



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΣΤΗΝ ΣΥΣΤΑΣΗ
ΤΗΣ ΚΟΙΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΑ
ΔΙΑΦΟΡΑ ΣΤΑΔΙΑ ΚΟΜΠΟΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ
ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ**

Γαρυφαλλοπούλου Ζωή

ΛΑΡΙΣΑ 2010

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο
Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το έτος 2009-2010,
υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση του κ. Δημητρίου Καρπούζα.

Εξεταστική επιτροπή

Δημήτριος Καρπούζας, Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Αποικοδομητικών
Μικροοργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Καλλιόπη Παπαδοπούλου, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών,
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Κωνσταντίνος Οιχαλιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας και Γονιμότητας
Εδάφους, Τμήματος Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής,
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Δ. Καρπούζα για την εμπιστοσύνη, την πολύτιμη καθοδήγηση και τις συμβουλές του σε όλη τη διάρκεια της μελέτης καθώς και για την ηθική υποστήριξη που μου προσέφερε. Επίσης ευχαριστώ την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Κ. Ρουσίδου για την αμέριστη βοήθεια και υποστήριξη που μου παρείχε σε όλη την διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών αλλά και μετά. Ευχαριστώ τον κ. Κ. Δελή (Διδάσκων ΠΔ 407) για τις συμβουλές τους σε φάσεις της εργασίας, καθώς και τις υποψήφια διδάκτορα Α. Κροκυδά για την επιστημονική υποστήριξη κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους της εργασίας. Ευχαριστώ ακόμα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την καλή συνεργασία σε όλη τη διάρκεια της συνύπαρξής μας.

Θα ήταν παράληψή μου να μην ευχαριστήσω την αδερφή μου Έφη για την υποστήριξή της και την υπομονή της αυτούς τους μήνες, τον Βαγγέλη για την κατανόηση και ηθική συμπαράσταση που μου προσέφερε καθώς και τους φίλους μου. Τέλος, ευχαριστώ τους αγαπημένους μου γονείς για την αδιάκοπη ηθική και υλική υποστήριξη, καθώς και την υπομονή που μου δείχνουν όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 Κομποστοποίηση	6
1.1.1 Γενικά	6
1.1.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την κομποστοποίηση.....	7
1.1.3 Πορεία της κομποστοποίησης και ο ρόλος των μικροοργανισμών.....	11
1.1.4 Ωρίμανση του compost	13
1.1.5 Συστήματα κομποστοποίησης.....	14
1.2 Κατσίγαρος.....	15
1.3 Τεχνικές στην μικροβιακή οικολογία	18
1.4 Μεταβολές της μικροβιακής κοινότητας.....	21
1.4.1. Μεταβολές της μικροβιακής κοινότητας κατά την διάρκεια της κομποστοποίησης	21
1.4.2 Μεταβολές της μικροβιακής κοινότητας λόγω κατσίγαρου	22
1.5 Στόχος της εργασίας.....	23
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24
2.1 Περιγραφή πειράματος.....	24
2.1.1 Χειρισμός κομπόστας	24
2.1.2 Συλλογή δειγμάτων	24
2.1.3 Απομόνωση βακτηρίων.....	25
2.2 Εξαγωγή DNA από κομπόστα και βακτήρια	26
2.2.1 Εξαγωγή DNA από κομπόστα	26
2.2.2 Εξαγωγή DNA από βακτήρια	27
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	28
2.3.1 Ενίσχυση του γονιδίου <i>nifH</i> στα βακτήρια με PCR.....	31
2.3.2 Ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA στα βακτήρια με PCR	33
2.3.3 Ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA στη βακτηριακή κοινότητα των δειγμάτων compost με PCR.....	35
2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αραρόζης.....	36
2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).....	36
2.6 Ταυτοποίηση βακτηρίων.....	41
2.6.1 Καθαρισμός προϊόντος PCR (PCR Clean-up)	41
2.6.2 Ποσοτικοποίηση των δειγμάτων.....	42
2.6.3 Κλωνοποίηση DNA (Ενθεση και μετασχηματισμός).....	42
2.6.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με υλικό αποικίας (colony PCR)	45
2.6.5 Εξαγωγή πλασμιδίου από <i>E. coli</i> (plasmid-preps)	46
2.6.6 Προετοιμασία των δειγμάτων για αλληλούχιση	47
2.7 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων DGGE.....	47
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	49
3.1 Αποτελέσματα εξαγωγής DNA από κομπόστα και βακτήρια	49
3.1.1 Εξαγωγή DNA από κομπόστα	49
3.1.2 Εξαγωγή DNA από βακτήρια	49
3.2 Αποτελέσματα Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).....	50
3.2.1 Ενίσχυση του γονιδίου <i>nifH</i> στα βακτήρια με PCR.....	50
3.2.2 Ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA στα βακτήρια με PCR	50

3.2.3 Ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA στη βακτηριακή κοινότητα της κομπόστας με PCR	51
3.3. Αποτελέσματα <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)</i> και στατιστική ανάλυση	52
3.3.1 Προκαταρκτική ομαδοποίηση απομονωθέντων βακτηρίων	52
3.3.2 Αλληλούχιση επιλεγέντων βακτηρίων	54
3.3.3. Μεταβολές στην βακτηριακή κοινότητα του compost.....	58
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	62
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	66

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κομποστοποίηση είναι η ελεγχόμενη αερόβια βιολογική αποσύνθεση και σταθεροποίηση της οργανικής ύλης μέσω της μεταβολικής δραστηριότητας ορισμένων μικροοργανισμών. Το αποτέλεσμα αυτής της διεργασίας είναι ένα σταθερό, τελικό προϊόν που ονομάζεται compost. Ως υπόστρωμα της κομποστοποίησης μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλά υποπροϊόντα της γεωργίας όπως είναι τα υπολείμματα βαμβακιού. Η διαβροχή του compost κατά την διάρκεια της κομποστοποίησης με θρεπτικά στοιχεία αποτελεί συνήθη πρακτική για επιτάχυνση και βελτιστοποίηση της διαδικασίας. Ο κασίγαρος (OMW) είναι υγρό απόβλητο των ελαιουργείων του οποίου η επίδραση στην μικροβιακή κοινότητα κατά την διάρκεια της κομποστοποίησης δεν είναι πλήρως γνωστή αφού περιέχει φαινόλες οι οποίες έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες και ταυτόχρονα έχει υψηλό οργανικό και ανόργανο φορτίο το οποίο αποτελεί πηγή θρεπτικών στοιχείων για τους μικροοργανισμούς. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη των μεταβολών στην σύσταση της κοινότητας των βακτηρίων στα διάφορα στάδια κομποστοποίησης υπολειμμάτων βαμβακιού. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε πείραμα κομποστοποίησης υπολειμμάτων καλλιέργειας βαμβακιού με δύο μεταχειρίσεις όπου στην μια ακολουλούθηκε πρόγραμμα εφαρμογής κασίγαρου ενώ η άλλη μεταχείριση δέχτηκε την ίδια ποσότητα νερού. Για την ανάλυση της βακτηριακής κοινότητας του compost στα διάφορα στάδια της κομποστοποίησης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος αποτύπωσης DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Παράλληλα πραγματοποιήθηκε φυλογενετικός χαρακτηρισμός βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα διάφορα στάδια κομποστοποίησης ως αζωτοδεσμευτικά και έλεγχος της παρουσίας τους στα διάφορα στάδια της κομποστοποίησης. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων των πηκτών DGGE έδειξε ότι η βακτηριακή κοινότητα επηρεάζεται από την προσθήκη κασίγαρου αλλά ακόμα πιο πολύ έχουμε μεταβολές στην κοινότητα των βακτηρίων καθώς η κομποστοποίηση εξελίσσεται και περνάει από το ένα στάδιο στο άλλο. Τα βακτήρια που απομονώθηκαν βρέθηκε ότι ανήκουν στα γένη *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas/Xanthomonas*, *Rhizobium/Agrobacterium*, *Flavobacterium*, και *Ochrobactrum* και δεν αποτελούσαν βασικά μέλη της μικροβιακής κοινότητας κατά την διάρκεια της κομποστοποίησης.

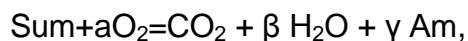
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Κομποστοποίηση

1.1.1 Γενικά

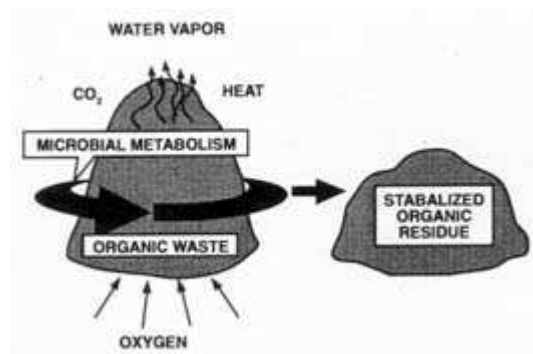
Κομποστοποίηση είναι η βιολογική αποσύνθεση και σταθεροποίηση οργανικών υποστρωμάτων, υπό συνθήκες που επιτρέπουν την ανάπτυξη θερμόφιλων θερμοκρασιών. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η παραγωγή ενός χρήσιμου, σταθερού και ώριμου τελικού προϊόντος που ονομάζεται "compost". Το compost είναι κατάλληλο για αποθήκευση και εφαρμογή στο έδαφος χωρίς δυσάρεστες επιπτώσεις για το περιβάλλον (Haug, 1986). Η κομποστοποίηση είναι η ίδια διαδικασία με την φυσική αποσύνθεση με την διαφορά ότι τα οργανικά απόβλητα εμπλουτίζονται με άλλα συστατικά για την βέλτιστη μικροβιακή ανάπτυξη. Στην κομποστοποίηση συμμετέχουν διάφοροι μικροοργανισμοί όπως είναι τα βακτήρια, οι μύκητες και τα ακτινοβακτήρια για να διασπάσουν τα οργανικά υποστρώματα σε απλούστερες ενώσεις. Οι μικροοργανισμοί απαιτούν συγκεκριμένες θρεπτικές και περιβαλλοντικές συνθήκες για να επιβιώσουν και να λειτουργήσουν. Χρειάζονται ικανοποιητικές ποσότητες θρεπτικών, οξυγόνου και νερού και αναπτύσσονται μόνο σε συγκεκριμένο εύρος θερμοκρασίας και pH.

Κάτω από αερόβιες συνθήκες η διαλυτή οργανική ουσία οξειδώνεται σε CO_2 και H_2O . Ως αποτέλεσμα αυτής της αντίδρασης, παράγεται βιομάζα. Η διαδικασία αυτή μπορεί να εκφραστεί με τον ακόλουθο γενικευμένο τύπο (Haug, 1986):



όπου Sum=οργανική ουσία και

Am=βιομάζα



Εικόνα 1.1. Κομποστοποίηση

Με την χρήση της κομποστοποίησης αποκομίζουμε σημαντικά οφέλη μερικά από τα οποία είναι:

- Μείωση των απορριμμάτων των αστικών κέντρων αφού μπορούν να κομποστοποιηθούν.
- Αποσύνθεση οργανικών υλικών.
- Παραγωγή του compost που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως λίπασμα.
- Μείωση του κινδύνου ρύπανσης στους χώρους υγειονομικής ταφής
- Μείωση του κινδύνου ρύπανσης του υπόγειου υδροφόρου ορίζοντα.

1.1.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την κομποστοποίηση

A. Πρώτη ύλη

Η πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται είναι ένας βασικός παράγοντας για την πορεία της κομποστοποίησης. Η φύση και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του αρχικού υλικού αποτελούν κριτήριο για την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου κομποστοποίησης ώστε αυτή να είναι αποτελεσματική και το τελικό προϊόν να είναι υψηλής ποιότητας. Στον πίνακα 1.1 παρουσιάζονται υλικά τα οποία είναι κατάλληλα για την διαδικασία της κομποστοποίησης.

ΠΗΓΗ ΠΡΩΤΗΣ ΥΛΗΣ	ΠΡΩΤΗ ΥΛΗ
Βιομηχανίες ξύλου	Φλοιοί δένδρων
Απορρίμματα πόλεων	Κλαδιά ,φύλλα, οργανικό κλάσμα σκουπιδιών, λάσπες βιολογικού
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,
Γεωργικές εκμεταλλεύσεις	Υπολείμματα καλλιεργειών, φύλλα, κλαδιά,
Ζωοτεχνικές μονάδες	Κοπριά ορνιθοτροφείων, χοιροστασιών,
Φυσικές πηγές	Οργανικές αποθέσεις , λιγνίτης

Πίνακας 1.1. Υλικά κατάλληλα προς κομποστοποίηση.

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 οδηγούν σε ομαλοποίηση στον χειρισμό τους και παραγωγή ασφαλούς προϊόντος.

B. Θρεπτικά συστατικά και λόγος C/N

Οι μικροοργανισμοί χρειάζονται θρεπτικά συστατικά σε μεγάλες ποσότητες. Τα κυριότερα μακρο-στοιχεία είναι ο άνθρακας (C) και το άζωτο (N) και μικρο-στοιχεία ο φώσφορος (P) και το κάλιο (K). Ο άνθρακας χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Ένα μέρος του (τα 2/3 περίπου) απελευθερώνεται ως CO₂ ενώ το υπόλοιπο μεταβολίζεται και συνδυάζεται με το άζωτο για την μικροβιακή αύξηση. Συνεπώς, κατά την διάρκεια της κομποστοποίησης ο άνθρακας συνεχώς μειώνεται. Το άζωτο χρησιμοποιείται στην σύνθεση των κυτταρικών υλικών, των αμινοξέων και των πρωτεϊνών και συνεχώς ανακυκλώνεται. Ο φώσφορος και το κάλιο συνήθως υπάρχουν σε ικανοποιητικές, ή τουλάχιστον επαρκείς ποσότητες στα περισσότερα οργανικά απόβλητα ζωικής και γεωργικής προέλευσης. Το κάλιο ωστόσο μπορεί να έχει χαμηλή συγκέντρωση στη λάσπη βιολογικών καθαρισμών, αν και σπάνια αποβαίνει περιοριστικός παράγοντας. Ελλείψεις σε μικροστοιχεία παρατηρούνται σπάνια.

Γενικά οι οργανισμοί χρειάζονται 25 φορές πιο πολύ άνθρακα από άζωτο. Γι' αυτό η παροχή του άνθρακα και του αζώτου πρέπει να είναι στην κατάλληλη αναλογία, η οποία είναι γνωστή ως 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 σωρός κομποστοποίησης 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).

Ωστόσο, σε κάποιες περιπτώσεις όπως είναι τα απόβλητα από βιομηχανίες ξύλου, όταν η τιμή του λόγου είναι 50/1 και υψηλότερη, η κομποστοποίηση είναι εξίσου αποτελεσματική (Campbell and Triperi, 1991). Συνήθως όμως όταν ο λόγος C/N υπερβαίνει το φυσιολογικό όριο και έχουμε περίσσεια άνθρακα σε σχέση με το άζωτο, η διαδικασία της κομποστοποίησης γίνεται με πιο αργούς ρυθμούς. Στην περίπτωση αυτή η διαθεσιμότητα του αζώτου είναι ο περιοριστικός παράγοντας. Οι μικροοργανισμοί απαιτούν περισσότερο χρόνο για να χρησιμοποιήσουν την περίσσεια άνθρακα όταν έχουν περιορισμένη πηγή αζώτου και χρειάζονται πολλοί βιολογικοί κύκλοι μικροοργανισμών για να μειωθεί ο λόγος C/N.

Όταν ο λόγος είναι χαμηλός (<20/1) επειδή η πρώτη ύλη είναι πλούσια σε άζωτο, τότε ο περιοριστικός παράγοντας είναι ο άνθρακας. Στην περίπτωση αυτή οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τον διαθέσιμο άνθρακα και η περίσσεια αζώτου μετατρέπεται σε αμμωνία και NH₄⁺. Αυτές οι μορφές αζώτου απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα, συσσωρεύονται στον σωρό της κομποστοποίησης σε τοξικές ποσότητες ή ελευθερώνονται από τον σωρό και ρυπαίνουν το έδαφος και τα υπόγεια υδροφόρα συστήματα. Σε κάθε περίπτωση δημιουργούν περιβαλλοντικό πρόβλημα το οποίο συνοδεύεται από δυσάρεστες οσμές αλλά και αύξηση του pH σε επίπεδα δυσμενή για την κομποστοποίηση.

