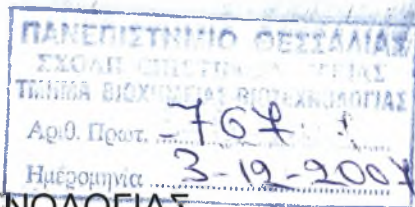




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Διπλωματική εργασία

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΕΛΑΙΟΥΡΓΕΙΩΝ
(ΚΑΤΣΙΓΑΡΟΣ) ΣΤΗΝ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ
ΚΟΙΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ**

ΡΟΥΣΙΔΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2007



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 6060/1
Ημερ. Εισ.: 04-03-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2007
ΡΟΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087370

Υπεύθυνος Καθηγητής

Καρπούζας Δημήτριος, Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Αποικοδομητικών
Μικροοργανισμών

Τριμελής Επιτροπή

- Καρπούζας Δημήτριος, Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Αποικοδομητικών
Μικροοργανισμών
- Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών
- Μαρκουλάτος Παναγιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Εφαρμοσμένη
Μικροβιολογία με έμφαση στη Βιοτεχνολογία

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τεχνικές για τη μέτρηση των επιδράσεων των αγροτικών πρακτικών στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους

Διάφορες μέθοδοι χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση των επιδράσεων των αγροτικών πρακτικών στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Αυτές μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες **(i) στις μεθόδους που βασίζονται στη καλλιέργεια των μικροοργανισμών και (ii) στις μη εξαρτώμενες από την καλλιέργεια μεθόδους**. Στο παρελθόν, οι μέθοδοι ανάλυσης των μικροοργανισμών του εδάφους βασίζονταν στην καλλιέργεια και στην απομόνωση (van Elsas JD et al., 1998). Μια μεγάλη ποικιλία θρεπτικών μέσων καλλιέργειας έχει αναπτυχθεί για να μεγιστοποιήσει την ανίχνευση ποικίλων μικροβιακών ομάδων (Balestra & Misaghi, 1997; Sait et al., 2002; Janssen et al., 2002; Joseph et al., 2003). Μια άλλη μέθοδος που εξαρτάται από την καλλιέργεια αναπτύχθηκε από τους Garland και Mills (1991) και βασίζεται στο Biolog σύστημα. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της μικροβιακής λειτουργικής ποικιλότητας και έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε μολυσμένα εδάφη (Koporka et al., 1988) στη ριζόσφαιρα των φυτών (Ellis et al., 1995) και σε εδάφη στα οποία έχει γίνει χρήση ζιζανιοκτόνων (EL Fantousi et al., 1999). Το κυριότερο μειονέκτημα των μεθόδων που στηρίζονται στη καλλιέργεια είναι ότι οι περισσότεροι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο. Έχει προταθεί ότι τουλάχιστον το 99% των βακτηρίων που παρατηρούνται στο μικροσκόπιο δεν μπορούν να καλλιεργηθούν με τις κοινές τεχνικές του εργαστηρίου (Borneman et al., 1996). Επίσης, πολλοί μύκητες είναι δύσκολο να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο (van Elsas et al., 1999, 2000).

Η ανάπτυξη των μοριακών βιολογικών μεθόδων, οι οποίες δεν βασίζονται στη καλλιέργεια μικροοργανισμών, προσφέρει νέες δυνατότητες στην ανάλυση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους. Οι μοριακές αυτές τεχνικές μπορεί να βασίζονται στη ανάλυση των λιπαρών οξέων (PLFA) ως δείκτες της μικροβιακής κοινότητας ή στη χρήση της αντίδρασης PCR με εκχυλισμένο DNA από έδαφος ως εκμαγείο (π.χ TRFLP, RISA, ARISA, DGGE).

Οι White και Findlay ανέπτυξαν την τεχνική της ανάλυσης των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων (**PLFA**, Phospholipid Fatty Acid Analysis) από περιβαλλοντικά δείγματα για το χαρακτηρισμό της δομής της μικροβιακής τους κοινότητας. Τα φωσφολιπίδια είναι συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών όλων των ζωντανών κυττάρων και αποσυντίθενται όταν το κύτταρο πεθαίνει. Διαφορετικές ομάδες μικροοργανισμών χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένα PLFA profile και κάθε ομάδα συνεισφέρει στο profile ανάλογα με τη βιομάζα της. Επομένως, μια αλλαγή στο profile των λιπαρών οξέων αντιπροσωπεύει μια αλλαγή στο μικροβιακό πληθυσμό. Η PLFA ανάλυση έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της αλλαγής της μικροβιακής κοινότητας εξαιτίας μολύνσεων με χημικά (Siciliano and Germida, 1998) και χρήσης αγροτικών πρακτικών (Bossio et al., 1998).

Η ανάλυση πολυμορφισμών μήκους ακραίων τμημάτων περιορισμού (**T-RFLP**, Terminal Restriction Fragment Polymorphisms) είναι μία μέθοδος με την οποία μπορεί να αποκτηθεί το γενετικό αποτύπωμα μιας μικροβιακής κοινότητας αναλύοντας τους πολυμορφισμούς ενός συγκεκριμένου γονιδίου. Αφού το DNA εκχυλιστεί από το περιβαλλοντικό δείγμα, το γονίδιο που μας ενδιαφέρει ενισχύεται με την τεχνική της PCR και με έναν εκκινητή σημασμένο με φθορίζουσα χρωστική (π.χ TET, 6-FAM). Στη συνέχεια ακολουθεί πέψη του προϊόντος της PCR με ένα ή περισσότερα ένζυμα περιορισμού. Από τη πέψη παράγονται τμήματα διαφορετικού μεγέθους τα οποία διαχωρίζονται σε gel. Με τη χρήση laser ανιχνεύονται μόνο τα σημασμένα ακραία τμήματα περιορισμού και το πρότυπο των μπαντών που προκύπτει αναλύεται με ειδικά προγράμματα όπου τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε γραφική παράσταση (electropherogram). Το πρότυπο των ζωνών (κορυφές στο electropherogram) παρέχει πληροφορίες για τη ποικιλομορφία καθώς κάθε ζώνη αντιπροσωπεύει μια ταξινομική ομάδα. Η μέθοδος T-RFLP είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την μελέτη σύνθετων μικροβιακών κοινοτήτων και για τη σύγκριση διαφορετικών δειγμάτων (Clement, B.G. et al., 1998; Liu et al., 1997)

Η μέθοδος **RISA** (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) αναπτύχθηκε από τους Borneman και Triplett (1997) και πρώτα χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας σε εδάφη. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την PCR ενίσχυση της διαγονιδιακής περιοχής (IGS, intergenic

spacer) ανάμεσα στη μικρή (16S για τα βακτήρια και 18S για τους μύκητες) και στη μεγάλη υπομονάδα (23S για τα βακτήρια και 28S για τους μύκητες) των rRNA γονιδίων. Αυτή η περιοχή είναι εξαιρετικά μεταβλητή σε μέγεθος και σε νουκλεοτιδική αλληλουχία. Η μέθοδος RISA εκμεταλλεύεται την ετερογένεια μήκους της περιοχής αυτής. Τα προϊόντα της PCR διαχωρίζονται σε gel πολυακρυλαμίδης με βάση το μέγεθός τους και γίνονται ορατά με βαφή με AgNO₃. Το αποτέλεσμα είναι ένα πρότυπο μπαντών στο οποίο κάθε μπάντα αντιπροσωπεύει τουλάχιστον έναν οργανισμό.

Οι Fisher και Triplett (1999) ανέπτυξαν τη μέθοδο **ARISA** (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) για να γίνεται η εκτίμηση της μικροβιακής ποικιλότητας πιο γρήγορα και πιο αποδοτικά. Η PCR ενίσχυση της IGS περιοχής γίνεται με τη χρήση εκκινητή σημασμένου με φθορίζουσα χρωστική, για να μπορεί να ανιχνευθεί το προϊόν στο αυτοματοποιημένο σύστημα ηλεκτροφόρησης. Η μικροβιακή ποικιλότητα σε ένα δείγμα εκτιμάται από το συνολικό αριθμό των μπαντών στο δείγμα στο πηκτή. Η μέθοδος ARISA έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την μελέτη διάφορων μικροβιακών πληθυσμών (Robledo et al., 1998; Borneman, 1999; Fisher and Triplett, 1999; Ranjard et al., 2000).

Η πρώτη μέθοδος αποτύπωσης DNA που εφαρμόστηκε με επιτυχία στη μικροβιακή οικολογία ήταν η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (**DGGE**, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Liesac W, et al., 1991). Το DGGE έχει τη ικανότητα να διαχωρίζει μικρά μόρια DNA (περίπου 200-700 bp) που έχουν το ίδιο μέγεθος, αλλά διαφέρουν τουλάχιστον σε ένα νουκλεοτίδιο, κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με αυξημένη βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών. Ο διαχωρισμός αυτός βασίζεται στη μειωμένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα ενός μερικώς αποδιαταγμένου μορίου DNA σε πηκτή σε σύγκριση με τη κινητικότητα της πλήρως δίκλωνης μορφής του μορίου. Οι δύο αλυσίδες ενός DNA τμήματος αποδιατάσσονται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία, η οποία εξαρτάται από (i) τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων (αλληλουχίες πλούσιες σε GC αποδιατάσσονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες) και (ii) από το στοίβαγμα μεταξύ των γειτονικών βάσεων στην ίδια αλυσίδα (base stacking). Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή ακρυλαμίδης, η κινητικότητα ενός μορίου επιβραδύνεται όταν μια περιοχή του

αποδιαταχθεί. Η ολική αποδιάταξη του μορίου αποτρέπεται από τη παρουσία μιας αλληλουχίας πλούσιας σε GC (GC clamp) στο ένα άκρο του. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός PCR εκκινήτη που φέρει στο 5' άκρο ένα GC clamp. Το πρότυπο των μπαντών που προκύπτει από την ηλεκτροφόρηση ενός δείγματος αντανakλά άμεσα τη γενετική του ποικιλότητα και ο αριθμός των μπαντών αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κυρίαρχων ειδών.

Αρχικά το DGGE χρησιμοποιήθηκε για το καθορισμό της γενετικής ποικιλότητας βακτηριακών πληθυσμών (Muyzer et al., 1993). Ωστόσο, το DGGE χρησιμοποιείται και για άλλους σκοπούς στη μικροβιακή οικολογία όπως είναι η μελέτη των αλλαγών που συμβαίνουν σε μια μικροβιακή κοινότητα εξαιτίας περιβαλλοντικών αλλαγών (Donner et al., 1996), και η σύγκριση διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης DNA (Heuer and Smalla, 1997).

1.2 Στόχος της διατριβής

Η μελέτη της επίδρασης των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων (κασίγαρος) στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους και ιδιαίτερα στη σύνθεση της βακτηριακής κοινότητας και στη σύνθεση της κοινότητας των μυκήτων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Σύντομη περιγραφή του πειράματος

2.1.1 Αρχικές αναλύσεις εδάφους

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΟ	ΠΗΛΟΑΜΜΩΔΕΣ	ΑΜΜΟΠΗΛΩΔΕΣ
Άμμος (%)	86,6	52,3
Ιλύς (%)	2,3	30,6
Άργιλος (%)	11,1	17,1
Κλάση	LS	SL
pH	5,8	6,2
Οργανική ουσία (%)	0,27	2,18
Ολικό N (%)	0,035	0,112

Πίνακας 1. Αποτελέσματα εδαφολογικών αναλύσεων των δυο εδαφών πριν τη χρησιμοποίησή τους στη διεξαγωγή του πειράματος

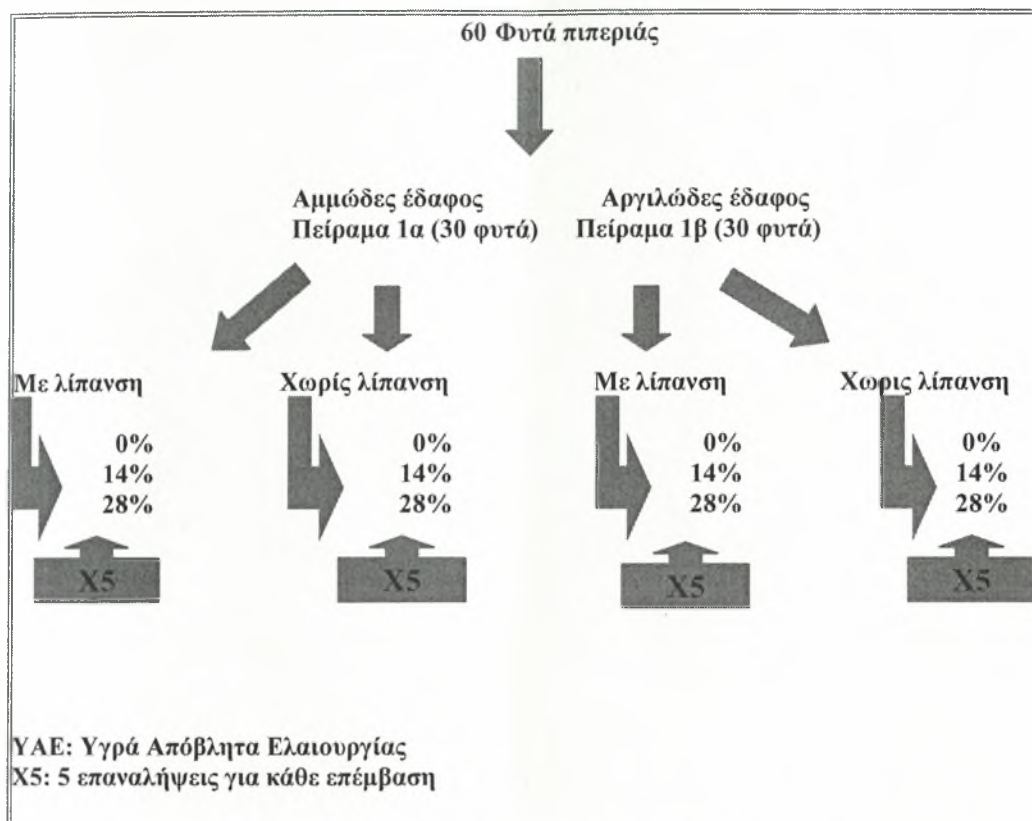
2.1.2 Σχεδιασμός

Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε δοχεία ανάπτυξης με ένα φυτό, και όγκο εδάφους 3 λίτρα. Τα δυο εδάφη που χρησιμοποιήθηκαν, (διαφορετικής σύστασης και οξύτητας, ένα ουδέτερο αμμοπηλώδες (SL) και ένα όξινο πηλοαμμώδες (LS)), είναι από την περιοχή της Βελίκας Μεσσηνίας στη συνέχεια θα αναφέρονται με το κύριο συστατικό τους, δηλαδή ως αμμώδες και ως πηλώδες αντίστοιχα.

Χρησιμοποιήθηκαν 60 δοχεία ανάπτυξης στα οποία φυτεύτηκαν φυτά πιπεριάς. Το πείραμα ήταν δι-παραγοντικό:

factor 1: ± αζωτούχο λίπανση (2 επίπεδα)

factor 2: 0%, 2% & 4% ΥΑΕ με το νερό άρδευσης (3 επίπεδα)



Εικόνα 1. Σχηματική περιγραφή πειράματος πιπεριάς

2.1.3 Καλλιεργητικές εργασίες

Οι γλάστρες στις οποίες πραγματοποιήθηκε το πείραμα τοποθετήθηκαν στο χώμα το οποίο είχε καλυφθεί με μαύρο πλαστικό για την αποφυγή του φυτρώματος ζιζανίων. Επίσης λόγω της υψηλής ηλιοφάνειας που επικρατούσε την χρονική περίοδο διεξαγωγής του πειράματος, αλλά και λόγω της ευαισθησίας των φυτών στην ηλιοφάνεια ο πειραματικός αγρός σκεπάστηκε με δίχτυ σκίασης.

Κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής του πειράματος εφαρμοζόταν βοτάνισμα στα δοχεία ανάπτυξης κάθε δεύτερη ημέρα.

2.1.4 Λίπανση φυτών

Βασικός εμπλουτισμός σε φώσφορο σε όλες τις επεμβάσεις με 4,5gr λιπάσματος 0-20-0 ανά δοχείο ανάπτυξης και φυτό.

Αζωτούχος λίπανση, μόνο στις επεμβάσεις που δέχονται λίπανση (+F) με 9gr λιπάσματος 20-0-0 ανά δοχείο ανάπτυξης και φυτό.

2.1.5 Εφαρμογή των ΥΑΕ

Στο πείραμα αυτό εφαρμόζονται τρεις συγκεντρώσεις ΥΑΕ (0%, 2%, και 4% με το νερό άρδευσης).

Εφαρμόζουμε άρδευση με 1L υγρού ανά γλάστρα και ημέρα. Σε 10L νερό διαλύουμε 200ml ΥΑΕ για να πετύχουμε συγκέντρωση 2% και (ημερήσια 20ml/pot, αντιστοιχεί σε 1L με 14% ΟΜΜ /pot εβδομαδιαία) και 400ml για να πετύχουμε συγκέντρωση 4% (ημερήσια 20ml/pot, αντιστοιχεί σε 1L με 28% ΟΜΜ /pot εβδομαδιαία).

Η έναρξη των αρδεύσεων με το διάλυμα των ΥΑΕ έγινε στις 26 Ιουνίου 2005 και η λήξη τον Σεπτέμβριο.

2.1.6 Διαχείριση εδαφικών δειγμάτων

Μετά το πέρας των πειραμάτων και την αφαίρεση του ριζικού συστήματος, τα εδάφη κάθε επέμβασης (5 reps των 3L = 15 L εδάφους ανά επέμβαση) ομογενοποιήθηκαν σε πλαστικούς σάκους και μετά από παραμονή μιας εβδομάδας στους σάκους (υπό σκιά και ανοιχτούς, υγρασία περίπου 60% WHC) λήφθηκαν και καταψύχθηκαν υποδείγματα (-20 °C) από το πείραμα της πιπεριάς, που οδηγήθηκαν για ανάλυση μικροβιακής κοινότητας.

2.2 Εκχύλιση DNA από δείγματα εδάφους

Το πρώτο βήμα για τον χαρακτηρισμό της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους με μοριακές μεθόδους είναι η εκχύλιση του DNA από το έδαφος. Δύο μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την απομόνωση του DNA: **(i) η μέθοδος άμεσης λύσης** (pioneered by Ogram et al., 1987) και **(ii) η μέθοδος απομόνωσης κυττάρων** (Torsvik, 1980). Η πρώτη μέθοδος βασίζεται στην άμεση λύση των κυττάρων στο έδαφος η οποία μπορεί να γίνει με μηχανικό ή χημικό ή ενζυμικό τρόπο ή και με συνδυασμό τους. Μετά τη λύση το DNA εκχυλίζεται και καθαρίζεται. Ενώ στη δεύτερη μέθοδο πριν τη λύση των κυττάρων και την ανάκτηση του DNA γίνεται διαχωρισμός των κυττάρων από τα σωματίδια του εδάφους. Για την περαιτέρω ανάλυση του εκχυλισμένου DNA με μοριακές τεχνικές όπως είναι η PCR είναι απαραίτητο το DNA να είναι αρκετά καθαρό. Η παρουσία ουσιών όπως είναι τα χουμικά οξέα και οι φαινολικές ενώσεις στο DNA μπορούν να αναστείλουν τις μοριακές αντιδράσεις. Και για τις δύο μεθόδους ένας μεγάλος αριθμός πρωτοκόλλων έχει δημοσιευτεί με διάφορες τροποποιήσεις που αποσκοπούν στη βελτίωση της ποιότητας και της ποσότητας του DNA που εκχυλίζεται. Επίσης διάφορα εμπορικά kits είναι διαθέσιμα για την εκχύλιση DNA από το έδαφος.

