C για την θερμοφιλή φάση. Στο εσωτερικό της φιάλης και πάνω στην επιφάνεια του κόμποστ τοποθετείται σωληνίσκος με 2 ml διαλύματος KOH 4N και εντός αυτού τοποθετούμε 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 εκλύμενο 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.



**Εικόνα 2.2** 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:

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

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 την 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  $H_2SO_4$  στην προχοΐδα τη στιγμή της ανάγνωσης του  $V$ .

$\rho$  = Πυκνότητα του διαλύματος 0.2 N  $H_2SO_4$  (= 1,012 g/cm<sup>3</sup>).

$d$  = Πυκνότητα Hg (13,596 g/cm<sup>3</sup>).

$P_0$  = 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 την διατομή των προχοΐδων και τον όγκο τους μετασχηματίζεται και λαμβάνουμε τον ακόλουθο απλούστερο τύπο:

$$v_0 = [(B-17-0,7815x)(50-x)] / [760*(1+0,00367\Theta)]$$

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

## 2.6 Μοριακές τεχνικές

### 2.6.1 Επιλογή βακτηριακών στελεχών για ταυτοποίηση

Από τα συνολικά δέκα κυτταρινολυτικά βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας Μεταπτυχιακής Μελέτης, μελετήθηκαν τρία, τα οποία προέρχονται από διαφορετικές φάσεις της διαδικασίας κομποστοποίησης.

**Πίνακας 2.3** Κωδικοποίηση και περιγραφή των υπό μελέτη στελεχών

a/a	Στέλεχος	Κωδικοποίηση	Περιγραφή
1	2	Cell2	4 <sup>η</sup> δειγματοληψία Αραίωση: 10 <sup>-7</sup> (ε)
2	8 (αποικία 2)	Cell8	3 <sup>η</sup> δειγματοληψία Αραίωση: 10 <sup>-7</sup> (δ) - Αποικία 2
3	9 (αποικία 1)	Cell9	3 <sup>η</sup> δειγματοληψία Αραίωση: 10 <sup>-7</sup> (δ) – Αποικία 1

## 2.6.2 Απομόνωση ολικού γενετικού υλικού (DNA)

### 2.6.2.1 Απομόνωση DNA (genomic extraction)

Από τα τρία βακτηριακά στελέχη το ένα βρέθηκε αρνητικά στην χρώση κατά Gram και τα δύο θετικά, οπότε ακολουθήθηκε το αντίστοιχο πρωτόκολλο που αφορά Gram<sup>-</sup> και Gram<sup>+</sup> βακτήρια. Για την απομόνωση του γενετικού υλικού ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία σύμφωνα με το kit Nucleonspin Plasmid της εταιρείας Macherey-Nagel ([www.mn-net.com](http://www.mn-net.com)):

#### I. Συλλογή των Βακτηριακών κυττάρων

Αρχικά έγινε φυγοκέντρηση 1,5ml καλλιέργειας στις 13.000 rpm ή 11.500 g (full speed) για τρία λεπτά. Ακολούθως ξεπλύνουμε με 1ml NaCl 150 mM και έγινε πάλι φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για τρία λεπτά και αφαιρούμε ότι υγρό έχει απομείνει στο σωλήνα τύπου erpendrf.

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

Σε σωλήνα τύπου erpendorf που έφερε τα βακτηριακά κύτταρα προστέθηκαν 180 μl από το buffer T και 20 μl διαλύματος RNase και αφήνουμε για 10 min. Ακολούθως βάζουμε 20 μl Proteinase K και αφήνουμε για 30 min στους 55 °C.

#### III. Λύση

Προσθέτουμε 200 μl διαλύματος Lyse C, όπου το αφήνουμε για επώαση στους 55°C για 10 min. Σύντομη ανάδευση.

#### IV. Ρύθμιση συνθηκών δέσμευσης DNA.

Στους σωλήνες τύπου erpendorf προσθέτουμε 200 μl αιθανόλης (95-100%) και ανακατεύουμε καλά (δεν κάνουμε ποτέ vortex).

#### V. Δέσμευση DNA

Για κάθε δείγμα τοποθετήθηκε μία στήλη σε ένα σωλήνα συλλογής, όπου από πριν έχουμε βάλει 500 μl διαλύματος column preparation και το αφήνουμε να πέσει (περιμένουμε λίγο παραπάνω από 5 min και ακολούθως κάνουμε φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 1 min).

Όλο το δείγμα από το erpendorf μεταφέρθηκε στη στήλη. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm για 1 min. Απόρριψη του διηθήματος και επανατοποθέτηση της στήλης στον σωλήνα συλλογής.

## VI. Ξέπλυμα της μεμβράνης

1<sup>η</sup> πλύση: Προσθήκη 500 µl διαλύματος wash solution 1. Φυγοκέντρωση στις 8.500 rpm για 1 min. Απόρριψη του διηθήματος και επανατοποθέτηση της στήλης στον σωλήνα συλλογής.

2<sup>η</sup> πλύση: Προσθήκη 500 µl διαλύματος wash solution. Φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 3 min. Απόρριψη του διηθήματος και επανατοποθέτηση της στήλης στον σωλήνα συλλογής.

## VII. Στέγνωμα της μεμβράνης

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

## VIII. Εκχύλιση DNA

Τοποθέτηση της στήλης σε eppendorf των 1,5 ml και προσθήκη 55 µl Elute. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Φυγοκέντρωση στις 8.500 rpm για 1 min. Επανατοποθετούμε την στήλη σε eppendorf των 1,5 ml και προσθέτουμε 55 µl Elute. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Φυγοκέντρωση στις 8.500 rpm για 1 min.

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

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

Η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων (ng/µl) στο εκάστοτε διάλυμα έκλυσης (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 έκλυσης 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.

#### 2.6.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Με τη χρήση της PCR ενισχύθηκαν δύο περιοχές του ολικού γενετικού υλικού των υπό μελέτη στελεχών, με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών (primers). Ενισχύθηκε μία περιοχή του γονιδίου που κωδικοποιεί για το 16S rRNA μήκους ~1450 βάσεων (97% του συνολικού 16S rRNA γονιδίου).

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.4**:

**Πίνακας 2.4** Αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για ενίσχυση του 16S rRNA.

		Όνομα	Αλληλουχία (5' – 3')
<b>16S rRNA</b>	Forward	fD1	5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3
	Reverse	rD1	5'- CAA GTC GTA AAA GGT AGC CGT -3'

Οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για τα δύο αυτά γονίδια φαίνονται στον **Πίνακα 2.5**:

**Πίνακας 2.5** Συνθήκες πραγματοποίησης PCR για ενίσχυση του 16S rRNA.

Στάδιο	Γονίδιο 16S rRNA	
Αρχική αποδιάταξη (initial denaturation)	94,5°C για 4:30 min	36 κύκλοι
Αποδιάταξη (denaturation)	94,5°C για 1 min	
Υβριδισμός εκκινητών* (annealing)	48°C για 1 min	
Επιμήκυνση (extention)	72°C για 1 min	
Τελική επιμήκυνση (final extention)	72°C για 8 min	
Διατήρηση (hold)	6°C για 50 min	

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

Ο υπολογισμός της θερμοκρασίας τήξεως γίνεται από τη σχέση:

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

Η βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών είναι περίπου  $5 - 10^\circ\text{C}$  χαμηλότερη της  $T_m$ .

Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε εντός ειδικού σωλήνα eppendorf. Τα αντιδραστήρια και η ποσότητα αυτών ανά αντίδραση PCR παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.6**:

**Πίνακας 2.6** Ποσότητες αντιδραστηρίων ανά αντίδραση PCR για ενίσχυση τμήματος 16S rRNA.

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Όγκος ανά αντίδραση (μl)</b>
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.

### 2.6.5 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.

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Η παρασκευή του έγινε ως εξής: 0.5g αγαρόζης προστέθηκαν σε 50ml διαλύματος TAE (1%). Το διάλυμα θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να είναι ομοιογενές. Στο διάλυμα, αφού κρυώσει, προστέθηκαν 5μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου (10mg/ml). Ακολούθησε ανάδευση και το διάλυμα αφέθηκε να στερεοποιηθεί στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, αφού πρώτα προσαρμόστηκε η κατάλληλη «χτένα» ώστε να σχηματιστούν τα βοθρία φόρτωσης.

Όταν το πήκτωμα στερεοποιήθηκε φορτώθηκαν τα δείγματά μας, αφού πρώτα προστέθηκε σε αυτά 2 μl 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 στη ζώνη μας. Εφαρμόστηκε τέλος ηλεκτρική τάση (80 – 90 V) στη συσκευή, οπότε και ξεκίνησε η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων.

### 2.6.6 Απομόνωση – ανάκτηση DNA από πήκτωμα αγαρόζης.

Σε μηχανήμα UV κόβονται οι ζώνες και προστίθενται σε eppendorf. Καταγράφεται το καθαρό βάρος κάθε ζώνης και έπειτα με τη χρήση του PCR clean-up Gel Extraction kit (Nucleospin Extract II- Macherey Nagel), γίνεται καθαρισμός του DNA από την αγαρόζη, όπως ακριβώς περιγράφεται στο πρωτόκολλο.

- Προσθέτουμε στο eppendorf Buffer NT **τη διπλάσια ποσότητα από αυτή του gel**
- Βάζουμε το eppendorf στο υδατόλουτρο στους 55 °C για 10 min (κάθε 2 min ανακινούμε)
- Από τα eppendorf βάζουμε όλο το υγρό στις κολώνες και κάνουμε φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 1 min και αδειάζουμε το υγρό από την κολώνα
- Βάζουμε 700 μl NT3 στις κολώνες και κάνουμε φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 1 min
- Πετάμε το υγρό από την κολώνα και κάνουμε πάλι φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 2 min



- Τοποθετούμε την κολώνα σε δικό μας erppendorf και βάζουμε 25 μl elution buffer, το αφήνουμε 5 min και κάνουμε φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 1 min

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

Η αντίδραση της λιγάσης (ligation) πραγματοποιήθηκε εντός σωλήνα erppendorf. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και η ποσότητα αυτών ανά αντίδραση, περιγράφονται στον **Πίνακας 2.7**:

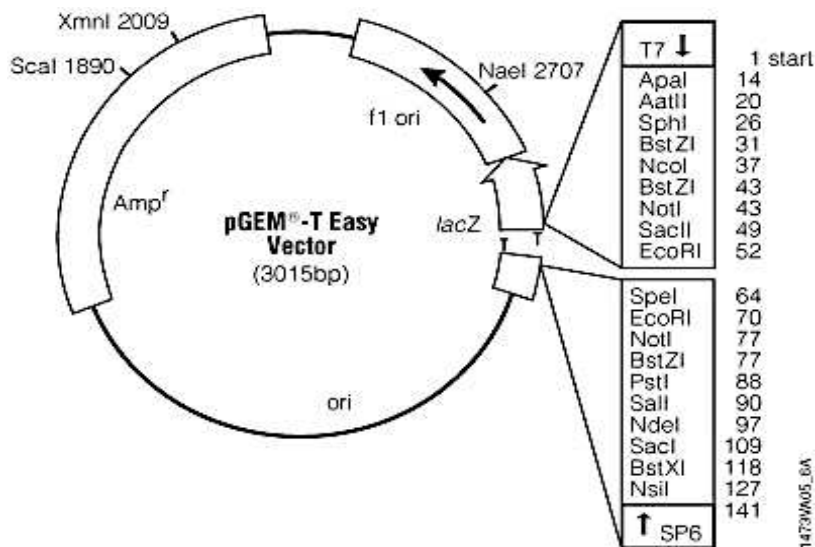
**Πίνακας 2.7** Ποσότητες αντιδραστηρίων ανά αντίδραση ligation.

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (μl) για το Cell2	Όγκος ανά αντίδραση (μl) για το Cell8	Όγκος ανά αντίδραση (μl) για το Cell9
10x buffer	1,2	1,2	1,2
PEG	1,2	1,2	1,2
T4 lig	0,5	0,5	0,5
Plasmid	0,5	0,5	0,5
Insert (16s) (25ng)	1,7	1,2	2,3
dd H <sub>2</sub> O	6,9	7,4	6,3
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>12</b>	<b>12</b>	<b>12</b>

\*Στην αντίδραση διασύνδεσης νουκλεϊκών μορίων (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 ολονύκτια παραμονή στους 4 °C.



**Εικόνα 2.3:** Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pGEM-T Easy (Promega).

### 2.6.6.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli*

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

- Προσθήκη 100 μl δεκτικών κυττάρων XL-Blue (*E. coli*) στα 10 μl της αντίδρασης ligation.
- Παραμονή στον πάγο για 10 min.
- Τοποθετείται στους 42°C (υδατόλουτρο) για 1 min και 30 sec. Με το θερμικό αυτό σοκ ανοίγουν οι βακτηριακές μεμβράνες και τα πλασμίδια εισέρχονται εντός του κυττάρου.
- Παραμονή στον πάγο για 30 sec.
- Προσθήκη 200μl LB θρεπτικού. Ήπια ανάδευση.
- Παραμονή σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 1 h. Ταυτόχρονα γίνεται η παρασκευή τρυβλίων με LB και αμικικιλίνη.
- Προσθήκη 10μl 1M IPTG (ή 2 μl 0,5M IPTG) και 50 μl X-gal( 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranoside). Η β-γαλακτοσιδάση μεταβολίζει την οργανική ένωση X-gal, παράγοντας μια αδρανή μπλε ουσία. Το IPTG είναι επαγωγέας για την έκφραση του γονιδίου lac z που εκφράζει τη β-γαλακτοζιδάση.

- Επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό LB με αμπικιλίνη, για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων. Παραμονή των τρυβλίων για 15 min στον πάγκο εργασίας. Τοποθέτηση σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C για 24 ώρες.

Με αυτή την τεχνική, οι αποικίες που έχουν δεχτεί το πλασμίδιο που φέρει την ένθεση, 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.