Ο λόγος C/N μπορεί να αποτελέσει έναν αξιόπιστο δείκτη μέτρησης της ωριμότητας και παρακολούθησης της κομποστοποίησης. Στο ώριμο τελικό προϊόν ο λόγος C/N είναι 12/1.

C. Οξυγόνο - Αερισμός

Η κομποστοποίηση είναι μία αερόβια διεργασία. Συνεπώς, το οξυγόνο είναι απαραίτητο για την επιβίωση των αερόβιων μικροοργανισμών που συμμετέχουν σε αυτή. Η ελάχιστη συγκέντρωση οξυγόνου που απαιτείται για να διατηρούνται οι αερόβιες συνθήκες είναι 5%. 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). Η παροχή οξυγόνου στον σωρό της κομποστοποίησης επιτυγχάνεται είτε με εξωτερικό αερισμό (forced aeration) είτε με παθητικό αερισμό ανάλογα με το σύστημα κομποστοποίησης που χρησιμοποιείται. Για να είναι αποτελεσματικός ο αερισμός πρέπει τα απόβλητα να έχουν επαρκές πορώδες για τον επαρκή αερισμό του κομποστοποιήσιμου υλικού. Για το σκοπό αυτό συχνά προστίθενται διογκωτικά υλικά (άχυρο, τεμάχια ξύλου κ.α.), ιδίως όταν τα απόβλητα δεν έχουν από μόνα τους κατάλληλη δομή και πορώδες (π.χ. λάσπη βιολογικών καθαρισμών, κομμένο γρασίδι). Αν το ποσοστό υγρασίας είναι πολύ υψηλό, το νερό καταλαμβάνει το πορώδες των υλικών και ο αερισμός γίνεται δυσχερής.

Ο αερισμός επηρεάζει την μικροβιακή δραστηριότητα, τον ρυθμό διάσπασης της οργανικής ύλης και την θερμοκρασία της κομποστοποίησης (Kuter et al., 1985). Ο περιορισμένος αερισμός οδηγεί σε αναερόβιες συνθήκες ενώ ο υπέρμετρος αερισμός έχει ως αποτέλεσμα χαμηλές θερμοκρασίες που εμποδίζουν την ανάπτυξη θερμοφίλων συνθηκών που είναι και οι ιδανικές για την αποικοδόμηση της οργανικής ύλης (Ahn et al., 2007). Πολλές εργασίες έχουν πραγματοποιηθεί (Li et al., 2008, Hong et al., 1983, Rasaroor et al., 2009) με διαφορετικούς ρυθμούς αερισμού και τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο ρυθμός που θα εφαρμοσθεί κάθε φορά εξαρτάται από την φύση της πρώτης ύλης καθώς και από την μέθοδο κομποστοποίησης που χρησιμοποιείται.

D. Υγρασία

Η υγρασία είναι πολύ σημαντική στην κομποστοποίηση αφού παρέχει το μέσο για την μεταφορά των θρεπτικών στοιχείων που απαιτούνται για τις μεταβολικές και φυσιολογικές δραστηριότητες των μικροοργανισμών (Stentiford, 1996, McCartney and Tingley, 1998). Θεωρητικά, η καλύτερη σταθεροποίηση της οργανικής ύλης επιτυγχάνεται σε ποσοστό υγρασίας 90%. Στην κομποστοποίηση όμως το βέλτιστο εύρος της υγρασίας κυμαίνεται μεταξύ 40% και 60%. Η πολύ χαμηλή υγρασία προκαλεί αφυδάτωση στην κομποστοποίηση η οποία εμποδίζει την βιολογική διαδικασία με αποτέλεσμα το τελικό προϊόν να είναι φυσικά σταθερό αλλά βιολογικά ασταθές (De Bertoldi et al., 1983). Αντίθετα, η υψηλή υγρασία οδηγεί σε αναερόβιες συνθήκες επειδή ο αερισμός περιορίζεται αφού οι πόροι μεταξύ των σωματιδίων γεμίζουν νερό (Schulze, 1962, Tiquia et al., 1996).

E. Θερμοκρασία

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η θερμοκρασία είναι μία σημαντική περιβαλλοντική μεταβλητή στην διαδικασία της κομποστοποίησης και επηρεάζει τον μικροβιακό μεταβολισμό καθώς και την σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας (Palmisano and Barlaz, 1996). Καθώς οι μικροοργανισμοί αποδομούν την οργανική ύλη παράγεται θερμότητα η οποία εγκλωβίζεται στη μάζα του σωρού της κομποστοποίησης και ανεβάζει τη θερμοκρασία. Αρχικά, η αύξηση της θερμοκρασίας ευνοεί την δραστηριότητα των μικροοργανισμών, όταν όμως ξεπεράσει τους 45-50°C αρχίζει να ελαττώνεται και πάνω από τους 75°C πρακτικά μηδενίζεται. Σε θερμοκρασίες κάτω των 35°C, η διαδικασία επιβραδύνεται δραματικά, αφού επηρεάζεται αρνητικά ο μεταβολισμός των μικροοργανισμών. Συνεπώς, για να επιτευχθεί ο μέγιστος ρυθμός βιο-αποικοδόμησης των οργανικών υλικών, πρέπει να διατηρείται η θερμοκρασία σε ευνοϊκά για τους μικροοργανισμούς επίπεδα.

Οι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στην διαδικασία χωρίζονται κυρίως σε δύο κατηγορίες: μεσόφιλοι και θερμόφιλοι μικροοργανισμοί. Οι μεσόφιλοι μικροοργανισμοί επιβιώνουν μέχρι τους 45°C περίπου ενώ οι θερμόφιλοι αναπτύσσονται από τους 45°C μέχρι τους 65°C και περισσότερο. Παρόλο που η κομποστοποίηση λαμβάνει χώρα όταν επικρατούν θερμοκρασίες από 32-60°C, στην πράξη προτιμούνται θερμοκρασίες που βελτιστοποιούν την δράση των θερμόφιλων μικροοργανισμών για δύο λόγους:

- Για την επίτευξη ταχύτερης αποδόμησης.
- Για τη καταστροφή παθογόνων και ζιζανίων.

Η μεγιστοποίηση της εξυγίανσης πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες άνω των 55°C, η μεγιστοποίηση της βιοαποδόμησης επιτυγχάνεται μεταξύ 45-55°C και τέλος η μεγιστοποίηση της μικροβιακής βιοποικιλότητας πραγματοποιείται μεταξύ 35 με 40°C (Stendiford, 1996).

F. pH

Η τιμή του pH της πρώτης ύλης δεν επηρεάζει τη διαδικασία της κομποστοποίησης επειδή διαφορετικοί μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε διαφορετικά επίπεδα pH. Ουσιαστικά, το pH κάθε φορά δείχνει ποιο είδος μικροοργανισμών θα αναπτυχθεί. Τα βακτήρια προτιμούν ουδέτερο pH, οι μύκητες αρέσκονται σε τιμές μεταξύ 4 και 6 και τα ακτινοβακτήρια περιορίζουν τη δράση τους σε ελαφρά αλκαλικά περιβάλλοντα. Οι οργανικές ενώσεις που μπορούν να κομποστοποιηθούν έχουν pH από 3 έως 11 ενώ βέλτιστες τιμές είναι μεταξύ 5,5 και 8 (De Bertoldi et al., 1982). Ωστόσο, η κομποστοποίηση γίνεται και σε pH 5 ή 9 αλλά με πιο αργούς ρυθμούς. Όταν το pH ξεπερνάει το 8,5 ευνοείται η μετατροπή του αζώτου σε αμμωνία.

Στα αρχικά στάδια της κομποστοποίησης το pH είναι χαμηλό (4-5) εξαιτίας του σχηματισμού των οργανικών οξέων. Οι όξινες συνθήκες δεν ευνοούν τους αερόβιους μικροοργανισμούς και ιδιαίτερα τα βακτήρια. Γι' αυτό και η κομποστοποίηση επιβραδύνεται. Ωστόσο δεν σταματά επειδή αναπτύσσονται οι μύκητες οι οποίοι χρησιμοποιούν τα οργανικά οξέα ως υπόστρωμα και έτσι το pH αρχίζει να αυξάνεται.

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 (Stendiford, 2001).

1.1.3 Πορεία της κομποστοποίησης και ο ρόλος των μικροοργανισμών

Η διαδικασία της κομποστοποίησης είναι χωρισμένη σε δύο περιόδους: Την ενεργή φάση και την φάση της ωρίμανσης. Η ενεργή φάση είναι φάση μεγάλης μικροβιακής δραστηριότητας κατά την οποία αποδομούνται τα περισσότερα υλικά ακόμα και τα πιο ανθεκτικά όπως είναι η κυτταρίνη. Ακολουθεί η φάση ωρίμανσης η οποία χαρακτηρίζεται από ήπια μικροβιακή δραστηριότητα κατά την οποία ολοκληρώνεται η αποδόμηση των οργανικών υλικών και ωριμάζει και σταθεροποιείται το τελικό προϊόν.

Σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της κομποστοποίησης έχουν οι μικροοργανισμοί. Κατά την διάρκειά της, η θερμοκρασία του σωρού της κομποστοποίησης ποικίλει. Καθώς η θερμοκρασία αλλάζει, οι συνθήκες γίνονται ακατάλληλες για κάποιους μικροοργανισμούς και ιδανικές για άλλες κατηγορίες μικροοργανισμών. Όπως έχουμε προαναφέρει οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι οι θερμοφιλοι και οι μεσόφιλοι. Ορίζοντας τα όρια των θερμοκρασιών στις οποίες δρα η κάθε ομάδα μικροοργανισμών δεν σημαίνει πως ένας θερμοφίλος μικροοργανισμός δεν μπορεί να εντοπιστεί σε μεσόφιλο στάδιο. Απλά δεν θα έχει την βέλτιστη μεταβολική δραστηριότητα. Οι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν κυρίως είναι τα βακτήρια, οι μύκητες και τα ακτινοβακτήρια. Τα βακτήρια είναι γρήγοροι αποικοδομητές και είναι υπεύθυνοι για την αποδόμηση απλών σακχάρων καθώς και των προϊόντων από την δράση των μυκήτων. Κάποια βακτήρια μπορούν να διασπούν και την κυτταρίνη. Οι μύκητες αποδομούν πιο ανθεκτικά υλικά όπως είναι οι πρωτεΐνες, η κυτταρίνη, η πεπτίνη και άλλα. Τέλος, τα ακτινοβακτήρια έχουν μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων αφού διασπούν οργανικά οξέα, σάκχαρα, άμυλο, αμινοξέα, κελουλόζη, πολυπεπτίδια και άλλα. Οι μικροοργανισμοί εναλλάσσονται στην πορεία της κομποστοποίησης σε τρία τουλάχιστον στάδια, τα οποία παρατηρούνται σχεδόν πάντα.

A. 1^ο στάδιο

Το στάδιο αυτό διαρκεί από μία μέχρι 2-3 μέρες. Χαρακτηρίζεται από τη ανάπτυξη και δράση των μεσόφιλων μικροοργανισμών που οδηγούν σε αύξηση της θερμοκρασίας (Albrecht, 2009). Επικρατούν μεσόφιλα βακτήρια που ξεκινούν την αποδόμηση των εύκολα αποδομήσιμων ουσιών όπως είναι τα σάκχαρα, τα αμινοξέα, τα λίπη και οι υδατάνθρακες με παράλληλη παραγωγή CO₂ μέχρι η θερμοκρασία να φτάσει τους 40°C. Το γεγονός της επικράτησης των βακτηρίων, οφείλεται στους γρήγορους ρυθμούς πολλαπλασιασμού τους καθώς και στην υψηλή αρχική υγρασία του υλικού (Strom, 1985). Στο στάδιο αυτό απαιτείται αρκετός αερισμός, υγρασία και θερμότητα, ενώ το pH μειώνεται εξαιτίας του σχηματισμού των οργανικών οξέων. Όταν η θερμοκρασία φτάνει τους 45°C οι μεσόφιλοι πληθυσμοί πεθαίνουν και κυριαρχούν τα θερμοφιλα βακτήρια (Miller, 1996). Το αρχικό αυτό στάδιο είναι πολύ κρίσιμο για την εξέλιξη της κομποστοποίησης, διότι αν η θερμοκρασία δεν κατορθώσει να προσεγγίσει τα επιθυμητά όρια της μεσόφιλης-θερμόφιλης φάσης τότε το τελικό προϊόν της κομποστοποίησης θα είναι πιθανότατα ακατάλληλο για εφαρμογή.

B. 2^ο στάδιο

Στο στάδιο αυτό ενεργοποιούνται οι θερμοφιλοι μικροοργανισμοί οι οποίοι προτιμούν θερμοκρασίες μεταξύ 45 και 70°C ενώ η ανάπτυξη και η δράση των μη θερμοφιλων βακτηρίων διακόπτεται. Η έντονη μεταβολική δραστηριότητα αυτών των μικροοργανισμών υποστηρίζει την σημαντική αύξηση της θερμοκρασίας, που είναι απαραίτητη για την εξουδετέρωση των παθογόνων και των ζιζανίων. Επίσης η ποικιλομορφία του θερμοφιλου πληθυσμού επιτρέπει την αποδόμηση μεγάλου εύρους υλικών από πολύ απλά έως και πιο πολύπλοκα και ανθεκτικά, όπως είναι η κυτταρίνη.

Κατά το στάδιο αυτό οι κυρίαρχοι πληθυσμοί είναι οι μύκητες οι οποίοι είναι ικανοί να διασπούν πολυπλοκότερες ουσίες, όπως πολυσακχαρίτες. Επίσης απαντώνται και ορισμένα είδη ακτινοβακτηρίων καθώς και ορισμένα είδη βακτηρίων που αναπτύσσονται σε θερμοφιλα επίπεδα, τα οποία έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν την κυτταρίνη ως πηγή άνθρακα. Σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες έχει απομονωθεί και ταυτοποιηθεί το γένος *Thermus thermophilus* (Beffa et al., 1996). 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 και γίνεται αλκαλικό, 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 παρατηρείται και απελευθέρωση NH₃, λόγω περίσσειας N. Όταν η θερμοκρασία είναι πάρα πολύ υψηλή, η μικροβιακή δραστηριότητα ελαττώνεται λόγω της εξάντλησης των αποδομήσιμων υλικών και του οξυγόνου ή λόγω της εξαιρετικά υψηλής θερμοκρασίας που είναι επιζήμια για την λειτουργία τους.

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 ημέρες μέχρι μήνες, ενώ κριτήριο λήξης της παρούσας φάσης αποτελεί η βαθμιαία μείωση της θερμοκρασίας.

C. 3^ο στάδιο

Στο στάδιο αυτό καθώς μειώνεται η μικροβιακή δραστηριότητα, μειώνεται και η θερμοκρασία. Η δράση των θερμοφιλων μικροοργανισμών σταματάει και τη θέση τους παίρνουν άλλοι μικροοργανισμοί που είναι πιο μεσόφιλοι και οι οποίοι συνεχίζουν την αποδόμηση με πιο αργούς ρυθμούς σε υλικά που δεν διασπάρθηκαν στα προηγούμενα στάδια. Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι κυρίως ακτινοβακτήρια που αποσυνθέτουν κυτταρίνη και μεσόφιλοι λιγνινολυτικοί μύκητες. Ο πληθυσμός των ακτινοβακτηρίων και των σαπροφυτικών μυκήτων είναι πολύ μεγάλος που δίνει στην επιφάνεια του compost λευκό χρώμα καθιστώντας τους ορατούς με γυμνό μάτι (Epstein, 1997, Tiquiq et al., 2002). Τα γένη των ακτινοβακτηρίων που έχουν ταυτοποιηθεί σε compost είναι *Streptomyces* sp., *Thermomonospora* sp., *Thermoactinomyces vulgaris* (Tuomela et al., 2000). Οι λόγοι που δικαιολογούν την εγκατάσταση μυκήτων και ακτινοβακτηρίων στην φάση αυτή

είναι το γεγονός ότι οι οργανισμοί αυτοί είναι λιγότερο απαιτητικοί σε υγρασία, προτιμούν το ουδέτερο έως αλκαλικό pH.