Από μελέτες σύγκρισης των δύο μεθόδων έχει βρεθεί ότι με την μέθοδο άμεσης λύσης εξάγεται μεγαλύτερη ποσότητα DNA ενώ με τη μέθοδο απομόνωσης κυττάρων εκχυλίζεται DNA μεγαλύτερου μοριακού βάρους και μεγαλύτερης καθαρότητας. Επίσης το DNA που εξάγεται από απομονωμένα κύτταρα προέρχεται κυρίως από βακτήρια ενώ με την μέθοδο άμεσης λύσης εξάγεται βακτηριακό και ευκαρυωτικό DNA (Roose-Amsaleg et al., 2001; Gabor et al., 2002; Robe et al., 2003).

Πειραματική διαδικασία

Εξαγωγή DNA πραγματοποιήθηκε από τρία δείγματα για κάθε μεταχείριση που περιλάμβανε είδος εδάφους, επίπεδο ΥΑΕ, εφαρμογή ή όχι αζωτούχου λιπανσης. Συνολικά DNA εκχυλίστηκε από 36 δείγματα εδάφους. Το DNA εκχυλίστηκε από τα δείγματα εδάφους με τη χρήση του UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.). Το kit χρησιμοποιεί άμεσης λύσης μέθοδο και η λύση των κυττάρων γίνεται με συνδυασμό μηχανικού και

χημικού τρόπου. Η εκχύλιση έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του παρασκευαστή το οποίο παρατίθεται παρακάτω.

- Προστίθενται 0,5g από κάθε δείγμα εδάφους σε ξεχωριστά bead tubes τα οποία περιέχουν bead Solution. Το bead Solution είναι ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο βοηθάει στο να διασκορπιστούν τα σωματίδια εδάφους και ξεκινάει να διαλύει τα χουμικά οξέα.
- Ακολουθεί ήπια ανάδευση στο vortex.
- Προστίθενται 60μl από το διάλυμα S1 και αναδεύονται σύντομα στο vortex. Το διάλυμα S1 περιέχει SDS το οποίο διασπά τα λιπαρά οξέα και τα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης των μικροοργανισμών.
- Προστίθενται 200μl από το διάλυμα IRS (Inhibitor Removal Solution) με το οποίο καθιζάνουν τα χουμικά οξέα και άλλοι αναστολείς της PCR.
- Στη συνέχεια τοποθετούνται τα bead tubes με κολλητική ταινία σε επίπεδη επιφάνεια η οποία τοποθετείται στο vortex και αναδεύονται στη μέγιστη ταχύτητα για 10 λεπτά. Κατά την ανάδευση τα σφαιρίδια συγκρούονται μεταξύ τους και με τα κύτταρα προκαλώντας έτσι τη λύση τους.
- Τα σωλάρια erpendorfs φυγοκεντρώνονται στις 10,000 x g για 30 δευτερόλεπτα. Στο σημείο αυτό τα κυτταρικά υπολείμματα, το έδαφος, τα σφαιρίδια και τα χουμικά οξέα δημιουργούν ένα ίζημα ενώ το DNA βρίσκεται στο υπερκείμενο.
- Μεταφέρεται το υπερκείμενο σε καθαρά σωλάρια erpendorfs.
- Προστίθενται 250μl από το διάλυμα S2, αναδεύονται για 5 δευτερόλεπτα και επωάζονται στους 4 °C για 5 λεπτά. Το διάλυμα S2 περιέχει ένα αντιδραστήριο το οποίο προκαλεί κατακρήμνιση πρωτεϊνών.
- Φυγοκεντρώνονται τα σωλάρια erpendorfs για 1 λεπτό στις 10,000 x g.
- Αποφεύγοντας το ίζημα, μεταφέρεται όλο το υπερκείμενο σε καθαρά σωλάρια erpendorfs.
- Προστίθενται 1,3ml από το διάλυμα S3 (διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης αλάτων) στο υπερκείμενο και αναδεύονται στο vortex για 5 δευτερόλεπτα. Το DNA προσδένεται στη μεμβράνη πυριτίου παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων αλάτων.
- Προστίθενται περίπου 700μl από το υπερκείμενο σε spin filter και φυγοκεντρώνονται στις 10,000 x g για 1 λεπτό. Απορρίπτεται το διάλυμα

που διέρχεται από την μεμβράνη, προστίθεται το υπόλοιπο υπερκείμενο στο spin filter και φυγοκεντρώνεται στις 10,000 x g για 1 λεπτό. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται μέχρι να περάσει όλο το υπερκείμενο από το spin filter. Το DNA προσδένεται στη μεμβράνη πυριτίου στο spin filter και σχεδόν όλες οι άλλες ουσίες (contaminants) διέρχονται από την μεμβράνη

- Προστίθενται 300μl από το διάλυμα S4 και φυγοκεντρώνεται για 30 δευτερόλεπτα στις 10,000 x g. Το διάλυμα S4 περιέχει αιθανόλη η οποία απομακρύνει κατάλοιπα άλατος, χουμικών οξέων και άλλων ουσιών ενώ αφήνει το DNA προσδεμένο στη μεμβράνη.
- Απορρίπτεται το διάλυμα που διέρχεται από την μεμβράνη.
- Φυγοκεντρώνεται ξανά για 1 λεπτό. Στο βήμα αυτό απομακρύνονται υπολείμματα αιθανόλης.
- Τοποθετείται το spin filter σε καινούριο σωλάριο erpendorfs.
- Προστίθενται 50 μl από το διάλυμα S5 (διάλυμα έκλουσης, 10mM Tris pH 8) στο κέντρο της άσπρης μεμβράνης.
- Φυγοκεντρώνεται για 30 sec. Καθώς το διάλυμα έκλουσης περνάει διαμέσου της μεμβράνης το DNA απελευθερώνεται και ρέει από την μεμβράνη σε νέο σωλάριο erpendorfs.
- Απορρίπτεται το spin filter. Το DNA διατηρείται στους -20 °C.

2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

2.3.1 Θεωρητικό μέρος

Η τεχνική της PCR (Polymerase Chain Reaction) επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό in vitro επιλεγμένων αλληλουχιών DNA από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος.

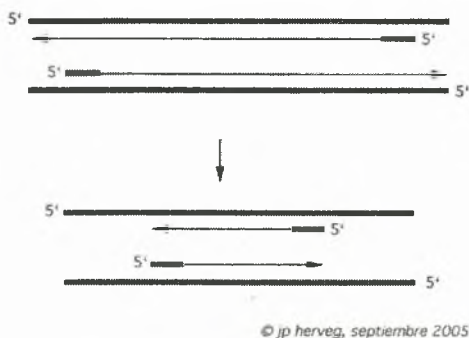
Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου στηρίζεται στη χρήση:

1. Ειδικής DNA πολυμεράσης η οποία είναι θερμοσταθερή και διατηρεί τη δραστηριότητά της σε θερμοκρασίες έως και 95 °C.
2. Ενός ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (συνήθως 15 - 30 βάσεων), τα οποία ονομάζονται εκκινητές (primers).
3. Κατάλληλου διαλύματος ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs).
4. Κατάλληλης συγκέντρωσης διαλύματος MgCl₂.

5. Ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος για την πολυμεράση.
6. Μικρής ποσότητας DNA που παίζει το ρόλο του μορίου-μήτρας.

Η τεχνική της PCR πραγματοποιείται σε κύκλους. Κάθε κύκλος πραγματοποιείται σε τρία στάδια και αποφέρει εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA στόχου. Στο πρώτο στάδιο της PCR, το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 92-95 °C. Στο δεύτερο στάδιο, οι εκκινητές που βρίσκονται σε μεγάλη περίσσεια υβριδίζονται με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες στους δύο κλώνους του DNA στους 50-65 °C. Κατά το τρίτο στάδιο, το οποίο πραγματοποιείται στους 70-78 °C, συντίθεται DNA αρχίζοντας από τους δύο εκκινητές. Ο άριστος αριθμός κύκλων εξαρτάται από την συγκέντρωση του DNA-στόχου και την απόδοση της PCR σε κάθε κύκλο. Μετά από μερικούς κύκλους το επικρατές προϊόν είναι δίκλωνο DNA, τα 5' άκρα του οποίου καθορίζονται από τους εκκινητές.

Μια τροποποιημένη μέθοδος PCR είναι η **nested PCR**. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί δύο διαδοχικές αντιδράσεις PCR, όπου το προϊόν της πρώτης αντίδρασης χρησιμοποιείται ως δείγμα για τη δεύτερη. Η πρώτη αντίδραση PCR χρησιμοποιεί ένα εξωτερικό ζευγάρι εκκινητών ενώ η δεύτερη ένα νέο ζευγάρι εκκινητών, εσωτερικό των αρχικών (Εικόνα 1).



© jp herveg, septiembre 2005

Εικόνα 2. Nested PCR

Ορισμένα πλεονεκτήματα της nested PCR είναι τα εξής:

- Έχει μεγαλύτερη ευαισθησία από την απλή αντίδραση PCR
- Έχει μεγαλύτερη ειδικότητα από την απλή αντίδραση PCR (στη nested PCR εάν μια λάθος αλληλουχία ενισχυθεί στη πρώτη PCR αντίδραση η πιθανότητα να ενισχυθεί στη δεύτερη αντίδραση είναι μικρή).
- Παράγονται τμήματα DNA κατάλληλα για ανάλυση με DGGE

Παρόλα αυτά με τη μέθοδο της nested PCR οι κύκλοι της PCR αντίδρασης αυξάνονται με συνέπεια να αυξάνεται και η πιθανότητα σχηματισμού χιμαιρικών μορφών και λαθών στην αλληλουχία του DNA.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της semi-nested PCR για την ενίσχυση των ITS περιοχών του rDNA μυκήτων, βασιδιομυκήτων και ασκομυκήτων και της nested PCR για την ενίσχυση τμήματος του 16S rDNA βακτηρίων από DNA που έχει εκχυλιστεί από έδαφος. Στη semi-nested PCR, στη δεύτερη αντίδραση ένας εκκινητής είναι ίδιος με έναν εκκινητή που χρησιμοποιείτε στη πρώτη PCR αντίδραση.

2.3.2 Υλικά

- DyNAzyme EXT DNA πολυμεράση (Finnzyme)
- DyNAzyme EXT Buffer (Finnzyme)
- Νουκλεοτίδια (dNTPs) (HT BIOTECHNOLOGY LTD)
- BSA (Bovine Serum Albumin)
- Εκκινητές

Πίνακας 2 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της ITS περιοχής μυκήτων

Εκκινητής	Αλληλουχία	Tm
ITS1F	5' – CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A – 3'	45.4°C
ITS4	5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3'	49.6°C
ITS1F-GC	5' – CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCT TGG TCA TTT AGA GGA AGT AA – 3'	99.0°C
ITS2	5' – GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC – 3'	55.7°C
ITS4B	5' – CAG GAG ACT TGT ACA CGG TCC AG – 3'	55.2°C
ITS4A	5' – CGC CGT TAC TGG GGC AAT CCC TG – 3'	66.8°C

Πίνακας 3 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της 16S rDNA αλληλουχίας βακτηρίων

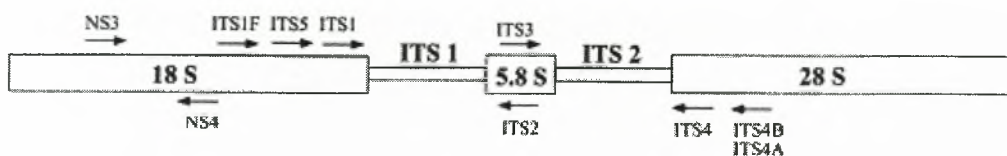
Εκκινητής	Αλληλουχία	Tm
63f	5' – AGG CCT AAC ACA TGC AAG TC – 3'	49.2°C
1087r	5' – CTC GTT GCG GGA CTT AAC CC – 3'	56.0°C
Muyzer F (357f-GC)	5' – CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG – 3'	103.2°C
Muyzer R (534r)	5' – ATT ACC GCG GCT GCT GG – 3'	54.4°C

2.3.3 Πειραματικό μέρος

(i) Ενίσχυση ITS περιοχής μυκήτων με τη τεχνική της semi-nested PCR

Στη πρώτη αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ITS1F και ITS4 οι οποίοι ενισχύουν την ITS περιοχή όλων των μυκήτων από DNA το οποίο έχει εκχυλιστεί από έδαφος.

Στη δεύτερη αντίδραση PCR, το προϊόν της πρώτης αντίδρασης ενισχύεται με τους ITS1F-GC και ITS2 εκκινητές. Ο ITS1F-GC εκκινητής είναι ίδιος με τον ITS1F με τη διαφορά ότι έχει μια αλληλουχία 40 νουκλεοτιδίων πλούσια σε GC (GC clamp) στο 5' άκρο του. Με τη δεύτερη αυτή αντίδραση PCR παράγονται μικρότερα ITS τμήματα τα οποία φέρουν GC-clamp. Το GC-clamp είναι απαραίτητο για να αποφευχθεί η ολική αποδιάταξη των δίκλωνων τμημάτων DNA κατά την διάρκεια του DGGE.



Εικόνα 3 Σχηματική αναπαράσταση του rDNA των μυκήτων και των θέσεων υβριδισμού ορισμένων εκκινητών.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR φαίνονται στους πίνακες 4 και 5.

Πίνακας 4 Πρώτη αντίδραση PCR για μύκητες

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Buffer (10x optimized)	2.5 μ l	1x (1.5mM MgCl ₂)
dNTPs (10mM)	0.5 μ l	200 μ M από το καθένα
Forward primer ITS1F (20 μ mol/ μ l)	0.25 μ l	0.2 μ M
Reverse primer ITS4 (20 μ mol/ μ l)	0.25 μ l	0.2 μ M
BSA (10 μ g/ μ l)	1 μ l	400ng/ μ l
Πολυμεράση (1U/ μ l)	1 μ l	1U/25 μ l
DNA	1 μ l	10-50ng
ddH ₂ O	18.5 μ l	
Συνολικός όγκος	25 μ l	

Πίνακας 5. Δεύτερη αντίδραση PCR για μύκητες

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Buffer (10x optimized)	5 μ l	1x (1.5mM MgCl ₂)
dNTPs (10mM)	1 μ l	200 μ M από το καθένα
Forward primer ITS1F-GC (20 μ mol/ μ l)	1 μ l	0.4 μ M
Reverse primer ITS2 (20 μ mol/ μ l)	1 μ l	0.4 μ M
Πολυμεράση (1U/ μ l)	1 μ l	1U/50 μ l
DNA (προϊόν της πρώτης αντίδρασης)	1 μ l	
ddH ₂ O	40 μ l	
Συνολικός όγκος	50 μ l	

Και οι δύο αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το πρόγραμμα που παρουσιάζεται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Πρόγραμμα PCR που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση της ITS περιοχής των μυκήτων του εδάφους

Αρχική αποδιάταξη	94°C	5min	
Αποδιάταξη	94°C	30sec	30 κύκλους
Υβριδοποίηση	55°C	30sec	
Επιμήκυνση	72°C	1min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10min	

(ii) Ενίσχυση ITS περιοχής βασιδιομυκήτων με τη τεχνική της semi-nested PCR

Στη πρώτη αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ITS1F και ITS4B οι οποίοι ενισχύουν ειδικά την ITS περιοχή των βασιδιομυκήτων από DNA το οποίο έχει εκχυλιστεί από έδαφος. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση και οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιείται φαίνονται στον Πίνακα 7 και 8 αντίστοιχα.

Η δεύτερη αντίδραση PCR είναι ίδια με τη δεύτερη PCR των μυκήτων. Χρησιμοποιήθηκαν οι ITS1F-GC και ITS2 εκκινητές και τα υλικά και οι συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης φαίνονται στον Πίνακα 5 και 6 αντίστοιχα.

Πίνακας 6. Πρώτη αντίδραση PCR για βασιδιομύκητες

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Buffer (10x optimized)	5 μ l	1x (1.5mM MgCl ₂)
dNTPs (10mM)	1 μ l	200 μ M από το καθένα
Forward primer ITS1F (20 μ mol/ μ l)	0.5 μ l	0.2 μ M
Reverse primer ITS4B (10 μ mol/ μ l)	1 μ l	0.2 μ M
BSA (10 μ g/ μ l)	2 μ l	400ng/ μ l
Πολυμεράση (1U/ μ l)	1 μ l	1U/50 μ l
DNA	1 μ l	10-50ng
ddH ₂ O	38,5 μ l	
Συνολικός όγκος	50 μ l	

Πίνακας 7. Συνθήκες πραγματοποίησης της πρώτης PCR αντίδρασης για τους βασιδιομύκητες

Αρχική αποδιάταξη	94°C	3min	
Αποδιάταξη	94°C	1min	35 κύκλους
Υβριδοποίηση	50°C	1min	
Επιμήκυνση	72°C	3min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	3min	

(iii) Ενίσχυση ITS περιοχής ασκομυκήτων με τη τεχνική της semi nested PCR
 Στη πρώτη αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ITS1F και ITS4A οι οποίοι ενισχύουν ειδικά την ITS περιοχή των ασκομυκήτων από DNA το οποίο έχει εκχυλιστεί από έδαφος. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση και οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιείται φαίνονται στον Πίνακα 9 και 10 αντίστοιχα.

Η δεύτερη αντίδραση PCR είναι ίδια με τη δεύτερη αντίδραση των μυκήτων. Χρησιμοποιήθηκαν οι ITS1F-GC και ITS2 εκκινητές και τα υλικά και οι συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης φαίνονται στον Πίνακα 5 και 6 αντίστοιχα.

Πίνακας 8. Πρώτη PCR αντίδραση για τους ασκομύκητες

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Buffer (10x optimized)	5 μ l	1x (1.5mM MgCl ₂)
dNTPs (10mM)	1 μ l	200 μ M από το καθένα
Forward primer ITS1F (20 μ mol/ μ l)	1 μ l	0.4 μ M
Reverse primer ITS4A (20 μ mol/ μ l)	1 μ l	0.4 μ M
BSA (10 μ g/ μ l)	2 μ l	400ng/ μ l
Πολυμεράση (1U/ μ l)	1 μ l	1U/50 μ l
DNA	1 μ l	10-50ng
ddH ₂ O	38 μ l	
Συνολικός όγκος	50 μ l	

Πίνακας 9. Συνθήκες πραγματοποίησης της πρώτης PCR αντίδρασης για τους ασκομύκητες

Αρχική αποδιάταξη	94°C	2.5min	
Αποδιάταξη	94°C	15sec	40 κύκλους
Υβριδοποίηση	55°C	1min	
Επιμήκυνση	72°C	1min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10min	

(iv) Ενίσχυση τμήματος του 16S rDNA βακτηρίων με τη τεχνική της nested PCR

Στη πρώτη αντίδραση PCR ενισχύεται ένα τμήμα του 16S rDNA των βακτηρίων με τους 63f και 1087r εκκινητές από DNA εκχυλισμένο από

έδαφος. Στη δεύτερη αντίδραση χρησιμοποιούνται οι εκκινητές Muzyer F (357f-GC) και Muzyer R (534r) οι οποίοι είναι εσωτερικοί των πρώτων και ενισχύουν την V3 μεταβλητή περιοχή του 16S rDNA των βακτηρίων. Ο εκκινητής Muzyer F (357f-GC) φέρει στο 5' άκρο του μια αλληλουχία 40 νουκλεοτιδίων πλούσια σε GC (GC clamp). Με τη δεύτερη αντίδραση παράγονται τμήματα DNA κατάλληλα για ανάλυση με DGGE (~200bp με GC clamp). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις καθώς και οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν φαίνονται στους πίνακες 11, 12 και 13 .