#### Παρασκευή δεκτικών κυττάρων *E. coli*

- Εμβολιασμός 5 ml LB με βακτηριολογικό κρίκο από στοκ γλυκερόλης *E. coli* XL-Blue. Ολονύκτια παραμονή στους 37 °C.
- Εμβολιασμός 50 ml LB με 1 ml από την παραπάνω καλλιέργεια. Στους 37 °C για ~2h (OD<sub>600</sub>=0.7).
- Επώαση 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<sub>2</sub> 80mM.
- Επώαση στον πάγο για 45 min. Φυγοκέντρωση για 15 min.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 5 ml CaCl<sub>2</sub> 80mM.
- Επώαση στον πάγο για 45 min. Προσθήκη 15% γλυκερόλης (900 μl γλυκερόλης στα 5 ml κυττάρων).
- Μοίρασμα σε σωλήνες erpendorf (100 μl). Παραμονή στον πάγο. Φύλαξη στους -80 °C.

### 2.6.6.3 Επιλογή μοναδιαίας αποικίας

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

### 2.6.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα *E. Coli*

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA που φέρει την ένθεση γίνεται σε 2 βήματα: α) γίνεται κατάτμηση με ένζυμο περιορισμού για επαλήθευση της ενσωμάτωσης της ένθεσης στο πλασμίδιο, με κατάτμηση με τη μέθοδο του βρασμού (Boiling preparation) και β) γίνεται απομόνωση και καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA με τη χρήση kit (Qia Prep) για να είναι έτοιμο για αλληλούχιση, για εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του προς μελέτη γονιδίου.

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

- Μεταφέρθηκαν 1,5ml από την καλλιέργεια που έφερε την αποκία με τα μετασχηματισμένα βακτήρια σε erppendorf και φυγοκεντρήθηκαν στις 13.000 rpm για 3 min. Απομάκρυνση όσο το δυνατόν μεγαλύτερης ποσότητας του υπερκειμένου.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 150 μl διαλύματος STET, παρουσία 2 μl λυσοζύμης (25 mg/ml). Ανακίνηση για πλήρη διαλυτοποίηση της pellet σε στατώ.
- Βρασμός του δείγματος για 45 sec.
- 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 σε στατώ.
- Κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA με φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 min σε ψυχόμενη φυγόκεντρο.
- Καλή απομάκρυνση του υπερκείμενου 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 **Πίνακα 2.8**.

**Πίνακας 2.8** Ποσότητες αντιδραστηρίων ανά αντίδραση πέψης με ενδονουκλεάση περιορισμού.

Αντιδραστήρια πέψης	Όγκος ανά αντίδραση (µl)
Πλασμιδιακό DNA	2,4
EcoRI enzyme	1,1
10x buffer	2
RNase	0,5
ddH <sub>2</sub> O (έως τελικό όγκο 20 µl)	14
<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.

### 2.6.7.2 QIAprep Miniprep

Παίρνουμε ένα δείγμα από τις υγρές καλλιέργειες που επιλέξαμε από την προηγούμενη μεθοδολογία

#### Διαδικασία

- Βάζουμε 1,5 ml από τις καλλιέργειες και φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm για 3 min. Αδειάζουμε το υπερκείμενο και ξαναβάζουμε 1 ml από τις καλλιέργειες

και φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm για 3 min. Απομάκρυνση του υπερκειμένου και ότι έχει μείνει αφαιρείται με την πιπέτα.

- Προετοιμασία των δοκιμαστικών σωλήνων με τις στήλες τους από το κουτί της μεθόδου
- Προσθήκη 240 μl Buffer A1( ψυγείο γιατί έχει RNase) και διαλυση του ιζήματος.
- Προσθήκη 240 μl Buffer A2 ( σπάει τις μεμβράνες ) και ήπια ανακίνηση μέχρι να γίνουν όλα διάφανα χωρίς θαμπάδα. Δεν πρέπει να μείνουν πολλή ώρα έτσι (μέχρι 5 min). Προσθήκη αμέσως 290 μl Buffer 3 και ανακίνηση κατευθείαν το καθένα ( που γεμίζει άσπρα κομματάκια τα οποία είναι κομμάτι μεμβρανών και πρωτεϊνών των μεμβρανών ) και φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 5 min
- Μεταφορά του υπερκειμένου που έχει το DNA μας με την πιπέτα στους σωλήνες με τις στήλες. Φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 1 min
- Προσθήκη 150 μl Buffer A4 και φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 1 min στη στήλη και εφόσον έχουν αδειάσει οι σωλήνες. Άδειασμα πάλι του περιεχομένου του σωλήνα και φυγοκέντρωση ξανά στις 13.000 rpm για 2 min (για να στεγνώσει η μεμβράνη από τυχόν υπολείμματα αιθανόλης)
- Έχουν ετοιμαστεί καινούριοι σωλήνες τύπου erpendorf και σημειώνεται όνομα δείγματος, γονιδίου και Qia-prep. Τοποθέτηση της κάθε στήλης στο αντίστοιχο erpendorf
- Προσθήκη 50 μl AE (στο κέντρο της στήλης) για 7-8 min. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 1 min. Το DNA είναι μέσα στους σωλήνες τύπου erpendorf και γίνετε ανάδευση με το χέρι
- Γίνετε φωτομέτρηση. Υπολογίζετε ότι θα σταλεί για αλληλούχιση 1μg από το κάθε δείγμα π.χ.  $1\mu\text{g}/0.1137 = 9 \mu\text{l}$  (για συγκέντρωση δείγματος από φωτομέτρηση 113,7 ng/μl)
- Προετοιμάζονται καινούρια erpendorf, γράφεται sequencing και παίρνουμε τα αντίστοιχα μl για το καθένα και τοποθετούνται στους 37 °C στο θάλαμο επώασης ανοιχτά με μεμβράνη από πάνω και αφήνονται μέχρι να στεγνώσουν πλήρως 3-4 hr. Μετά τοποθετούνται στην κατάψυξη
- Γίνετε επαλήθευση με πέψη EcoR-I.

**Πίνακας 2.9** 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>

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.

### 2.6.8 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 & Masatoshi, 1987).

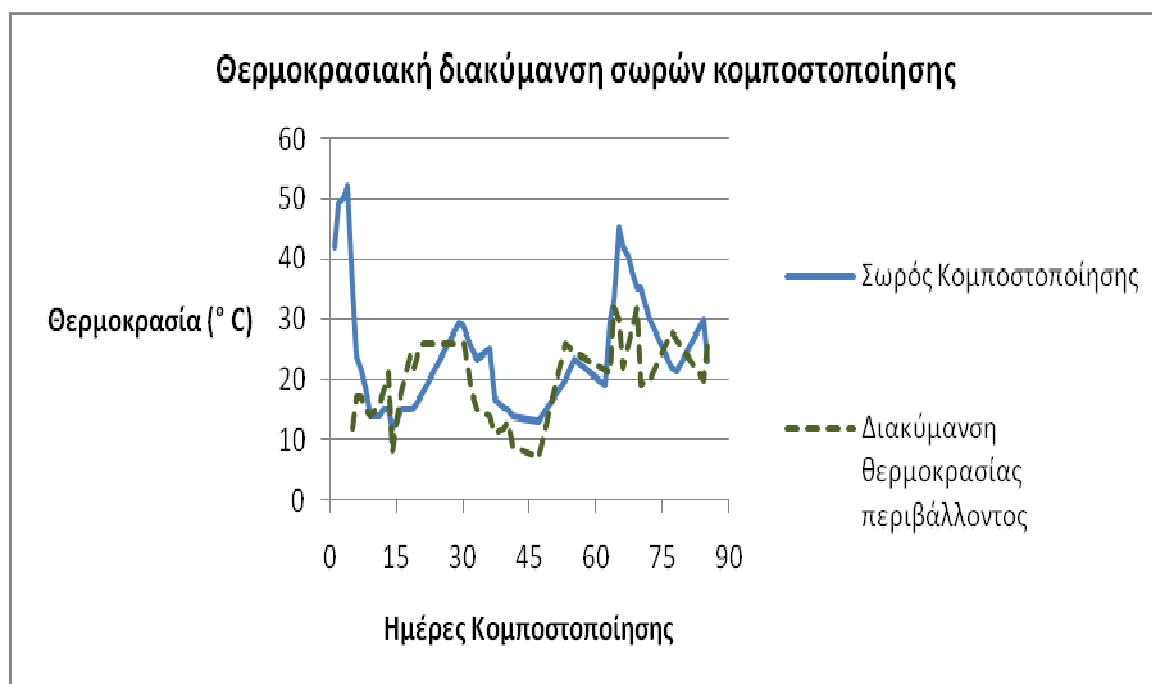
## Κεφάλαιο 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 Φυσικοχημικές Παράμετροι

#### 3.1.1 Θερμοκρασία

Το προς κομποστοποίηση υλικό (ΥΕΒ) τοποθετήθηκε στο κιβώτιο κομποστοποίησης στις 20 Ιανουαρίου 2011. Οι μετρήσεις της θερμοκρασίας του σωρού άρχισαν με την έναρξη του πειράματος και συνεχίστηκαν σχεδόν καθημερινά μέχρι και τη φάση της ωρίμανσης.

Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων της θερμοκρασίας όπως αυτά παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 3.1** φαίνεται ότι η μέγιστη θερμοκρασία που καταγράφηκε ήταν 52 °C την 4<sup>η</sup> ημέρα της κομποστοποίησης, όπου ήταν και το μέγιστο της πρώτης θερμοφίλης φάσης. Η υψηλότερη θερμοκρασία μετά το πρώτο γύρισμα του σωρού, καταγράφηκε την 65<sup>η</sup> ημέρα (3 ημέρες μετά το γύρισμα και τη διαβροχή ) και ήταν 45 °C.



**Διάγραμμα 3.1** Διακύμανση της θερμοκρασίας συναρτήσει του χρόνου.

Τα στάδια της κομποστοποίησης όπως προέκυψαν από τη διακύμανση της



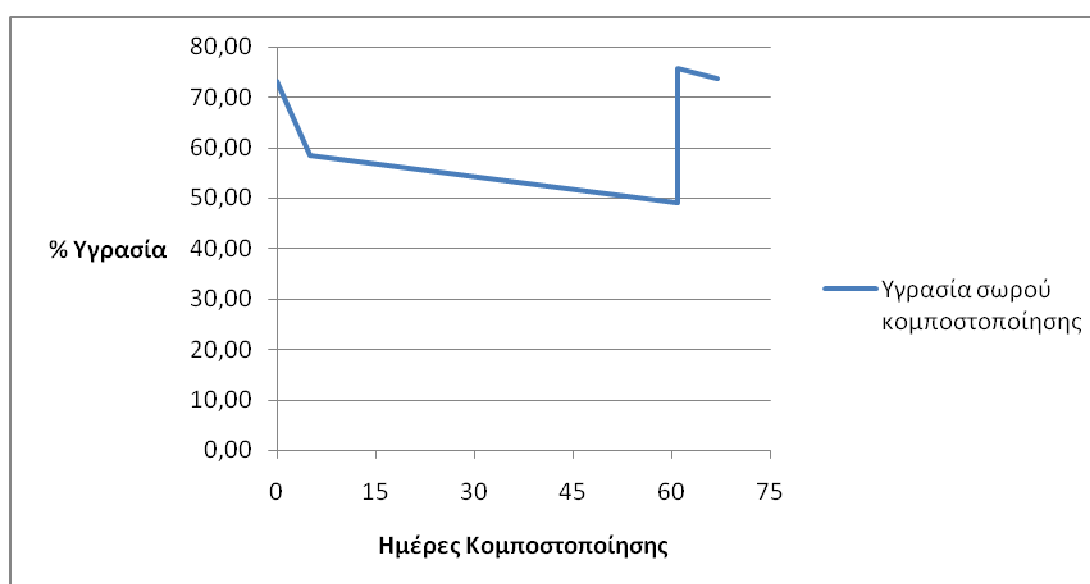
θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια του πειράματος, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.1**

**Πίνακας 3.1** Διάρκεια των φάσεων κομποστοποίησης, σε ημέρες.

Φάσεις Κομποστοποίησης	Σωρός Κομποστοποίησης
Αρχική Μεσόφιλη	0 (εγκατάσταση)
1 <sup>η</sup> θερμόφιλη	1 <sup>η</sup> – 4 <sup>η</sup>
2 <sup>η</sup> Μεσόφιλη	5 <sup>η</sup> – 64 <sup>η</sup>
2 <sup>η</sup> θερμόφιλη	65 <sup>η</sup> – 67 <sup>η</sup>
3 <sup>η</sup> μεσόφιλη - Ωρίμανση	68 <sup>η</sup> – Τέλος της διαδικασίας

### 3.1.2 Υγρασία

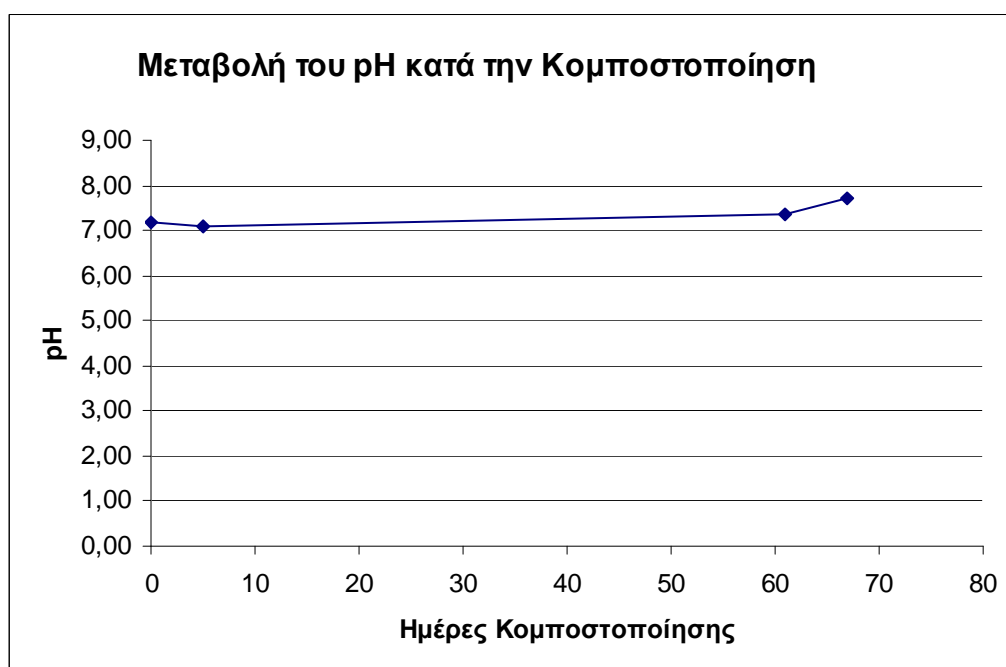
Οι μετρήσεις της υγρασίας έγιναν τις ημερομηνίες των δειγματοληψιών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 3.1**. Η πορεία της υγρασίας του σωρού ήταν αναμενόμενη. Μετά την αρχική διαβροχή (73,10 %) ακολούθησε πτωτική πορεία και έφτασε το 49,13% την 61<sup>η</sup> ημέρα. Αμέσως μετά τη διαβροχή (την ίδια ημέρα) αυξήθηκε στην τιμή του 75,70%.