Η ενέργεια που παράγεται από τη μικροβιακή δραστηριότητα είναι περιορισμένη 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 (Cray et al., 1971). Η υγρασία κατά το στάδιο αυτό βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό τους σε χαμηλούς πληθυσμούς. Μετά το θερμοφιλό στάδιο έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί τα γένη των βακτηρίων *Pseudomonas* και *Xanthomonas* (Peters et al., 2000).

Καθώς η θερμοκρασία πέφτει κάτω από τους 35⁰C, οι ενώσεις που δεν έχουν ήδη διασπαστεί εμφανίζουν μια αντοχή στην αποσύνθεση, ενώ κυριαρχούν οι μύκητες με την ικανότητα τους να αποδομούν τις υπολειμματικές ενώσεις. Η συνολική μικροβιακή δραστηριότητα μειώνεται σταδιακά με πολύ αργούς ρυθμούς, όταν οι ενώσεις που απομένουν είναι ανθεκτικές στην αποσύνθεση.

1.1.4 Ωρίμανση του compost

Στο στάδιο αυτό συμβαίνουν περίπλοκες αντιδράσεις συμπύκνωσης και πολυμερισμού. Το τελικό προϊόν, το compost αποτελείται από ένα σταθεροποιημένο οργανικό υπόλειμμα, παρόμοιο με τα χουμικά υλικά του εδάφους, που σχηματίζονται στη φύση από ζωικά και φυτικά υπολείμματα με ανάλογη βιολογική διαδικασία. Πρέπει να είναι απαλλαγμένο από οσμές που σχετίζονται με σήψη και αποσύνθεση, η οσμή του θα πρέπει να είναι γαιώδης δηλαδή να έχει την χαρακτηριστική οσμή του εδάφους. Το χρώμα του πρέπει να είναι σκούρο καφέ έως και μαύρο.

Όσον αφορά τα χημικά του χαρακτηριστικά, έχει υγρασία περίπου 30-50% και pH 6-8. Στην φάση αυτή η μικροβιακή δραστηριότητα βρίσκεται σε πολύ χαμηλό επίπεδο και είναι υπεύθυνη για την σταθεροποίηση του προϊόντος. Η σταθεροποίηση περιλαμβάνει την περαιτέρω αποδόμηση των οργανικών οξέων και των ανθεκτικών υλικών και τον σχηματισμό των χουμικών ενώσεων.

Το υλικό στη φάση αυτή δεν μπορεί να ακολουθήσει έναν ακόμα θερμοφιλό κύκλο, δηλαδή να "ξανανεβάσει" θερμοκρασία, λόγω της απουσίας οργανικής ύλης. Έχει παρατηρηθεί ότι μετά την θερμοφιλή φάση της κομποστοποίησης δεν συμβαίνουν περαιτέρω απώλειες αζώτου (Adani et al., 1995). Επίσης στη φάση αυτή παρατηρείται αύξηση των αρωματικών ενώσεων και μείωση του λόγου C/N.

Για κάθε compost ξεχωριστά έχει θεσπιστεί μία σειρά από χαρακτηριστικά που θα πρέπει να πληρούνται ώστε να θεωρείται έτοιμο για χρήση (Barth et al., 2000). Το compost πρέπει να είναι ώριμο και σταθερό. Οι όροι ωρίμανση και σταθερότητα περιγράφουν τον βαθμό αποδόμησης και μετατροπής των οργανικών υλικών σε compost (Zmora-Nahum et al., 2005), αν και αναφέρονται σε διαφορετικές ιδιότητες του compost. Η σταθερότητα σχετίζεται με τον ρυθμό της μικροβιακής δραστηριότητας στο compost και υπολογίζεται μελετώντας την αλλαγή των χημικών χαρακτηριστικών του

compost (Pichler and Ko"gel-Knabner, 2000). Η ωρίμανση σχετίζεται με τον βαθμό αποδόμησης των φυτοτοξικών οργανικών υλικών και την απουσία των παθογόνων και των ζιζανίων (Wu et al., 2000). Και οι δύο ιδιότητες είναι σημαντικές για την ποιότητα και την αγοραστική δύναμη του τελικού προϊόντος.

1.1.5 Συστήματα κομποστοποίησης

Υπάρχουν διάφορα συστήματα κομποστοποίησης από τα οποία τα πιο διαδεδομένα είναι τα συστήματα ανοιχτού τύπου και συστήματα κλειστού τύπου. Η επιλογή του συστήματος είναι πολύ σημαντική γιατί επηρεάζει την πορεία της κομποστοποίησης καθώς και την ποιότητα του compost.

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

- Από τη φύση και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της πρώτης ύλης που θα υποστεί κομποστοποίηση.
- Από το αν η πρώτη ύλη είναι διαθέσιμη όλο το χρόνο ή εποχιακά.
- Από τη απόσταση του σημείου παραγωγής της πρώτης ύλης και του τόπου επεξεργασίας της.
- Από την επιλογή της τοποθεσίας εγκατάστασης της μονάδας κομποστοποίησης (κατοικημένη περιοχή ή όχι).
- Από το δίκτυο διανομής του τελικού προϊόντος.
- Από τα κριτήρια ποιότητας του τελικού προϊόντος που έχει θεσπίσει ο σχετικός φορέας του κράτους.
- Από το οικονομικό κέρδος της όλης διαδικασίας.
- Από το ύψος του κεφαλαίου που είναι διαθέσιμο για αγορά εξοπλισμού και κάλυψη αναγκών σε ανθρώπινο δυναμικό.

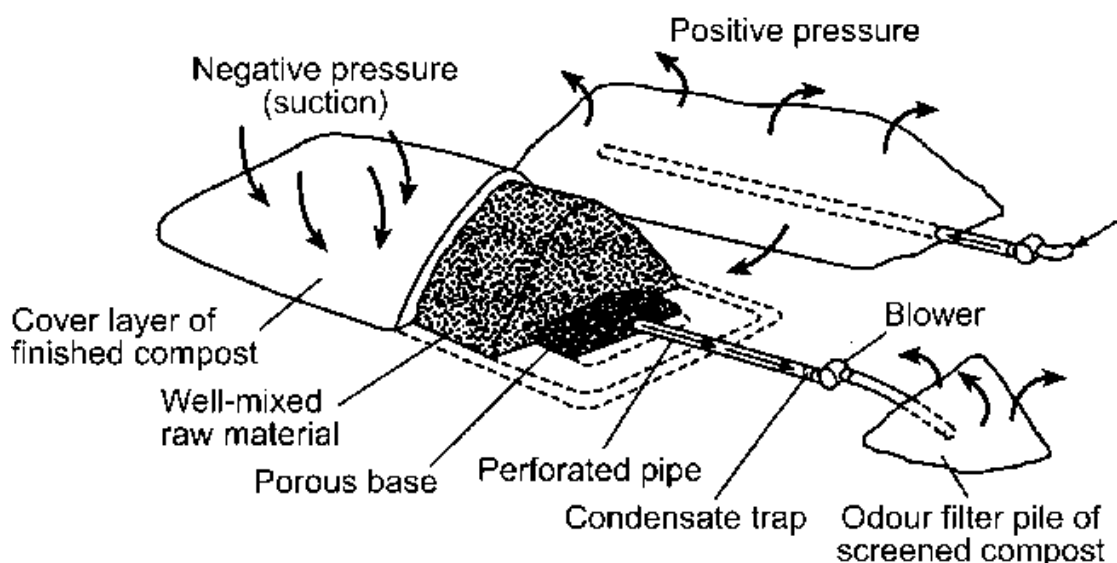
A. Ανοιχτά συστήματα

Τα ανοιχτά συστήματα κομποστοποίησης ανάλογα με το σύστημα αερισμού του υποστρώματος χωρίζονται σε στατικά συστήματα με δυναμικές συνθήκες αερισμού (aerated static piles) και σε αναδευόμενα συστήματα χωρίς δυναμικό αερισμό (windrows).

Στα στατικά συστήματα με δυναμικές συνθήκες αερισμού, δεν χρησιμοποιείται καμία μέθοδος ανάδευσης ή αναστροφής του υλικού. Ο αερισμός του υποστρώματος γίνεται με εισαγωγή ή αναρόφηση αέρα. Ο χρόνος παραμονής εξαρτάται από τη σύσταση του υποστρώματος αλλά και από την ένταση του αερισμού του. Συνήθως απαιτείται χρόνος 7 – 8 εβδομάδων.

Στα αναδευόμενα συστήματα χωρίς δυναμικό αερισμό, πραγματοποιείται τακτική ανάδευση του υποστρώματος, συνήθως με μηχανικό εξοπλισμό. Το οξυγόνο παρέχεται αρχικά από το φυσικό αερισμό σαν αποτέλεσμα του φαινομένου της καμινάδας δηλαδή της ανοδικής κίνησης του θερμού αέρα από το εσωτερικό του σωρού και αντικατάστασης του με ψυχρότερο από τα πλάγια, καθώς και από την ανταλλαγή των αερίων κατά τη διάρκεια της αναστροφής. Ο χρόνος παραμονής κυμαίνεται ανάλογα με τη σύσταση των

κομποστοποιήσιμων υλικών από 2 έως 6 μήνες. Χρησιμοποιείται για μεγάλο εύρος ποικιλίας οργανικών απορριμμάτων και αποτελεί μια χαμηλή σε κόστος μέθοδο.



Εικόνα 1.2. Σύστημα κομποστοποίησης με δυναμικές συνθήκες αερισμού.

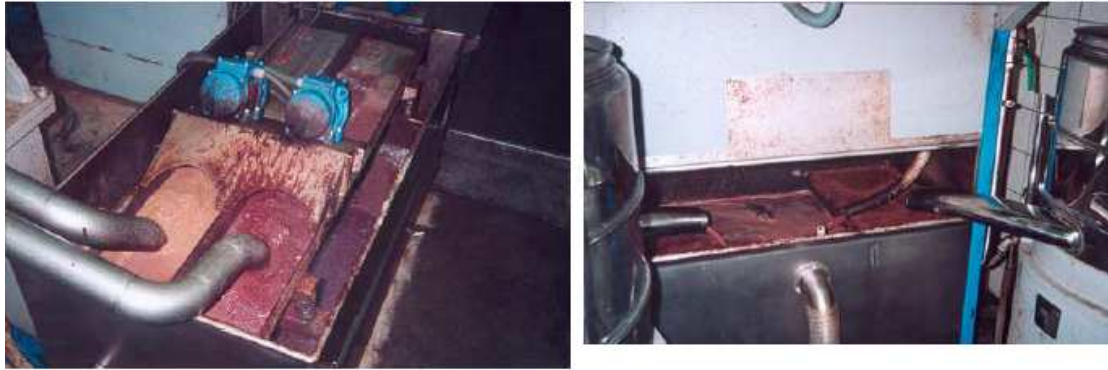
B. Κλειστά συστήματα

Τα κλειστά συστήματα ταξινομούνται ανάλογα με τον τρόπο που η προς κομποστοποίηση πρώτη ύλη μεταφέρεται στον αντιδραστήρα σε κάθετους και οριζόντιους αντιδραστήρες με αερισμό ή ανάδευση του υλικού. Σε αυτά τα συστήματα το υλικό κομποστοποιείται υπό πλήρως ελεγχόμενες συνθήκες αερισμού, θερμοκρασίες και υγρασίας. Το πλεονέκτημα τους είναι ότι μπορούν να μειώσουν τις περιβαλλοντικές οχλήσεις, όπως τη δυσάρεστη οσμή.

Αυτά τα συστήματα σπανίως χρησιμοποιούνται λόγω του κόστους λειτουργίας του εργοστασίου αλλά και της συντήρησης του, καθώς απαιτείται υψηλή τεχνολογία με μεγάλη πολυπλοκότητα.

1.2 Κασίγαρος

Στις Μεσογειακές χώρες παράγονται τεράστιες ποσότητες ελαιόλαδου κατά την περίοδο Οκτωβρίου – Δεκεμβρίου. Ταυτόχρονα, παράγονται μεγάλες ποσότητες ($3 \cdot 10^7 \text{ m}^3/\text{έτος}$) υγρών αποβλήτων που ονομάζονται κασίγαρος (olive-mill wastewater, OMW). Ο κασίγαρος παράγεται από ελαιουργεία που χρησιμοποιούν φυγοκεντρικούς διαχωριστήρες τριών φάσεων και περιέχει πολύ ελαιόλαδο, φυτικά υγρά του καρπού της ελιάς και νερό που έχει χρησιμοποιηθεί σε διαφορετικά στάδια της βιομηχανικής διαδικασίας (Paredes et al. 1999).



Εικόνα 1.3 . Υγρά απόβλητα ελαιουργείων (κασίγαρος)

Ο κασίγαρος έχει χρώμα σκούρο κόκκινο έως μαύρο που εξαρτάται από την ηλικία και τον τύπο του ελαιολάδου (Jaouani et al., 2003), είναι όξινος (pH 4-5), έχει υψηλό οργανικό φορτίο με μεγάλες συγκεντρώσεις αρωματικών ενώσεων (D'Annibale et al., 2004), λιπαρά οξέα, πηκτίνες, ταννίνες, σάκχαρα και πολυφαινόλες (Jaouani et al., 2003). Επίσης περιέχει υψηλή συγκέντρωση αλάτων καθώς και αξιοσημείωτα επίπεδα αζώτου, φωσφόρου, ασβεστίου, μαγνησίου και σιδήρου (Paredes et al. 1999). Στον πίνακα 1.2 παρουσιάζεται μια γενική σύσταση του κασίγαρου.

Νερό	83,2%	{ λιπαρές ουσίες, πρωτεΐνες, σάκχαρα, πολυαλκοόλες, φαινολικές ουσίες, πολυσακχαρίδια, ταννίνες, πηκτίνες
Οργανική ύλη	15%	
Ανόργανα συστατικά	1,8%	νάτριο, άζωτο, φώσφορος, μαγνήσιο

Πίνακας 1.2. Χημική σύσταση του κασίγαρου (Fiestas Ros de Ursions and Borja Padilla, 1992)

Η παρουσία μεγάλου αριθμού ενώσεων όπως οι πολυφαινόλες, που έχουν φυτοτοξικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες (Paredes et al., 1999), τον καθιστούν ως υγρό απόβλητο με πιθανά σημαντικές αρνητικές επιδράσεις στον άνθρωπο και στο περιβάλλον. Παλαιότερα, ο κασίγαρος μετά από σύντομη επεξεργασία απορρίπτονταν σε παρακείμενα υδροφόρα συστήματα. Η ανεξέλεγκτη απόρριψη αυτών των αποβλήτων στα υδροφόρα συστήματα οδήγησαν σε διάφορα προβλήματα με τελικό αποτέλεσμα την απαγόρευση της απόρριψης των αποβλήτων στα υδροφόρα συστήματα (Garcia-Barrionuevo et al., 1992).

Σήμερα, η κύρια πρακτική που ακολουθείται από την πλειονότητα των ελαιουργείων όσον αφορά την διαχείριση του κασίγαρου είναι η διοχέτευση και αποθήκευση του σε λεκάνες εξάτμισης. Παρόλα αυτά η εφαρμογή των λεκανών εξάτμισης δεν αποτελεί την ενδεδειγμένη λύση όσον αφορά την διαχείριση του κασίγαρου με κύριο κριτήριο την προστασία του φυσικού περιβάλλοντος. Τα σημαντικότερα προβλήματα που προκύπτουν από την εφαρμογή της συγκεκριμένης πρακτικής είναι:

- ο η αλλοίωση των ποιοτικών χαρακτηριστικών των υπόγειων υδάτων λόγω έκπλυσης του κασίγαρου στις περιπτώσεις όπου δεν έχει πραγματοποιηθεί στεγανοποίηση του πυθμένα των λεκανών
- ο οι οχλήσεις που δημιουργούνται σε σημαντική ακτίνα περιμετρικά των λεκανών εξάτμισης λόγω της έκλυσης έντονα δυσάρεστων οσμών
- ο η αισθητική υποβάθμιση της ευρύτερης της λεκάνης περιοχής.