Πίνακας 10. Πρώτη PCR αντίδραση για τα βακτήρια

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Buffer (10x optimized)	2.5 μ l	1x (1.5mM MgCl ₂)
dNTPs (10mM)	0.5 μ l	200 μ M από το καθένα
Forward primer 63f (20 μ mol/ μ l)	0.25 μ l	0.2 μ M
Reverse primer 1087r (20 μ mol/ μ l)	0.25 μ l	0.2 μ M
BSA (10 μ g/ μ l)	1 μ l	400ng/ μ l
Πολυμεράση (1U/ μ l)	1 μ l	1U/25 μ l
DNA	1 μ l	10-50ng
ddH ₂ O	18.5 μ l	
Συνολικός όγκος	25 μ l	

Πίνακας 11. Δεύτερη PCR αντίδραση για τα βακτήρια

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Buffer (10x optimized)	5 μ l	1x (1.5mM MgCl ₂)
dNTPs (10mM)	1 μ l	200 μ M από το καθένα
Forward primer 357f-GC (20 μ mol/ μ l)	1 μ l	0.4 μ M
Reverse primer 534r (20 μ mol/ μ l)	1 μ l	0.4 μ M
Πολυμεράση (1U/ μ l)	1 μ l	1U/50 μ l
DNA	1 μ l	
ddH ₂ O	40 μ l	
Συνολικός όγκος	50 μ l	

Πίνακας 12. Συνθήκες πραγματοποίησης της πρώτης και δεύτερης PCR αντίδρασης για τα βακτήρια

Αρχική αποδιάταξη	95°C	5min	
Αποδιάταξη	95°C	30sec	30 κύκλους
Υβριδοποίηση	55°C	30sec	
Επιμήκυνση	72°C	1min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10min	

2.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτική αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθαρισμό κομματιών DNA.

Στη εργασία αυτή πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση στα δείγματα DNA που εκχυλίστηκαν από το έδαφος για τον έλεγχο της απόδοσης της εκχύλισης και στα προϊόντα των PCR για τον έλεγχο της παρουσίας του επιθυμητού προϊόντος.

Διαλύματα

5x TBE (Tris Borate EDTA) Buffer

Tris Base	54gr
Boric Acid	27.5gr
0.5M EDTA (pH 8)	20ml
Προσαρμογή του όγκου στο 1L με απεσταγμένο νερό	

6x loading buffer

Γλυκερόλη	5ml
Bromophenol blue	1ml
20x TAE	0.5ml
dd H ₂ O	3.5ml

Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων εκχυλισμένου DNA

Χρησιμοποιείται πηκτική 0.7% (0.7gr αγαρόζη σε 100ml TBE). Στη πηκτική φορτώνονται 5μl από κάθε δείγμα DNA αναμειγμένα με 3μl loading buffer 6x. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 80V. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης τοποθετείται η πηκτική σε απεσταγμένο νερό που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 0.5μg/ml και στη συνέχεια ξεπλένεται. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια χρωστική που φθορίζει στο υπεριώδες φως και παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA. Έτσι είναι δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στην πηκτική αφού τοποθετηθεί σε συσκευή UV.

Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

Χρησιμοποιείται πηκτή 1% [1gr αγαρόζη σε 100ml TBE και 6ml βρωμιούχου αιθιδίου (1%)]. Στη πηκτή φορτώνονται 5μl από το προϊόν PCR αναμειγμένα με 3μl loading buffer 6x. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 110V. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης είναι δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στη πηκτή αφού τοποθετηθεί σε συσκευή UV.

2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών - DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

2.5.1 Θεωρητικό μέρος

Το DGGE χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό δίκλωνων τμημάτων DNA που έχουν το ίδιο μέγεθος αλλά διαφορετική αλληλουχία βάσεων. Ο διαχωρισμός βασίζεται στη μειωμένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα ενός μερικώς αποδιαταγμένου μορίου DNA σε gel πολυακρυλαμίδης σε σύγκριση με τη κινητικότητα της πλήρως δίκλωνης μορφής του μορίου. Όταν ένα μόριο DNA ηλεκτροφορείται σε πηκτή με αυξημένη βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών, φτάνει σε ένα σημείο όπου αρχίζει μερικώς να αποδιατάσσεται με αποτέλεσμα να επιβραδύνεται η κίνηση του και τελικά σταματάει να κινείται. Το σημείο στο οποίο ένα μόριο DNA αποδιατάσσεται και σταματάει εξαρτάται από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του μορίου. Διαφορετικές αλληλουχίες DNA αποδιατάσσονται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αποδιατακτικών ουσιών και σταματάνε σε διαφορετικά σημεία στην πηκτή και έτσι διαχωρίζονται. Το DGGE μπορεί να διαχωρίσει τμήματα DNA που διαφέρουν ακόμα και σε μία βάση.

2.5.2 Υλικά και διαλύματα

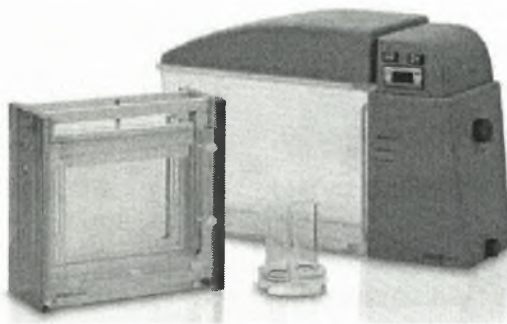
- Πλήρες σύστημα DGGE (INGENYphorU-2x2)
- Αντλία ανάμειξης διαλυμάτων αποδιατακτικών ουσιών
- Γράσο σιλικόνης
- GelBond film
- Ακρυλαμίδη (Acrylamide-Bisacrylamide 40% solution 37.5:1)

- Φορμαμίδη (Deinized formamide)
- Ουρία
- TEMED (N,N,N',N' – tetramethylenediamine)
- 10% Ammonium Persulphate Solution (APS, 100mg σε 1ml ddH₂O)
- 50x TAE
Tris base 242gr
Glacial acetic acid 57.1ml
0.5M EDTA (pH 8) 100ml
Ο όγκος προσαρμόζεται στο 1L απεσταγμένο νερό
- Διαλύματα 0% και 100% denaturants

	0%	100%
Ακρυλαμίδη	20ml	20ml
Φορμαμίδη	-	40ml
Ουρία	-	42gr
50x TAE	2ml	2ml
H ₂ O	στα 100ml	στα 100ml

2.5.3 Πειραματικό μέρος

Το DGGE πραγματοποιείται με το INGENYphorU-2x2 σύστημα (Εικόνα 3).



Εικόνα 4. INGENYphorU-2x2 σύστημα

Στην παρούσα εργασία το DGGE χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των προϊόντων των nested PCR. Για τους μύκητες, βασιδιομύκητες και ασκομύκητες χρησιμοποιήθηκε πηκτή ακρυλαμίδης 8% (w/v) με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών που κυμαίνεται από 30 μέχρι 55%. Ενώ για τα βακτήρια χρησιμοποιήθηκε πηκτή ακρυλαμίδης 8% με βαθμίδωση από 45 μέχρι 65%.

Παρακάτω παρατίθεται περιληπτικά το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για το DGGE.

A. Προετοιμασία της κασέτας ηλεκτροφόρησης

- Τοποθετούμε την κασέτα ηλεκτροφόρησης INGENY στον πάγκο του εργαστηρίου και τοποθετούμε εντός αυτής την pressure unit (U-shaped). Η pressure unit θα έρθει σε επαφή με την μικρή γυάλινη πλάκα του σάντουιτς ηλεκτροφόρησης.
- Καθαρίζουμε τις γυάλινες πλάκες με αιθανόλη. Επί της γυάλινης πλάκας με τις μεγάλες προεξοχές στις άκρες τοποθετούμε ένα φύλλο από το GelBond film. Προσεκτικά κόβουμε το φιλμ έτσι ώστε όλες οι πλευρές του να εφαρμόζουν πλήρως παράλληλα με τις άκρες της γυάλινης πλάκας αλλά να βρίσκονται ελαφρώς εντός του περιγράμματος της πλάκας. Το GelBond φιλμ τοποθετείται για να είναι πιο εύκολος ο χειρισμός της πηκτής μετά την ηλεκτροφόρηση.
- Τοποθετούμε μια στρώση από γράσο σιλικόνης στην δεξιά, αριστερή και κάτω πλευρά του spacer ώστε να περιορίσουμε τις διαρροές τον τοποθετούμε επί της μεγάλης γυάλινης πλάκας ώστε η μικρή λευκή προεξέχουσα ζώνη να εφαρμόσει έναντι της κάτω επιφάνειας της πλάκας.
- Τοποθετούμε επάνω στο spacer και στην μεγάλη γυάλινη πλάκα την μικρότερη γυάλινη πλάκα. Πιέζουμε το σάντουιτς ώστε να δημιουργηθεί μια καλή εφαρμογή μεταξύ του spacer και των πλακών.
- Με προσοχή ανασηκώνουμε το σάντουιτς και το τοποθετούμε μέσα στην κασέτα ηλεκτροφόρησης. Τραβάμε το spacer προς τα πάνω μέχρι το σημείο που μπορεί να πάει χωρίς όμως να ανασηκώσουμε και τις γυάλινες πλάκες.
- Σφίγγουμε τις τρεις κάτω βίδες της κασέτας ηλεκτροφόρησης INGENY, τοποθετούμε τα χτενάκια και σφίγγουμε όλες τις υπόλοιπες βίδες του συστήματος.
- Το σύστημα είναι έτοιμο για τη παρασκευή της πηκτής.

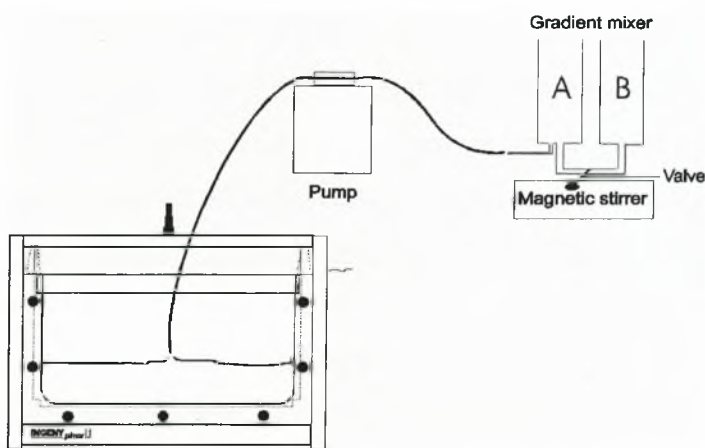
B. Προετοιμασία των διαλυμάτων και παρασκευή της πηκτής

- Ανάμιξη των διαλυμάτων των αποδιατακτικών ουσιών 0% και 100% σε κατάλληλες αναλογίες για προετοιμασία διαλυμάτων με υψηλή και χαμηλή συγκέντρωση αποδιατακτικών ουσιών στο εύρος που θέλουμε.

Πίνακας 13. Αναλογία όγκων των διαλυμάτων 0 και 100% denaturants που πρέπει να αναμειχθούν για να πάρουμε διαλύματα (25ml) με τις επιθυμητές συγκεντρώσεις denaturants

	Συγκέντρωση αποδιατακτών	100%	0%
Μύκητες	30%	7.5ml	17.5ml
Βασιδιομύκητες	55%	13.75ml	11.25ml
Ασκομύκητες			
Βακτήρια	45%	11.25ml	13.75ml
	65%	16.25ml	8.75ml

- Τοποθετούμε το διάλυμα με τη υψηλή συγκέντρωση αποδιατακτικών στο αριστερό δοχείο του συστήματος ανάμιξης (A) και το διάλυμα με τη χαμηλή συγκέντρωση στο δεξί δοχείο (B) ενώ η βαλβίδα επικοινωνίας μεταξύ των δύο δοχείων είναι κλειστή (Εικόνα 4). Τοποθετούμε μαγνητάκια εντός κάθε δοχείου.
- Αφού ξεκινήσουμε την ανάδευση, προσθέτουμε 100μl APS (10%) και 10μl TEMED και στα δύο διαλύματα και ανοίγουμε την αντλία και την βαλβίδα επικοινωνίας μεταξύ των δοχείων. Μόλις προσθέσουμε αυτά τα δύο συστατικά ξεκινά ουσιαστικά ο πολυμερισμός της ακρυλαμιδής.
- Το διάλυμα αρχίζει και φτάνει μέσω του σωλήνα της αντλίας στο εσωτερικό μεταξύ των δύο γυάλινων πλακών (Εικόνα 4).



Εικόνα 5. Παρασκευή της πηκτής με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών

- Όταν η πηκτή φτάσει λίγο κάτω από τα χτενάκια σταματάμε την αντλία. Αφήνουμε την πηκτή να πολυμεριστεί για περίπου 30 min και προσθέτουμε το stacker (4ml/gel από διάλυμα 0% denaturants, 40μl APS, 4μl TEMED).

- Η πηκτή αφήνεται για τουλάχιστον μία ώρα ώστε να πολυμεριστεί πλήρως η ακρυλαμίδα.
- Κατά τη διάρκεια αυτού του χρονικού διαστήματος ρυθμίζουμε την θέρμανση στην δεξαμενή του συστήματος με το buffer στους 60°C.

Γ. Ηλεκτροφόρηση της πηκτής

- Μόλις ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης, τοποθετούμε την κασέτα INGENY εντός του δοχείου με διάλυμα 1x TAE.
- Γεμίζουμε με buffer το upper buffer reservoir του συστήματος INGENY. Απομακρύνουμε προσεκτικά τα combs και πιέζουμε το spacer προς τα κάτω. Φυσαλίδες που θα δημιουργηθούν στον πυθμένα κάτω από την πηκτή μπορούν να απομακρυνθούν κρατώντας την κασέτα INGENY υπό γωνία.
- Συνδέουμε τα ηλεκτρόδια τα οποία θα πρέπει να έχουν καλυφθεί με το διάλυμα 1 X TAE ώστε να δημιουργηθεί ηλεκτρικό πεδίο.
- Κλείνουμε τη βαλβίδα που ελέγχει την κίνηση του TAE στο upper buffer reservoir ώστε όταν τοποθετούμε τα δείγματα στα πηγαδάκια να μην τα πετάξει έξω το TAE με τη ροή του.
- Για να μειώσουμε τη διάχυση των δειγμάτων κατά τη διάρκεια του φορτώματος στην πηκτή η ισχύς του ρεύματος θα πρέπει να μειωθεί στα 12V.
- Φορτώνουμε το προϊόν των PCR αντιδράσεων (περίπου 500ng/γραμμή με 5μl loading buffer). Για τη δημιουργία marker για το DGGE αναμείξαμε τα προϊόντα των nested PCR ενός αριθμού κλώνων που διαχωρίζονται στο gel. Ηλεκτροφορήσαμε το PCR προϊόν κάθε κλώνου χωριστά και την ανάμειξή τους.
- Συνδέουμε τη συσκευή INGENY με εξωτερική πηγή ισχύος. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 75V για 960min.

Δ. Βαφή της πηκτής με τη μέθοδο του νιτρικού άργυρου (AgNO₃)

Διαλύματα

Fixing Solution I:	10% αιθανόλη 0.5% οξικό οξύ
Staining Solution:	1g AgNO ₃ σε 1L απεσταγμένο νερό

Το συγκεκριμένο διάλυμα πρέπει να παρασκευάζεται λίγο πριν την χρήση του

Developing Solution:	0.1g NaBH ₄ 1L NaOH 1.5% 4ml φορμαλδεύδη
Fixing Solution II:	0.75% Na ₂ CO ₃
Preservative Solution:	25% αιθανόλη 10% γλυκερόλη

Πειραματική διαδικασία

- Η πηκτή ξεπλένεται ελαφρώς με νερό
- Τοποθετούμε την πηκτή σε πλαστικό δοχείο που περιέχει 500 ml Fixing Solution I.
- Ανακίνηση σε περιστροφικό αναδευτήρα για 2 ώρες (η πηκτή είναι πλήρως εμβαπτισμένη στο διάλυμα)
- Απομακρύνουμε το Fixing Solution I, ξεπλένουμε με νερό και προσθέτουμε στο ίδιο δοχείο 500ml Staining Solution
- Ανακίνηση σε orbital shaker για 20 λεπτά
- Αποχύνουμε το Staining Solution στη βρύση με ροή νερού, ξεπλένουμε με νερό και προσθέτουμε 500ml Developing Solution
- Ανακίνηση σε περιστροφικό αναδευτήρα μέχρι να αρχίσουν να φαίνονται οι ζώνες DNA στην πηκτή
- Όταν έχει ολοκληρωθεί η εμφάνιση της πηκτής, απομακρύνουμε το Developing Solution και προσθέτουμε 500ml Fixing Solution II
- Ακολουθεί ανάδευση για 10 λεπτά
- Ακολουθεί απομάκρυνση της πηκτής από το δοχείο και τοποθέτηση του σε στρώμα από χαρτί
- Τοποθέτηση της πηκτής σε σακουλάκι πλαστικό με αεροστεγές κλείσιμο μαζί με περίπου 10ml Preservative Solution

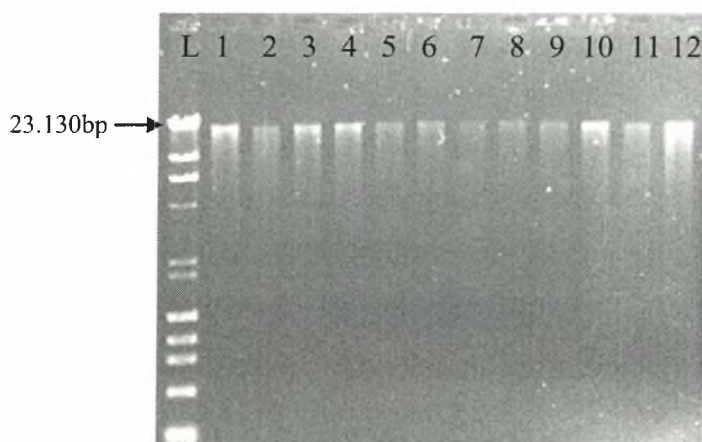
2.6 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ DGGE

Κάθε πηκτική πολυακρυλαμίδης τοποθετήθηκε σε τράπεζα φωτός και φωτογραφήθηκε με υψηλής ανάλυσης ψηφιακή φωτογραφική μηχανή. Οι φωτογραφίες από κάθε πηκτική DGGE μετατράπηκαν σε κατάλληλης μορφής αρχεία και ψηφιοποιήθηκαν. Στην συνέχεια η φωτογραφία της κάθε πηκτικής χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία δεδομένων δυαδικής μορφής (binary dataset) με το πακέτο GelCompar II βασιζόμενο στην παρουσία ή απουσία ζωνών DNA στο μοριακό αποτύπωμα του κάθε δείγματος. Τα δυαδικής μορφής δεδομένα που δημιουργήθηκαν για κάθε δείγμα αναλύθηκαν με την στατιστική μέθοδο Principal Coordinate Analysis που είναι ιδανική για την μείωση του αριθμού των μεταβλητών σε ομάδες δεδομένων που περιέχουν μεγάλο αριθμό μεταβλητών και βρίσκονται σε γραμμική συσχέτιση μεταξύ τους. Οι τιμές των άδηλων φορέων (latent vectors) ή νέων συντεταγμένων (coordinates) που προκύπτουν από την αρχική αυτή στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα για νέα στατιστική ανάλυση με τη μέθοδο Canonical Variate Analysis. Η στατιστική ανάλυση όλων των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο GENSTAT 7.0v.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Αποτελέσματα εξαγωγής DNA από δείγματα εδάφους

Αρχικά πραγματοποιήθηκε εξαγωγή DNA από τα δείγματα εδάφους. Για τον έλεγχο της απόδοσης της εξαγωγής, μια ποσότητα από τα δείγματα DNA ηλεκτροφορεύεται σε πηκτική αгарόζης 0.7% (Εικόνα 5).