**Διάγραμμα 3.2** Η πορεία της υγρασίας του σωρού κατά τη διάρκεια της κομποστοποίησης

### 3.1.3 Μεταβολή του pH

Στο **Διάγραμμα 3.3** φαίνεται ότι το pH καθ' όλη τη διάρκεια της κομποστοποίησης είναι ουδέτερο έως ελαφρώς αλκαλικό. Είναι ευδιάκριτο ότι δεν υπάρχουν σημαντικές μεταβολές μέχρι τη δεύτερη θερμοφιλική φάση. Όσο ο σωρός πλησιάζει προς τη φάση της ωρίμανσης παρατηρείται τάση αύξησης του pH (7,70 την 67<sup>η</sup> ημέρα).



**Διάγραμμα 3.3** Η πορεία των τιμών του pH κατά τη διάρκεια της κομποστοποίησης

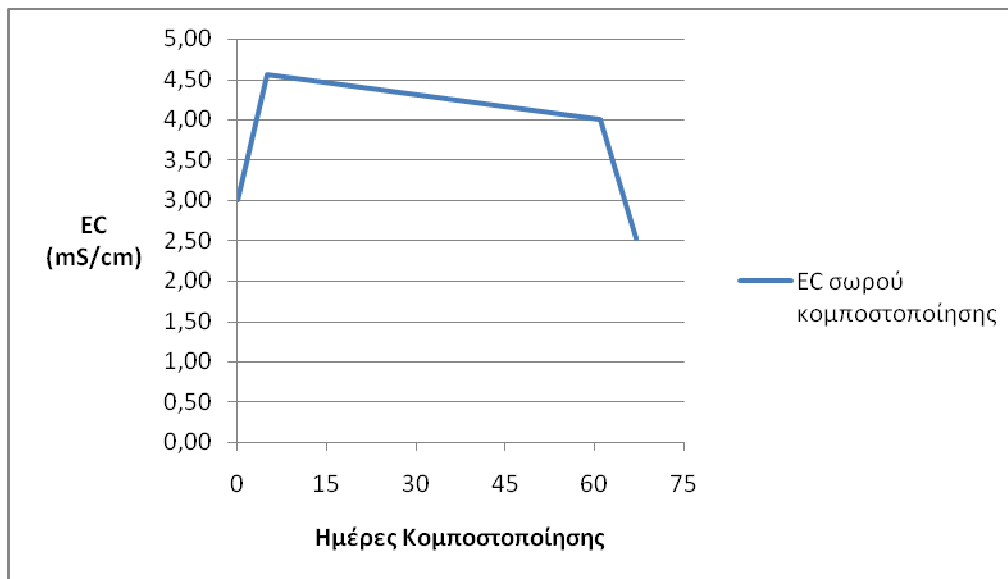
### 3.1.4 Μεταβολή της ηλεκτρικής αγωγιμότητας

Η ηλεκτρική αγωγιμότητα διαλύματος είναι μια μαθηματική έκφραση της ικανότητας ενός υδατικού διαλύματος να άγει το ηλεκτρικό ρεύμα. Η μονάδα μέτρησής της είναι Siemens/m.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της ηλεκτρικής αγωγιμότητας παρουσιάζονται

στην διάγραμμα 3.4. Στη δεύτερη δειγματοληψία η τιμή της ηλεκτρικής αγωγιμότητας παρουσίασε μία απότομη αύξηση, στη συνέχεια μειώθηκε σταδιακά φθάνοντας ακόμα και σε χαμηλότερα επίπεδα της αρχικής τιμής.

Εύρος EC: 2.53 - 4.55 mS/cm.



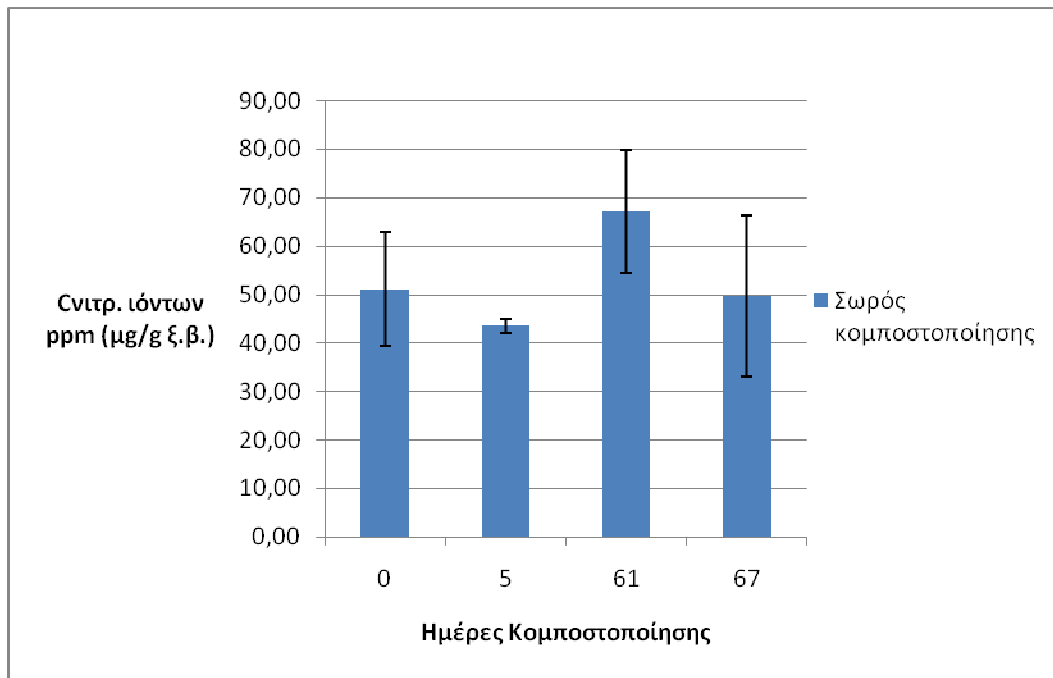
---

**Διάγραμμα 3.4** Η πορεία των τιμών της ηλεκτρικής αγωγιμότητας κατά τη διάρκεια της κομποστοποίησης.

---

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

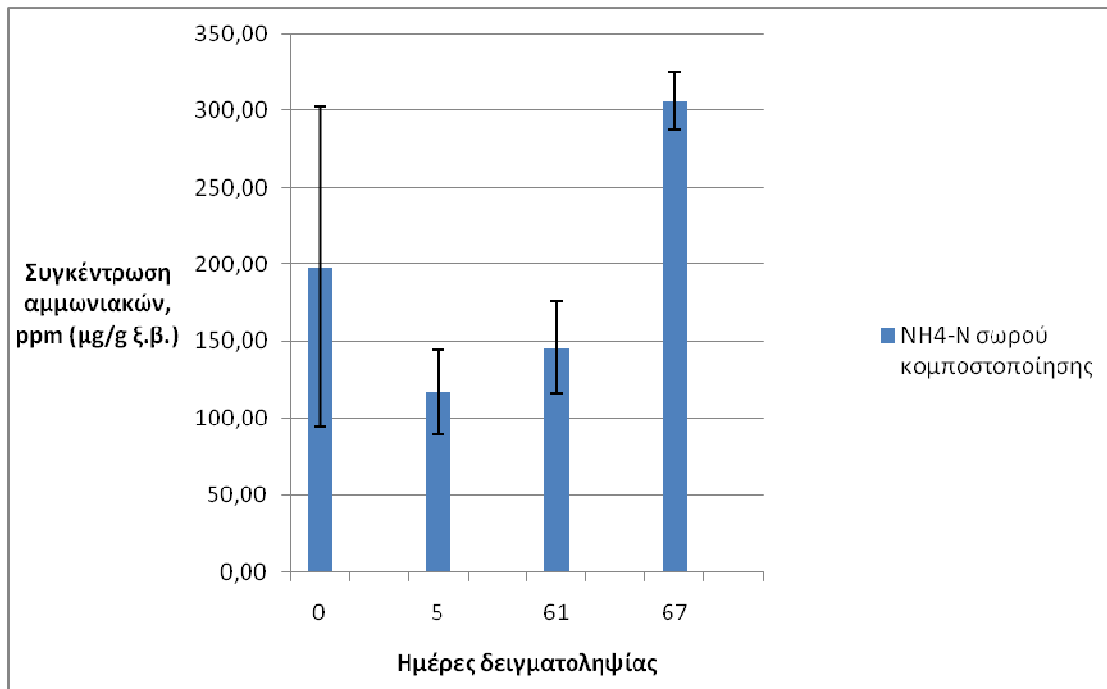
Όπως φαίνεται στο **Διάγραμμα 3.5** το νιτρικό άζωτο παραμένει σχεδόν σταθερό έως και την 1<sup>η</sup> θερμόφιλη φάση. Κατά τη 2<sup>η</sup> μεσόφιλη αυξάνεται ελαφρώς, ενώ κατά τη 2<sup>η</sup> θερμόφιλη παρατηρείται μικρή πτώση.



**Διάγραμμα 3.5** Διακύμανση της συγκέντρωσης του νιτρικού αζώτου συναρτήσει του χρόνου.

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

Η συγκέντρωση του αμμωνιακού αζώτου παρουσιάζει πτωτική τάση κατά την 1<sup>η</sup> θερμόφιλη φάση. Στη συνέχεια, έως και τη 2<sup>η</sup> θερμόφιλη φάση παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης του αμμωνιακού αζώτου. Η αύξηση αυτή είναι ένδειξη ότι δεν έχει ολοκληρωθεί ακόμα η διαδικασία της κομποστοποίησης.

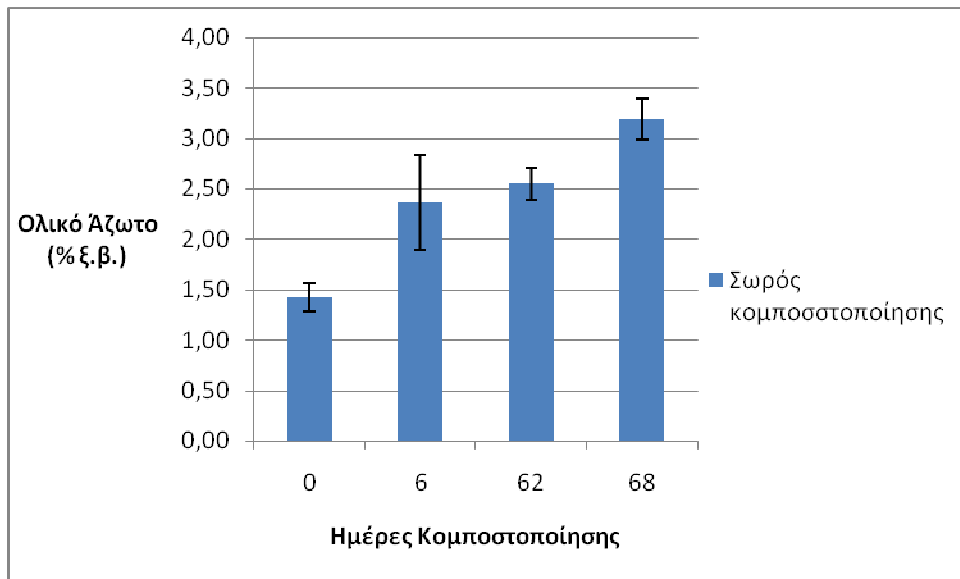


**Διάγραμμα 3.6** Διακύμανση της συγκέντρωσης του αμμωνιακού αζώτου συναρτήσει του χρόνου.

### 3.1.7 Ολικό άζωτο

Στο **Διάγραμμα 3.7** φαίνεται ότι το ολικό άζωτο αυξάνεται σε όλη τη διάρκεια της κομποστοποίησης.