Εικόνα 1.4. Λεκάνες εξάτμισης

Ωστόσο δεν είναι μόνο αρνητικές οι συνέπειες του κασίγαρου. Το υψηλό οργανικό φορτίο και τα ανόργανα συστατικά που περιέχει καθιστούν τον κασίγαρο ενδιαφέρον για την χρήση του στην υδρολίπανση αγροτικών εδάφων (Cegarra et al., 1996), ιδιαίτερα στις χώρες της νότιας Μεσογείου που χαρακτηρίζονται από έλλειψη νερού και εδάφη φτωχά σε οργανική ύλη. Η ασφαλής χρήση του κασίγαρου ως πηγή νερού και θρεπτικών αρχικά απαιτεί μεταχειρίσεις οι οποίες θα μειώσουν την φυτοτοξική και αντιμικροβιακή του δράση δηλαδή την απομάκρυνση των πολυφαινολών οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε καθαρή μορφή στην παραγωγή καλλυντικών, φαρμάκων, συμπληρωμάτων διατροφής. Συμβατικές χημικές και βιολογικές μέθοδοι επεξεργασίας αποβλήτων παρουσίασαν τεχνικές και οικονομικές δυσκολίες (Flouri et al., 1996) και δεν ήταν αρκετά αποτελεσματικές.

Μία μέθοδος επεξεργασίας του κασίγαρου είναι η κομποστοποίηση. Η εφαρμογή της κομποστοποίησης στον κασίγαρο μαζί με άλλα απόβλητα όπως είναι τα υπολείμματα βαμβακιού και άλλα θα μπορούσε να μετατρέψει τον κασίγαρο σε ένα φυσικό εδαφοβελτιωτικό για την γεωργία. Οι Hachicha et al., (2009) μελέτησαν την κομποστοποίηση κασίγαρου μαζί με φλούδες από σουσάμι και στις μετρήσεις τους είδαν ότι το τελικό προϊόν είχε ιδιότητες ενός καλού εδαφοβελτιωτικού με αναλογία C/N μέχρι και 18,8, ενώ ήταν πλούσιο σε χουμικά οξέα. Επίσης είχαν μειωθεί οι πολυφαινόλες άρα και η φυτοτοξικότητα (Hachicha et al., 2009).

1.3 Τεχνικές στην μικροβιακή οικολογία

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της σύστασης της μικροβιακής κοινότητας σε περιβαλλοντικά δείγματα μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες:

- i. Τεχνικές βασιζόμενες στην καλλιέργεια σε μέσα ανάπτυξης ή βιοχημικές τεχνικές
- ii. Τεχνικές μη βασιζόμενες στην καλλιέργεια μικροοργανισμών ή τεχνικές μοριακής αποτύπωσης.

A. Τεχνικές βασιζόμενες στην καλλιέργεια σε μέσα ανάπτυξης ή βιοχημικές τεχνικές

Οι παραδοσιακές μέθοδοι για τον υπολογισμό της μικροβιακής ποικιλότητας συμπεριλαμβάνουν την καλλιέργεια μικροοργανισμών σε τρυβλία με εκλεκτικό θρεπτικό μέσο και η καταμέτρηση των αποικιών ή χρήση μικροσκοπίου για την καταμέτρηση και αναγνώριση μικροοργανισμών. Και οι δύο μέθοδοι παρέχουν μεγάλη ευαισθησία στην αναγνώριση μικροοργανισμών και χρησιμοποιήθηκαν ευρέως σε πολλές εργασίες (Elmholt et al. 1999, Cho et al, 2001, Cabello and Arambarri 2002). Επίσης, είναι απλές μέθοδοι, με χαμηλό κόστος και ευκολία στον χειρισμό. Ωστόσο οι παραπάνω τεχνικές δεν παρουσιάζουν την αληθινή εικόνα μιας μικροβιακής κοινότητας, αφού οι περισσότεροι μικροοργανισμοί δεν καλλιεργούνται. Σύμφωνα με νέες εκτιμήσεις μόνο το 1-5% των μικροοργανισμών που υπάρχουν μπορούν να καλλιεργηθούν στα γνωστά μέχρι σήμερα θρεπτικά μέσα (Torvsik and Ovreas, 2002).

Phospholipid Fatty Acid (PLFA) Analysis

Η ανάλυση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών είναι μία βιοχημική μέθοδος που δε βασίζεται σε καλλιέργεια μικροοργανισμών. Τα φωσφολιπίδια αποτελούν συστατικό των μεμβρανών όλων των οργανισμών και κάθε ομάδα μικροοργανισμών έχει ένα χαρακτηριστικό αποτύπωμα φωσφολιπιδίων. Συνεπώς μία αλλαγή στο αποτύπωμα των φωσφολιπιδίων αντιπροσωπεύει αλλαγή στην μικροβιακή κοινότητα. Στην οικολογία του εδάφους, τα φωσφολιπίδια αρχικά χρησιμοποιούνταν στην ταυτοποίηση απομονωμένων μικροοργανισμών, ενώ τώρα έχουν ευρεία εφαρμογή στις μελέτες μικροβιακών κοινοτήτων σε περιβαλλοντικά υποστρώματα (έδαφος, ιζήματα). Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην παρακάτω αρχή: Τα λιπαρά οξέα απομονώνονται από την μεμβράνη των μικροοργανισμών με εκχύλιση (Blight and Dyer, 1959) με μίγμα χλωροφορμίου, μεθανόλης και ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού ή φωσφορικού οξέος. Στη συνέχεια αυτά τα λιπίδια διαχωρίζονται σε ουδέτερα λιπίδια, γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια μέσω μίας στήλης ανταλλαγής. Τα φωσφολιπίδια μετατρέπονται στους αντίστοιχους μεθυλικούς εστέρες οι οποίοι μπορούν να προσδιοριστούν ποιοτικά και ποσοτικά με αέρια χρωματογραφία. Η ανάλυση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων έχει χρησιμοποιηθεί για την μελέτη των επιδράσεων πολλών παραγόντων στις μικροβιακές κοινότητες του εδάφους όπως του pH (Bååth and Anderson 2003, Bååth et al. 1995), των βαρέων μετάλλων (Frostegård et al. 1993b,

Kandeler et al., 2000) ή μεταχειρίσεων του εδάφους (Marschner et al. 2003, Zelles et al. 1995).

B. Τεχνικές μη βασιζόμενες σε καλλιέργεια μικροοργανισμών ή τεχνικές μοριακής αποτύπωσης

Η ανάπτυξη τεχνικών που δεν βασίζονται στην καλλιέργεια μικροοργανισμών πρόσφερε νέες δυνατότητες στην ανάλυση των μικροβιακών κοινοτήτων. Σ' αυτές συμπεριλαμβάνονται:

- η ανάλυση πολυμορφισμών μήκους ακραίων τμημάτων περιορισμού (**T-RFLP**, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)
- η μέθοδος **RISA** (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)
- η μέθοδος **ARISA** (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)
- η μέθοδος αποτύπωσης DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (**DGGE**, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
- η μέθοδος αποτύπωσης DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση θερμοκρασίας (**TGGE**, Temperature Gradient Gel Electrophoresis)

Η ανάλυση πολυμορφισμών μήκους ακραίων τμημάτων περιορισμού (**T-RFLP**) είναι μία ποσοτική μοριακή τεχνική που αναπτύχθηκε για την γρήγορη ανάλυση της ποικιλομορφίας των μικροβιακών κοινοτήτων σε διάφορα οικοσυστήματα και βασίζεται στον πολυμορφισμό του DNA. Η τεχνική περιλαμβάνει ενίσχυση με PCR κατά την οποία ο ένας από τους δύο εκκινητές είναι σημασμένος με φθορίζουσα χρωστική (π.χ. TET, 6-FAM) στο 5' άκρο. Στη συνέχεια ακολουθεί πέψη με ένζυμα περιορισμού. Από την πέψη παράγονται τμήματα διαφορετικού μεγέθους τα οποία διαχωρίζονται σε συσκευή πολυκάναλου τριχοειδή αναλυτή αλληλουχιών (multichannel capillary sequencer) όπου ανιχνεύονται μόνο τα σημασμένα ακραία τμήματα περιορισμού και το ηλεκτροφοριογράφημα που προκύπτει αποτελεί το αποτύπωμα της μικροβιακής κοινότητας και αναλύεται με ειδικά προγράμματα (GeneMapper). Το πρότυπο των ζωνών (κορυφές στο ηλεκτροφοριογράφημα) παρέχει πληροφορίες για την 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 (Liu et al., 1997, Clement et al., 1998).

Η μέθοδος **RISA** είναι μία τεχνική ανάλυσης μικροβιακών κοινοτήτων με την οποία εκτιμάται η μικροβιακή ποικιλότητα και σύσταση. Έχει χρησιμοποιηθεί σε μελέτες στο έδαφος (Borneman and Triplett, 1997) και πιο πρόσφατα στην ριζόσφαιρα (Robledo et al., 1998) και στο θαλάσσιο περιβάλλον (Acinas et al., 1999). Αρχικά, ενισχύεται με PCR η περιοχή μεταξύ της μικρής (16S) και της μεγάλης (23S) ριβοσωμικής υπομονάδας. Η περιοχή 16S-23S εμφανίζει εξαιρετική ετερογένεια στο μήκος και στην νουκλεοτιδική αλληλουχία. Η μέθοδος RISA βασίζεται στην ετερογένεια του μήκους. Στην συνέχεια, το ενισχυμένο προϊόν ηλεκτροφορείται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και οι ζώνες γίνονται ορατές με χρωστική αργύρου. Το αποτέλεσμα είναι ένα πρότυπο ζωνών νουκλεϊκών οξέων όπου κάθε ζώνη αντιπροσωπεύει τουλάχιστον έναν οργανισμό. Αν και η μέθοδος RISA είναι αρκετά ικανοποιητική στην ανάλυση μικροβιακών κοινοτήτων, ωστόσο είναι αρκετά χρονοβόρα, απαιτεί μεγάλες ποσότητες DNA και η ανάλυση τείνει να είναι χαμηλή (Fisher and Triplett, 1999).

Οι περιορισμοί αυτοί έκαναν αναγκαία την ανάπτυξη μιας νέας μεθόδου που ονομάζεται **ARISA**. Η τεχνική αυτή βασίζεται στις ίδιες αρχές με την RISA. Η διαφορά τους είναι ότι κατά την ενίσχυση του DNA χρησιμοποιούνται σημασμένοι εκκινητές με φθορίζουσα χρωστική. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται με ένα αυτοματοποιημένο σύστημα το οποίο ανιχνεύει τα σημασμένα κομμάτια DNA. Η μέθοδος ARISA είναι μία γρήγορη και αποτελεσματική τεχνική με μεγάλη ευαισθησία γι' αυτό χρειάζεται και μικρότερη ποσότητα DNA. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον υπολογισμό της ποικιλομορφίας καθώς και της σύστασης μιας μικροβιακής κοινότητας (Fisher and Triplett, 1999).

Η μέθοδος αποτύπωσης DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (**DGGE**) αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τον Muyzer et al. (1993) και χρησιμοποιείται για την απεικόνιση μικροβιακών πληθυσμών από έδαφος (Ovreas et al., 1998), από απόβλητα για την απομάκρυνση των φαινολών (Whiteley et al., 2000), καθώς και σε άλλες περιπτώσεις. Επίσης η ανάλυση με την μέθοδο DGGE μπορεί να εστιάσει σε ένα μόνο μέρος μιας μικροβιακής κοινότητας χρησιμοποιώντας εκκινητές με εξειδίκευση για την ενίσχυση περιοχών του ριβοσωμικού RNA συγκεκριμένων ομάδων μικροοργανισμών όπως βασιδιομύκητες, ασκομύκητες, νιτροποιητικά βακτήρια και αρχαία, ακτινοβακτήρια καθώς και γένη βακτηρίων όπως *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Sphingomonas*.

Η τεχνική DGGE βασίζεται στο γεγονός ότι ένα μερικώς αποδιατεταγμένο μόριο DNA μεταναστεύει στην πηκτή πιο αργά από το πλήρως δίκλωνο μόριο. Αυτό οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ του μονόκλωνου DNA και της πηκτής. Αντίθετα το δίκλωνο DNA περνάει πιο εύκολα μέσα από την πηκτή. Η πηκτή του DGGE περιέχει αποδιατακτικές ουσίες (φορμαμίδη και ουρία) με την διαβάθμιση να αυξάνεται σταδιακά από την κορυφή προς τον πυθμένα της πηκτής. Όταν εισέλθει στην πηκτή ένα δίκλωνο DNA, ανάλογα με το ποσοστό %GC (όσο περισσότερους δεσμούς ανάμεσα σε γουανίνη και κυτοσίνη έχει τόσο πιο δύσκολα αποδιατάσσεται) που περιέχει θα αρχίσει να αποδιατάσσεται, οι δύο κλώνοι διαχωρίζονται και η μετανάστευση του μορίου γίνεται πιο αργή. Το σημείο στο οποίο το μόριο σταματάει να κινείται είναι το αποτύπωμα του

συγκεκριμένου μικροοργανισμού. Πριν πραγματοποιηθεί το DGGE το DNA ενισχύεται με PCR χρησιμοποιώντας εκκινήτες που στο 5' άκρο φέρουν μία περιοχή που έχει 35-40 ζεύγη βάσεων γουανίνης και κυτοσίνης (GC clamp). Αυτό είναι απαραίτητο για να αποφευχθεί η πλήρης αποδιάταξη του μορίου DNA και να παραμείνει στη θέση του. Όταν οι δύο κλώνοι διαχωρίζονται πλήρως η μετανάστευσή τους στην πηκτή αυξάνεται. Το προϊόν της PCR τοποθετείται στο πάνω μέρος της πηκτής και στην συνέχεια μετακινείται προς τα κάτω, υποβοηθούμενο και από το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται, δηλαδή προς αυξανόμενη συγκέντρωση αποδιατακτικών ουσιών. Η μέθοδος DGGE μας επιτρέπει να διαχωρίζουμε μόρια DNA που έχουν διαφορά μεταξύ τους έστω και ένα νουκλεοτίδιο. Όταν στην πηκτή «φορτώσουμε» DNA από μικροοργανισμούς μιας μικροβιακής κοινότητας, οι ζώνες που θα προκύψουν θα αποτελούν την γενετική ποικιλότητα της κοινότητας.

Η μέθοδος αποτύπωσης DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση θερμοκρασίας (TGGE) διαφέρει από το DGGE στο γεγονός ότι έχουμε αυξανόμενη βαθμίδωση θερμοκρασίας προς το θετικό ηλεκτρόδιο. Η πηκτή περιέχει και αυτή αποδιατακτικές ουσίες με σταθερή συγκέντρωση οι οποίες μειώνουν την θερμοκρασία που απαιτείται για την πλήρη αποδιάταξη των δύο κλώνων. Επίσης, μειώνουν την ενέργεια που απαιτείται. Η αποδιάταξη του DNA γίνεται με τον ίδιο τρόπο που γίνεται με την μέθοδο DGGE.

1.4 Μεταβολές της μικροβιακής κοινότητας

1.4.1. Μεταβολές της μικροβιακής κοινότητας κατά την διάρκεια της κομποστοποίησης

Η παρακολούθηση της μικροβιακής διαδοχής είναι σημαντική για τον αποτελεσματικό χειρισμό της διαδικασίας της κομποστοποίησης, αφού οι μικροοργανισμοί αποτελούν έναν από τους βασικότερους παράγοντες για την αποτελεσματικότητα της κομποστοποίησης (Macaulay et al., 1993). Η σύσταση της μικροβιακής κοινότητας έχει βρεθεί ότι μεταβάλλεται σε σημαντικό βαθμό μεταξύ των διαφόρων στάδιων της κομποστοποίησης όπως έχει αποδειχθεί με την εφαρμογή μεθόδων όπως η ανάλυση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων (PLFAs) (Hellmann et al., 1997, Herrmann and Shann, 1997, Carpenter-Boggs et al., 1998, Klamer and Bååth, 1998). Στο μεσόφιλο στάδιο τα βακτήρια που συμμετέχουν είναι συνήθως ζυμωτικά τα οποία μπορούν εύκολα να απομονωθούν και αποδοθούν εύκολα αποδομήσιμα υποστρώματα (Golueke et al., 1954). Στα θερμόφιλα στάδια όπου το pH και η θερμοκρασία αυξάνονται οι μικροοργανισμοί αυτοί εξαφανίζονται και δίνουν την θέση τους σε θερμόφιλα βακτήρια που σε πολλές περιπτώσεις ανήκουν σε σποριογόνα βακτηριακά γένη όπως *Bacillus*. Η παραγωγή σπορίων αποτελεί έναν από τους πιο διαδεδομένους μηχανισμούς αντοχής των βακτηρίων σε ακραίες συνθήκες που προκαλούνται συνήθως από υψηλές θερμοκρασίες (Chroni et al., 2009). Ο Strom, (1985b) παρατήρησε ότι το 87%

των απομονωμένων θερμοφίλων βακτηρίων αναγνωρίζονται ως *Bacillus* spp. Τέλος, στο στάδιο της ωρίμανσης που αναπτύσσονται και πάλι μεσόφιλα βακτήρια, αυτά δεν έχουν καμία σχέση με τα βακτήρια των προηγούμενων μεσόφιλων σταδίων. Στο στάδιο αυτό η μικροβιακή δραστηριότητα είναι πολύ χαμηλή. Τα περισσότερα είδη βακτηρίων που συμμετέχουν αποτελούν γνωστά βακτήρια εδάφους (Ishii et al., 2000).