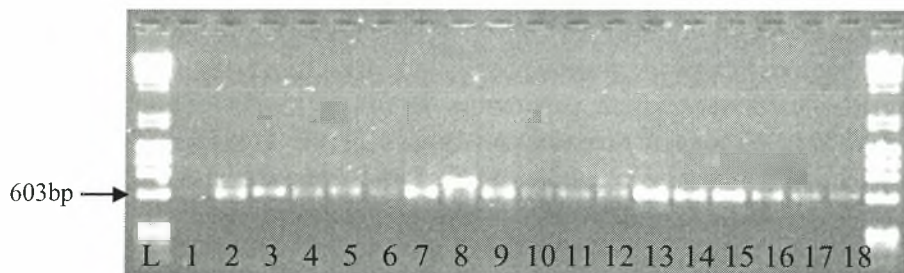


Εικόνα 6. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτική αгарόζης 0.7% δειγμάτων DNA από εδάφη. L λ *Hind*III-DNA marker, 1-3 DNA από δείγματα πηλώδους εδάφους με 14% YAE, 4-9 DNA από δείγματα αμμώδους εδάφους με 14% ή 28% YAE αντίστοιχα, 10-12 DNA από δείγματα πηλώδους εδάφους με 0% YAE. Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 5 μl DNA

3.2. Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

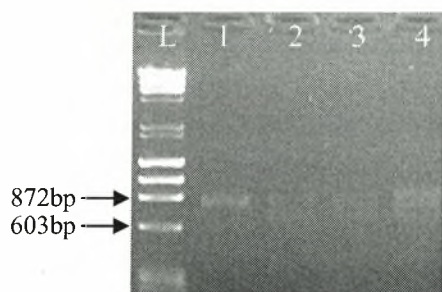
Στη συνέχεια χρησιμοποιείται η τεχνική της semi-nested PCR για την ενίσχυση των ITS περιοχών του rDNA μυκήτων, βασιδιομυκήτων και ασκομυκήτων και της nested PCR για την ενίσχυση τμήματος του 16S rDNA βακτηρίων από τα δείγματα DNA που εκχυλίστηκαν από το έδαφος.

Στην πρώτη αντίδραση PCR για τους μύκητες χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ITS1F και ITS4 οι οποίοι ενισχύουν την ITS περιοχή όλων των μυκήτων. Το προϊόν της ενίσχυσης αυτής είναι περίπου 600bp (Εικόνα 7)



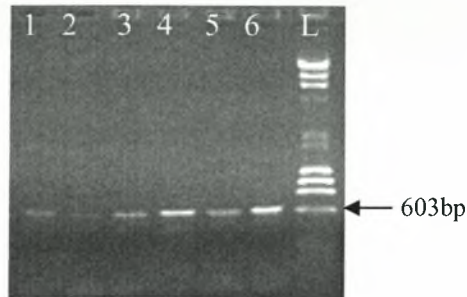
Εικόνα 7. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 1% PCR προϊόντων της ITS περιοχής από την κοινότητα των μυκήτων του εδάφους. L: λ *Hind*III-DNA marker, 1-9: PCR προϊόν από δείγματα εδάφους με 0, 14 ή 28% YAE χωρίς αζωτούχο λίπανση, 10-12 PCR προϊόν από δείγματα εδάφους με 0, 14 ή 28% YAE με αζωτούχο λίπανση. Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 5 μl προϊόν

Στη πρώτη αντίδραση PCR για τους βασιδιομύκητες χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ITS1F και ITS4B οι οποίοι ενισχύουν ειδικά την ITS περιοχή των βασιδιομυκήτων. Το προϊόν της ενίσχυσης αυτής είναι περίπου 700bp (Εικόνα 8).



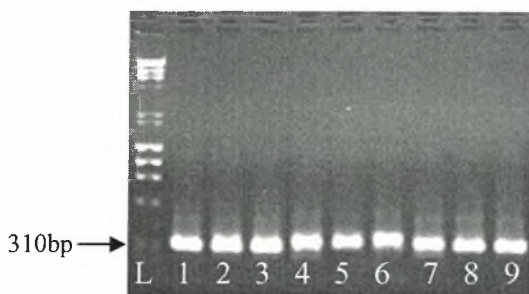
Εικόνα 8. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 1% PCR προϊόντων της ITS περιοχής από την κοινότητα των βασιδιομυκήτων του εδάφους. L: λ *Hind*III-DNA marker, 1, 2, 3: PCR προϊόν από δείγματα αμμώδους εδάφους με 0, 14 και 28% YAE και 4: PCR προϊόν από δείγματα αμμώδους εδάφους με 0% YAE. Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 5 μl προϊόν PCR

Στη πρώτη αντίδραση PCR για τους ασκομύκητες χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ITS1F και ITS4A οι οποίοι ενισχύουν ειδικά την ITS περιοχή των ασκομυκήτων. Το προϊόν της ενίσχυσης αυτής είναι περίπου 600bp (Εικόνα 9).



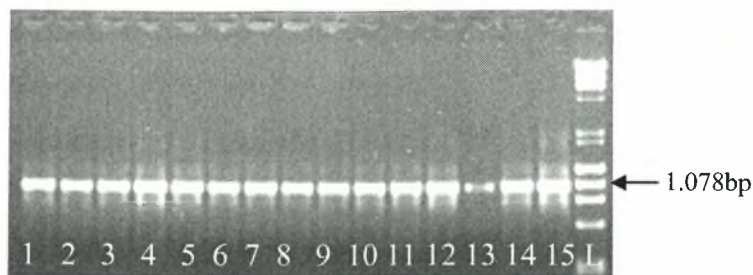
Εικόνα 9. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1% PCR προϊόντων της ITS περιοχής από την κοινότητα των ασκομυκήτων του εδάφους. L: λ *Hind*III-DNA marker, 1- 3: PCR προϊόν από δείγματα αμμώδους εδάφους 14 % YAE και 4-6: PCR προϊόν από δείγματα αμμώδους εδάφους με 28% YAE. Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 10 μl προϊόν PCR

Η δεύτερη αντίδραση PCR είναι ίδια για μύκητες, βασιδιομύκητες και ασκομύκητες. Χρησιμοποιήθηκαν οι ITS1F-GC και ITS2 εκκινητές και το προϊόν της αντίδρασης αυτής είναι περίπου 310bp (Εικόνα 10).



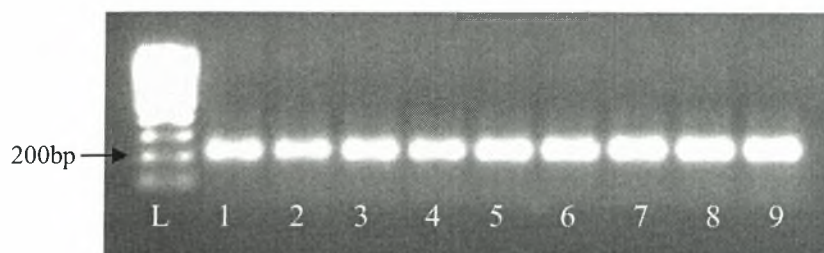
Εικόνα 10. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1% PCR προϊόντων που προέκυψαν από nested-PCR επί του αρχικού προϊόντος ολόκληρης της ITS περιοχής. L: λ *Hind*III-DNA marker, 1- 3: PCR προϊόν από δείγματα αμμώδους εδάφους 0 % YAE και 4-6: PCR προϊόν από δείγματα αμμώδους εδάφους με 14% YAE, 6-9: PCR προϊόν από δείγματα αμμώδους εδάφους με 28% YAE. Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 10 μl προϊόν PCR

Στη πρώτη αντίδραση PCR για την ενίσχυση ενός τμήματος 16S rDNA των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν οι 63f και 1087r εκκινητές. Το προϊόν της αντίδρασης είναι περίπου 1000bp (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1% PCR προϊόντων από το 16S rRNA γονίδιο της βακτηριακής κοινότητας του εδάφους. L: λ *Hind*III-DNA marker, 1- 3: PCR προϊόν από δείγματα αμμώδους εδάφους 14 % YAE 4-6: PCR προϊόν από δείγματα αμμώδους εδάφους με 28% YAE, 6-9: PCR προϊόν από δείγματα αμμώδους εδάφους με 0% YAE και λίπανση, 10-12 PCR προϊόν από δείγματα αμμώδους εδάφους με 14% YAE και λίπανση, 13-15 PCR προϊόν από δείγματα αμμώδους εδάφους με 28% YAE και λίπανση. Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 10 μl προϊόν PCR.

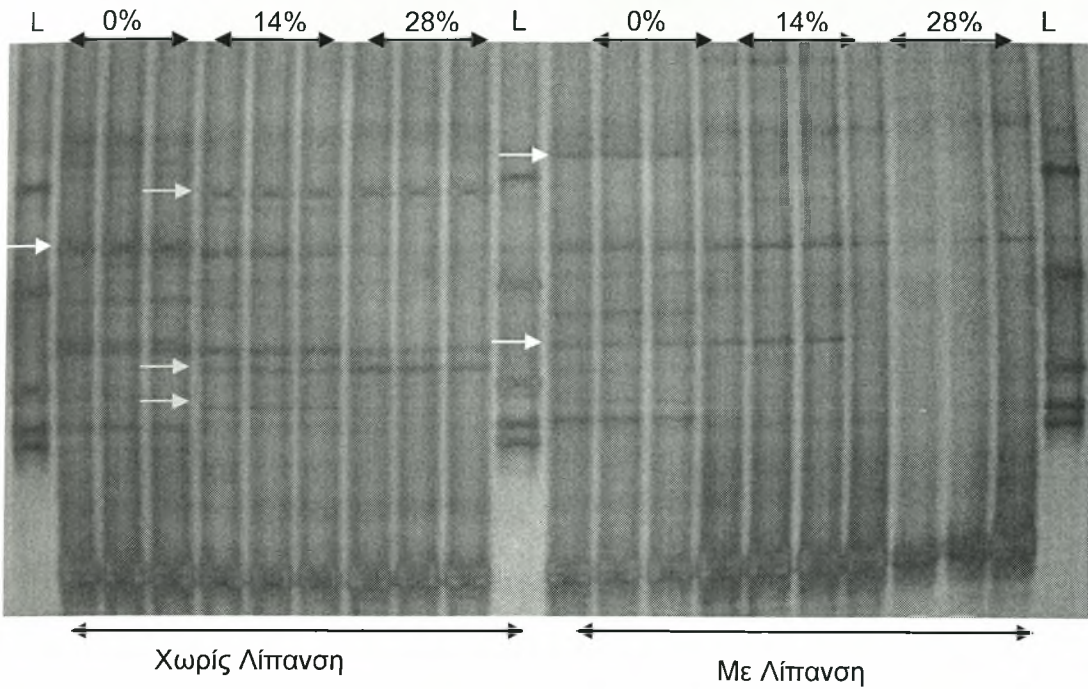
Στη δεύτερη αντίδραση για τα βακτήρια χρησιμοποιούνται οι εκκινητές *Muzyer F* (357f-GC) και *Muzyer R* (534r) οι οποίοι είναι εσωτερικοί των πρώτων και ενισχύουν την V3 μεταβλητή περιοχή του 16S rDNA των βακτηρίων (προϊόν περίπου 200bp) (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1% PCR προϊόντων από το 16S rRNA γονίδιο της βακτηριακής κοινότητας του εδάφους. L: 1000 bp DNA Ladder, 1- 3: PCR προϊόν από δείγματα αμμώδους εδάφους 14 % YAE 4-6: PCR προϊόν από δείγματα αμμώδους εδάφους με 28% YAE, 6-9: PCR προϊόν από δείγματα αμμώδους εδάφους με 0% YAE και λίπανση. Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 10 μl προϊόν PCR.

3.2. Αποτελέσματα Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

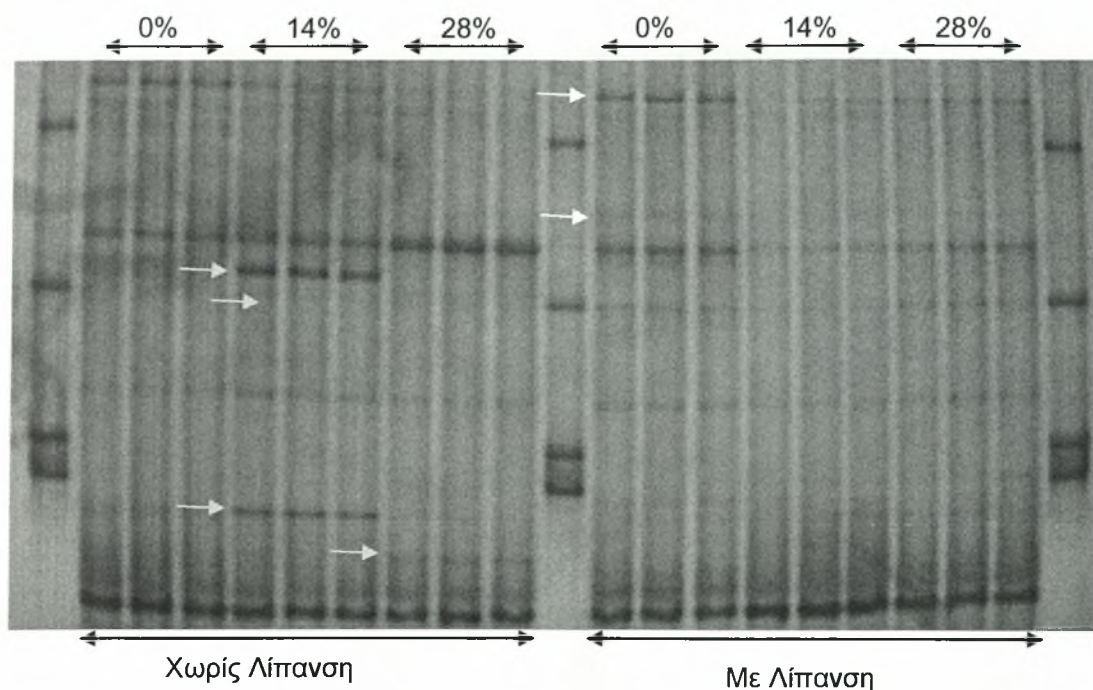
Μύκητες σε αμμώδες έδαφος (30-55%)



Εικόνα 13. Εικόνα πηκτής πολυακρυλαμιδίου DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 30-55% όπου αναλύθηκαν τα προϊόντα PCR από την ITS περιοχή της κοινότητας των μυκήτων του αμμώδους εδάφους. Όπου L marker που αποτελείται από ανάμιξη προϊόντων PCR από την περιοχή ITS γνωστών μυκήτων (εικόνα 20), 0, 14, 28% αποτελούν τα επίπεδα YAE που εφαρμόστηκαν στα εδάφη με ή χωρίς επιπλέον αζωτούχο λίπανση

Τα αποτυπώματα της μικροβιακής κοινότητας των μυκήτων σε εδάφη που δέχθηκαν YAE σε διάφορα επίπεδα με ή χωρίς λίπανση παρουσιάζονται στην Εικόνα 13. Διακρίνονται ζώνες DNA που διαφοροποιούνται και εμφανίζονται ή εξαφανίζονται ανάλογα με την μεταχείριση και μπορούν να αποτελέσουν ζώνες-δείκτες που αντιπροσωπεύουν μύκητες που ευνοούνται ή δεν ευνοούνται από την παρουσία ή όχι YAE, αζωτούχου λίπανσης ή συνδιασμού των δύο. Χαρακτηριστικά θα μπορούσαμε να αναφερθούμε σε ζώνες που εμφανίζονται σε μεταχειρίσεις όπου εφαρμόστηκαν YAE (κίτρινα τόξα) καθώς και σε ζώνες που είναι παρούσες στις μεταχειρίσεις χωρίς YAE και εμφανίζονται ασθενώς ή καθόλου στις μεταχειρίσεις όπου εφαρμόστηκαν YAE (λευκά τόξα)

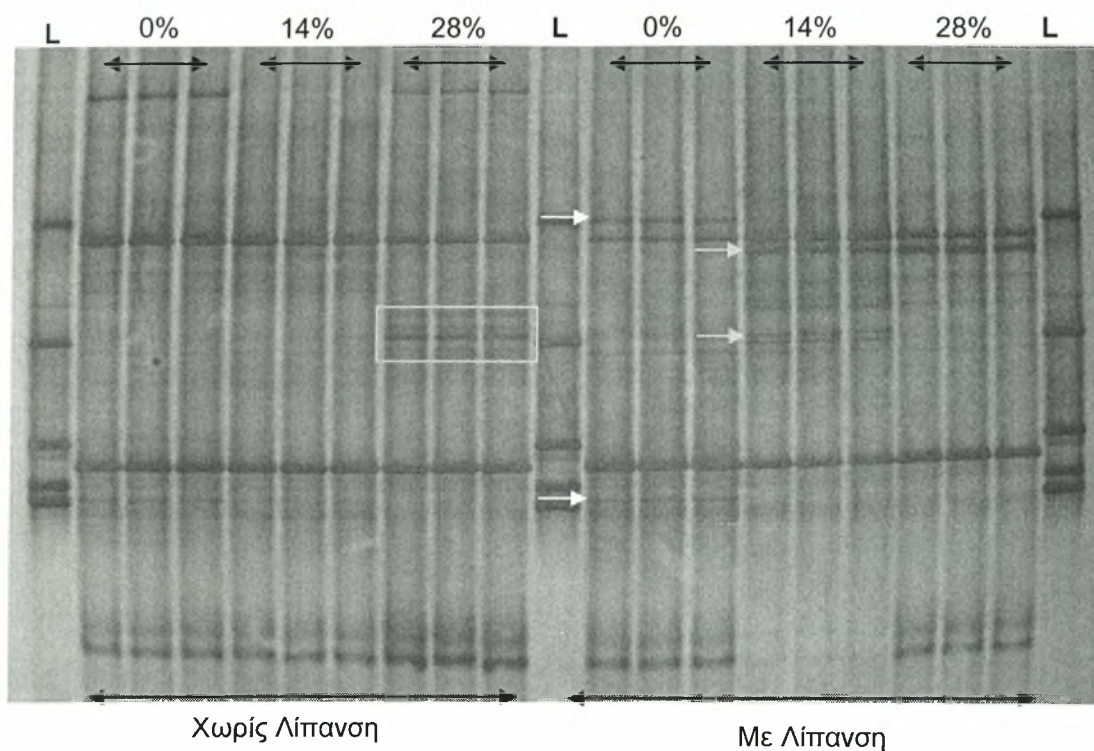
Μύκητες σε πηλώδες έδαφος (30-55%)