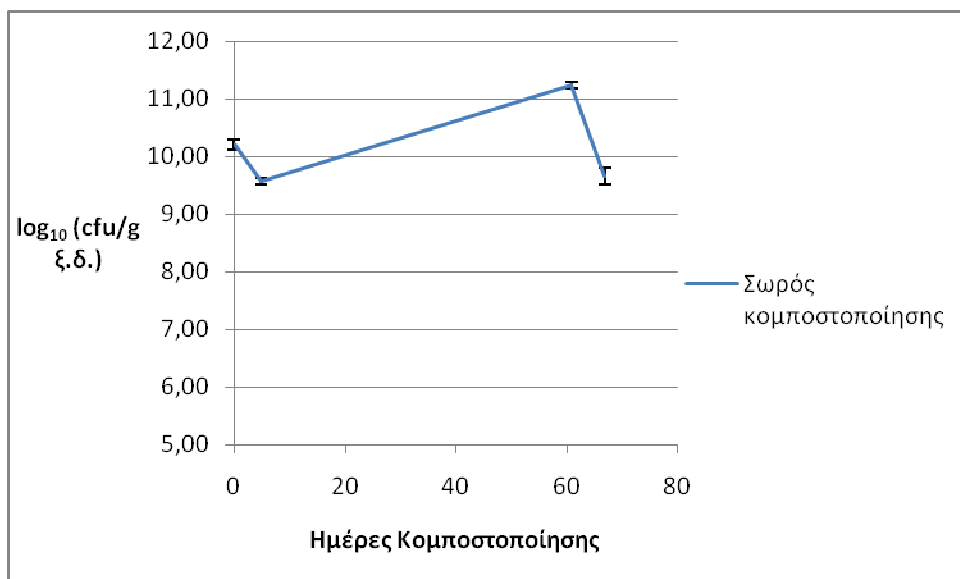
Εύρος %N: 1.43 – 3.19



**Διάγραμμα 3.7** Διακύμανση ολικού αζώτου συναρτήσει του χρόνου.

### 3.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις

#### 3.2.1 Ολικά βακτήρια



**Διάγραμμα 3.8** Διακύμανση Αριθμού Βιώσιμων Μονάδων Ολικών Βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου

Στο **Διάγραμμα 3.8** φαίνεται ότι ο ABM των Ολικών Βακτηρίων αρχικά παρουσιάζει μικρή μείωση μέχρι και την 1<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση. Η μείωση αυτή οφείλεται στις υψηλές θερμοκρασίες που επικρατούν στο σωρό κομποστοποίησης τη συγκεκριμένη χρονική περίοδο. Όπως είναι φυσικό αναμένεται σταδιακή μείωση των μεσόφιλων μικροοργανισμών και αντικατάστασή τους από θερμοφίλους μικροοργανισμούς.

Κατά τη 2<sup>η</sup> μεσόφιλη φάση ο ABM των ολικών βακτηρίων αυξάνεται όπου παρατηρείται και το μέγιστο, λόγω της επαναφοράς της θερμοκρασίας σε περισσότερο φυσιολογικά επίπεδα.

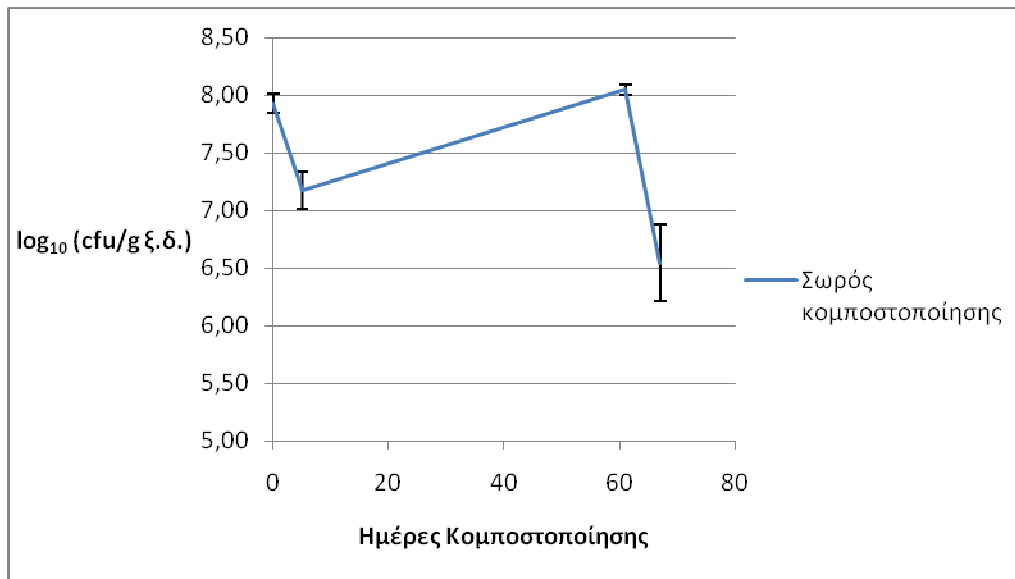
Αμέσως μετά το γύρισμα, τη διαβροχή και την αύξηση της θερμοκρασίας παρατηρείται νέα μείωση του πληθυσμού των Ολικών Βακτηρίων κατά τη δεύτερη θερμοφιλή φάση.

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

### 3.2.2 Μύκητες

Όπως φαίνεται στο **Διάγραμμα 3.9** ο Αριθμός Βιώσιμων Μονάδων των Μυκήτων μειώνεται κατά την 1<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση, λόγω του γεγονότος ότι επικρατούν υψηλές θερμοκρασίες σε αυτή τη φάση της κομποστοποίησης και οι μύκητες είναι κυρίως μεσόφιλοι οργανισμοί. Κατά την 2<sup>η</sup> μεσόφιλη φάση ο ABM αυξάνεται λόγω της επαναφοράς της θερμοκρασίας σε φυσιολογικά επίπεδα. Με την άνοδο της θερμοκρασίας κατά την 2<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση παρατηρείται εκ νέου μείωση των ABM των μυκήτων για τους λόγους που προαναφέρθησαν.

*Εύρος πληθυσμού μυκήτων:  $3.50 \times 10^6 - 1.11 \times 10^8$  propagules (αναπαραγωγικές μονάδες)/g ξ.δ.*

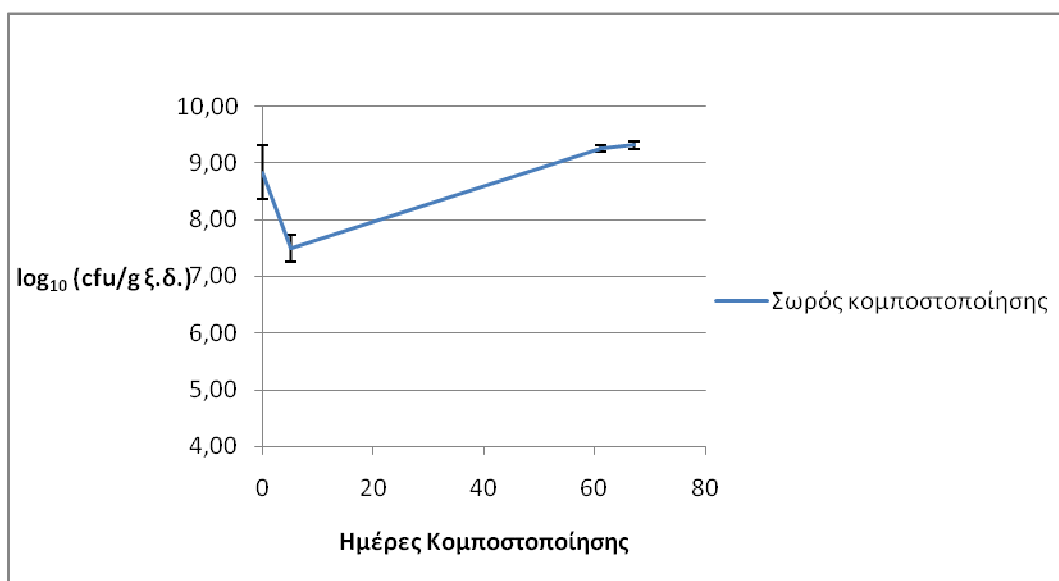


**Διάγραμμα 3.9** Διακύμανση Αριθμού Βιώσιμων Μονάδων Μυκήτων συναρτήσει του χρόνου.

### 3.2.3 Ακτινομύκητες

Ο πληθυσμός των ακτινομυκήτων μειώνεται σημαντικά κατά την πρώτη θερμοφιλή φάση, ενώ μετά το πέρας της και καθώς η θερμοκρασία μειώνεται, ο πληθυσμός επανέρχεται στην αρχική του πυκνότητα και παραμένει σταθερός και κατά τη δεύτερη θερμοφιλή φάση (**Διάγραμμα 3.10**).

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



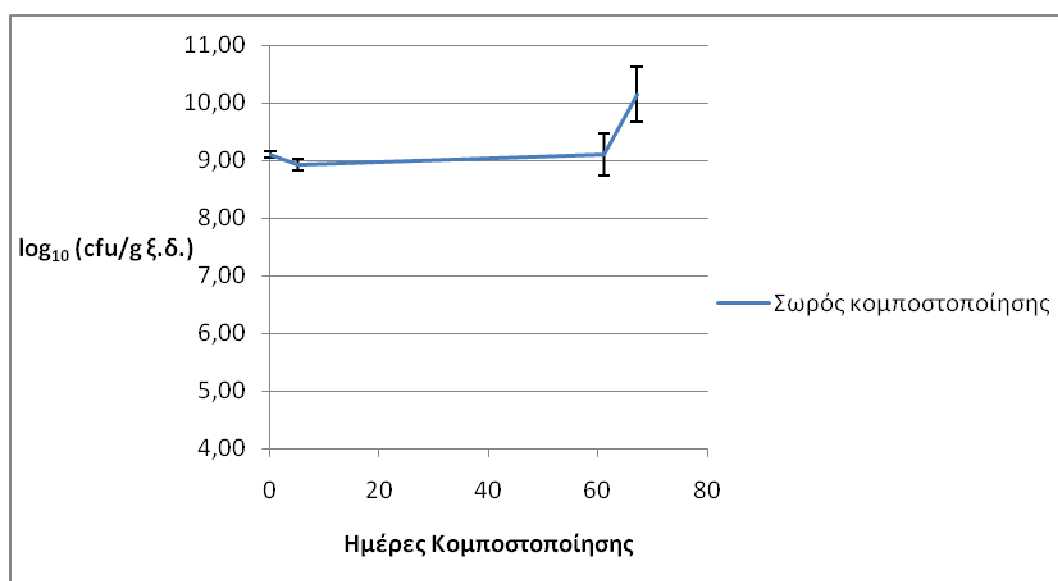
**Διάγραμμα 3.10** Διακύμανση Αριθμού Βιώσιμων Μονάδων Ακτινομυκήτων συναρτήσει του χρόνου.



### 3.2.4 Σποριογόνα βακτήρια

Όπως φαίνεται από το **Διάγραμμα 3.11** ο ABM των σποριογόνων βακτηρίων παραμένει σχεδόν αμετάβλητος μέχρι και τη 2<sup>η</sup> μεσόφιλη φάση, ενώ στη συνέχεια παρατηρείται αύξηση του πληθυσμού λόγω των υψηλών θερμοκρασιών και τη δυνατότητα που έχουν τα σποριογόνα βακτήρια να επιβιώνουν σε αυτές.

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

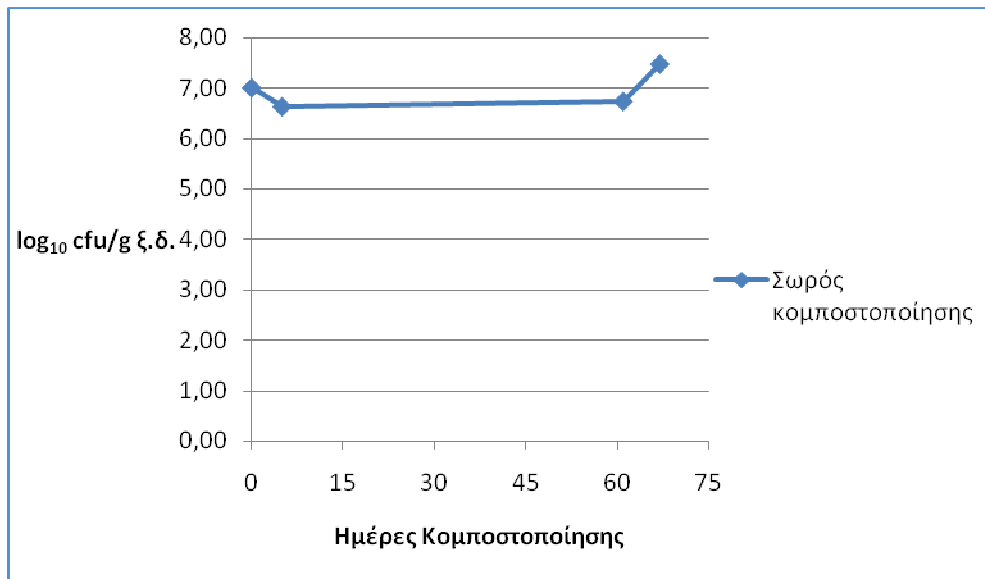


**Διάγραμμα 3.11** Διακύμανση Αριθμού Βιώσιμων Μονάδων Σποριογόνων Βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου.

### 3.2.5 Αζωτοδεσμευτικά βακτήρια

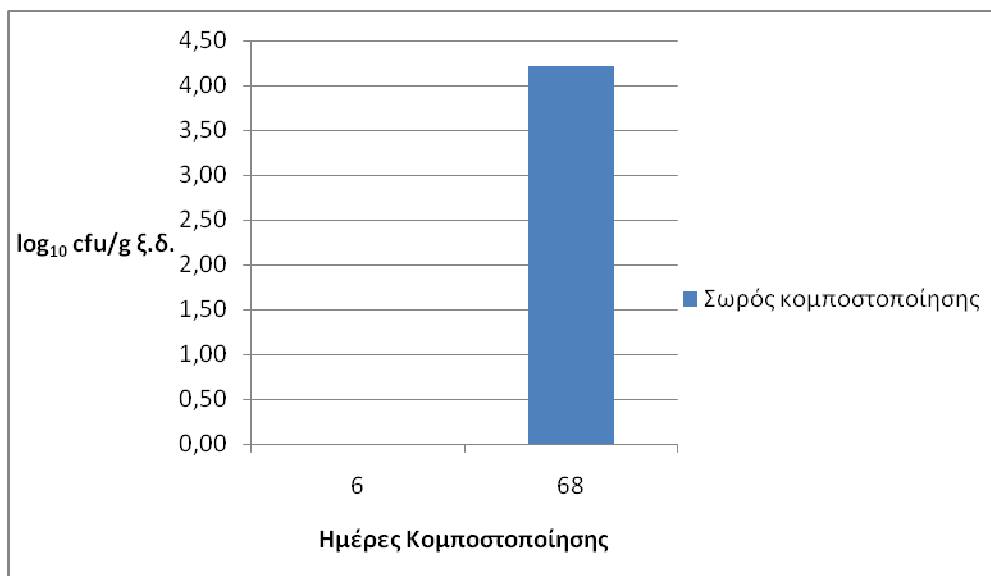
Ο πληθυσμός των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων από την έναρξη της κομποστοποίησης έως τη 2<sup>η</sup> μεσόφιλη φάση παραμένει σχεδόν σταθερός. Κατά τη 2<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση παρατηρήθηκε μικρή αύξηση του πληθυσμού των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων.