1.4.2 Μεταβολές της μικροβιακής κοινότητας λόγω κασίγαρου

Ο κασίγαρος μπορεί να επηρεάσει τη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους καθώς η εφαρμογή του οδηγεί σε εμπλουτισμό του εδάφους με υψηλές ποσότητες αποδομήσιμου οργανικού φορτίου καθώς και άλλα θρεπτικά στοιχεία ενώ από την άλλη είναι πιθανό να οδηγήσει σε τοξικότητα λόγω του αυξημένου φορτίου πολυφαινολικών (Tardioli et al., 1997, Kotsou et al., 2004, Mekki et al., 2006b). Οι περισσότερες μελέτες εστίασαν στην χρήση συμβατικών μικροβιολογικών τεχνικών για την αξιολόγηση των επιδράσεων της εφαρμογής του κασίγαρου στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Έτσι, οι Mekki et al., (2006b) παρατήρησαν ότι η μικροβιακή κοινότητα επηρεάζεται από την προσθήκη κασίγαρου αλλά κάθε είδος με διαφορετικό τρόπο. Ο πληθυσμός των μεσόφιλων βακτηρίων αυξάνεται ενώ οι μύκητες και τα νιτροποιητικά βακτήρια μειώνονται. Ακτινοβακτήρια και σποριογόνα βακτήρια δεν επηρεάστηκαν από την προσθήκη κασίγαρου. Οι παραπάνω μελέτες πραγματοποιήθηκαν με την βοήθεια συμβατικών μικροβιολογικών μεθόδων (καλλιέργεια σε τριβλία) οι οποίες δεν παρέχουν πλήρη εικόνα της μικροβιακής κοινότητας αφού ένα μόνο μικρό ποσοστό των μικροοργανισμών (1-5%) μπορεί να καλλιεργηθεί (Torsvik & Onreas, 2002). Κατά τα τελευταία έτη μελετήθηκε η επίδραση του κασίγαρου στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους με την χρήση βιοχημικών και μοριακών βιολογικών τεχνικών που δεν προϋποθέτουν την καλλιέργεια σε τριβλίο. Έτσι, οι Mechri et al., (2007) χρησιμοποιώντας την μέθοδο ανάλυσης των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων (PLFAs) απέδειξαν ότι η προσθήκη κασίγαρου έφερε μεταβολές στα PLFAs των διαφορετικών ομάδων οργανισμών. Συγκεκριμένα, η προσθήκη κασίγαρου προκάλεσε αύξηση των PLFAs-δεικτών των αρνητικά κατά Gram βακτηρίων, των ακτινοβακτηρίων και των μυκήτων ενώ μείωσε τα PLFAs- δείκτες των θετικά κατά Gram βακτηρίων.

Μόλις πρόσφατα τεχνικές μοριακής αποτύπωσης χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη των επιδράσεων του κασίγαρου στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Έτσι αρχικές μελέτες από τους Rousidou et al., (2009) έδειξαν ότι η ημερήσια άρδευση εδαφών με διαφορετικές δόσεις κασίγαρου επηρεάζουν την κοινότητα των μυκήτων σε σημαντικό βαθμό σε αντίθεση με τα βακτήρια των οποίων η κοινότητα παρουσίασε διαφοροποιήσεις ανάλογα με τον τύπο του εδάφους που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα. Περαιτέρω μελέτες από την ίδια ομάδα (Kargouzas et al., 2009) έδειξαν ότι η ημερήσια άρδευση δύο διαφορετικού τύπου εδαφών με κασίγαρο για διάστημα τριών μηνών οδήγησε σε σημαντικότερες μεταβολές στην σύσταση της κοινότητας των βασιδιομυκήτων οι οποίες περιορίζονταν όταν υπήρχε εξωγενής λίπανση με άζωτο. Αντίθετα, ο κασίγαρος προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στην κοινότητα των ασκομυκήτων μόνο παρουσία επιπρόσθετης αζωτούχου

λίπανσης. Δημιουργία βιβλιοθηκών κλώνων στην ίδια μελέτη έδειξε ότι ο κασίγαρος ευνοούσε την ανάπτυξη ζυμών του γένους *Cryptococcus* που ευνοούνται από την βιοδιαθεσιμότητα στο έδαφος εύκολα αποδομήσιμων οργανικών υλικών ενώ αντίθετα οδήγησε σε επίσχεση της ανάπτυξης πιθανών φυτοπαθογόνων. Παράλληλες μελέτες για την επίδραση του κασίγαρου στους δενδρόμορφους μυκορριζικούς μύκητες έδειξαν ότι η εφαρμογή του είχε μια σημαντική αλλά παροδική επίδραση στην ποικιλότητα αλλά και στην ικανότητα αποικισμού των μυκορριζικών μυκήτων (Ipsilantis et al., 2009). Πρόσφατες μελέτες από την ίδια ομάδα έδειξαν σημαντική επίδραση του κασίγαρου στην κοινότητα των νιτροποιητικών βακτηρίων ενώ για την κοινότητα των ακτινοβακτηρίων αυτή η επίδραση ήταν εξαρτώμενη από το είδος του εδάφους στο οποίο έγινε η εφαρμογή κασίγαρου (Kargouzas et al., 2010). Σε όλες τις παραπάνω μελέτες χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές μοριακής αποτύπωσης DGGE σε συνδυασμό με δημιουργία βιβλιοθηκών κλώνων ώστε να ταυτοποιηθούν φυλογενετικά οι μικροοργανισμοί που επηρεάζονται, θετικά ή αρνητικά, από την εφαρμογή του κασίγαρου στο έδαφος. Γενικότερα, από τις παραπάνω μελέτες προκύπτει ότι ο κασίγαρος παρουσιάζει περιορισμένη και παροδική άμεση τοξική δράση στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους και οι έντονες μεταβολές που προκαλεί οφείλονται κυρίως στην μεγάλη περιεκτικότητα του σε αποδομήσιμη οργανική ύλη που εναποτίθεται στο έδαφος με την εφαρμογή του.

Σε όλες τις παραπάνω μελέτες αξιολογήθηκε η επίδραση του κασίγαρου στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Αντίθετα ως σήμερα δεν έχει μελετηθεί η επίδραση της εφαρμογής κασίγαρου στην μικροβιακή κοινότητα που αναπτύσσεται κατά την διάρκεια της κομποστοποίησης αγροτικών και άλλων υλικών.

1.5 Στόχος της εργασίας

Οι κύριοι στόχοι της παρούσας εργασίας ήταν:

- Η μελέτη των μεταβολών στην σύσταση της βακτηριακής κοινότητας κατά την διάρκεια της κομποστοποίησης με ή χωρίς εφαρμογή κασίγαρου
- Η ταυτοποίηση βακτηρίων που απομονώθηκαν ως αζωτοδεσμευτικά και η μελέτη του οικολογικού τους ρόλου κατά την διάρκεια της κομποστοποίησης.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Περιγραφή πειράματος

2.1.1 Χειρισμός κομπόστας

Η κομποστοποίηση πραγματοποιήθηκε σε υπολείμματα καλλιέργειας βαμβακιού (ΥΒ) στο Γεωργικό Πανεπιστήμιο Αθηνών στο εργαστήριο της Γεωργικής και Γενικής Μικροβιολογίας. Η διαδικασία κομποστοποίησης περιελάμβανε πέντε στάδια:

- I. Στάδιο επώασης
- II. 1^ο Θερμόφιλο στάδιο
- III. Μεσόφιλο στάδιο
- IV. 2^ο Θερμόφιλο στάδιο
- V. Στάδιο ωρίμανσης

Τμήμα του αρχικού compost διαποτίστηκε με κασίγαρο, προκειμένου να έχουμε δύο μεταχειρίσεις. Χάριν ευκολίας για το υπόλοιπο της εργασίας η μεταχείριση με τον κασίγαρο θα συμβολίζεται με OMW και το compost χωρίς τον κασίγαρο θα ονομάζεται Μάρτυρας και θα συμβολίζεται με M.

2.1.2 Συλλογή δειγμάτων

Από κάθε στάδιο κομποστοποίησης και στις δύο μεταχειρίσεις συλλέχθηκαν τρία δείγματα compost (3 επαναλήψεις). Το πλάνο των δειγματοληψιών που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.1.

	Στάδιο	Ημερομηνία	Μεταχείριση
1 ^η δειγματοληψία	Επώαση	03/05/07	M
		03/05/07	OMW
2 ^η δειγματοληψία	1 ^ο Θερμόφιλο	07/05/07	M
		08/05/07	OMW
3 ^η δειγματοληψία	Μεσόφιλο	04/06/07	M
		04/06/07	OMW
4 ^η δειγματοληψία	2 ^ο Θερμόφιλο	08/06/07	M
		11/06/07	OMW
5 ^η δειγματοληψία	Ωρίμανση	03/07/07	M
		03/07/07	OMW

Πίνακας 2.1. Συλλογή δειγμάτων κομποστοποίησης

2.1.3 Απομόνωση βακτηρίων

Παράλληλα κατά την διάρκεια της κομποστοποίησης απομονώθηκαν από τα πέντε στάδια που αναφέρθηκαν παραπάνω, 51 βακτηριακές καλλιέργειες τα οποία θεωρούνταν και αζωτοδεσμευτικά. Προκαταρκτική αξιολόγηση τους σε σύστημα DGGE ώστε να επιτευχθεί μια αρχική ομαδοποίηση τους έδειξε ότι μόνο 27 από αυτά ήταν σε αμιγή μορφή ενώ και τα υπόλοιπα 24 αποτελούσαν μικτές καλλιέργειες από διάφορα από τα υπόλοιπα 27 βακτήρια που ήταν σε αμιγή μορφή. Στον πίνακα 2.2 παρουσιάζονται τα αμιγή βακτήρια με κωδικούς αριθμούς (η αρίθμηση θα διατηρηθεί σε όλη την εργασία) και το στάδιο της κομποστοποίησης από το οποίο απομονώθηκαν.

Βακτήρια	Στάδιο απομόνωσης
14	2 ^ο θερμόφιλο στάδιο
15	2 ^ο θερμόφιλο στάδιο
18	2 ^ο θερμόφιλο στάδιο
21	2 ^ο θερμόφιλο στάδιο
22	2 ^ο θερμόφιλο στάδιο
23	2 ^ο θερμόφιλο στάδιο
24	2 ^ο θερμόφιλο στάδιο
25	2 ^ο θερμόφιλο στάδιο
27	2 ^ο θερμόφιλο στάδιο
28	2 ^ο θερμόφιλο στάδιο
29	2 ^ο θερμόφιλο στάδιο
30	2 ^ο θερμόφιλο στάδιο
34	2 ^ο θερμόφιλο στάδιο
36	2 ^ο θερμόφιλο στάδιο
41	Στάδιο επώασης
44	1 ^ο θερμόφιλο στάδιο
45	1 ^ο θερμόφιλο στάδιο
47	1 ^ο θερμόφιλο στάδιο
51	Μεσόφιλο στάδιο
54	Μεσόφιλο στάδιο
55	Μεσόφιλο στάδιο
57	Στάδιο ωρίμανσης
60III	Στάδιο ωρίμανσης
61	Στάδιο ωρίμανσης
62	Στάδιο ωρίμανσης
65	Στάδιο ωρίμανσης
66	Στάδιο ωρίμανσης

Πίνακας 2.2. Οι κωδικοί των απομονωθέντων βακτηρίων που βρίσκονταν σε αμιγή μορφή και το στάδιο από το οποίο απομονώθηκαν

2.2 Εξαγωγή DNA από κομπόστα και βακτήρια

2.2.1 Εξαγωγή DNA από κομπόστα

Η εξαγωγή του DNA από τα δείγματα compost πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εμπορικού kit PowerSoil DNA Isolation (MoBio Laboratories, Inc.). Εξαγωγή DNA πραγματοποιήθηκε από τρία δείγματα για κάθε μεταχείριση (M & OMW) από κάθε στάδιο κομποστοποίησης. Συνεπώς, συνολικά DNA εκχυλίστηκε από 30 δείγματα compost (5 στάδια x 2 μεταχειρίσεις x 3 επαναλήψεις). Η εκχύλιση έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του παρασκευαστή το οποίο παρατίθεται παρακάτω:

- Στα bead tubes που περιέχονται στο kit προστίθενται 0,5 g από κάθε δείγμα compost. Τα bead tubes περιέχουν ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο βοηθάει να διασκορπιστούν τα σωματίδια της κομπόστας, ξεκινάει να διαλυτοποιεί τα χουμικά οξέα και προστατεύει τα νουκλεϊκά οξέα από την αποδόμηση.
- Ακολουθεί ήπια ανάδευση σε vortex.
- Προσθήκη 60 μl από το διάλυμα C1 και ήπια ανακίνηση των σωληνίσκων. Το διάλυμα C1 περιέχει SDS το οποίο διασπά τα λιπαρά οξέα και τα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης των μικροοργανισμών.
- Στη συνέχεια τοποθετούνται τα bead tubes σε κατάλληλη πλατφόρμα η οποία τοποθετείται στο vortex και αναδύονται στη μέγιστη ταχύτητα για 10 min. Κατά την ανάδευση τα σφαιρίδια συγκρούονται μεταξύ τους και με τα κύτταρα προκαλώντας έτσι τη λύση τους.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση των bead tubes σε 13200 rpm για 30 sec. Στο σημείο αυτό τα κυτταρικά υπολείμματα, το έδαφος, τα σφαιρίδια και τα χουμικά οξέα δημιουργούν ένα ίζημα ενώ το DNA βρίσκεται στο υπερκείμενο.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέους σωληνίσκους των 2 ml
- Προσθήκη 250 μl από το διάλυμα C2 στους σωληνίσκους και ανάδευση σε vortex για 5 sec. Ακολουθεί επώαση στους 4⁰C για 5 min. Το διάλυμα C2 προκαλεί κατακρήμνιση των πρωτεϊνών.
- Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min στις 13200 rpm.
- Αποφεύγοντας το ίζημα, μεταφέρονται τουλάχιστον 600 μl από το υπερκείμενο σε νέους σωληνίσκους
- Προσθήκη 200 μl από το διάλυμα C3 και σύντομη ανάδευση στο vortex. Επώαση στους 4⁰C για 5 min.
- Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min σε 13200 rpm.
- Μεταφέρονται τουλάχιστον 750 μl από το υπερκείμενο σε νέους σωληνίσκους των 2 ml.
- Προσθήκη 1,2 ml από το διάλυμα C4 στο υπερκείμενο και ανάδευση σε vortex για 5 sec. Το C4 είναι διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης αλάτων. Το DNA προσδένεται στη μεμβράνη πυριτίου παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων αλάτων.
- Μεταφέρονται περίπου 700 μl από το υπερκείμενο σε Spin Filter και φυγοκεντρώνται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min σε 13200 rpm. Απορρίπτεται το διάλυμα που διέρχεται από την μεμβράνη και μεταφέρονται ακόμα 700 μl από το υπερκείμενο στα Spin Filter. Φυγοκεντρώνται όπως και πριν και απομακρύνεται το διάλυμα που

διέρχεται από την μεμβράνη. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται μέχρι να περάσει όλο το υπερκείμενο από το Spin Filter. Το DNA προσδένεται στη μεμβράνη πυριτίου στα Spin Filter και σχεδόν όλες οι άλλες ουσίες διέρχονται από την μεμβράνη.