Εικόνα 14. Εικόνα πηκτής πολυακρυλαμιδίου DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 30-55% όπου αναλύθηκαν τα προϊόντα PCR από την ITS περιοχή της κοινότητας των μυκήτων του πηλώδους εδάφους. Όπου L marker που αποτελείται από ανάμιξη προϊόντων PCR από την περιοχή ITS γνωστών μυκήτων (εικόνα 20), 0, 14, 28% αποτελούν τα επίπεδα YAE που εφαρμόστηκαν στα εδάφη με ή χωρίς επιπλέον αζωτούχο λίπανση

Τα αποτυπώματα της μικροβιακής κοινότητας των μυκήτων σε πηλώδη εδάφη που δέχθηκαν YAE σε διάφορα επίπεδα με ή χωρίς λίπανση παρουσιάζονται στην Εικόνα 14. Διακρίνονται ζώνες DNA που διαφοροποιούνται και εμφανίζονται ή εξαφανίζονται ανάλογα με την μεταχείριση και μπορούν να αποτελέσουν ζώνες-δείκτες που αντιπροσωπεύουν μύκητες που ευνοούνται ή δεν ευνοούνται από την παρουσία ή όχι YAE, αζωτούχου λίπανσης ή συνδυασμού των δύο. Χαρακτηριστικά θα μπορούσαμε να αναφερθούμε σε ζώνες που εμφανίζονται σε μεταχειρίσεις όπου εφαρμόστηκαν YAE (κίτρινα τόξα) καθώς και σε ζώνες που είναι παρούσες στις μεταχειρίσεις χωρίς YAE και εμφανίζονται ασθενώς ή καθόλου στις μεταχειρίσεις όπου εφαρμόστηκαν YAE (λευκά τόξα)

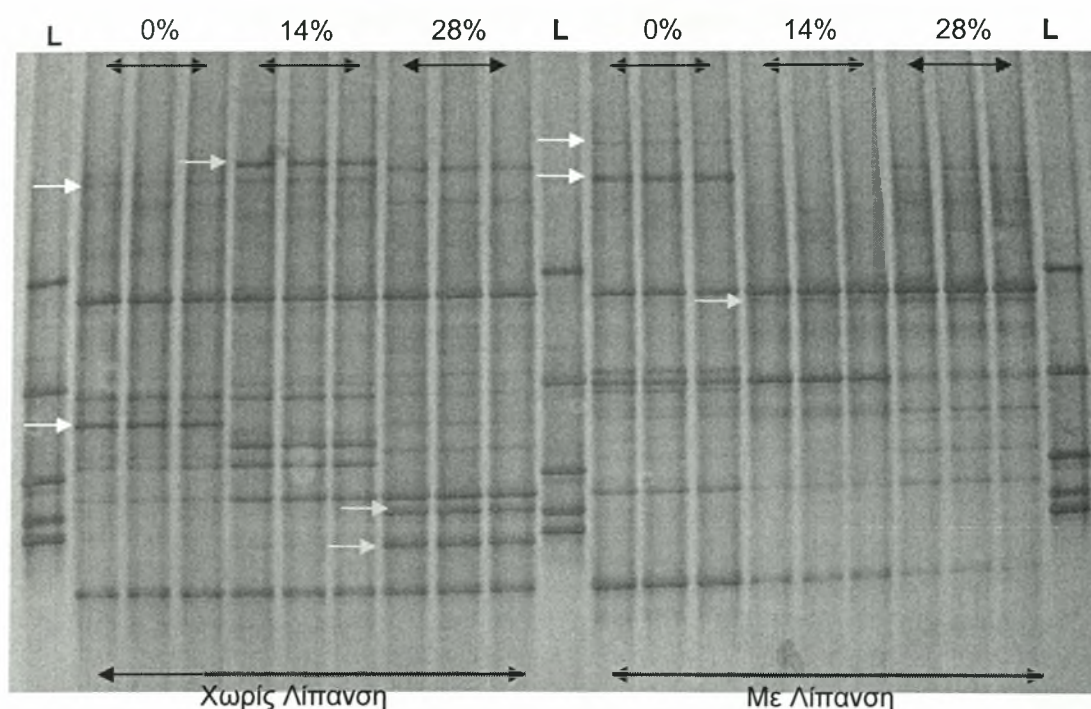
Βασιδιομύκητες σε αμμώδες έδαφος (30-55%)



Εικόνα 15. Εικόνα πηκτής πολυακρυλαμιδίου DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 30-55% όπου αναλύθηκαν τα προϊόντα PCR από την ITS περιοχή της κοινότητας των βασιδιομυκήτων του αμμώδους εδάφους. Όπου L marker που αποτελείται από ανάμιξη προϊόντων PCR από την περιοχή ITS γνωστών μυκήτων (εικόνα 20), 0, 14, 28% αποτελούν τα επίπεδα YAE που εφαρμόστηκαν στα εδάφη με ή χωρίς επιπλέον αζωτούχο λίπανση

Τα αποτυπώματα της μικροβιακής κοινότητας των βασιδιομυκήτων σε αμμώδη εδάφη που δέχθηκαν YAE σε διάφορα επίπεδα με ή χωρίς λίπανση παρουσιάζονται στην Εικόνα 15. Διακρίνονται ζώνες DNA που διαφοροποιούνται και εμφανίζονται ή εξαφανίζονται ανάλογα με την μεταχείριση και μπορούν να αποτελέσουν ζώνες-δείκτες που αντιπροσωπεύουν μύκητες που ευνοούνται ή δεν ευνοούνται από την παρουσία ή όχι YAE, αζωτούχου λίπανσης ή συνδυασμού των δύο. Χαρακτηριστικά θα μπορούσαμε να αναφερθούμε σε ζώνες που εμφανίζονται σε μεταχειρίσεις όπου εφαρμόστηκαν YAE (κίτρινα τόξα) καθώς και σε ζώνες που είναι παρούσες στις μεταχειρίσεις χωρίς YAE και εμφανίζονται ασθενώς ή καθόλου στις μεταχειρίσεις όπου εφαρμόστηκαν YAE (λευκά τόξα)

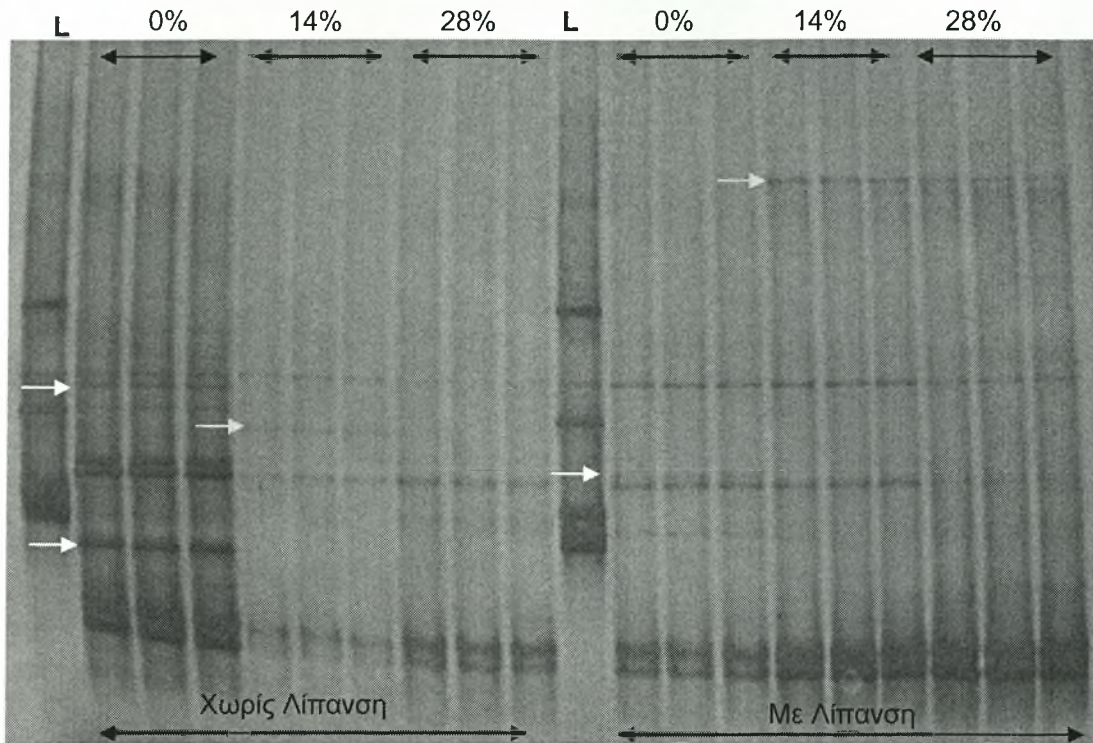
Βασιδιομύκητες σε πηλώδες έδαφος (30-55%)



Εικόνα 16. Εικόνα πηκτής πολυακρυλαμιδίου DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 30-55% όπου αναλύθηκαν τα προϊόντα PCR από την ITS περιοχή της κοινότητας των βασιδιομυκήτων του πηλώδους εδάφους. Όπου L marker που αποτελείται από ανάμιξη προϊόντων PCR από την περιοχή ITS γνωστών μυκήτων (εικόνα 20), 0, 14, 28% αποτελούν τα επίπεδα YAE που εφαρμόστηκαν στα εδάφη με ή χωρίς επιπλέον αζωτούχο λίπανση

Τα αποτυπώματα της μικροβιακής κοινότητας των βασιδιομυκήτων σε πηλώδη εδάφη που δέχθηκαν YAE σε διάφορα επίπεδα με ή χωρίς λίπανση παρουσιάζονται στην Εικόνα 16. Διακρίνονται ζώνες DNA που διαφοροποιούνται και εμφανίζονται ή εξαφανίζονται ανάλογα με την μεταχείριση και μπορούν να αποτελέσουν ζώνες-δείκτες που αντιπροσωπεύουν μύκητες που ευνοούνται ή δεν ευνοούνται από την παρουσία ή όχι YAE, αζωτούχου λίπανσης ή συνδυασμού των δύο. Χαρακτηριστικά θα μπορούσαμε να αναφερθούμε σε ζώνες που εμφανίζονται σε μεταχειρίσεις όπου εφαρμόστηκαν YAE (κίτρινα τόξα) καθώς και σε ζώνες που είναι παρούσες στις μεταχειρίσεις χωρίς YAE και εμφανίζονται ασθενώς ή καθόλου στις μεταχειρίσεις όπου εφαρμόστηκαν YAE (λευκά τόξα)

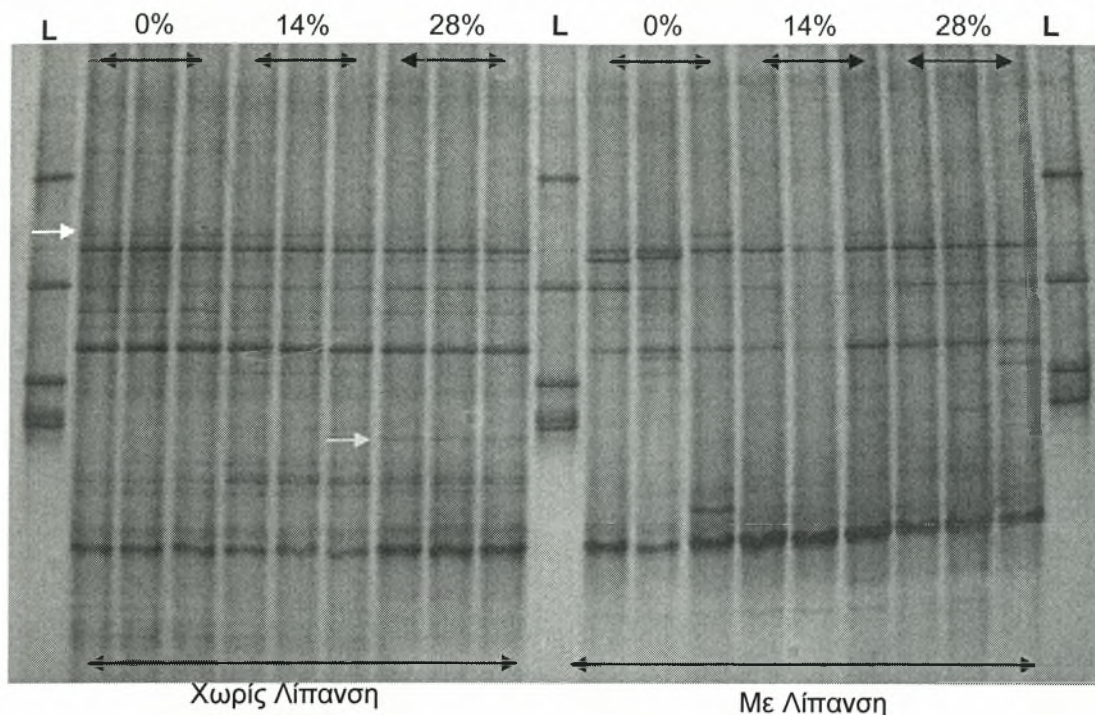
Ασκομύκητες σε αμμώδες έδαφος (30-55%)



Εικόνα 17. Εικόνα πηκτής πολυακρυλαμιδίου DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 30-55% όπου αναλύθηκαν τα προϊόντα PCR από την ITS περιοχή της κοινότητας των ασκομυκήτων του αμμώδους εδάφους. Όπου L marker που αποτελείται από ανάμιξη προϊόντων PCR από την περιοχή ITS γνωστών μυκήτων (εικόνα 20), 0, 14, 28% αποτελούν τα επίπεδα YAE που εφαρμόστηκαν στα εδάφη με ή χωρίς επιπλέον αζωτούχο λίπανση

Τα αποτυπώματα της μικροβιακής κοινότητας των ασκομυκήτων σε αμμώδη εδάφη που δέχθηκαν YAE σε διάφορα επίπεδα με ή χωρίς λίπανση παρουσιάζονται στην Εικόνα 17. Τα αποτυπώματα των διαφόρων μεταχειρίσεων για τους ασκομύκητες παρουσιάζουν ελάχιστες διαφοροποιήσεις μεταξύ τους δείχνοντας ότι η κοινότητα των ασκομυκήτων του εδάφους δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα από την εφαρμογή YAE. Μικρός αριθμός ζωνών DNA διαφοροποιούνται ανάλογα με την μεταχείριση. Χαρακτηριστικά θα μπορούσαμε να αναφερθούμε σε ζώνες που εμφανίζονται σε μεταχειρίσεις όπου εφαρμόστηκαν YAE (κίτρινα τόξα) καθώς και σε ζώνες που είναι παρούσες στις μεταχειρίσεις χωρίς YAE και εμφανίζονται ασθενής ή καθόλου στις μεταχειρίσεις όπου εφαρμόστηκαν YAE (λευκά τόξα).

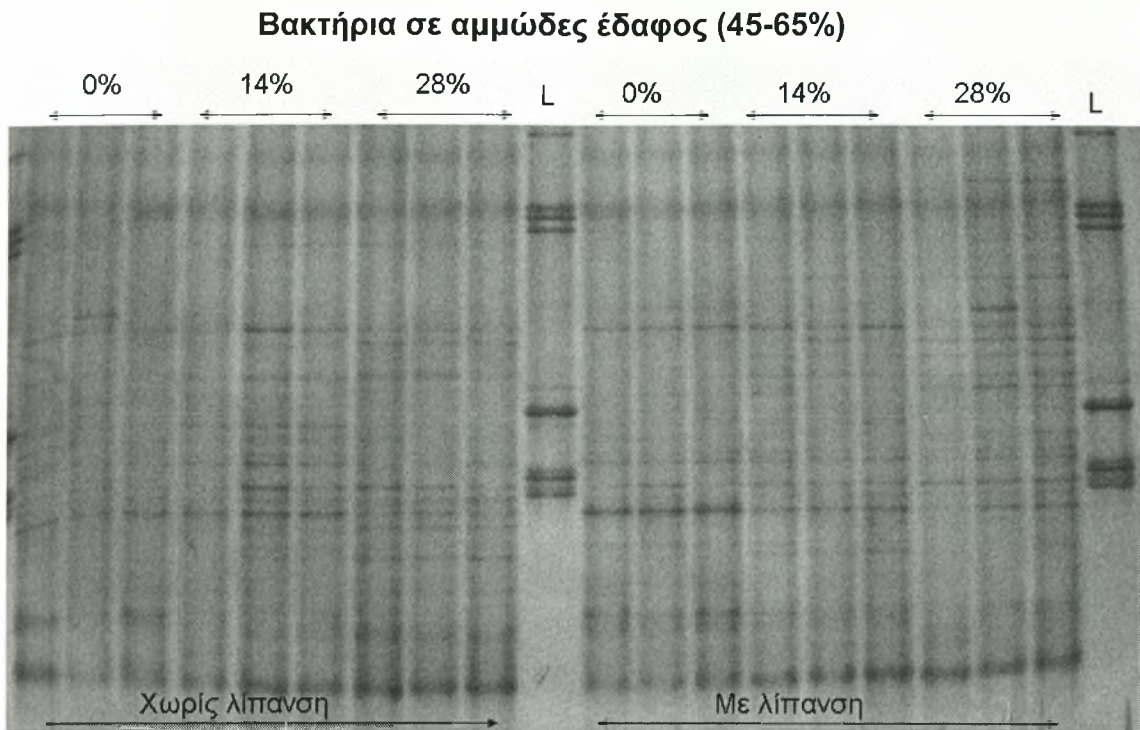
Ασκομύκητες σε πηλώδες έδαφος (30-55%)



Εικόνα 18. Εικόνα πηκτής πολυακρυλαμιδίου DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 30-55% όπου αναλύθηκαν τα προϊόντα PCR από την ITS περιοχή της κοινότητας των ασκομυκήτων του πηλώδους εδάφους. Όπου L marker που αποτελείται από ανάμιξη προϊόντων PCR από την περιοχή ITS γνωστών μυκήτων (εικόνα 20), 0, 14, 28% αποτελούν τα επίπεδα YAE που εφαρμόστηκαν στα εδάφη με ή χωρίς επιπλέον αζωτούχο λίπανση