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



**Διάγραμμα 3.11** Διακύμανση πληθυσμού Αζωτοδεσμευτικών Βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου.

Στις δύο θερμοφιλες φάσεις ο πληθυσμός των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων εκτιμήθηκε μετά από επώαση των σωλήνων της MPN και στους 50 °C. Μετά την επώαση παρατηρήθηκε ότι κατά την 1<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση ο πληθυσμός ήταν μηδενικός (όλοι οι σωλήνες έδειξαν μηδενική αζωτοδέσμευση), ενώ στη 2<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση ο πληθυσμός των θερμοφιλων ή/και των θερμοανθεκτικών αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων εκτιμήθηκε στα επίπεδα των  $1.66 \times 10^4$  cfu/g ξ.δ.



**Διάγραμμα 3.12** Διακύμανση του πληθυσμού των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου, μετά από επώαση των σωλήνων στους 50 °C.

### 3.2.6 Αζωτοδεσμευτική δραστηριότητα δειγμάτων κόμποστ

Η εκτίμηση της αζωτοδεσμευτικής δραστηριότητας σε δείγματα κόμποστ τα οποία επώασθησαν στους 30 °C και στους 50 °C έδειξε ότι μόνο σε δείγματα που επώασθησαν στους 50 °C ανιχνεύθηκε θετική ένδειξη στη δοκιμή αναγωγής του ακετυλενίου ( σε ένα φιαλίδιο universal στη 2<sup>η</sup> δειγματοληψία και σε δύο στην 4<sup>η</sup> ) (Πίνακας 3.2)

**Πίνακας 3.2** Αποτελέσματα της δοκιμής ακετυλενίου στα δείγματα κόμποστ, στις θερμοφίλες φάσεις (2<sup>η</sup>, 4<sup>η</sup> δειγματοληψία). Οι σωλήνες επώαστηκαν στους 30 και στους 50 °C. Με (+) σημειώνονται οι σωλήνες με θετική ένδειξη αναγωγής ακετυλενίου.

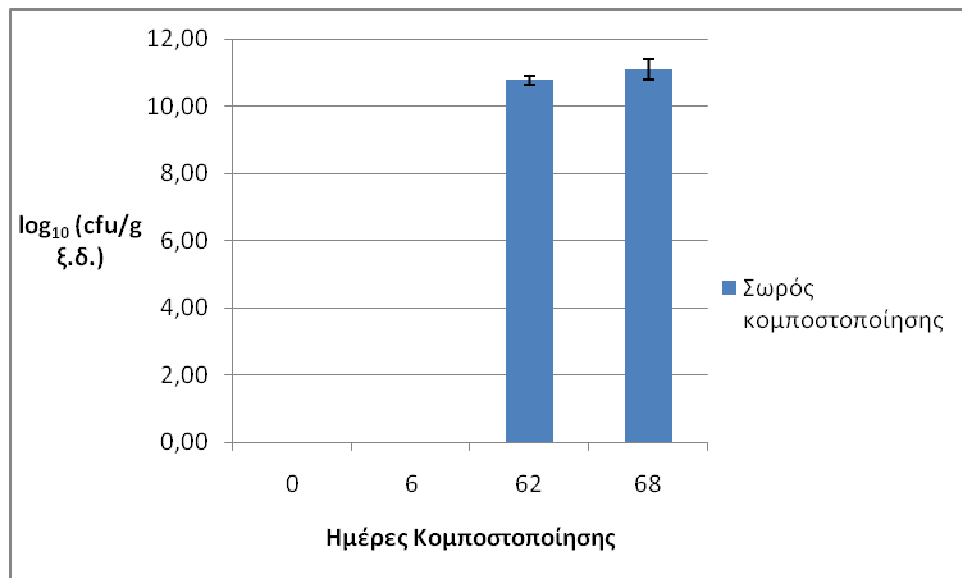
Σωρός Κομποστοποίησης									
Θερμοκρασία επώασης σωλήνων		30° C				50° C			
Δειγματοληψία		2η		4η		2η		4η	
		Ένδειξη σωλήνα	nmoles Eth/g ξ.δ./day	Ένδειξη σωλήνα	nmoles Eth/g ξ.δ./day	Ένδειξη σωλήνα	nmoles Eth/g ξ.δ./day	Ένδειξη σωλήνα	nmoles Eth/g ξ.δ./day
Επανάληψη	1	-	-	-	-	-	-	+	0,88
	2	-	-	-	-	-	-	+	0,84
	3	-	-	-	-	+	0,29	-	-

### 3.2.7 Κυτταρινολυτικά Βακτήρια

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

Αρχικά και μέχρι τη 2<sup>η</sup> μεσόφιλη φάση δεν παρατηρήθηκαν πληθυσμοί κυτταρινολυτικών βακτηρίων. Στο τέλος της 2<sup>η</sup> μεσόφιλης φάσης (62<sup>η</sup> ημέρα) παρατηρήθηκαν κυτταρινολυτικά βακτήρια, ενώ κατά τη 2<sup>η</sup> θερμοφιλή φάση ο πληθυσμός τους παρουσίασε μικρή αύξηση. Όπως φαίνεται και στο **Διάγραμμα 3.13** κυτταρινολυτικά βακτήρια καταμετρήθηκαν και απομονώθηκαν μετά από 60 ημέρες κομποστοποίησης. Αυτό οφείλεται στην εξάντληση των εύκολα αποικοδομήσιμων ουσιών καθώς και στην παραμονή σύνθετων οργανικών ουσιών, όπως η κυτταρίνη και η λιγνίνη.

Εύρος πληθυσμού κυτταρινολυτικών βακτηρίων:  $5.97 \times 10^{10} - 1.18 \times 10^{11}$  cfu/g ξ.δ.



**Διάγραμμα 3.13** Διακύμανση του ABM των κυτταρινολυτικών βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου.

Στον **Πίνακα 3.3** παρουσιάζονται οι απομονώσεις των κυτταρινολυτικών βακτηρίων που πραγματοποιήθηκαν στις δύο δειγματοληψίες. Όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.3 τρία στελέχη (1 *Serratia* και 2 *Brevibacillus*) ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση μοριακών τεχνικών.

**Πίνακας 3.3** Κωδικοποίηση και περιγραφή των κυτταρινολυτικών βακτηρίων.

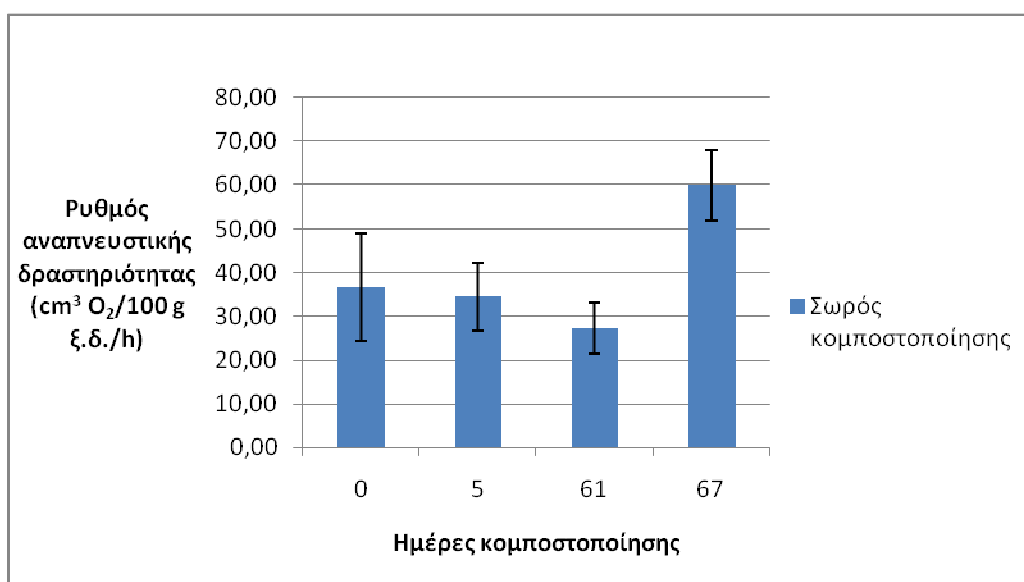
<b>a/a</b>	<b>Στέλεχος</b>	<b>Κωδικοποίηση</b>	<b>Περιγραφή</b>
<b>1</b>	1 (αποικία 2)	Cell1	4 <sup>η</sup> δειγματοληψία Αραίωση: 10 <sup>-7</sup> (β) - Αποικία 2
<b>2</b>	2 (αποικία 3)	Cell2	4 <sup>η</sup> δειγματοληψία Αραίωση: 10 <sup>-7</sup> (ε) - Αποικία 3
<b>3</b>	3 (αποικία 2)	Cell3	4 <sup>η</sup> δειγματοληψία Αραίωση: 10 <sup>-7</sup> (ε) - Αποικία 2
<b>4</b>	4 (αποικία 3)	Cell4	4 <sup>η</sup> δειγματοληψία Αραίωση: 10 <sup>-7</sup> (γ) - Αποικία 3
<b>5</b>	5 (αποικία 2)	Cell5	4 <sup>η</sup> δειγματοληψία Αραίωση: 10 <sup>-7</sup> (δ) - Αποικία 2
<b>6</b>	6 (αποικία 1)	Cell6	4 <sup>η</sup> δειγματοληψία Αραίωση: 10 <sup>-7</sup> (δ) - Αποικία 1
<b>7</b>	7 (αποικία 1)	Cell7	3 <sup>η</sup> δειγματοληψία Αραίωση: 10 <sup>-7</sup> (δ) - Αποικία 1
<b>8</b>	8 (αποικία 2)	Cell8	3 <sup>η</sup> δειγματοληψία Αραίωση: 10 <sup>-7</sup> (δ) - Αποικία 2
<b>9</b>	9 (αποικία 1)	Cell9	3 <sup>η</sup> δειγματοληψία Αραίωση: 10 <sup>-7</sup> (δ) – Αποικία 1
<b>10</b>	10 (αποικία 2)	Cell10	4 <sup>η</sup> δειγματοληψία Αραίωση: 10 <sup>-8</sup> (δ) - Αποικία 2

### **3.2.8 Αναπνευστική δραστηριότητα**

Η εκτίμηση της αναπνευστικής δραστηριότητας σε δείγματα εδάφους ή κόμποστ δίνει μία εικόνα της συνολικής μικροβιακής χλωρίδας του δείγματος η οποία είναι ενεργή.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος μετρήθηκε η ένταση της αναπνευστικής δραστηριότητας σε δείγματα από όλες τις δειγματοληψίες σε θερμοκρασία επώασης των δειγμάτων στους 30 °C. Στις δειγματοληψίες της 1<sup>ης</sup> και της 2<sup>ης</sup> θερμοφιλης φάσης εκτιμήθηκε η ένταση της αναπνευστικής δραστηριότητας σε δείγματα που επώαστηκαν και στους 50 °C.

Όπως φαίνεται και στο **Διάγραμμα 3.14**, στο οποίο παρουσιάζεται η διακύμανση της αναπνευστικής δραστηριότητας μετά από επώαση των δειγμάτων στους 30 °C, παρατηρήθηκε μικρή μείωση του ρυθμού αναπνευστικής δραστηριότητας μέχρι και τη 2<sup>η</sup> μεσόφιλη φάση. Κατά τη 2<sup>η</sup> θερμοφιλη φάση παρατηρείται μεγάλη αύξηση του ρυθμού της αναπνευστικής δραστηριότητας πιθανότατα λόγω ανάπτυξης θερμοανθεκτικότητας σε μέρος του πληθυσμού των μικροβιακών ομάδων.

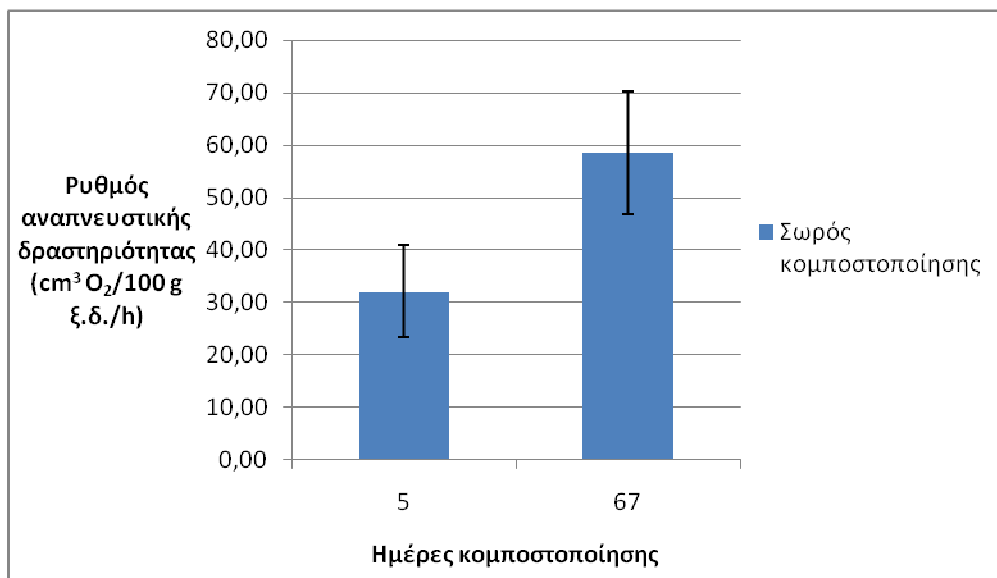


**Διάγραμμα 3.14** Διακύμανση του ρυθμού αναπνευστικής δραστηριότητας συναρτήσει του χρόνου, μετά από επώαση των δειγμάτων στους 30 °C.