- Προσθήκη 500 μl από το διάλυμα C5 και φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 sec σε 13200 rpm. Το διάλυμα C5 περιέχει αιθανόλη η οποία απομακρύνει κατάλοιπα άλατος, χουμικών οξέων και άλλων ουσιών ενώ αφήνει το DNA προσδεμένο στη μεμβράνη.
- Το διάλυμα που έχει διέλθει από την μεμβράνη απορρίπτεται.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min σε 13200 rpm. Με την φυγοκέντρηση αυτή απομακρύνονται υπολείμματα αιθανόλης.
- Τα Spin Filter τοποθετούνται σε νέους σωληνίσκους των 1,5 ml και προστίθενται 50 μl από το διάλυμα C6 (διάλυμα έκλουσης, 10 mM Tris pH 8).
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 sec σε θερμοκρασία δωματίου σε 13200 rpm και το εκλουόμενο υγρό περιέχει το DNA που αποθηκεύεται στους -20°C.

2.2.2 Εξαγωγή DNA από βακτήρια

Η εξαγωγή του DNA από τα βακτήρια τα οποία απομονώθηκαν από τα διάφορα στάδια της κομποστοποίησης πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό kit NucleoSpin Tissue (Macherey – nagel). Η εκχύλιση έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του παρασκευαστή (Support protocol for bacteria). Τα βήματα παρατίθενται παρακάτω:

1. Προετοιμασία δείγματος

- Στην καλλιέργεια κάθε βακτηρίου σε τριβλίο με LB άγαρ προστίθενται αρχικά 0,5 ml αποστειρωμένο ddH₂O και συγκομίζεται η βακτηριακή ανάπτυξη.
- Το υγρό μεταφέρεται σε σωληνίσκο erpendorf και φυγοκεντρείται για 5 min στις 13200 rpm.
- Ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκειμένου και διατήρηση του βακτηριακού ιζήματος (pellet).

2. Στάδια προ-λύσις

- Προσθήκη 180 μl buffer T₁ (lysis buffer) και ανάμιξη,
- Προσθήκη 25μl proteinase K και ανάμιξη σε vortex.
- Επώαση σε υδατόλουτρο στους 56°C για 3 h.
- Προσθήκη 10μl RNase A (10mg/ml).

3. Λύση

- Ανάδευση σε vortex.
- Προσθήκη 200 μl buffer B₃ (lysis buffer)
- Έντονη ανάδευση σε vortex και επώαση στους 70°C για 10 min,
- Σύντομη ανάδευση σε vortex.

- Φυγοκέντρηση για 5 min στις 13200 rpm και μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωληνίσκο erpendorf.
4. Προσαρμογή συνθήκων για την πρόσδεση DNA
 - Προσθήκη 210 μl αιθανόλης (καθαρότητας 96 -100%) για καθίζηση του DNA.
 - Έντονη ανάδευση σε vortex.
 5. Πρόσδεση DNA
 - Μεταφορά δείγματος σε στήλη φυγοκέντρησης (tissue column).
 - Φυγοκέντρηση για 1 min στις 13200 rpm.
 - Απομάκρυνση του εκλουόμενου υγρού.
 6. Πλύση στήλης πυριτικού οξέος
 - 1^η πλύση
 - Προσθήκη 500 μl buffer BW (wash buffer)
 - Φυγοκέντρηση για 1 min στις 13200 rpm.
 - Απομάκρυνση του εκλουόμενου υγρού.
 - 2^η πλύση
 - Προσθήκη 600 μl buffer B₅ (wash buffer)
 - Φυγοκέντρηση για 1 min στις 13200 rpm.
 - Απομάκρυνση του εκλουόμενου υγρού.
 7. Ξήρανση στήλης
 - Φυγοκέντρηση για 1 min στις 13200 rpm. Σε αυτό το στάδιο απομακρύνονται πλήρως τα όποια υπολείμματα αιθανόλη ενώ το DNA παραμένει προσδεμένο στην μεμβράνη της στήλης.
 8. Έκλυση DNA
 - Προσθήκη 100 μl buffer BE στην στήλη (απαιτείται προθέρμανση του BE στους 70°C).
 - Επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.
 - Φυγοκέντρηση για 1 min στις 13200 rpm.
 - Το διάλυμα που έχει διέλθει από την μεμβράνη είναι το DNA και αποθηκεύεται στους -20°C.

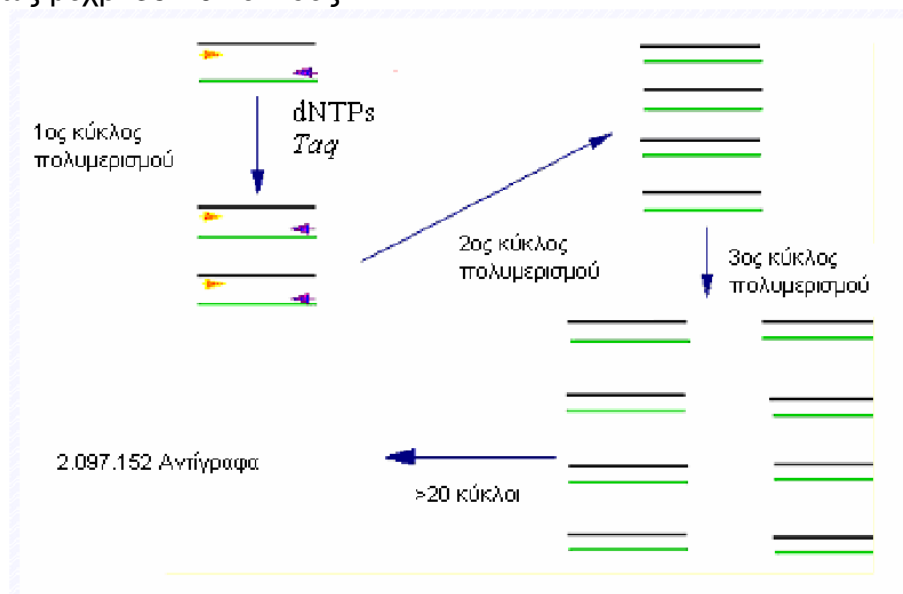
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) επιτρέπει την παραγωγή μεγάλου αριθμού αντιγράφων DNA ή RNA σε σύντομο χρονικό διάστημα, με μικρή αρχική ποσότητα DNA ή RNA. Κατά την αντίδραση αυτή πολλαπλασιάζεται επιλεκτικά μόριο DNA ή RNA κατά πολλαπλασία του εκατομμυρίου σε λίγες μόνο ώρες. Το τμήμα του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί οριοθετείται από δύο εκκινήτες, οι οποίοι είναι μικρά ολιγονουκλεοτίδια (18-25 βάσεις), συμπληρωματικά με τα άκρα της αλληλουχίας που μας ενδιαφέρει. Η αντίδραση πραγματοποιείται με τη βοήθεια του ενζύμου DNA πολυμεράση που είναι ανθεκτική σε θερμοκρασία

έως 95°C Η PCR στηρίζεται σε μια διαδικασία που επαναλαμβάνεται κυκλικά:

- Αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA λόγω υψηλής θερμοκρασίας (90-95°C) (denaturation).
- Υβριδισμός των εκκινητών στη συμπληρωματική ακολουθία των αποδιατεταγμένων αλυσίδων (annealing). Ως θερμοκρασία υβριδισμού επιλέγεται μία θερμοκρασία κατά 5°C μικρότερη από το σημείο τήξης T_m του εκκινητή με το χαμηλότερο σημείο τήξης. Το σημείο τήξης των εκκινητών υπολογίζεται από τον τύπο $T_m=(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$. Ελέγχονται διάφορες θερμοκρασίες αντίδρασης και προσδιορίζεται η πλέον κατάλληλη με ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων της PCR.
- Πολυμερισμός της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA με τη βοήθεια της DNA πολυμεράσης (extension).

Με την πραγματοποίηση αυτών των τριών σταδίων ολοκληρώνεται ο πρώτος κύκλος της PCR και από την αρχική δίκλωνη αλυσίδα προκύπτουν δύο θυγατρικές δίκλωνες αλυσίδες (εικόνα 2.1). Η αντίδραση συνεχίζεται συνήθως μέχρι 35-40 κύκλους.

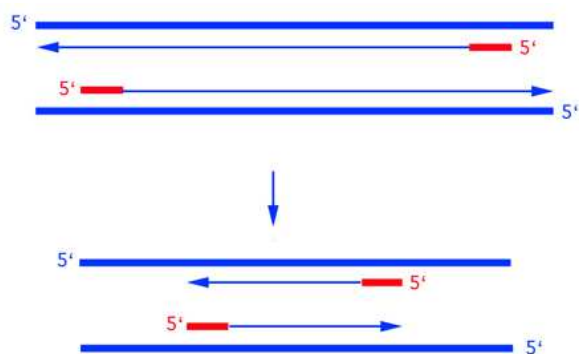


Εικόνα 2.1. Κύκλος της αντίδρασης PCR.

Όλη η αντίδραση PCR ολοκληρώνεται στο ίδιο μείγμα αντιδραστηρίων, για το οποίο απαιτούνται:

- ✓ DNA στόχος
- ✓ Εκκινητικά μόρια «primers» (πίνακας)
- ✓ Τριφωσφορικά δεοξυροβουκλεοτίδια
- ✓ Ένζυμο DNA πολυμεράση
- ✓ Ιόντα Mg^{++} απαραίτητα για την ενζυμική δράση
- ✓ Κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα pH~8,2 για την δράση του ενζύμου

Το κύριο χαρακτηριστικό της PCR είναι η ιδιαίτερα υψηλή ευαισθησία της μεθόδου. Η ευαισθησία είναι δυνατόν να αυξηθεί χρησιμοποιώντας την τεχνική «nested PCR» (PCR εσωτερικής ένθεσης). Στην τεχνική αυτή το προϊόν της PCR υποβάλλεται σε 2^η PCR χρησιμοποιώντας σαν εκκινητικά μόρια ένα νέο ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία είναι εσωτερικά των δύο αρχικών εκκινητικών μορίων.



© jp herveg, septiembre 2005

Εικόνα 2.2. PCR εσωτερικής ένθεσης

Ορισμένα πλεονεκτήματα της PCR εσωτερικής ένθεσης είναι τα εξής:

- ✓ Έχει υψηλότερη ευαισθησία
- ✓ Παράγονται τμήματα κατάλληλα για ανάλυση σε σύστημα DGGE

Ωστόσο, στην περίπτωση εφαρμογής της PCR εσωτερικής ένθεσης υπάρχει αυξημένος κίνδυνος επιμόλυνσης των προϊόντων, γεγονός που αποτελεί και το «τίμημα» της εξαιρετικής ευαισθησίας.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

ΥΛΙΚΑ

- DyNAzyme EXT Buffer 10x Mg free
- DyNAzyme EXT Buffer 10x contains 15mM MgCl₂
- MgCl₂ (25mM)
- Νουκλεοτίδια (dNTPs)
- BSA (Bovine Serum Albumin)
- DyNAzyme EXT DNA πολυμεράση
- H₂O αποστειρωμένο
- Εκκινητές (primers) (πίνακας 3)

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται στον πίνακα 2.3.

Εκκινητής	Αλληλουχία	Γονίδιο-στόχος
nifHforA	5' - GCI WTI TAY GGN AAR GGN GG - 3'	nifH
nifHrev	5' - GCR TAI ABN GCC ATC ATY TC - 3'	nifH
Zfor	5' - TGY GAY CCN AAR GCN GA - 3'	nifH
Zrev	5' - AND GCC ATC ATY TCN CC - 3'	nifH
PolF	5' - TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC - 3'	nifH
PolR	5 - ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA - 3'	nifH
63F	5'-AGG CCT AAC ACA TGC AAG TC -3'	16S rRNA
1087R	5'-CTC GTT GCG GGA CTT AAC CC -3'	16S rRNA
8F	5'- CAC GGA TCC AGA CTT TGA TYM TGG CTC A -3'	16S rRNA
1512R	5'- GTG AAG CTT ACG GYT AGC TTG TTA CGA C -3'	16S rRNA
Muyzer F (357f-GC)	5' - GC clamp - GCC TAC GGG AGG CAG CAG -3'	16S rRNA
Muyzer R (534r)	5'- ATT ACC GCG GCT GCT GG -3'	16S rRNA

Πίνακας 2.3. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία. Οι εκκινητές για την ενίσχυση του γονιδίου *nif* είναι πολύ εκφλισμένοι, όπου Y=C/T, S=G/C, R=A/G, B=C/G/T, D=G/A/T, N=A/G/C/T, W=A/T, I=Inosin

2.3.1 Ενίσχυση του γονιδίου *nifH* στα βακτήρια με PCR

Αρχικά στα βακτήρια προσπαθήσαμε να ενισχύσουμε το γονίδιο της νιτρογενάσης (*nifH*) καθώς τα βακτήρια απομονώθηκαν ως πιθανά αζωτοδεσμευτικά. Χρησιμοποιήσαμε 3 ζεύγη εκκινητών (universal *nif*, *pol*, *Z*) όπως φαίνεται και στον πίνακα 3. Τα παραπάνω τρία ζεύγη αποτελούν τα τρία ζεύγη εκκινητών που έχουν χρησιμοποιηθεί ως σήμερα για την ανίχνευση και ταυτοποίηση αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων χρησιμοποιώντας ως γονίδιο-στόχο το *nifH* (Widmer et al., 1999, Shaffer et al., 2000, Poly et al., 2001, Diallo et al., 2008). Στους πίνακες 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 και 2.9 παρουσιάζονται τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες PCR.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Buffer χωρίς MgCl₂(10x optimized)	5 μl	1x
MgCl₂ (25mM)	4 μl	2 mM
dNTPs (10mM)	1 μl	0,2 mM
BSA (10mg/ml)	2,5 μl	500 ng/μl
Forward primer nifHforA (20pmol/μl)	5 μl	2 μM
Reverse primer nifHrev (20pmol/μl)	5 μl	2 μM
Πολυμεράση EXT(1U/μl)	1 μl	1 U/50 μl
DNA	2 μl	10-50 ng
ddH₂O	24,5 μl	
Συνολικός όγκος	50μl	

Πίνακας 2.4. Αντίδραση PCR με τους universal nif primers

Αρχική αποδιάταξη	95 °C	5 min	
Αποδιάταξη	94 °C για 11 sec & 92 °C για 15 sec		40 κύκλους
Υβριδοποίηση	48 °C για 8 sec & 50 °C για 30 sec		
Επιμήκυνση	74 °C για 20 sec & 72 °C για 20sec		
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10 min	

Πίνακας 2.5. Συνθήκες πραγματοποίησης της PCR με τους universal nif primers

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Buffer (10x optimized)	5 μl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
dNTPs (10mM)	1 μl	0,2 mM
BSA (10mg/ml)	2,5 μl	500 ng/μl
Forward primer Zfor (20pmol/μl)	1,25 μl	0,5 μM
Reverse primer Zrev (20pmol/μl)	1,25 μl	0,5 μM
Πολυμεράση EXT(1U/μl)	1 μl	1 U/50 μl
DNA	3 μl	10-50 ng
ddH₂O	35 μl	
Συνολικός όγκος	50 μl	

Πίνακας 2.6. Αντίδραση PCR με τους Z nifH primers

Αρχική αποδιάταξη	94 °C	5 min	
Αποδιάταξη	94 °C	1 min	35 κύκλους
Υβριδοποίηση	56 °C	40 sec	
Επιμήκυνση	72 °C	40 sec	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10 min	

Πίνακας 2.7. Συνθήκες πραγματοποίησης της PCR με τους Z nifH primers

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Buffer (10x optimized)	5 μ l	1x (1,5 mM MgCl ₂)
dNTPs (10mM)	1 μ l	0,2 mM
BSA (10mg/ml)	0,5 μ l	100 ng/ μ l
Forward primer PoIF (20 μ mol/ μ l)	1,25 μ l	0,5 μ M
Reverse primer PoIR (20 μ mol/ μ l)	1,25 μ l	0,5 μ M
Πολυμεράση EXT(1U/ μ l)	1 μ l	1 U/50 μ l
DNA	3 μ l	10-50 ng
ddH ₂ O	37 μ l	
Συνολικός όγκος	50 μl	

Πίνακας 2.8. Αντίδραση PCR με τους Pol nifH primers

Αρχική αποδιάταξη	94 °C	2 min	30 κύκλους
Αποδιάταξη	94 °C	1 min	
Υβριδοποίηση	55 °C	40 sec	
Επιμήκυνση	72 °C	40 sec	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	5 min	

Πίνακας 2.9. Συνθήκες πραγματοποίησης της PCR με τους Pol nifH primers

2.3.2 Ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA στα βακτήρια με PCR

Επαναλαμβανόμενες προσπάθειες ενίσχυσης του γονιδίου *nifH* στα απομονωθέντα βακτήρια καθώς και στα δείγματα DNA από τα compost απέτυχαν ή δεν έδωσαν επαναλαμβανόμενα και σταθερά επιτυχή αποτελέσματα. Για τον λόγο αυτό αποφασίστηκε να πραγματοποιηθεί ενίσχυση του συντηρημένου γονιδίου 16S rRNA των βακτηρίων ώστε να γίνει ταυτοποίηση των απομονωθέντων βακτηρίων και παράλληλα αποτύπωση των μεταβολών συνολικά της βακτηριακής κοινότητας στα διάφορα στάδια κομποστοποίησης, παρουσία ή όχι κασίγαρου. Στην πρώτη αντίδραση PCR ενισχύθηκε όλο το γονίδιο 16s rRNA με τους 8f και 1512r εκκινητές από DNA των βακτηρίων. Στην δεύτερη αντίδραση PCR (nested PCR) χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Muzzer F (357f-GC) και Muzzer R (534r) οι οποίοι είναι εσωτερικοί των πρώτων και ενισχύουν την V3 μεταβλητή περιοχή του 16S rRNA των βακτηρίων (Muzzer et al., 1993). Ο εκκινητής Muzzer 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). Το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών έχει αποδειχτεί ότι αποτελεί τους πλέον ενδεδειγμένους εκκινητές για ανάλυση της βακτηριακής κοινότητας με την μέθοδο DGGE (Muzzer et al., 1993). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται στους πίνακες 2.10, 2.11, 2.12, 2.13.