Τα αποτυπώματα της μικροβιακής κοινότητας των ασκομυκήτων σε αμμώδη εδάφη που δέχθηκαν YAE σε διάφορα επίπεδα με ή χωρίς λίπανση παρουσιάζονται στην Εικόνα 18. Τα αποτυπώματα των διαφόρων μεταχειρίσεων για τους ασκομύκητες δεν παρουσιάζουν μεγάλες διαφοροποιήσεις μεταξύ τους όπως και στα αμμώδη εδάφη καταδεικνύοντας την χαμηλή επίδραση των YAE στην κοινότητα των ασκομυκήτων του εδάφους. Μικρός αριθμός ζωνών DNA διαφοροποιούνται ανάλογα με την μεταχείριση. Χαρακτηριστικά θα μπορούσαμε να αναφερθούμε σε ζώνες που εμφανίζονται σε μεταχειρίσεις όπου εφαρμόστηκαν YAE (κίτρινα τόξα) καθώς και σε ζώνες που είναι παρούσες στις μεταχειρίσεις χωρίς YAE και εμφανίζονται ασθενώς ή καθόλου στις μεταχειρίσεις όπου εφαρμόστηκαν YAE (λευκά τόξα). Τα αποτυπώματα των διαφόρων επαναλήψεων της ίδια

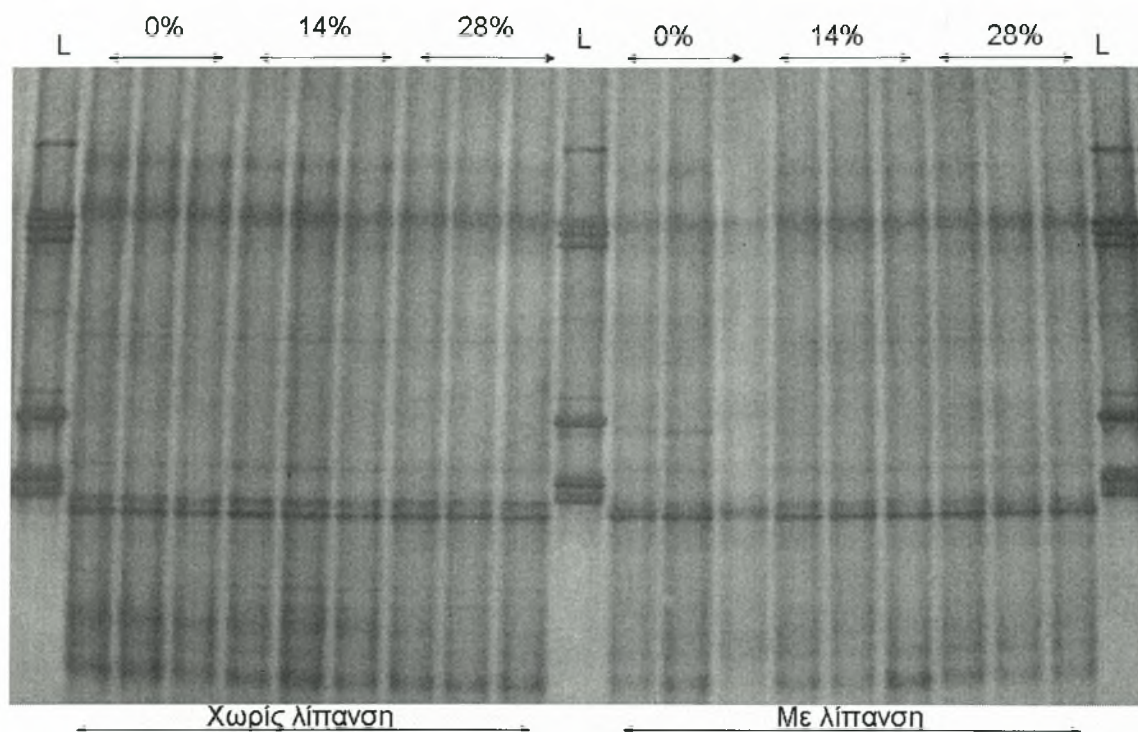
μεταχείρισης παρουσιάζουν ικανοποιητική επαναληψιμότητα και μικρή παραλλακτικότητα μεταξύ τους.



Εικόνα 19. Εικόνα πηκτής πολυακρυλαμιδίου DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 45-65% όπου αναλύθηκαν τα προϊόντα PCR από την V3 περιοχή 16S rRNA γονιδίου της κοινότητας των βακτηρίων του αμμώδους εδάφους. Όπου L marker που αποτελείται από ανάμιξη προϊόντων PCR από την περιοχή V3 του 16S rRNA γονιδίου γνωστών βακτηριακών στελεχών (εικόνα 21), 0, 14, 28% αποτελούν τα επίπεδα YAE που εφαρμόστηκαν στα εδάφη με ή χωρίς επιπλέον αζωτούχο λίπανση

Τα αποτυπώματα της μικροβιακής κοινότητας των βακτηρίων σε αμμώδη εδάφη που δέχθηκαν YAE σε διάφορα επίπεδα με ή χωρίς λίπανση παρουσιάζονται στην Εικόνα 19. Τα αποτυπώματα των διαφόρων μεταχειρίσεων για τα βακτήρια παρουσιάζουν κάποιες αλλά όχι μεγάλες διαφοροποιήσεις ανάλογα με την μεταχείριση με YAE ή αζωτούχο λίπανση. Τα αποτυπώματα των διαφόρων επαναλήψεων της ίδια μεταχείρισης παρουσιάζουν ικανοποιητική επαναληψιμότητα και μικρή παραλλακτικότητα μεταξύ τους.

Βακτήρια σε πηλώδες έδαφος (45-65%)



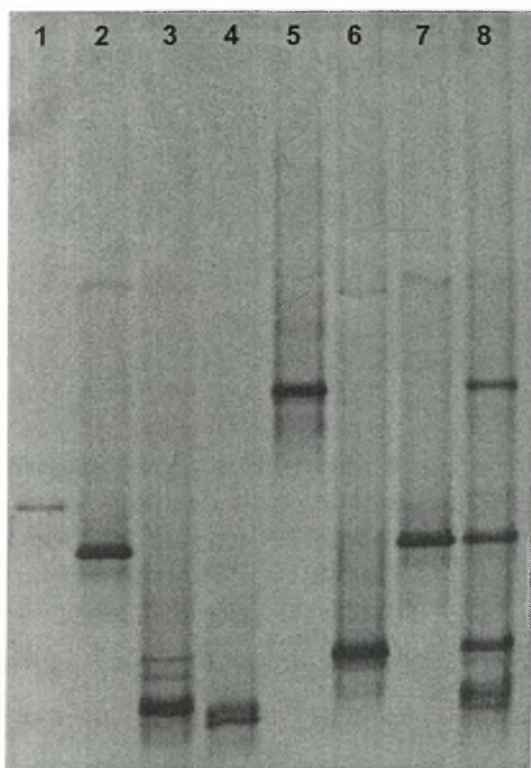
Εικόνα 20. Εικόνα πηκτής πολυακρυλαμιδίου DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 45-65% όπου αναλύθηκαν τα προϊόντα PCR από την V3 περιοχή 16S rRNA γονιδίου της κοινότητας των βακτηρίων του πηλώδους εδάφους. Όπου L marker που αποτελείται από ανάμιξη προϊόντων PCR από την περιοχή V3 του 16S rRNA γονιδίου γνωστών βακτηριακών στελεχών (εικόνα 21), 0, 14, 28% αποτελούν τα επίπεδα YAE που εφαρμόστηκαν στα εδάφη με ή χωρίς επιπλέον αζωτούχο λίπανση

Τα αποτυπώματα της μικροβιακής κοινότητας των βακτηρίων σε πηλώδη εδάφη που δέχθηκαν YAE σε διάφορα επίπεδα με ή χωρίς λίπανση παρουσιάζονται στην Εικόνα 20. Τα αποτυπώματα των διαφόρων μεταχειρίσεων για τα βακτήρια δεν παρουσιάζουν κάποιες διαφοροποιήσεις ανάλογα με την μεταχείριση με YAE ή αζωτούχο λίπανση. Συνεπώς, η εφαρμογή YAE με ή χωρίς αζωτούχο λίπανση δεν φαίνεται να προκαλεί μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα των βακτηρίων σε πηλώδες έδαφος σε αντίθεση κάποιες διαφοροποιήσεις μεταξύ μεταχειρίσεων εμφανίζονται στο αμμώδες έδαφος. Οι εικόνες των πηκτών DGGE που προέκυψαν για κάθε έδαφος και κοινότητα μικροοργανισμών αναλύθηκε στατιστικά όπως περιγράφηκε προηγουμένως ώστε να επιβεβαιωθούν και τα πρώτα

συμπεράσματα που μπορούμε να συλλέξουμε με βάση την οπτική ανάγνωση των πηκτών

Τα ladders των μυκήτων και βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις πηκτές DGGE και οι κινητικότητά τους σε αυτές παρουσιάζονται στις Εικόνες 20 και 21 αντίστοιχα. Από τις εικόνες αυτές μπορούμε να διακρίνουμε ότι η τεχνική DGGE έχει υψηλή διακριτική ικανότητα και μπορεί να διακρίνει δύο είδη μυκήτων που ανήκουν στο ίδιο γένος όπως συμβαίνει με τους μύκητες του γένους *Pleurotus* (Γραμμές 3, 4, 5, 6) και *Fusarium* (Γραμμές 1, 2, 7).

Ladder για μύκητες

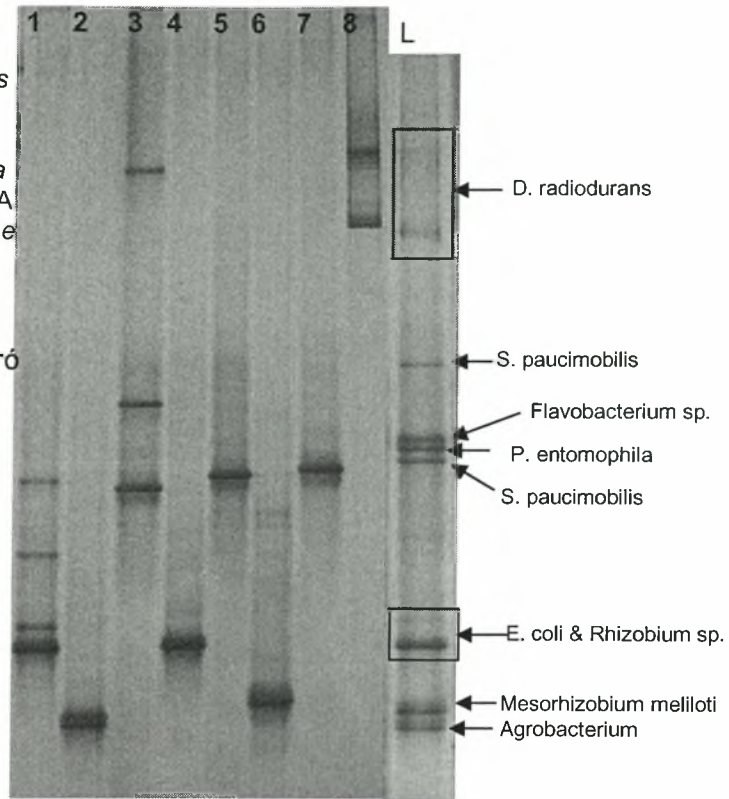


- 1: *Fusarium oxysporum radici lycopersici*
- 2: *Fusarium solani* (FORK)
- 3: *P. ostreatus*
- 4: *P. cystidiosus*
- 5: *P. djamor*
- 6: *Pleurotus eryngii*
- 7: *Fusarium solani* (FORK)
- 8: Προϊόν ανάμιξης PCR προϊόντων από την ITS περιοχή των μυκήτων από τις γραμμές 1-7

Εικόνα 20. Εικόνα πηκτής πολυακρυλαμιδίου DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 30-55%. Σε κάθε σειρά της πηκτής αναλύθηκαν 1 μl από το προϊόν της PCR της ITS περιοχής γνωστών στελεχών μυκήτων. Το προϊόν ανάμιξης (γραμμή 8) περιέχει την ίδια συγκέντρωση (20 ng/μl) για όλους του μύκητες που αναλύθηκαν

Ladder για βακτήρια

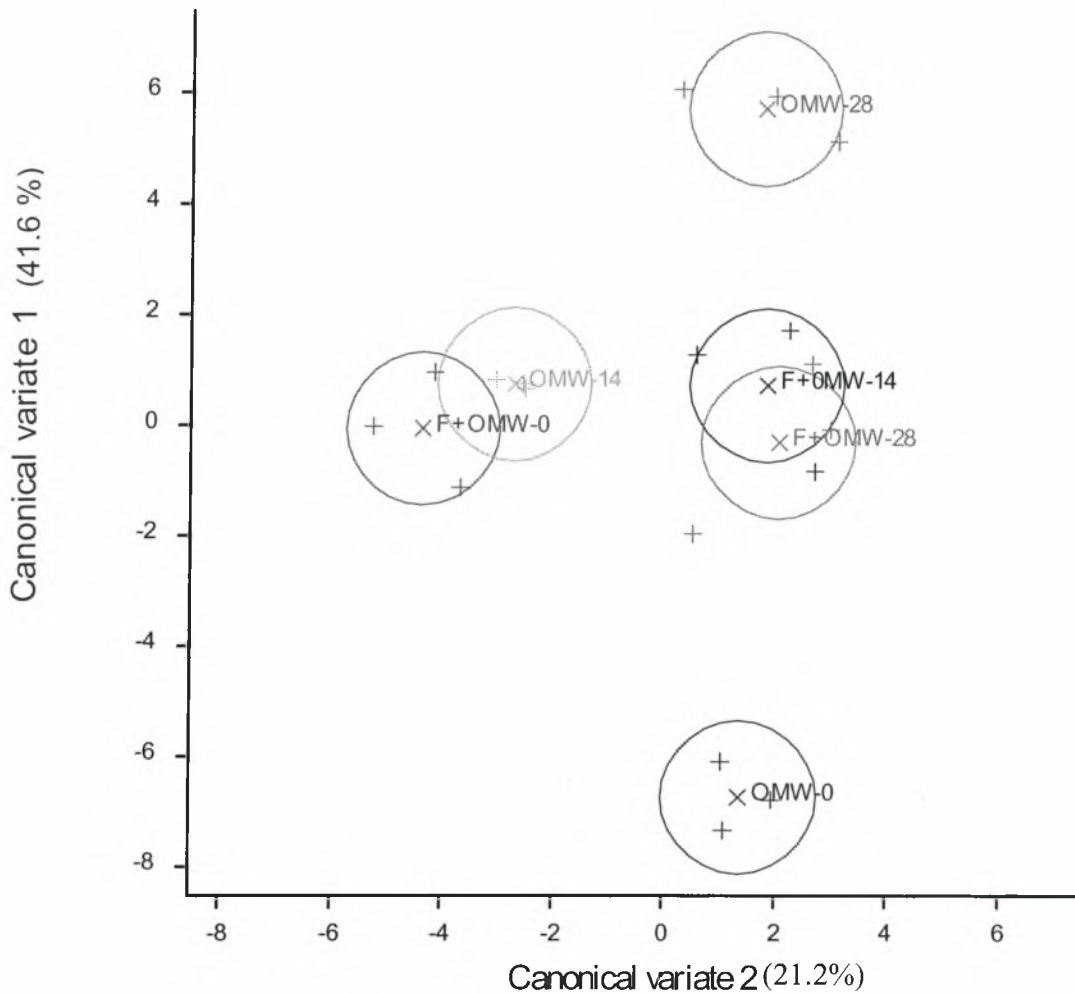
- 1: *E. coli* DH5a
2: *Agrobacterium tumefaciens*
3: *Shingomonas paucimobilis*
4: *Rhizobium* sp.
5: *Pseudomonas entomophila*
6: *Mesorhizobium meliloti* R7A
7: *Flavobacterium johnsoniae*
8: *Deinococcus radiodurans*
L Προϊόν ανάμιξης PCR
προϊόντων από την V3
περιοχή των βακτηρίων από
τις γραμμές 1-8



Εικόνα 21. Εικόνα πηκτής πολυακρυλαμιδίου DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 45-65%. Σε κάθε σειρά της πηκτής αναλύθηκαν 1 μ l από το προϊόν της PCR. Το προϊόν ανάμιξης (γραμμή 8) περιέχει την ίδια συγκέντρωση (20 ng/ μ l) για όλα τα βακτήρια που αναλύθηκαν.