Στο **Διάγραμμα 3.15** παρουσιάζεται η διακύμανση της αναπνευστικής δραστηριότητας μετά από επώαση των δειγμάτων στους 50 °C. Φαίνεται ότι υπάρχει αυξημένη αναπνευστική δραστηριότητα κατά τη 2<sup>η</sup> θερμοφιλη φάση σε σχέση με την 1<sup>η</sup>.

Μικρή αύξηση στο ρυθμό αναπνευστικής δραστηριότητας παρατηρείται στους 50 °C σε σχέση με τους 30 °C. Εντούτοις δεν παρατηρείται μεγάλη διαφορά στο ρυθμό αναπνευστικής δραστηριότητας στις δύο θερμοκρασίες επώασης. Η μικρή

παρατηρηθείσα διαφορά είναι αναμενόμενη, εφόσον ο μικροβιακός πληθυσμός είναι προσαρμοσμένος και στις δύο θερμοκρασίες.



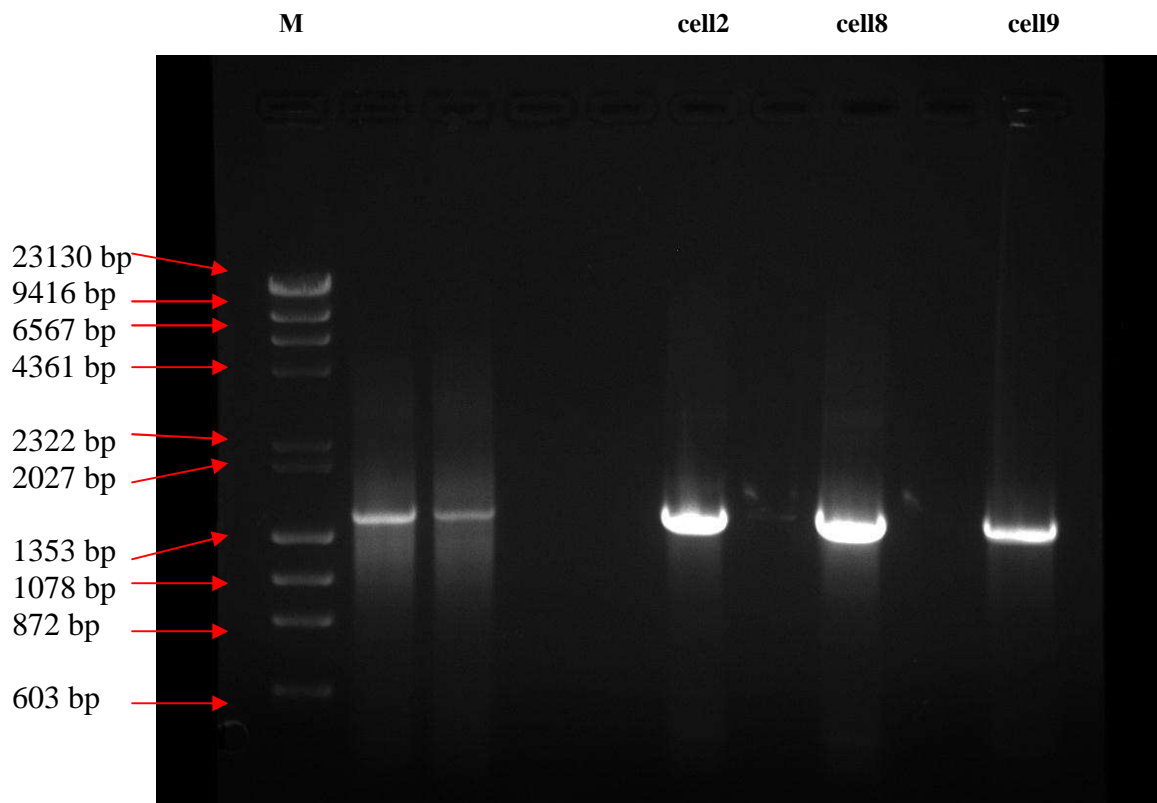
**Διάγραμμα 3.15** Διακύμανση του ρυθμού αναπνευστικής δραστηριότητας συναρτήσει του χρόνου, μετά από επώαση των δειγμάτων στους 50 °C.

### ***3.3 Μικροβιολογικές αναλύσεις με τη χρήση μοριακών τεχνικών***

#### **3.3.1 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου 16S rRNA**

Τρία από τα κυτταρινολυτικά βακτήρια τα οποία είχαν απομονωθεί σε θρεπτικό υπόστρωμα CMC Agar (εκλεκτικό για κυτταρινολυτικά βακτήρια) ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση μοριακών τεχνικών (Cell2, Cell8, Cell9). Το Cell2 απομονώθηκε από την 4<sup>η</sup> δειγματοληψία, ενώ τα Cell8 και Cell9 απομονώθηκαν από την 3<sup>η</sup> δειγματοληψία.

Και στα τρία στελέχη πραγματοποιήθηκε μοριακή ανάλυση για το συντηρημένο γονίδιο 16S rRNA. Στη συνέχεια τα προϊόντα της PCR υποκλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα pGEM – T easy (Promega).

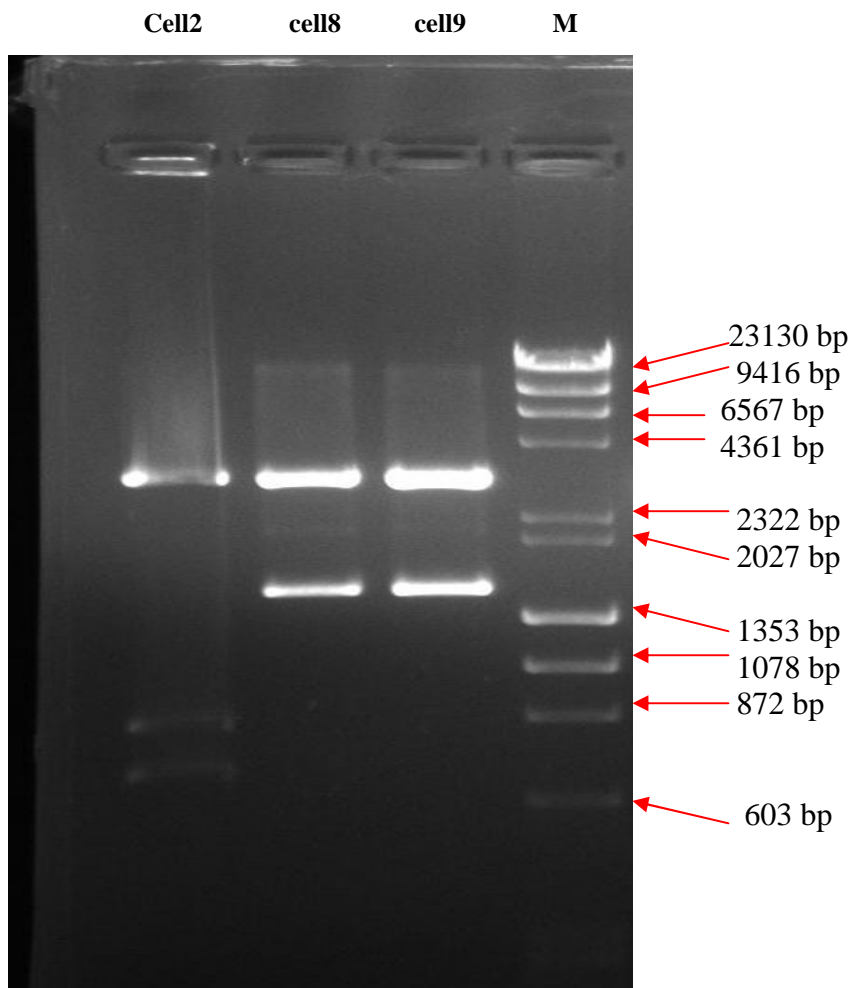


**Εικόνα 3.1** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1%) του προϊόντος της αντίδρασης PCR.

Στην **Εικόνα 3.1** παρουσιάζεται η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1%) του προϊόντος της αντίδρασης PCR που πραγματοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA επί του ολικού γενετικού υλικού (DNA) των δειγμάτων Cell2, Cell8, Cell9. Με M σημειώνεται ο μάρτυρας των μοριακών μεγεθών.

Στην **Εικόνα 3.2** παρατηρούμε μετά την πέψη των πλασμιδίων με περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI*, ότι στην πρώτη θέση που έχουμε εισάγει το γονίδιό μας, υπάρχει θέση αναγνώρισης από την περιοριστική ενδονουκλεάση εντός του γονιδίου 16S rRNA, για αυτό και είναι ορατές δύο ζώνες στη θέση που αναμένουμε το insert.





**Εικόνα 3.2** Πέψη των πλασμιδίων με περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI* (κλώνοι 16S rRNA – Cell2, Cell8, Cell9).

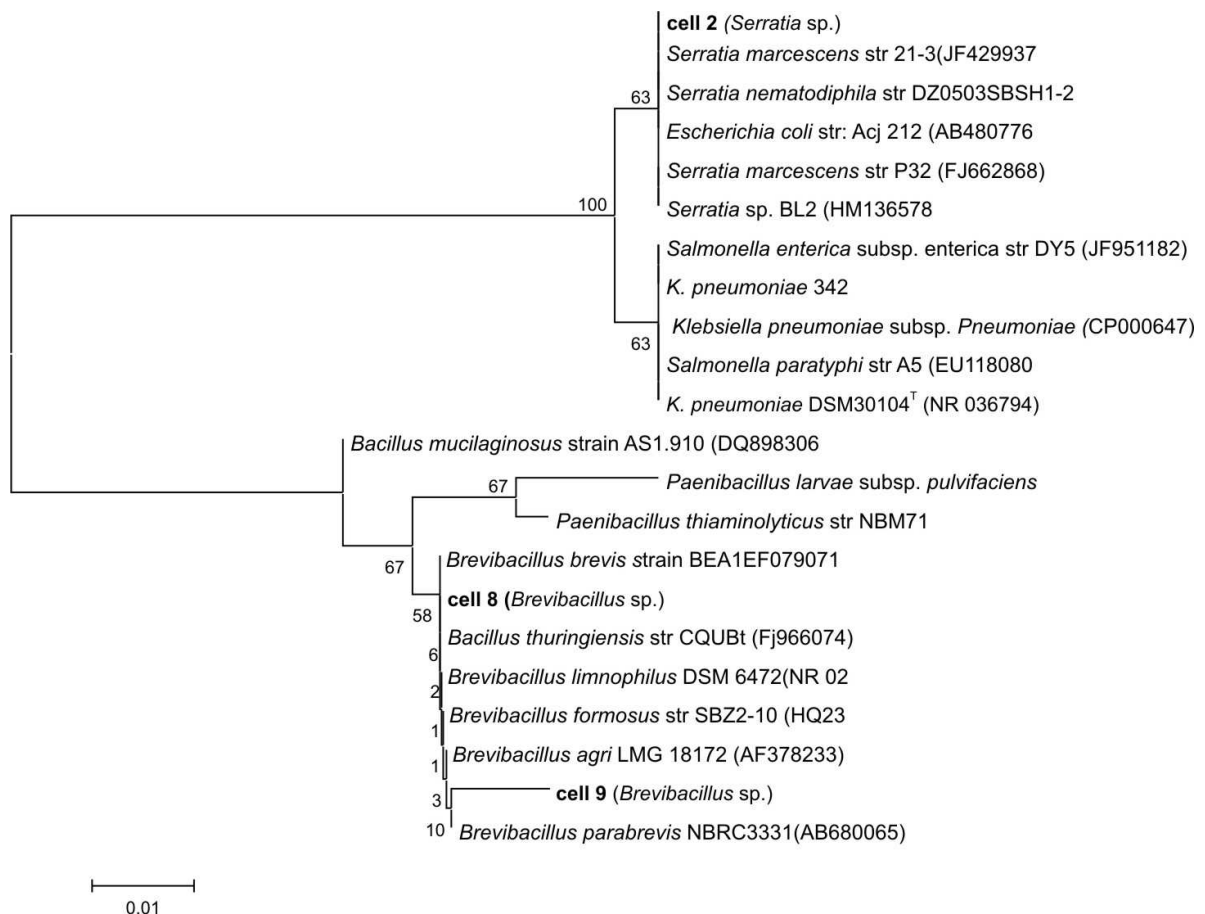
### 3.3.2 Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA

Τα πλασμίδια που έφεραν τα κλωνοποιημένα *16S rDNA* εστάλησαν σε αναλυτικό εργαστήριο, όπου και πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής τους ακολουθίας (*sequencing*). Κατόπιν η ανάλυση του γονιδίου *16S rDNA* 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 που κωδικοποιούν για το ριβοσωμικό RNA, και εμφανίζουν υψηλή ομολογία με αντίστοιχα γονίδια κοινών κυτταρινολυτικών βακτηρίων, τα οποία έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από άλλους οργανισμούς και είναι καταχωρημένα σε διεθνείς βάσεις δεδομένων.

Συγκεκριμένα βρέθηκε υψηλή ομολογία με είδη του γένους *Serratia* και *Brevibacillus*. Η νουκλεοτιδική ακολουθία του 16S rRNA γονιδίου των εξεταζόμενων βακτηρίων παρουσιάζεται στο παράρτημα Β'.