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Όγκος</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>
Buffer (10x optimized)	5 μ l	1x (1,5 mM MgCl ₂)
dNTPs (10 mM)	1 μ l	0,2 mM
BSA (10 mg/ml)	2 μ l	400 ng/ μ l
Forward primer 8f (20 pmol/μl)	2 μ l	0,8 pmol/ μ l
Reverse primer 1512r (20 pmol/μl)	2 μ l	0,8 pmol/ μ l
Πολυμεράση EXT(1 U/μl)	1 μ l	1 U/50 μ l
DNA	1 μ l	10-50 ng
ddH₂O	36 μ l	
Συνολικός όγκος	50 μl	

Πίνακας 2.10. Πρώτη αντίδραση PCR για τα βακτήρια

Αρχική αποδιάταξη	94 °C	5 min	30 κύκλους
Αποδιάταξη	94 °C	1 min	
Υβριδοποίηση	55 °C	1 min	
Επιμήκυνση	72 °C	2 min	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10 min	

Πίνακας 2.11. Συνθήκες πραγματοποίησης της πρώτης PCR για τα βακτήρια

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Όγκος</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>
Buffer (10x optimized)	5 μ l	1x (1,5 mM MgCl ₂)
dNTPs (10mM)	1 μ l	0,2 mM
Forward primer 357f-GC (20pmol/μl)	1 μ l	0,4 μ M
Reverse primer 534r (20pmol/μl)	1 μ l	0,4 μ M
Πολυμεράση EXT(1U/μl)	1 μ l	1 U/50 μ l
DNA	1 μ l	10-50 ng
ddH₂O	40 μ l	
Συνολικός όγκος	50 μl	

Πίνακας 2.12. Δεύτερη αντίδραση PCR για τα βακτήρια

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

Πίνακας 2.13. Συνθήκες πραγματοποίησης της δεύτερης PCR για τα βακτήρια

2.3.3 Ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA στη βακτηριακή κοινότητα των δειγμάτων compost με PCR

Στην πρώτη αντίδραση PCR ενισχύεται ένα τμήμα του 16S rRNA των βακτηρίων με τους εκκινητές 63f -1087r από DNA εκχυλισμένο από compost. Στην δεύτερη αντίδραση χρησιμοποιούνται και πάλι οι εκκινητές Muzyer F (357f -GC) και Muzyer R (534r) (PCR εσωτερικής ένθεσης), αφού θα ακολουθήσει DGGE της βακτηριακής κοινότητας της κομπόστας. Στους πίνακες 2.14, 2.15, 2.16 παρουσιάζονται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι PCR.

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Όγκος</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>
Buffer (10x optimized)	5 μl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
dNTPs (10mM)	1 μl	0,2 mM
BSA (10mg/ml)	2 μl	400 ng/μl
Forward primer 63f (20pmol/μl)	0,5 μl	0,2 μM
Reverse primer 1087r (20pmol/μl)	0,5 μl	0,2 μM
Πολυμεράση EXT(1U/μl)	1 μl	1 U/50 μl
DNA	1 μl	10-50 ng
ddH₂O	39 μl	
Συνολικός όγκος	50 μl	

Πίνακας 2.14. Πρώτη αντίδραση PCR για την βακτηριακή κοινότητα

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Όγκος</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>
Buffer (10x optimized)	5 μl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
dNTPs (10mM)	1 μl	0,2 mM
Forward primer 357f-GC (20pmol/μl)	1 μl	0,4 μM
Reverse primer 534r (20pmol/μl)	1 μl	0,4 μM
Πολυμεράση EXT(1U/μl)	1 μl	1 U/50 μl
DNA	1 μl	10-50 ng
ddH₂O	40 μl	
Συνολικός όγκος	50 μl	

Πίνακας 2.15. Δεύτερη αντίδραση PCR για την βακτηριακή κοινότητα

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

Πίνακας 2.16. Συνθήκες πραγματοποίησης της πρώτης και της δεύτερης PCR για την βακτηριακή κοινότητα

2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθαρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθός τους. Αυτό επιτυγχάνεται με εφαρμογή διαφοράς ηλεκτρικού δυναμικού στο πήκτωμα αγαρόζης. Τα αρνητικά φορτισμένα μόρια νουκλεϊκού οξέος κινούνται μέσα στην πηκτή προς το θετικό πόλο με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του λογαρίθμου του μοριακού τους βάρους. Αυτή η κίνηση δημιουργεί μια σειρά ζωνών. Κάθε ζώνη αντιστοιχεί σε ένα τμήμα DNA με συγκεκριμένο μέγεθος. Όσο πιο κοντά στο κάτω άκρο του πηκτώματος βρίσκεται η ζώνη, τόσο μικρότερο είναι το μέγεθός της. Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση στα δείγματα DNA που εκχυλίστηκαν από τα βακτήρια και την βακτηριακή κοινότητα της κομπόστας για τον έλεγχο της απόδοσης της εκχύλισης και στα προϊόντα των PCR για τον έλεγχο της παρουσίας του επιθυμητού σε μέγεθος προϊόντος.

2.4.1 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA κομπόστας και βακτηρίων

Χρησιμοποιήθηκε πηκτή 0,8% (0,8 g αγαρόζη σε 100 ml TAE και 3 μl βρωμιούχου αιθιδίου). Στην πηκτή φορτώθηκαν 5 μl από κάθε δείγμα DNA αναμεμειγμένα με 1 μl loading buffer 6x. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 90 V. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ήταν δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στην πηκτή αφού τοποθετηθεί σε τράπεζα φωτογράφησης UV.

2.4.2 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

Χρησιμοποιήθηκε πηκτή 1% (1 g αγαρόζη σε 100 ml TAE και 3 μl βρωμιούχου αιθιδίου) για τα προϊόντα των PCR και πηκτή 1,2% (1,2 g αγαρόζη σε 100 ml TAE και 3 μl βρωμιούχου αιθιδίου) για τα προϊόντα των PCR εσωτερικής ένθεσης. Στην πηκτή φορτώθηκαν 5 μl από κάθε δείγμα DNA αναμεμειγμένα με 1 μl loading buffer 6x. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 100 V. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ήταν δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στην πηκτή αφού τοποθετηθεί σε τράπεζα φωτογράφησης UV.

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

Το DGGE είναι μία μέθοδος κάθετης ηλεκτροφόρησης που διαχωρίζει το DNA ανάλογα με την αλληλουχία του. Το DGGE βασίζεται στο γεγονός ότι το δίκλωνο DNA κινείται πιο γρήγορα από το μονόκλωνο DNA σε μία πηκτή με αυξημένη βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών. Όταν ένα μόριο DNA ηλεκτροφορείται σε πηκτή DGGE ανάλογα με την αλληλουχία του μετά από κάποιο σημείο αρχίζει να αποδιατάσσεται και αλληλεπιδρά με το περιβάλλον της πηκτής μέχρι να ακινητοποιηθεί. Το σημείο αυτό θα είναι μία ζώνη στο

DGGE. Συνεπώς διαφορετικές αλληλουχίες σταματάνε σε διαφορετικά σημεία και μας δίνουν διαφορετικές ζώνες. Οι αλληλουχίες που έχουν μεγάλο ποσοστό GC αποδιατάσσονται πιο δύσκολα συνεπώς οι ζώνες που θα παρουσιάζουν θα είναι πιο χαμηλά στην πηκτική. Ωστόσο, το δίκλωνο DNA δεν πρέπει να αποδιαταχθεί πλήρως δεν μπορεί να αποδιαταχθεί πλήρως λόγω του GC clamp στο 5' άκρο του προϊόντος PCR εσωτερικής ένθεσης.

Στην παρούσα εργασία η μέθοδος DGGE χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των προϊόντων που προέκυψαν από την PCR εσωτερικής ένθεσης στα βακτήρια και στην βακτηριακή κοινότητα της κομπόστας.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- Πλήρες σύστημα DGGE (INGENYphorU-2x2)
- Αντλία ανάμειξης διαλυμάτων αποδιατακτικών ουσιών
- Γράσο σιλικόνης
- Διάλυμα ακρυλαμίδης (Acrylamide-Bisacrylamide 40% solution 37.5:1)
- Φορμαμίδη (Deionized formamide)
- Ουρία
- TEMED (N, N, N', N' – tetramethylenediamine)
- 10% Ammonium Persulphate Solution (APS, 100mg σε 1ml ddH₂O)
- 50xTAE
 - Tris base 242 g
 - Glacial acetic acid 57 ml
 - 0,5 M EDTA (pH 8) 100 ml
 Ο όγκος προσαρμόζεται στο 1 L απεσταγμένο νερό
- Διαλύματα 0% και 100% αποδιατακτικών ουσιών

Διαλύματα	0%	100%
Ακρυλαμίδη	20 ml	20 ml
Φορμαμίδη	-	40 ml
Ουρία	-	42 g
50xTAE	2 ml	2 ml
H₂O	στα 100 ml	στα 100 ml

Πίνακας 2.17

Η ανάλυση DGGE πραγματοποιείται με τη συσκευή INGENYphorU-2x2. (εικόνα 2.3)



Εικόνα 2.3. INGENYphorU-2x2 σύστημα

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.
- Τοποθετούμε μια στρώση από γράσο σιλικόνης στην δεξιά, αριστερή και κάτω πλευρά του spacer ώστε να περιορίσουμε τις διαρροές.
- Τοποθετούμε επάνω στο spacer και στην μεγάλη γυάλινη πλάκα την μικρότερη γυάλινη πλάκα. Πιέζουμε το σάντουιτς ώστε να δημιουργηθεί καλή εφαρμογή μεταξύ του spacer και των πλακών.
- Με προσοχή ανασηκώνουμε το σάντουιτς των δύο γυάλινων πλακών με το spacer και το τοποθετούμε μέσα στην κασέτα ηλεκτροφόρησης.
- Τραβάμε το spacer με προσοχή 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, τοποθετούμε τα χτενάκια (combs), σφίγγουμε όλες τις υπόλοιπες βίδες του συστήματος.
- Το σύστημα είναι έτοιμο για την παρασκευή της πηκτής

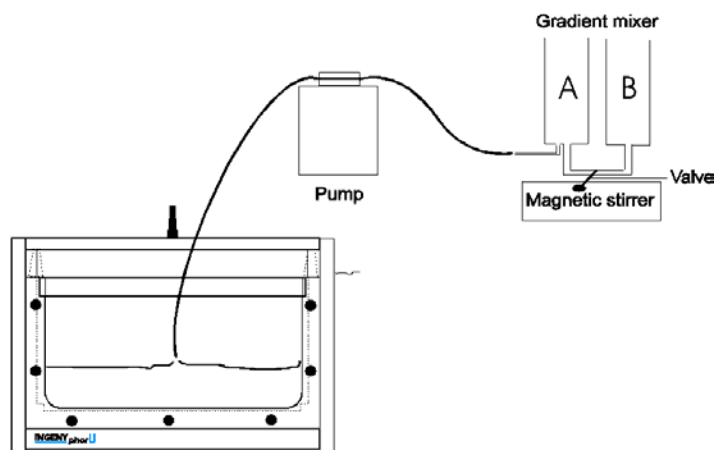
B. Προετοιμασία των διαλυμάτων και παρασκευή της πηκτής

- Προετοιμασία των διαλυμάτων των αποδιατακτικών ουσιών 0% και 100%. (Πίνακας 2.17)
- Ανάμιξη των διαλυμάτων αποδιατακτικών ουσιών 0% και 100% σε κατάλληλες αναλογίες για προετοιμασία διαλυμάτων με υψηλή και χαμηλή συγκέντρωση αποδιατακτικών ουσιών στο εύρος που θέλουμε (Πίνακας 2.18).

	Εύρος συγκέντρωσης αποδιατακτικών ουσιών (%)	0% (ml)	100% (ml)
Βακτήρια	45 - 65	11,25 - 8,75	13,75 - 16,25
Βακτηριακή κοινότητα	40 - 70	10 - 7,5	15,0 - 17,5

Πίνακας 2.18. Αναλογία όγκων των διαλυμάτων 0% και 100% denaturants που πρέπει να αναμιχθούν για να πάρουμε διαλύματα (25ml) με υψηλή και χαμηλή συγκέντρωση αποδιατακτικών ουσιών στο εύρος που θέλουμε

- Τοποθετούμε το διάλυμα με την υψηλή συγκέντρωση αποδιατακτικών στο αριστερό δοχείο του συστήματος (A) και το διάλυμα με τη χαμηλή συγκέντρωση στο δεξί δοχείο (B) ενώ η βαλβίδα επικοινωνίας μεταξύ των δύο δοχείων είναι κλειστή. Τοποθετούμε μαγνητάκια σε κάθε δοχείο.
- Αφού ξεκινήσουμε την ανάδευση, προσθέτουμε 100 μl 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 ακρυλαμίδης.
- Το διάλυμα αρχίζει και φτάνει μέσω του σωλήνα της αντλίας στο εσωτερικό μεταξύ των δύο γυάλινων πλακών. (Εικόνα 2.4)



Εικόνα 2.4. 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 (6 ml από το 0%, 6 ml TEMED, 60 μl APS) με σύριγγα.
- Η πηκτή χρειάζεται τουλάχιστον μία ώρα για να πολυμεριστεί πλήρως η ακρυλαμίδα.
- Κατά την διάρκεια αυτού του χρονικού διαστήματος ρυθμίζουμε την θέρμανση στην δεξαμενή του συστήματος με το ρυθμιστικό διάλυμα στους 60°C.

Γ. Ηλεκτροφόρηση της πηκτής

- Μόλις ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης, τοποθετούμε την κασέτα INGENY εντός του δοχείου με το ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE.
- Γεμίζουμε με διάλυμα 1x TAE το επάνω τμήμα του δοχείου (upper buffer reservoir) του συστήματος INGENY. Απομακρύνουμε προσεκτικά τα χτενάκια 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 1xTAE ώστε να δημιουργηθεί ηλεκτρικό πεδίο.
- Κλείνουμε την βαλβίδα που ελέγχει την κίνηση του διαλύματος 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 (1 μl για τα βακτήρια, 0,6 μl για την βακτηριακή κοινότητα). Για τη δημιουργία ladder για το DGGE αναμείξαμε τα προϊόντα της PCR εσωτερικής ένθεσης των βακτηρίων και φορτώσαμε 4 μl σε κάθε γραμμή ηλεκτροφόρησης.
- Συνδέουμε τη συσκευή INGENY με εξωτερική πηγή ισχύος. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 75V για 960 min.