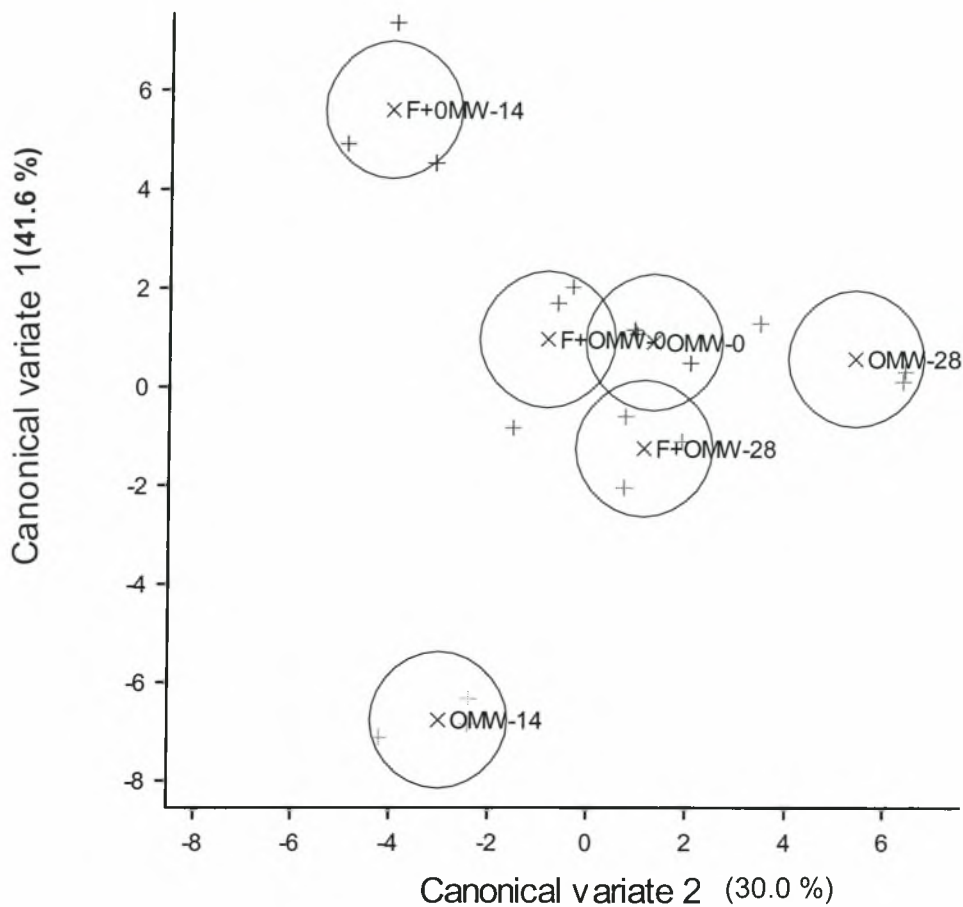
3.3. Στατιστική Ανάλυση δεδομένων DGGE

Μύκητες, Αμμώδες έδαφος



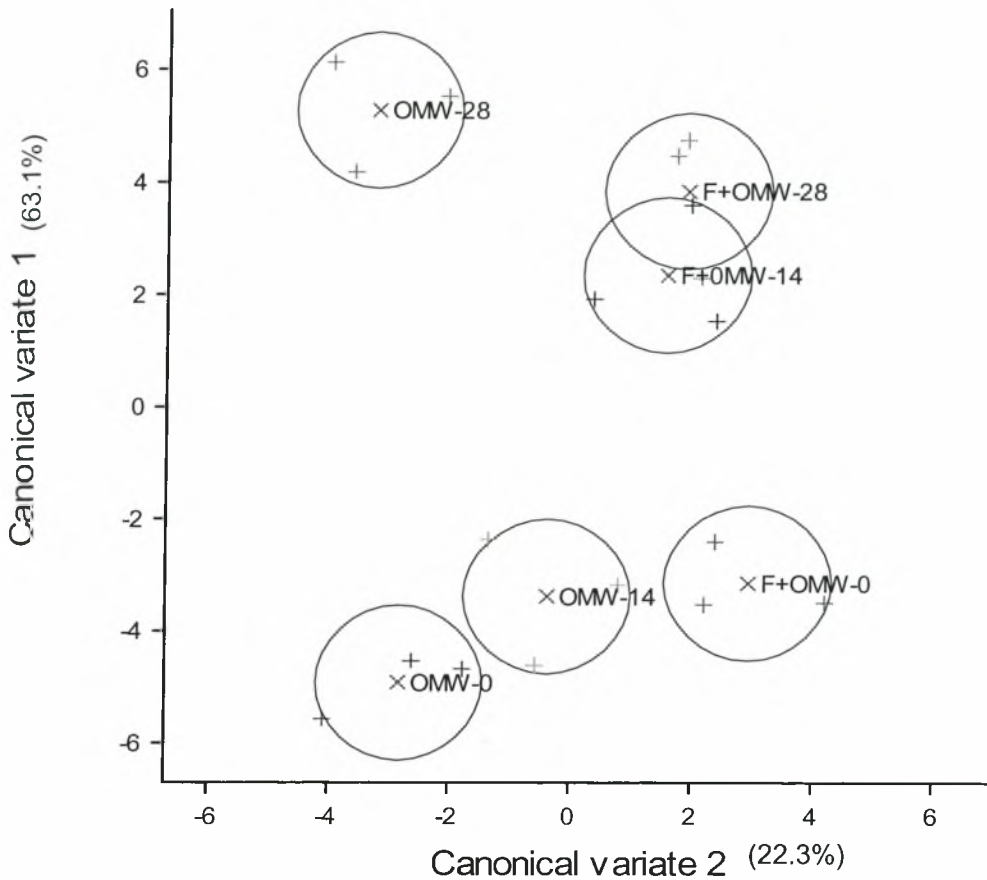
Διάγραμμα 1. Παρουσίαση των μεταβολών που επέφερε η εφαρμογή των ΥΑΕ με ή χωρίς αζωτούχο λίπανση στην μικροβιακή κοινότητα των μυκήτων του αμμώδους εδάφους. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με την μέθοδο Principal Coordinate Analysis και οι πέντε πρώτοι άδηλοι παράγοντες για κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα για νέα ανάλυση με την μέθοδο Canonical Variate Analysis. Για κάθε μεταχείριση παρουσιάζονται οι τιμές του μέσου όρου καθώς και των τριών επαναλήψεων ενώ οι κύκλοι αποτελούν 95% όρια εμπιστοσύνης.

Μύκητες, Πηλώδες έδαφος



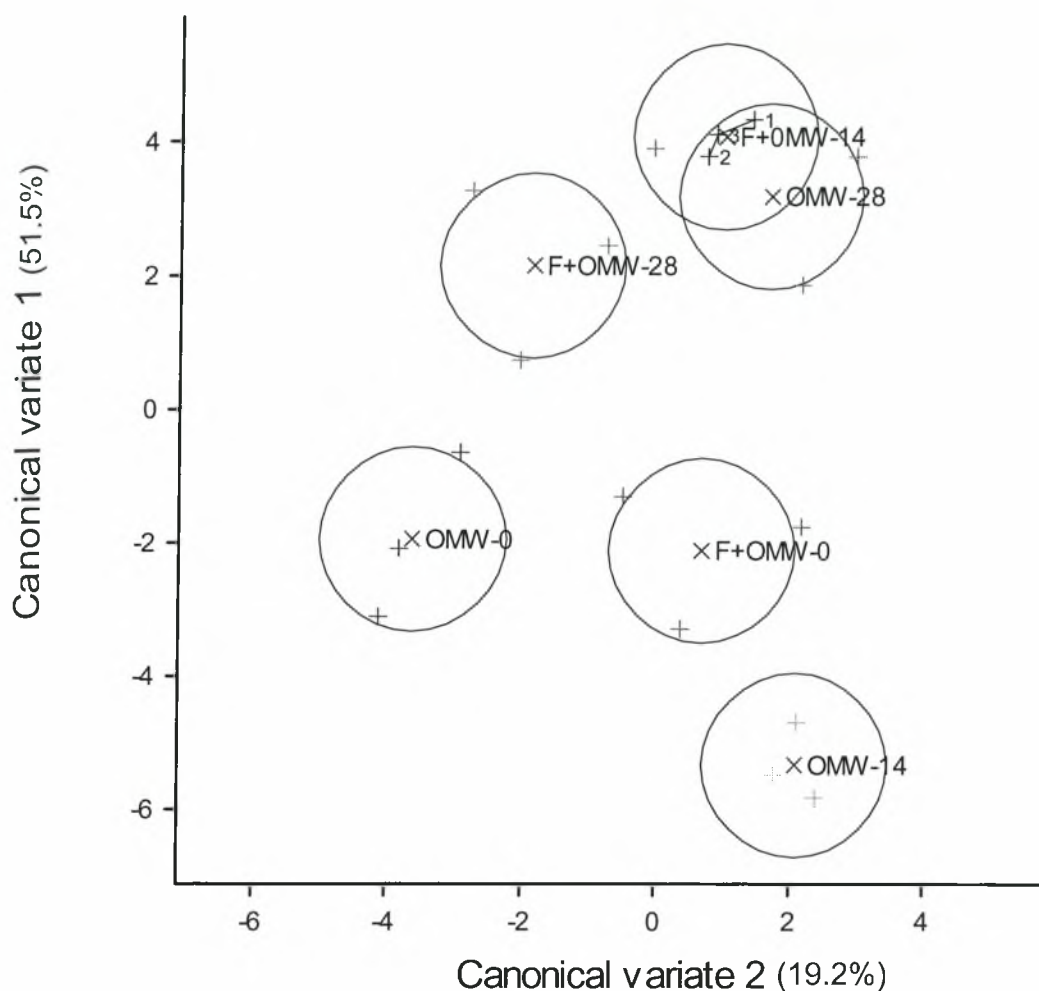
Διάγραμμα 2. Παρουσίαση των μεταβολών που επέφερε η εφαρμογή των ΥΑΕ με ή χωρίς αζωτούχο λίπανση στην μικροβιακή κοινότητα των μυκήτων του πηλώδους εδάφους. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με την μέθοδο Principal Coordinate Analysis και οι πέντε πρώτοι άδηλοι παράγοντες για κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα για νέα ανάλυση με την μέθοδο Canonical Variate Analysis. Για κάθε μεταχείριση παρουσιάζονται οι τιμές του μέσου όρου καθώς και των τριών επαναλήψεων ενώ οι κύκλοι αποτελούν 95% όρια εμπιστοσύνης.

Βασιδιομύκητες, Αμμώδες έδαφος



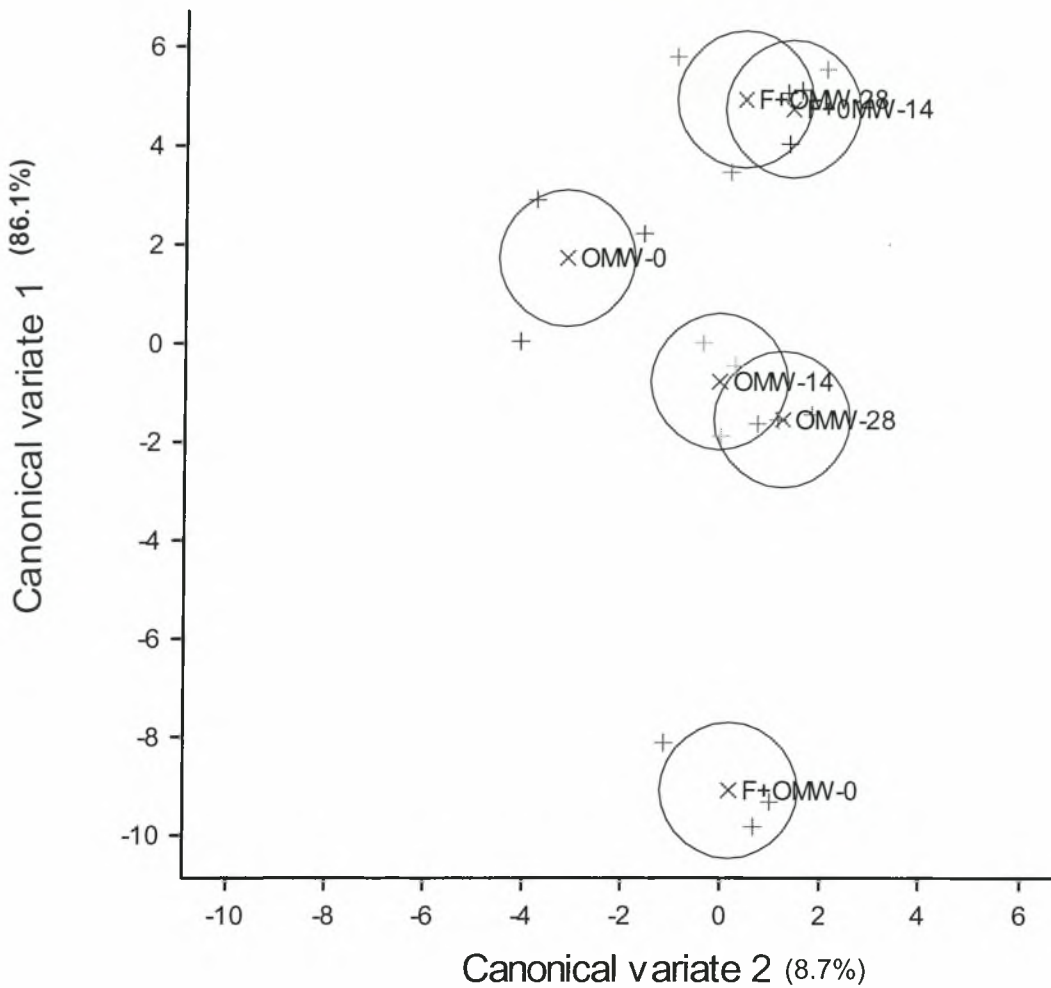
Διάγραμμα 3. Παρουσίαση των μεταβολών που επέφερε η εφαρμογή των ΥΑΕ με ή χωρίς αζωτούχο λίπανση στην μικροβιακή κοινότητα των βασιδιομυκήτων του αμμώδους εδάφους. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με την μέθοδο Principal Coordinate Analysis και οι πέντε πρώτοι άδηλοι παράγοντες για κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα για νέα ανάλυση με την μέθοδο Canonical Variate Analysis. Για κάθε μεταχείριση παρουσιάζονται οι τιμές του μέσου όρου καθώς και των τριών επαναλήψεων ενώ οι κύκλοι αποτελούν 95% όρια εμπιστοσύνης.

Βασιδιομύκητες, Πηλώδες έδαφος



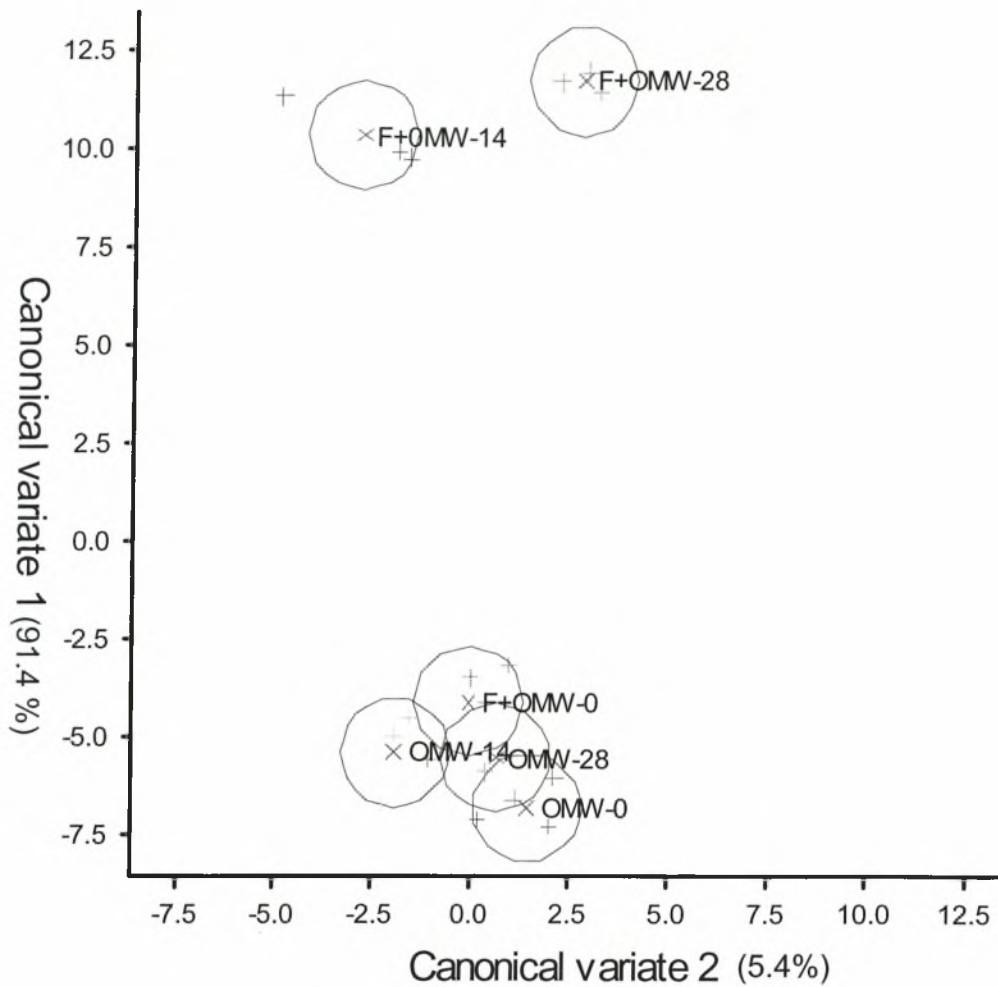
Διάγραμμα 4. Παρουσίαση των μεταβολών που επέφερε η εφαρμογή των ΥΑΕ με ή χωρίς αζωτούχο λίπανση στην μικροβιακή κοινότητα των βασιδιομυκήτων του πηλώδους εδάφους. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με την μέθοδο Principal Coordinate Analysis και οι πέντε πρώτοι άδηλοι παράγοντες για κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα για νέα ανάλυση με την μέθοδο Canonical Variate Analysis. Για κάθε μεταχείριση παρουσιάζονται οι τιμές του μέσου όρου καθώς και των τριών επαναλήψεων ενώ οι κύκλοι αποτελούν 95% όρια εμπιστοσύνης.

Ασκομύκητες, Αμμώδες έδαφος

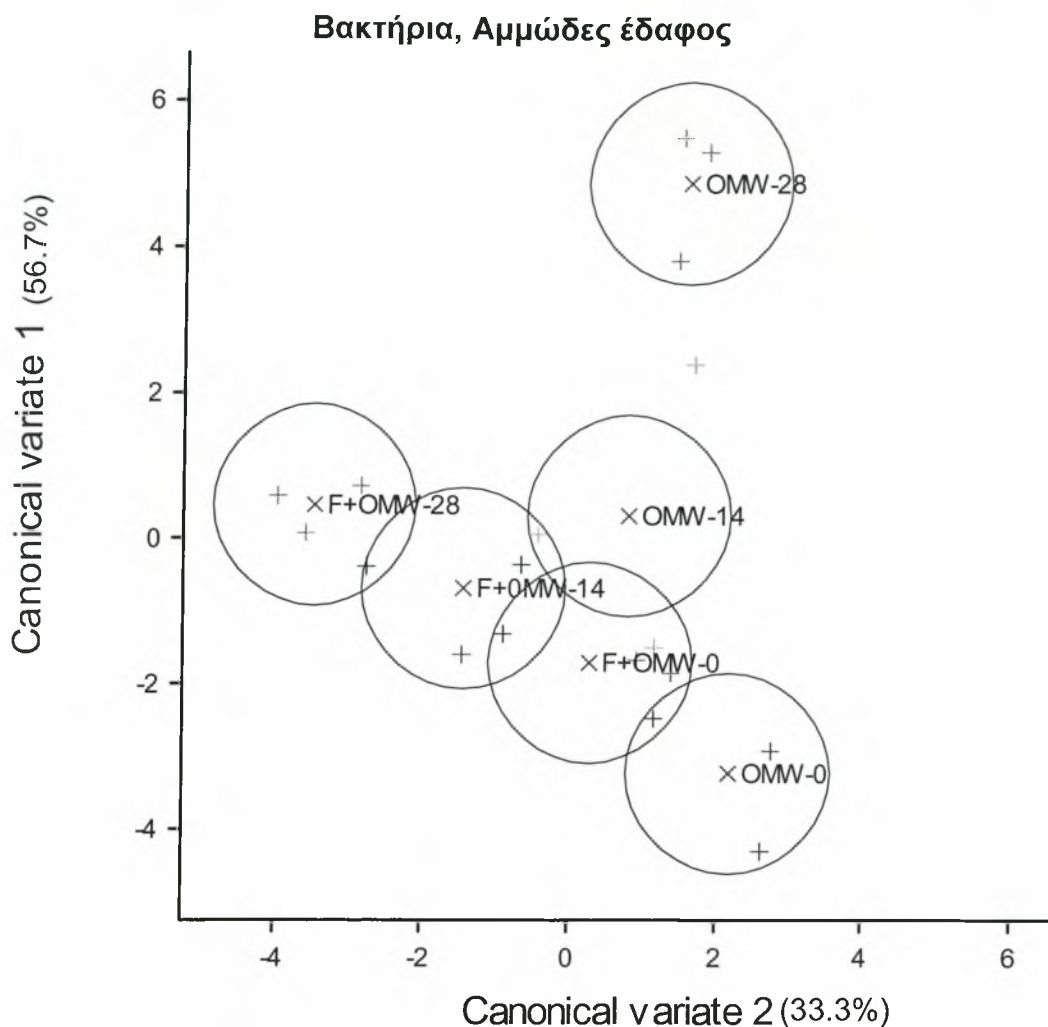


Διάγραμμα 5. Παρουσίαση των μεταβολών που επέφερε η εφαρμογή των ΥΑΕ με ή χωρίς αζωτούχο λίπανση στην μικροβιακή κοινότητα των ασκομυκήτων του αμμώδους εδάφους. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με την μέθοδο Principal Coordinate Analysis και οι πέντε πρώτοι άδηλοι παράγοντες για κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα για νέα ανάλυση με την μέθοδο Canonical Variate Analysis. Για κάθε μεταχείριση παρουσιάζονται οι τιμές του μέσου όρου καθώς και των τριών επαναλήψεων ενώ οι κύκλοι αποτελούν 95% όρια εμπιστοσύνης.