### 3.3.3 Φυλογενετική Ανάλυση 16S rRNA γονιδίου

Το φυλογενετικό δένδρο παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.3**. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το στέλεχος cell 2 ανήκει στο γένος *Serratia* και τα cell 8 και cell 9 στο γένος *Brevibacillus*.



**Εικόνα 3.3** Εξελικτικές σχέσεις 22 taxa. Η απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το βέλτιστο δενδρόγραμμα. 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 900 θέσεων συμπεριλήφθηκαν στα τελικά δεδομένα. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2007).



## **Κεφάλαιο 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Τα ΥΕΒ αποτελούν μία σημαντική πηγή περιβαλλοντικών ρύπων που προκαλούν σημαντική επιβάρυνση στο ήδη επιβαρυσμένο περιβάλλον μας. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να μελετηθούν οι παράμετροι από τις οποίες εξαρτάται η πορεία της κομποστοποίησης αυτού του υποπροϊόντος.

Η οργανική ουσία αποικοδομείται μέσω μιας αργής μικροβιακής διαδικασίας η οποία οδηγεί σε έκλυση ενέργειας υπό μορφή θερμότητας και διοξειδίου του άνθρακα. Η κομποστοποίηση χαρακτηρίζεται ως μία διαδικασία κατά την οποία παρατηρείται αποικοδόμηση της οργανικής ουσίας. Κύριο χαρακτηριστικό αποτελεί η αύξηση των θερμοκρασιών του προς κομποστοποίηση υλικού σε τιμές της θερμοφίλης περιοχής του. Οι Brewer and Sullivan (2003) εντόπισαν υψηλές θερμοκρασίες έως και 75 °C από τις πρώτες ημέρες της κομποστοποίησης έως και την 25<sup>η</sup> ημέρα. Την 40<sup>η</sup> έως την 60<sup>η</sup> ημέρα, οι θερμοκρασίες κυμαίνονται μεταξύ 25 °C και 40 °C, ενώ μετά την 70<sup>η</sup> ημέρα έπεσε στα επίπεδα των 20 – 35 °C. Ανάλογη εικόνα στη διακύμανση των θερμοκρασιών παρατηρήθηκε κατά την κομποστοποίηση ΥΕΒ καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Η μέγιστη τιμή της μετρήθηκε την 4<sup>η</sup> ημέρα στους 52 °C την πρώτη θερμοφίλη φάση, ενώ στη δεύτερη θερμοφίλη φάση αμέσως μετά τη διαβροχή η μέγιστη θερμοκρασία ήταν 45 °C. Η θερμοκρασιακή διακύμανση των σταδίων κομποστοποίησης του σωρού συμφωνεί σε γενικές γραμμές με τον Bonito et al. (2010).

Όσον αφορά στην υγρασία, παρά το γεγονός ότι την 61η ημέρα κομποστοποίησης μειώθηκε σε ποσοστό 49,13%, 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.

Όσον αφορά στη διακύμανση του pH δεν υπήρχαν έντονες διαφοροποιήσεις με αυτά που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία. Όπως ήταν αναμενόμενο, η τιμή του pH αυξάνεται σε όλη τη διάρκεια της κομποστοποίησης, 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).

Ανάλογη διακύμανση με τα αναφερόμενα στη διεθνή βιβλιογραφία παρατηρήθηκε και για την ηλεκτρική αγωγιμότητα.

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 από την 1<sup>η</sup> θερμοφιλή 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 και συν. (1994) παρατήρησαν σημαντικές αυξομειώσεις στα επίπεδα του αμμωνιακού αζώτου κατά την κομποστοποίηση υπολειμμάτων εκκοκκισμού βάμβακος.

Οι χαμηλές τιμές νιτρικού αζώτου στις θερμοφιλείς φάσεις, είναι αναμενόμενες, δεδομένου ότι θερμοκρασίες >40 °C είναι ανασταλτικές για τα νιτροποιητικά βακτήρια, σύμφωνα με τους Brewer & Sullivan (2003).

Η συγκέντρωση του ολικού αζώτου αυξάνεται σε όλη τη διάρκεια της κομποστοποίησης, κυρίως λόγω ελάττωσης του βάρους του σωρού. 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> θερμοφιλή φάση.

Όσο αφορά στην αναπνευστική δραστηριότητα, παρατηρείται μικρή διαφορά στο ρυθμό αναπνευστικής δραστηριότητας στους 30 και στους 50 °C, αφού οι μικροβιακές ομάδες είναι προσαρμοσμένες και στις δύο θερμοκρασίες.

Η μη ολοκληρωμένη κομποστοποίηση του σωρού 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 Rysckeboer *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 θερμοφιλείς φάσεις.

Αυτό ήταν αποτέλεσμα της απενεργοποίησης ή θανάτωσης των μεσόφιλων μικροοργανισμών στην αρχή της θερμοφιλης φάσης (Beffa *et al.*, 1996b).

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

Οι ακτινομύκητες 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).

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

Ο πληθυσμός των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων ήταν υψηλός σε όλες τις φάσεις της κομποστοποίησης. Τα πληθυσμιακά επίπεδα των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων διατηρήθηκαν σχεδόν σταθερά ως και τη 2<sup>η</sup> μεσόφιλη φάση, ενώ αυξήθηκαν στη 2<sup>η</sup> θερμοφιλη (29,98\*10<sup>6</sup> cfu/g ξ.δ.). Ιδιαίτερα σημαντικός ήταν ο εντοπισμός ενεργούς θερμοανθεκτικής μικροχλωρίδας κατά το στάδιο της 2<sup>ης</sup> θερμοφιλης φάσης, γεγονός που υποδηλώνει ότι μέρος του αρχικού πληθυσμού αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων έχει προσαρμοστεί στην υψηλή θερμοκρασία και παραμένει ενεργό.

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

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> θερμοφιλη φάση), όταν αυτές οι ουσίες είχαν αποικοδομηθεί σε μεγάλο βαθμό και στο υπόστρωμα παρέμεναν δύσκολα αφομοιώσιμες ουσίες όπως η κυτταρίνη αλλά και η λιγνίνη.

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, έγινε προσπάθεια ταυτοποίησης τριών κυτταρινολυτικών βακτηριακών στελεχών από τις δέκα συνολικά απομωνώσεις. Η ταυτοποίηση έγινε με τη χρήση μοριακών τεχνικών. Μελετήθηκε το γονίδιο 16S rRNA. Το γονίδιο 16S rRNA χρησιμοποιείται ευρέως στη διεξαγωγή φυλογενετικών δένδρογραμμάτων, καθώς αποτελεί εξαιρετικό μόριο για την εξακρίβωση των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των προκαρυωτικών οργανισμών.

Οι αλληλουχίες 16S rRNA των τριών στελεχών (cell2, cell8, cell9) συγκρίθηκαν με αλληλουχίες ήδη ταυτοποιημένων οργανισμών οι οποίες είναι καταχωρημένες σε διεθνείς βάσεις δεδομένων και βρέθηκε υψηλή ομολογία, μέσω 16S rRNA, με κυτταρινολυτικούς οργανισμούς των γενών *Brevibacillus* και *Serratia*.

Το γένος *Brevibacillus* ανήκει στην οικογένεια *Paenibacillaceae*. Αναφέρθηκε πρώτη φορά από τους Shida *et al.* (1996) με την αναταξινόμηση δέκα ειδών του γένους *Bacillus*. Παρά το γεγονός ότι έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες για την αξιοποίηση της χρήσης της κυτταρίνης από τη βιβλιογραφία έχουν καταγραφεί μόλις 75 στελέχη βακτηριακών ειδών που μπορούν να αναπτυχθούν σε κρυσταλλική κυτταρίνη και να την χρησιμοποιήσουν ως αποκλειστική πηγή άνθρακα και ενέργειας.

Το γένος *Serratia* είναι Gram- βακτήρια, τα οποία μπορούν να απομονωθούν από το νερό, το έδαφος, τα φυτά και τον αέρα. (Grimont and Grimont, 1978). Το 1823 ο Bartolomeo Bizio, ένας φαρμακοποιός από την Πάντοβα της Ιταλίας ανακάλυψε και ονόμασε το *Serratia marcescens*. Το γένος *Serratia* ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*.

Σύμφωνα με το φυλογενετικό δενδρόγραμμα του 16S rRNA το Cell2 ανήκει στο γένος *Serratia*, και τα cell 8 και call 9 ανήκουν στο γένος *Brevibacillus*.

Λίγα στελέχη του γένους *Brevibacillus* φαίνεται να είναι κυτταρινολυτικά. Το στέλεχος *Brevibacillus* JXL που απομονώθηκε από τα απόβλητα χοίρων φαίνεται να είναι το πρώτο στέλεχος του γένους *Brevibacillus* που μπορεί να καλλιεργηθεί σε κυτταρίνη και να την χρησιμοποιεί ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας (Schwarz, 2001).

Η πορεία της κομποστοποίησης προχώρησε ικανοποιητικά, τουλάχιστον ως την 68<sup>η</sup> ημέρα (ημέρα τελευταίας δειγματοληψίας). Επομένως η κομποστοποίηση των υπολειμμάτων εκκοκκισμού βάμβακος αποτελεί μια περιβαλλοντικά ορθή πρακτική, η οποία μπορεί να δώσει λύση στο πρόβλημα διαχείρισης αυτού του αγροτικού υποπροϊόντος. 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.

# 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 diazotizing: 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)-ethylendiamine)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 νιτροπρωσικού 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

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

Δείκτης: 0,35 g bromocresol 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 χρωστική 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).

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

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Ποσότητα (g/l)</b>
<b>Glycerol</b>	10 (8,5 ml)
<b>Casein vitamin free</b>	0,3
<b>KNO<sub>3</sub></b>	2
<b>NaCl</b>	2
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	2
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	0,05
<b>CaCO<sub>3</sub></b>	0,02
<b>FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	0,01
<b>Agar</b>	18
<b>Cycloheximide heat stable</b>	0,05
<b>Adjust PH to 7.0 with HCl</b>	

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:

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Ποσότητα (g/l)</b>
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.

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

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

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 χαρτιού κουζίνας, 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 αποιονισμένο H<sub>2</sub>O διαλύονται τόσα 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 αμπικιλίνη: Παρασκευή του στερεού LB όπως παραπάνω. Μετά την αποστείρωση του υλικού, αφήνουμε το θρεπτικό να κρυώσει, και μετά προστίθεται αντιβιοτικό αμπικιλίνης (100 mg/ml) σε αναλογία 1:1000. Διατήρηση των τρυβλίων στους 4 °C.

#### ***3.2 Αντιβιοτικά***

Διάλυμα αμπικιλίνης (100 mg/ml): Ανά 1 ml αποστειρωμένου ddH<sub>2</sub>O διαλύονται 100 mg αμπικιλίνης. Αποστείρωση του διαλύματος με φιλτράρισμα αυτού μέσα από διηθητικό φίλτρο (0,22 μm). Διατήρηση στους -20 °C.

### **3.3 Διαλύματα ηλεκτροφόρησης**

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

### **3.4 Διαλύματα για μετασχηματισμό κυττάρων *E.coli***

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 εκχύλιση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο βρασμού**

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> θερμοφίλη (Θ1), μεσόφιλη (Μ), 2<sup>η</sup> θερμοφίλη (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 Κομποστοποίησης</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)

### 2. Μικροβιολογικές αναλύσεις με χρήση κλασσικών μεθόδων

*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 (Α), 1<sup>η</sup> θερμοφίλη (Θ1), μεσόφιλη (Μ), 2<sup>η</sup> θερμοφίλη (Θ2) φάση της κομποστοποίησης.

Δείγμα	Ολικά Βακτήρια	Μύκητες	Ακτινομύκητες.	Σποριογόννα Βακτήρια	Κυτταρινολυτικά Βακτήρια	Αζωτοδεσμευτικά Βακτήρια
<b>Σωρός Κομποστοποίησης</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>	5,97*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>	1,18*10 <sup>11</sup>	29,98*10 <sup>6</sup>

### 3. Ταυτοποίηση βακτηρίων με χρήση μοριακών τεχνικών

#### 3.1 Νουκλεοτιδική αλληλουχία 16S rRNA γονιδίου των στελεχών Cell2, Cell8, Cell9.

>cell 2 *Serratia* sp.

```
GCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGATTTCGATTACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCY  
AKTCATGAATCACAAAGTGGTAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGA  
ACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGTAGC  
ATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCC  
GGACTACGACGTACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATACG  
CATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACC  
TTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGAACCGCTGGCAACAAAG  
GATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAAACACGAGCTGACGACA  
GCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCTCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTG  
GATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCT  
TGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTAAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTC  
GATTTAACCGGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAGGGCACAACCTCCAAATCGACATCGTT  
TACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTCGCACCTGAGCGT  
CARTCTCGTCCAGGGGGCCGCCTTCG
```

>cell 8 *Brevibacillus* sp.

```
GGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGTCCCTTCGGGGGCTAG  
CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTCTCAGACTGGGATAACATAGGGAA  
ACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTTGGATCGCATGATCTGAAAAGAAAAGATGGCTTTT  
CGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACC  
AAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACG  
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATG  
GAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTTCTCGGATTGTAAGTTCTGTTGTCAGGGACGA  
ACACGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGACGAGAAAGCCACGGCTAA  
CTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGT  
AAAGCGCGCGCAGGCGGCTATGTAAGTCTGGTGTAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGTT  
GCATCGGAAACTGTGTAGCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGCGGTATTCCACGTGTAGCGGT  
GAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAAGTGA  
CGCTGAGCGCAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAG
```

>cell 9 *Brevibacillus* sp., *Brevibacillus formosus* or *Brevibacillus agri*

```
GACCACCAGTGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGG  
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTT  
GGGGTTTTCAATACCCTCAGTGCCGAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTAC  
GCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGT  
GGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGCTGACCGCTCTG  
GAGACAGAGCTTCCCTTCGGGGCAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT  
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTATCTTTAGTTGCCAGCAT  
TCAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGTGCAAGACGGAGGAAGGCGGGGATGACGTC  
AAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTGGTACAACGGGA  
CGCTACCTCGCGAGAGGACGCAATCTCTTAAAACCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGC  
AACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATA  
CGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGGGAGTTTGCAACACCCGAAGTCG  
GTGAGGTAACCGCAAGGAGCCAGCCCGCAAGGTGGGGTAGATGACTGGGGTGAAGTCG  
TAACAAGGTAGCCGTA
```

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

**Allan, R. N., Lebbe, L., Heyrman, J., De Vos, P., Buchanan, C. J. & Logan, N. A.** (2005). *Brevibacillus levickii* sp. nov. and *Aneurinibacillus terranovensensis* sp. nov., two novel thermoacidophiles isolated from geothermal soils of northern Victoria Land, Antarctica. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 1039–1050.

**Anahory, T., Darbas, H., Ongaro, O., Jean-Pierre, H. & Mion, P.,** (1998). *Serratia ficaria*: a misidentified or unidentified rare cause of human infections in fig tree culture zones. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 3266–3272.

**Baek, S. H., Im, W.-T., Oh, H.-W., Lee, J.-S., Oh, H.-M. & Lee, S.-T.** (2006). *Brevibacillus ginsengisoli* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from soil of a ginseng field. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 2665– 2669.

**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.

**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.



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

**Chen Y. & Inbar Y.** (1993). Chemical and spectroscopical analyses of organic matter transformation during composting in relation to compost maturity. In: Hoitink, H.A.J. and H. M. Keener (eds). *Science Engineering of Composting: Design, Environmental, Microbiology Utilization Aspects*. The Ohio State University, pp.551-600.

**Choi M.J., Bae J.Y., Kim K.Y., Kang H. & Cha C.J.** (2010). *Brevibacillus fluminis* sp. nov., isolated from sediment of estuarine wetland. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2010, **60**: 1595-1599.

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

**De Bertoldi ML, Vallini G. & Pera A.** (1982). Technological aspects of composting including modelling and microbiology. In: Gasser, J.K.R. *Composting of Agricultural and Other Wastes*. Elsevier Applied Science Publishers, New York, pp.27-41.

**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.

**Grimont, P.A. & Grimont, F.,** (1978). The genus *Serratia*. *Annu.Rev. Microbiol.* **32**: 221–248.

**Golueke C. G.** (1972). *Composting - A study of the proces and its principles*. Rodale Press, Emmaus, Pennsylvania, USA.: Rodale Press.

**Goto, K., Fujita, R., Kato, Y., Asahara, M. & Yokota, A.** (2004). Reclassification of *Brevibacillus brevis* strains NCIMB 13288 and DSM 6472 (5NRRL NRS-887) as *Aneurinibacillus danicus* sp. nov. and *Brevibacillus limnophilus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 419–427.

**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.

**Hejazi, A. & Falkiner, F.R.**, (1997). *Serratia marcescens*. J. Med. Microbiol. **46**: 903–912.

**Handar Y.** (1993). Formation and properties of humic substance originating from composts. In: de Bertoldi M., P. Sequi, B. Lemmes and T. Papi (eds). The science of composting. Blackie Academic & Professional, London, pp 235-239.

**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.

**Haug R. T.** (1986). Composting process design criteria, part 3, aeration. BioCycle, **26**: 53-57.

**Hoitink H. A. J.** (1980). Composted bark, a lightweight growth medium with fungicidal properties. Plant Disease **64**:142-147.

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

**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.

**Hungate R.E.** (1963) Polysaccharide storage and growth efficiency in *Ruminococcus albus* J. Bacteriol. Vol.86, pp.848-854.

**Inan K., Canakci S., Belduz A.O. & Sahin F.** (2012). *Brevibacillus aydinogluensis* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from Karakoc hot spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2012, **62**: 849-855

**Jeris J. S. & Regan R. W.** (1973c). Controlling environmental parameters for optimal composting. Part III. *Compost Sci.* **14**(3): 16 – 22. In “The science of composting”. (Ed: Epstein E., 1997). CRC Press. Boca Raton. Florida.

**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.

**Kawai, E., Akatsuka, H., Idei, A., Shibatani, T. & Omori, K.,** (1998). *Serratia marcescens* S-layer protein is secreted extracellularly via an ATP-binding cassette exporter, the Lip system. *Mol. Microbiol.* **27**: 941–952.

**Kim M.K., Sathiyaraj S., Pulla R.K. & Yang D.C.** (2009). *Brevibacillus panacihumi* sp. nov., a  $\beta$ -glucosidase-producing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2009, **59**: 1227-1231.

**Li, X., Tetling, S., Winkler, U.K., Jaeger, K.E. & Benedik, M.J.,** (1995). Gene cloning, sequence analysis, purification, and secretion by *Escherichia coli* of an extracellular lipase from *Serratia marcescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2674–2680.

**Liang Y., Yesuf J., Schmitt S., Bender K. & Bozzola J.** (2009). Study of cellulases from a newly isolated thermophilic and cellulolytic *Brevibacillus* sp. strain JXL. *J Ind Microbiol Biotechnol* **36**:961–970

**Logan, N. A., Forsyth, G., Lebbe, L., Goris, J., Heyndrickx, M., Balcaen, A., Verhelst, A., Falsen, E., Ljungh, A. & other authors** (2002). Polyphasic identification of *Bacillus* and *Brevibacillus* strains from clinical, dairy and industrial specimens and proposal of *Brevibacillus invocatus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 953–966.

**Lou J., Dawson A. & Strobel J.** (1997) Cellobiose and Cellodextrin Metabolism by the Ruminant Bacterium *Ruminococcus albus* *Current Microbiol.* **35**: 221–227.

**Lynd L.R., Weimer P.J, van Zyl W.H. & Pretorius I.S.** (2002) Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology *Micbobiol. Molec. Biol. Rev.* **66**(3) : 506–577.

**Madigan M., Martinko J. & Parker J.** (2007). *Brock Βιολογία των Μικροοργανισμών. Τόμος I, II. 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.

**Mc Kinley V. L., Vestal J. R & Eralp A. E.** (1985). Microbial Activity in Composting (i). *BioCycle*, **26**(9): 39-43.

**Miller F. C.** (1993). Minimizing odor generation during composting. In: Hoitink H. A. J. and H. M. Keener. Science and Engineering of Composting, pp. 219-241

**Nestle, M. & Roberts, W.K.,** (1969). An extracellular nuclease from *Serratia marcescens*. I. Purification and some properties of the enzyme. J. Biol. Chem. **244**, 5213–5218.

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

**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.

**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.

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

**Schultz K. L.** (1961). Aerobic decomposition of organic waste materials. Final Report. Project RG-4180 (C5R1). In “*The science of composting*”. (Ed: Epstein E., 1997). CRC Press. Boca Raton. Florida.

**Schwarz WH** (2001) The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. Appl Microbiol Biotechnol **56**:634–649. doi:10.1007/s002530100710

**Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K. & Komagata, K.** (1996). Proposal for two genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. Int J Syst Bacteriol **46**: 939–946.

**Skerman, V.B.D., McGowan, V. & Sneath, P.H.A.,** (1980). Approved lists of bacterial names. Int. J. Syst. Bacteriol. **30**: 225–420.

**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.

**Stentiford E. I.** (1996). Composting control: Principles and practice. In: De Bertoldi, M. P. Sequi, B. Lemmes and T, Papi (eds). *The Science of Composting. Part I.* Blackie Academic and Professional, Chapman and Hall, London, pp. 224-252.

**Stentiford E. I.** (2001). Composting - optimising the process and keeping the neighbours happy. Διημερίδα: Ολοκληρωμένη διαχείριση οργανικών αποβλήτων και υπολειμμάτων. Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο. Αθήνα 2001, 41-48.

**Strom P. F.** (1985). Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solid-waste composting. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**:899-905.

**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. *Proc.Nat.Acad.Sci (USA)* **101**(30): 11030 – 11035.

**Teeri T.T., Koivula A., Linder M., Wohlfahrt G., Divne C. & Jones T.A.** (1998). *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose. *Biochem. Soc. Trans.***26**: 173–178.

**Thurston B., Dawson K.A. & Strobel H.J.** (1993) Cellobiose versus glucose utilization by the ruminal bacterium *Ruminococcus albus* *Appl. Env. Microbiol* **59**: 2631-2637.

**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.

**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.

**Yu I. & Hungate R.E.** (1979). The extracellular cellulases of *Ruminococcus albus* Ann. Rech. Vet. **10**(2-3: 251-254.

**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.

**Αϊβαλάκης Γ., Καραμπουρνιώτης Γ. & Φασσέας Κ.** (2005). Γενική Βοτανική. Η Μορφολογία, η Ανατομία και η Φυσιολογία των Ανώτερων Φυτών

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

**Ζήκου Ε.** (2010). Βιοσύνθεση ενδοκυτταρικού λίπους υψηλού διατροφικού και φαρμακευτικού ενδιαφέροντος κατά την αύξηση του μύκητα *Thamnidium elegans* σε σακχαρούχα ανανεώσιμα υποστρώματα.

**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.

## ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ



---

**Εικόνα 1:** Αναμόχλευση σωρού με παράλληλη διαβροχή.

---



---

**Εικόνα 2:** Δακτύλιος κυτταρινόλυσης σε CMC άγαρ, μετά από χρώση με διάλυμα ιωδίου της χρωστικής Gram.

---

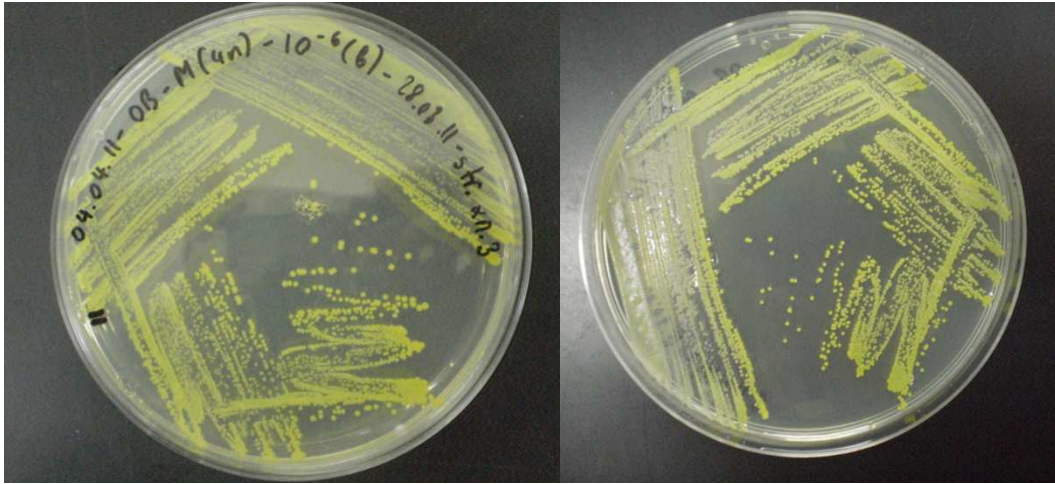


---

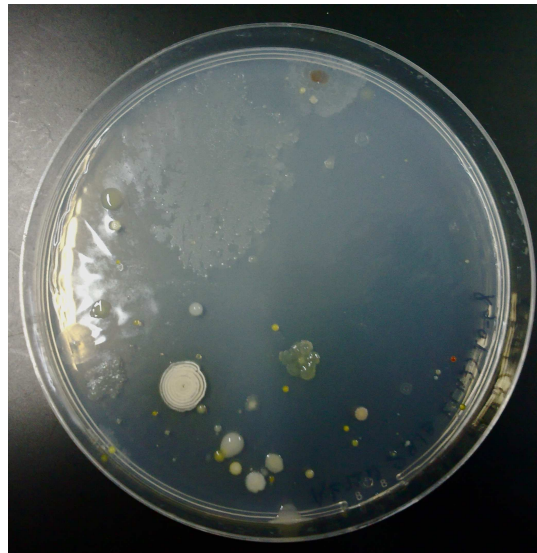
**Εικόνα 3:** Σωλήνες με θρεπτικό διάλυμα Rennie για ανάπτυξη αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων.

---

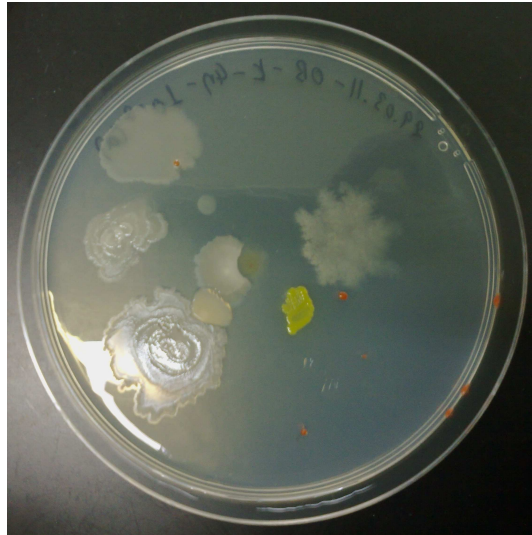




**Εικόνα 4:** Απομόνωση βακτηριακού στελέχους σε καθαρή καλλιέργεια (θρεπτικό υλικό NA).



**Εικόνα 5:** Στελέχη ακτινομυκήτων που αναπτύχθηκαν σε GCA (4η δειγματοληψία, αραιώση  $10^{-6}$ ).



---

**Εικόνα 6:** Ολικά Βακτήρια σε NA (4η δειγματοληψία, αραιώση  $10^7$ ).

---



---

**Εικόνα 7:** Στελέχη μυκήτων που αναπτύχθηκαν σε PDA (3η δειγματοληψία, αραιώση  $10^{-4}$ ).

---