Ασκομύκητες, Πηλώδες έδαφος

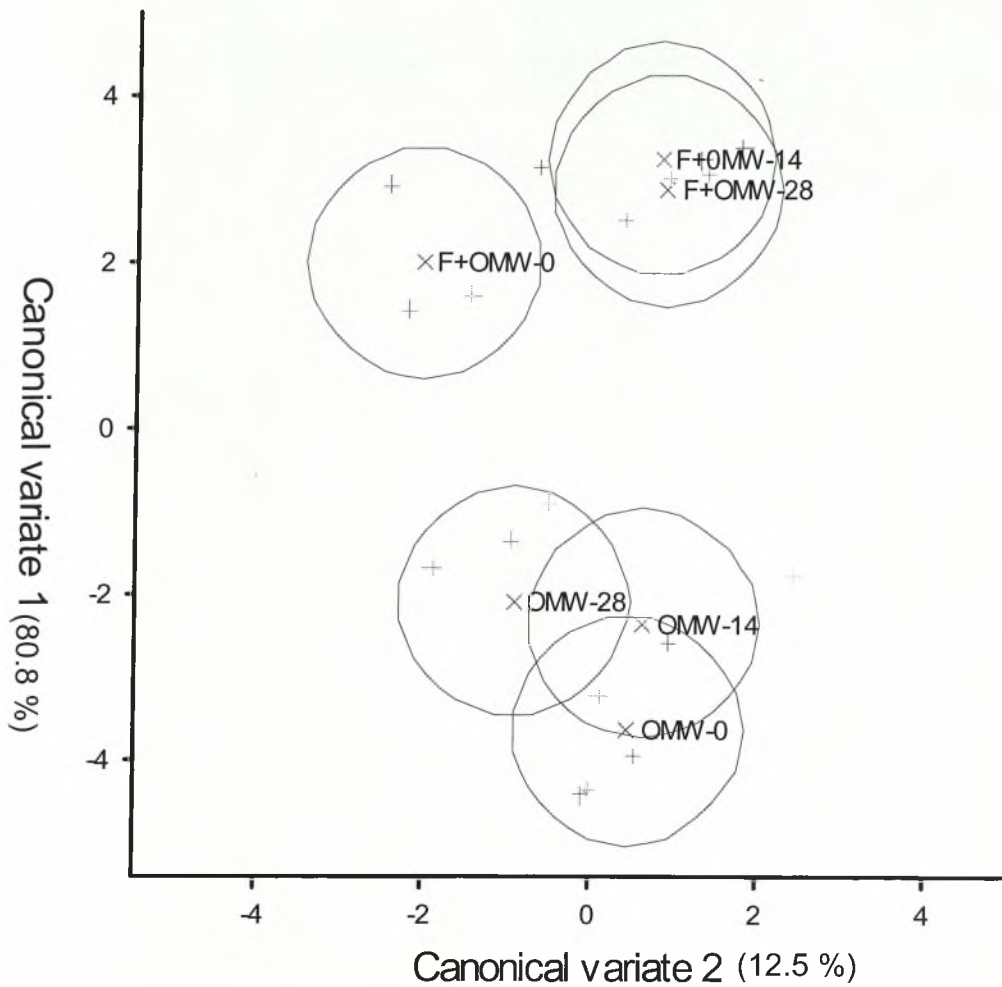


Διάγραμμα 6. Παρουσίαση των μεταβολών που επέφερε η εφαρμογή των ΥΑΕ με ή χωρίς αζωτούχο λίπανση στην μικροβιακή κοινότητα των ασκομυκήτων του πηλώδους εδάφους. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με την μέθοδο Principal Coordinate Analysis και οι πέντε πρώτοι άδηλοι παράγοντες για κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα για νέα ανάλυση με την μέθοδο Canonical Variate Analysis. Για κάθε μεταχείριση παρουσιάζονται οι τιμές του μέσου όρου καθώς και των τριών επαναλήψεων ενώ οι κύκλοι αποτελούν 95% όρια εμπιστοσύνης.



Διάγραμμα 7. Παρουσίαση των μεταβολών που επέφερε η εφαρμογή των ΥΑΕ με ή χωρίς αζωτούχο λίπανση στην μικροβιακή κοινότητα των βακτηρίων του αμμώδους εδάφους. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με την μέθοδο Principal Coordinate Analysis και οι πέντε πρώτοι άδηλοι παράγοντες για κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα για νέα ανάλυση με την μέθοδο Canonical Variate Analysis. Για κάθε μεταχείριση παρουσιάζονται οι τιμές του μέσου όρου καθώς και των τριών επαναλήψεων ενώ οι κύκλοι αποτελούν 95% όρια εμπιστοσύνης.

Βακτήρια, Πηλώδες έδαφος



Διάγραμμα 8. Παρουσίαση των μεταβολών που επέφερε η εφαρμογή των ΥΑΕ με ή χωρίς αζωτούχο λίπανση στην μικροβιακή κοινότητα των βακτηρίων του πηλώδους εδάφους. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με την μέθοδο Principal Coordinate Analysis και οι πέντε πρώτοι άδηλοι παράγοντες για κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα για νέα ανάλυση με την μέθοδο Canonical Variate Analysis. Για κάθε μεταχείριση παρουσιάζονται οι τιμές του μέσου όρου καθώς και των τριών επαναλήψεων ενώ οι κύκλοι αποτελούν 95% όρια εμπιστοσύνης.

Γενικότερα, σε όλα τα διαγράμματα οι δύο κανονικές μεταβλητές (canonical variates 1, 2) εξηγούν περισσότερο από 70% της παραλλακτικότητας των δειγμάτων. Η στατιστική επεξεργασία των πηκτών DGGE επιβεβαιώνει σε γενικές γραμμές τα πρώτα συμπεράσματα από την οπτική ανάγνωση των πηκτών. Έτσι η εφαρμογή ΥΑΕ διαφοροποίησε σε σημαντικό βαθμό την μικροβιακή κοινότητα των μυκήτων και των βασιδιομυκήτων και στο αμμώδες και στο πηλώδες έδαφος. Αντίθετα, εφαρμογή ΥΑΕ διαφοροποίησε σε μικρότερο βαθμό την κοινότητα των ασκομυκήτων σε αμμώδη και πηλώδη

εδάφη ενώ η βακτηριακή κοινότητα του πηλώδους εδάφους φαίνεται ότι δεν επηρεάστηκε ιδιαίτερα από την εφαρμογή ΥΑΕ. Μικρότερες μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα φαίνεται ότι προκάλεσε η παροχή αζωτούχου λίπανσης σε σχέση με τις αντίστοιχες επιδράσεις που προκάλεσαν τα ΥΑΕ.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Προκαταρκτική στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η μικροβιακή κοινότητα των δύο εδαφών, πηλώδους και αμμώδους εδάφους, διέφερε σε πολύ σημαντικό βαθμό και επικάλυπτε την πιθανή επίδραση των ΥΑΕ ή της επιπρόσθετης λίπανσης στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους. Κατά συνέπεια θεωρήθηκε ότι τα δεδομένα που προέκυψαν από κάθε έδαφος θα πρέπει να εξεταστούν και να αναλυθούν ξεχωριστά ώστε να επικεντρωθεί η στατιστική ανάλυση στην επιβεβαίωση ή όχι πιθανών επιδράσεων των ΥΑΕ, της αζωτούχου λίπανσης ή ο συνδυασμός αυτών των μεταχειρίσεων στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους.

Πίνακας 1. Συνοπτική παρουσίαση των επιδράσεων των ΥΑΕ στις διάφορες ομάδες τις μικροβιακής κοινότητας του εδάφους όπως προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση των δεδομένων

Ομάδες μικροοργανισμών	Αμμώδες έδαφος		Πηλώδες έδαφος	
	Διαφοροποίηση	Επίδραση Δόσης ΥΑΕ	Διαφοροποίηση	Επίδραση Δόσης ΥΑΕ
Βακτήρια	++	ΝΑΙ	-	ΟΧΙ
Μύκητες	+++	ΝΑΙ	+++	ΝΑΙ
Ασκομύκητες	+	ΟΧΙ	-	ΟΧΙ
Βασιδιομύκητες	+++	ΝΑΙ	+++	ΝΑΙ

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται συνοπτικά οι επιδράσεις των ΥΑΕ στις διάφορες ομάδες μικροοργανισμών που συμμετέχουν στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Γενικότερα η προσθήκη ΥΑΕ και στα δύο εδάφη που μελετήθηκαν οδήγησε σε σημαντικές μεταβολές της μικροβιακής κοινότητας των μυκήτων καθώς και των βασιδιομυκήτων. Οι μεταβολές αυτές ήταν δοσοεξαρτώμενες καθώς εμφανίζονταν ιδιαίτερα σημαντικές όσο το επίπεδο

των ΥΑΕ που εφαρμόζονταν αυξάνονταν. Οι βασιδιομύκητες αποτελούν σημαντική ομάδα μυκήτων που περιλαμβάνει φυτοπαθογόνα αλλά και του μύκητες λευκής σήψης οι οποίοι έχει αποδειχθεί ότι έχουν την ικανότητα να διασπούν διάφορων οργανικών ρύπων και φαινολικών ξενοβιοτικών μοριών (Bumpus et al., 1985, Reddy 1995) στα οποία είναι πλούσια τα ΥΑΕ (Sierna et al., 2007), υπό συνθήκες καταπόνησης (έλλειψης αζώτου). Αντίθετα, μικρές αλλά στατιστικώς σημαντικές επιδράσεις των ΥΑΕ παρατηρήθηκαν για μια άλλη ομάδα μυκήτων του εδάφους, τους ασκομύκητες και μόνο στο αμμώδες έδαφος ενώ καμμία επίδραση δεν παρατηρήθηκε στην κοινότητα των ασκομυκήτων στα δείγματα του πηλώδους εδάφους που δέχτηκαν ΥΑΕ σε δύο επίπεδα εφαρμογής σε σχέση με τα αντίστοιχα εδάφη μάρτυρες.

Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα για την βακτηριακή κοινότητα του εδάφους. Έτσι μικρή αλλά στατιστικώς σημαντική επίδραση των ΥΑΕ παρατηρήθηκε μόνο στο αμμώδες έδαφος όπου και η επίδραση ήταν δοσοεξαρτώμενη. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στην σύσταση της βακτηριακής κοινότητας στα πηλώδη εδάφη από την προσθήκη ΥΑΕ.

Η αυξημένη επίδραση των ΥΑΕ στην μικροβιακή κοινότητα των βακτηρίων και των ασκομυκήτων στο αμμώδες έδαφος σε σχέση με την απουσία αντίστοιχων επιδράσεων στο πηλώδες έδαφος πιθανότατα οφείλεται σε αυξημένη διαθεσιμότητα των φαινολικών συστατικών των ΥΑΕ στα αμμώδη εδάφη σε σχέση με τα αργιλώδη. Η αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών των ΥΑΕ στο αμμώδες έδαφος συνεπάγεται και μεγαλύτερη έκθεση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους στα φαινολικά και συνεπώς μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης σημαντικών μεταβολών στην σύσταση της κοινότητας των βακτηρίων και των ακτινομυκήτων.

Πίνακας 2. Συνοπτική παρουσίαση των επιδράσεων των ΥΑΕ σε συνδυασμό με αζωτούχο λίπανση στις διάφορες ομάδες της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους όπως προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση των δεδομένων

Ομάδες μικροοργανισμών	Αμμώδες έδαφος		Πηλώδες έδαφος	
	Διαφοροποίηση	Επίδραση Δόσης ΥΑΕ	Διαφοροποίηση	Επίδραση Δόσης ΥΑΕ

Βακτήρια	+	ΟΧΙ	+	ΟΧΙ
Μύκητες	++	ΟΧΙ	++	ΟΧΙ
Ασκομύκητες	+++	ΟΧΙ	+++	ΟΧΙ
Βασιδιομύκητες	++	ΟΧΙ	++	ΟΧΙ

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται συνοπτικά οι επιδράσεις των ΥΑΕ σε συνδυασμό με αζωτούχο λίπανση στις διάφορες ομάδες μικροοργανισμών της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους. Η ταυτόχρονη προσθήκη ΥΑΕ και αζωτούχου λίπανσης φαίνεται ότι αμβλύνει σημαντικά την επίδραση των ΥΑΕ στην κοινότητα των μυκήτων και των βασιδιομυκήτων που εμφανίζονται να είναι οι μικροβιακές ομάδες του εδάφους που επηρεάζονται σε μεγαλύτερο βαθμό από την προσθήκη ΥΑΕ χωρίς αζωτούχο λίπανση. Σε αντίθεση με τους βασιδιομύκητες, η συνδυασμένη προσθήκη ΥΑΕ και αζωτούχου λίπανσης φαίνεται να μεγενθύνει τις επιδράσεις των ΥΑΕ στους ασκομύκητες και αυτό παρατηρήθηκε και στα δύο εδάφη που μελετήθηκαν. Οι ασκομύκητες αποτελούν σημαντική ομάδα μυκήτων και συμπεριλαμβάνουν σημαντικό αριθμό φυτοπαθογόνων και σαπροφυτικών μυκήτων εδάφους. Η ταυτόχρονη παρουσία αζωτούχου λίπανσης σε συνδυασμό με τα ΥΑΕ στο έδαφος πιθανόν να δημιουργεί ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης για τους ασκομύκητες ώστε να μπορούν να χρησιμοποιήσουν την διαθέσιμη οργανική ύλη που παρέχεται από τα ΥΑΕ. Η προσθήκη αζωτούχου λίπανσης σε συνδυασμό με ΥΑΕ προκαλεί μικρές αλλά στατιστικά σημαντικές μεταβολές στην βακτηριακή κοινότητα του εδάφους. Σε αντίθεση με τις δόσοεξαρτώμενες επιδράσεις των ΥΑΕ στην κοινότητα των μυκήτων και των βασιδιομυκήτων, η ταυτόχρονη προσθήκη ΥΑΕ και αζωτούχου λίπανσης δεν φαίνεται να προκαλεί δόσοεξαρτώμενες επιδράσεις σε καμία από τις μικροβιακές ομάδες που μελετήθηκαν.

Η αντίδραση των μυκήτων και των βασιδιομυκήτων στην προσθήκη ΥΑΕ με ή χωρίς αζωτούχο λίπανση είναι πανομοιότυπη και αυτό μπορεί να αποδοθεί στην σημαντική συμμετοχή των βασιδιομυκήτων στην κοινότητα των μυκήτων του εδάφους που οδηγεί και σε παρόμοια εικόνα και ευρύτερα για όλους τους μύκητες του εδάφους. Αυτό δεν φαίνεται να ισχύει για τους ασκομύκητες που παρουσιάζον ακριβώς αντίθετη εικόνα σε σχέση με την προσθήκη ΥΑΕ.

Τελικά Συμπεράσματα

- Η προσθήκη ΥΑΕ τόσο σε αμμώδες όσο και σε πηλώδες έδαφος επηρεάζει συγκεκριμένες ομάδες της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας κυρίως βασιδιομύκητες που έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τα πλούσια σε φαινολικά παραπροϊόντα
- Η επίδραση σε βακτηριακούς πληθυσμούς είναι ελάχιστη και μόνο σε αμμώδες έδαφος
- Όλες οι επιδράσεις που παρατηρήθηκαν είναι δόσοεξαρτώμενες
- Η ταυτόχρονη προσθήκη αζωτούχου λίπανσης και ΥΑΕ αμβλύνει τις παρατηρούμενες με εφαρμογή ΥΑΕ επιδράσεις σε βασιδιομύκητες
- Οι ασκομύκητες αποτελούν τους πλέον επηρεάζομενους μικροοργανισμούς του εδάφους από την ταυτόχρονη παρουσία αζωτούχου λίπανσης και ΥΑΕ

Συνέχιση της μελέτης

Η παρούσα μελέτη θα ολοκληρωθεί στο άμεσο μέλλον με αναγνώριση των επιμέρους μικροοργανισμών μυκήτων, βασιδιομυκήτων και ασκομυκήτων που φαίνεται να επηρεάζονται από την προσθήκη ΥΑΕ με ή χωρίς αζωτούχο λίπανση. Αυτό θα πραγματοποιηθεί με εξαγωγή των ζωνών DNA από τις πηκτές πολυακρυλαμιδίου που φαίνεται ότι είναι χαρακτηριστικές για κάθε μεταχείριση, όπως φαίνεται ενδεικτικά στην παρακάτω φωτογραφία πηκτής. Το DNA θα υποκλωνοποιηθεί σε κατάλληλους φορείς και θα αλληλουχηθεί ώστε να πάρουμε φυλλογενετικές πληροφορίες για την ταυτότητα των μικροοργανισμών που φαίνεται να επηρεάζονται από τις μεταχειρίσεις ΥΑΕ.

Φωτογραφία 1. Πηκτή πολυακρυλαμιδίου με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 30-55% όπου διακρίνονται τα μοριακά αποτυπώματα της κοινότητας των βασιδιομυκήτων του πηλώδους εδάφους. Με τα κόκκινα τόξα σημαίνονται ζώνες DNA που διαφοροποιούνται (εμφανίζονται ή εξαφανίζονται) ανάλογα με την προσθήκη ΥΑΕ με ή χωρίς αζωτούχο λίπανσης

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bumpus JA, Tien M, Wright D, Aust SD (1985) Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* 228 , 1434-1436
- Ogram, A., Saylor, G.S and Barkay, T. (1987) The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Methods* 7, 57-66.
- Torsvik, V.L., (1980) Isolation of bacterial DNA from soil. *Soil Biol. Biochem.* 12, 15-21.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H. and Forney, L.J. (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4516-454522
- Clement, B.G., Kehl, L.E., DeBord, K.L. and Kitts, C.L. (1988) Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *J. Microbiol. Methods* 31, 135-142
- Robleto, E.A., Borneman, J., and Triplett, E.W. (1998) Effects of bacterial antibiotic production on rhizosphere microbial communities from a culture-independent perspective. *Appl Environ Microbiol* 64: 5020–5022.
- Borneman, J. (1999) Culture-independent identification of microorganisms that respond to specified stimuli. *Appl Environ Microbiol* 65: 3398–3400.
- Fisher, M.M., and Triplett, E.W. (1999) Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* 65: 4630–4636.
- Ranjard, L., Nazaret, S., Gourbiere, F., Thioulouse, J., Linet, P., and Richaume, A. (2000) A soil microscale study to reveal the heterogeneity of Hg (II) impact on indigenous bacteria by quantification of adapted phenotypes and analysis of community DNA fingerprints. *FEMS Microbiol Ecol* 31: 107–115.
- Liesac W, Weyland H, Stackebrandt E (1991) Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rRNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. *Microb Ecol* 21: 191-198]

- Muyzer G, de Waal C, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59:695-700
- Donner G, Schwarz K, Hoppe H-G and Muyzer G (1996) Profiling the succession of bacterial populations in pelagic chemoclines. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* 48: 7-14
- Reddy, CA (1995) The potential of white rot fungi in the treatment of pollutants, *Current Opinion in Biotechnology* 6, 320-328.
- Sierra J, Marti E., Garau MA, Cruanas R (2007) Effects of agronomic use of olive oil mill wastewater – Field experiment. *The Science of the Total Environment* 378, 90-94.