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

Διαλύματα

- **Fixing solution I:** 10% αιθανόλη και 0,5% οξικό οξύ
- **Staining solution:** 1 g AgNO₃ σε 1 L απεσταγμένο νερό
Το συγκεκριμένο διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν την χρήση του.
- **Developing solution:** 0,1 g NaBH₄, 1 L NaOH 1,5%, 4ml φορμαλδεΐδη

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Η πηκτή ξεπλένεται ελαφρώς με νερό.
- Τοποθετούμε περίπου 500ml από το διάλυμα Fixing solution I σε πλαστικό δοχείο και στην συνέχεια μεταφέρουμε την πηκτή εντός του δοχείου.
- Ανακίνηση σε περιστροφικό αναδευτήρα για 2 ώρες.
- Απομακρύνουμε το Fixing solution I, ξεπλένουμε με νερό και προσθέτουμε στο ίδιο δοχείο 500 ml Staining solution.
- Ανακίνηση σε περιστροφικό αναδευτήρα για 20 min.

- Απομακρύνουμε το Staining solution στη βρύση με ροή νερού, ξεπλένουμε με νερό και προσθέτουμε 500 ml Developing solution.
- Ανακίνηση σε περιστροφικό αναδευτήρα μέχρι να αρχίσουν να φαίνονται ζώνες στη πηκτή.
- Τοποθετούμε το gel σε τράπεζα φωτός και το φωτογραφίζουμε με υψηλής ανάλυσης ψηφιακή φωτογραφική μηχανή.

2.6 Ταυτοποίηση βακτηρίων

Τα βακτήρια τα οποία απομονώθηκαν από τα διάφορα στάδια της κομποστοποίησης ταυτοποιήθηκαν και με βάση το αποτύπωμα DGGE των μεταχειρίσεων από τις οποίες απομονώθηκαν προσπαθήσαμε να αντλήσουμε πληροφορίες για τον οικολογικό τους ρόλο κατά την διάρκεια της κομποστοποίησης και αν αυτός επηρεάζεται από την προσθήκη κασιόγαρου. Τα βακτήρια ταυτοποιήθηκαν με αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA το οποίο αρχικά ενισχύθηκε με PCR, ακολούθησε ένθεση σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα, μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα *E.coli*, επιβεβαίωση της ένθεσης και αλληλούχιση του ενθέματος. Το πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε περιγράφεται βήμα προς βήμα:

2.6.1 Καθαρισμός προϊόντος PCR (PCR Clean-up)

Τα προϊόντα PCR από το DNA των απομονωθέντων βακτηρίων με το ζεύγος εκκινητών 8f – 1512r καθαρίστηκαν με το εμπορικό kit NucleoSpin extract II (Macherey -Nagel) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του παρασκευαστή:

1. Προσαρμογή συνθηκών για την πρόσδεση DNA
 - Αναμείχθηκε 1 όγκος του προϊόντος PCR με 2 όγκους buffer NT το οποίο συμβάλλει στην πρόσδεση του DNA στην μεμβράνη πυριτίου παρουσία υψηλής συγκέντρωσης αλάτων.
2. Πρόσδεση DNA
 - Μεταφορά του δείγματος σε NucleoSpin extract II column.
 - Φυγοκέντρηση για 1 min στις 13200 rpm.
 - Απομάκρυνση του υπερκειμένου.
3. Πλύση μεμβράνης πυριτίου
 - Προσθήκη 600 μl Buffer NT3 (washing buffer) που περιέχει αιθανόλη.
 - Φυγοκέντρηση για 1 min στις 13200 rpm.
 - Εάν είναι απαραίτητο επαναλαμβάνεται το προηγούμενο βήμα με προσθήκη 200 μl buffer NT3.
4. Ξήρανση μεμβράνης
 - Φυγοκέντρηση για 2 min στις 13200 rpm. Στο στάδιο αυτό απομακρύνεται το NT3.
 - Επώαση για 3 min στους 70°C

5. Έκλουση DNA

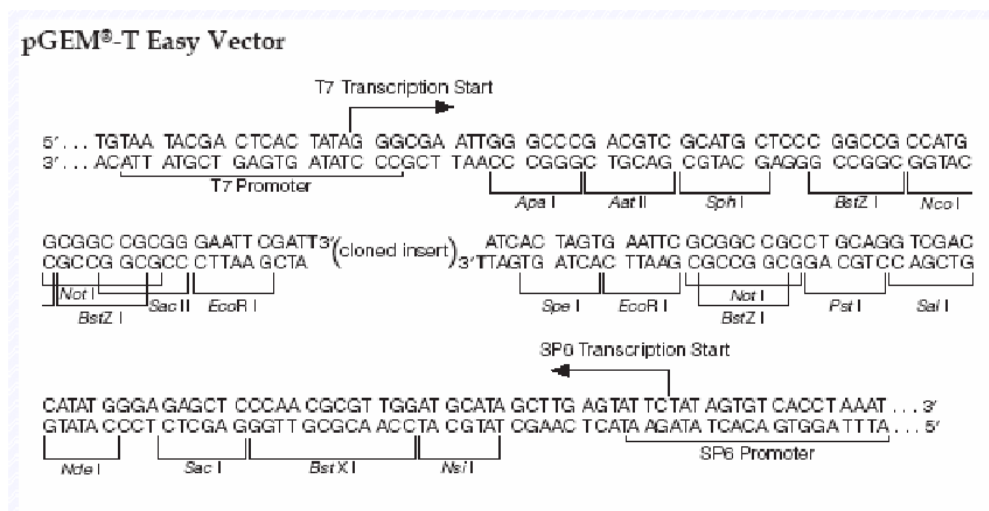
- Προσθήκη 30 μl αποστειρωμένου H₂O,
- Επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρηση για 1 min στις 13200 rpm
- Συλλογή του εκλουόμενου υγρού που περιέχει το DNA το οποίο και διατηρείται στους -20°C.

2.6.2 Ποσοτικοποίηση των δειγμάτων

Πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση του dsDNA στα προϊόντα καθαρισμού με προσδιορισμό της απορόφησης στα 260nm. Στα δείγματα πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:25 (2μl DNA σε 48μl H₂O) ενώ το τυφλό ήταν 48μl H₂O.

2.6.3 Κλωνοποίηση DNA (Ένθεση και μετασχηματισμός)

Για την κλωνοποίηση των προϊόντων PCR χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pGEM-T Easy (Promega). Ο φορέας κλωνοποίησης pGEM-T Easy Vector παρέχεται σε γραμμική μορφή η οποία σε κάθε άκρο έχει ένα νουκλεοτίδιο που περιέχει τη βάση θυμίνη. Επίσης παρέχει τη δυνατότητα επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων με τη χρήση αμπικιλίνης στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, καθώς διαθέτει ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Επίσης διαθέτει την κωδικεύσα περιοχή του α-πεπτιδίου του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης (*lacZ*), το οποίο εξασφαλίζει τη δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης που καταλύει τη διάσπαση του χρωμογόνου συστατικού παρουσία X-gal/IPTG στο θρεπτικό μέσο. Μέσα στο *lacZ* βρίσκεται η θέση κλωνοποίησης του ενθέματος και έτσι απενεργοποίηση αυτού του γονιδίου με την εισαγωγή του ενθέματος στη θέση κλωνοποίησης επιτρέπει την επιλογή των ανασυνδυασμένων κλώνων καθώς δεν πραγματοποιείται χρωμογόνος αντίδραση. Συνεπώς, παρέχεται η δυνατότητα επιλογής των ανασυνδυασμένων και μη ανασυνδυασμένων κλώνων με την ανάπτυξη λευκών και μπλε αποικιών, αντίστοιχα.



Εικόνα 2.5. Η αλληλουχία του pGEM-T Easy Vector.

Ένθεση

ΥΛΙΚΑ

- 2x Rapid Ligation Buffer
 - ρGEM-T Easy Vector
 - T4 DNA Ligase
 - PCR προϊόν
- } περιέχονται στο kit

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Για το υπολογισμό της ποσότητας (ng) του ενθέματος που θα χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση ένθεσης χρησιμοποιήσαμε τον τύπο:

$$\text{ng φορέα} \times \frac{\text{kb μέγεθος ενθέματος}}{\text{kb μέγεθος φορέα}} \times \text{ένθεμα:φορέα molar ratio} = \text{ng ενθέματος}$$

$$\rightarrow \frac{2,5 \times 1,5}{3} \times \frac{3}{1} \rightarrow 37,5 \text{ ng insert.}$$

Με βάση την ποσοτικοποίηση για το κάθε προϊόν PCR προστέθηκε στην αντίδραση κατάλληλος όγκος (μl).

Η αντίδραση ένθεσης πραγματοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 10μl για κάθε βακτήριο και περιείχε τα παρακάτω:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα (μl)
2x Rapid Ligation Buffer	5
ρGEM-T Easy Vector	0,5
T4 DNA Ligase	1
PCR product	x
H ₂ O	ψ
Συνολικός όγκος	10

Η αντίδραση ένθεσης πραγματοποιήθηκε σε σωληνίσκους erpendorf και αφού τα αντιδραστήρια αναμίχθηκαν επιμελώς, οι σωληνίσκοι τοποθετήθηκαν για επώαση στους 4°C για 16 h.

Μετασχηματισμός

Το προϊόν ένθεσης μετασχηματίστηκε σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* DH3 που επιστρώθηκαν σε τριβλία LB άγαρ με αμπικιλίνη. Τα τριβλία τοποθετήθηκαν για επώαση κατά την διάρκεια της νύχτας και ακολούθησε την επόμενη ημέρα επιλογή μπλε/λευκών αποικιών με τις λευκές αποικίες να περιέχουν το προϊόν ένθεσης.

ΥΛΙΚΑ

- Δεκτικά κύτταρα (*E. coli* DH3)
- X-gal (2%)
- IPTG (0,1 M)
- Αμπικιλίνη (stock 100 mg/ml)
- Προϊόν ένθεσης
- Θρεπτικό μέσο LB (7,5 gr Nutrient Broth 'Ε', 7,5 gr άγαρ, προσθήκη H₂O μέχρι τα 500ml)

* Nutrient Broth 'Ε':

Συστατικά	gr/lt
Beef extract	1,0
Yeast extract	2,0
Πεπτόνη (peptone)	5,0
Χλωριούχο Νάτριο (sodium chloride)	5,0

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Προσθήκη 2 μl πλασμιδίου σε 90 μl δεκτικών κυττάρων και σύντομη ανάμιξη.
- Επώαση για 30 min σε πάγο.
- Επώαση στους 42⁰C για 50 sec (heat shock).
- Επώαση για 2 min στον πάγο.
- Προσθήκη 200 μl θρεπτικού μέσου LB και επώαση στους 37⁰C για 50 min
- Προσθήκη 50 μl διαλύματος X-gal και 10 μl διαλύματος IPTG.
- Επίστρωση σε τριβλία LB με αμπικιλίνη (100 μg/ml) .
- Επώαση στους 37⁰C για 16 h.

Με το πέρας των 16 h, στα τριβλία παρατήθηκε ανάπτυξη μπλε και λευκών αποικιών. Τα βακτήρια που αναπτύχθηκαν παρουσία του αντιβιοτικού φέρουν το επιθυμητό πλασμίδιο. Μεταξύ των προϊόντων ένθεσης υπήρχαν και επανακυκλοποιημένα μόρια πλασμιδίου χωρίς ένθεμα. Τα βακτήρια που φέρουν τέτοιο πλασμίδιο διαθέτουν ενεργό το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης και έτσι μπορούν να μεταβολίσουν το ανάλογο της λακτόζης X-Gal που υπάρχει στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας και να δώσουν μπλε ουσία ως παραπροϊόν (5-bromo-4-chloro-indigo) χρωματίζοντας τις βακτηριακές αποικίες. Οι λευκές αποικίες ανήκουν στα βακτήρια που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Η επιβεβαίωση της επιτυχίας της ένθεσης έγινε με τη μέθοδο colony-PCR.

2.6.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με υλικό αποικίας (colony PCR)

Για να επιβεβαιώσουμε με γρήγορο τρόπο αν τα βακτηριακά κύτταρα μιας μοναδικής αποικίας φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, πραγματοποιήθηκε colony PCR με εκκινητές τους 8f -1512r. Με την άκρη αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας επιλέχθηκαν λευκές αποικίες τα κύτταρα των οποίων μεταφέρθηκαν στο σωληνίσκο με τα υπόλοιπα αντιδραστήρια PCR και αποτέλεσαν το εκμαγείο. Η υψηλή θερμοκρασία και η διάρκεια του πρώτου βήματος της αντίδρασης (95°C, 5 min) εξασφαλίζουν την λύση των κυττάρων και την έκθεση του γυμνού και αποδιατεταγμένου πλασμιδίου στα υλικά της αντίδρασης ώστε να ενισχυθεί τελικά το τμήμα DNA που επιθυμούμε. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η PCR παρουσιάζονται στους Πίνακες 2.19 και 2.20 αντίστοιχα.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Buffer for cPCR(10x optimized)	1,5 μl	1x
dNTPs (10 mM)	0,3 μl	0,2 mM
MgCl ₂ (25 mM)	0,9 μl	2 mM
Forward primer 8f (20 pmol/μl)	0,6 μl	0,8 pmol/μl
Reverse primer 1512r (20 pmol/μl)	0,6 μl	0,8 pmol/μl
Πολυμεράση Kapa Taq(1U/μl)	0,06 μl	1 U/50 μl
ddH ₂ O	11,04 μl	
Συνολικός όγκος	15 μl	

Πίνακας 2.19. Colony PCR

Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min	30 κύκλους
Αποδιάταξη	95°C	1 min	
Υβριδοποίηση	55°C	1 min	
Επιμήκυνση	72°C	2 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min	

Πίνακας 2.20. Συνθήκες πραγματοποίησης της colony PCR.

Ηλεκτροφόρηση των colony PCR προϊόντων

Χρησιμοποιήθηκε πηκτή 1% (1 g αγαρόζη σε 100 ml TAE και 3μl βρωμιούχου αιθιδίου). Στην πηκτή φορτώθηκαν 5 μl από κάθε δείγμα DNA αναμειγμένα με 1 μl loading buffer 6x. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 90V. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ήταν δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στην πηκτή αφού τοποθετηθεί σε τράπεζα φωτογράφησης UV.

Οι οδοντογλυφίδες που χρησιμοποιήθηκαν για την επιλογή των αποικιών στην colony PCR εμβαπτίστηκαν ακολούθως σε αποστειρωμένους σωλήνες Falcons (50 ml) με θρεπτικό μέσο LB με αμπικικιλίνη (100 μg/ml). Οι σωλήνες στην συνέχεια επωάστηκαν για 16 ώρες στους 37°C με ανάδευση.

Μετά τις 16 ώρες οι υγρές καλλιέργειες είχαν αναπτυχθεί και περιείχαν κύτταρα *E.coli* με το πλασμίδιο. Για κάθε βακτήριο προετοιμάστηκαν πέντε κλώνοι εκ των οποίων τρεις αποστάλησαν για αλληλούχιση ώστε να επιβεβαιωθεί η αμιγότητα των βακτηριών αλλά και η επαναληψιμότητα της διαδικασίας.

2.6.5 Εξαγωγή πλασμιδίου από *E. coli* (plasmid-preps)

Η εξαγωγή των πλασμιδίων από τα μετασχηματισμένα κύτταρα των επιλεγμένων κλώνων *E. coli* πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό kit Plasmid DNA Purification (Macherey-Nagel) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του παρασκευαστή:

1. Καλλιέργεια και συγκομιδή βακτηριακών κυττάρων
 - Παραλήφθησαν 1,5 ml από κάθε υγρή καλλιέργεια και τοποθετήθηκαν σε σωληνίσκους erpendorf.
 - Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 30 sec στις 13200 rpm.
 - Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το βήμα αυτό επαναλήφθηκε 2-3 φορές.
2. Λύση κυττάρων
 - Πραγματοποιήθηκε προσθήκη 250 µl buffer A1 το οποίο περιέχει RNaseA για την απομάκρυνση του βακτηριακού RNA που θα απελευθερωθεί με τη λύση των κυττάρων.
 - Ακολούθησε έντονη ανάδευση σε vortex μέχρι να διαλυθεί το ίζημα και
 - Προσθήκη 250 µl buffer A2 που βοηθά στην λύση των κυττάρων καθώς περιέχει SDS σε αλκαλικό περιβάλλον.
 - Ακολούθησε ανακίνηση των δειγμάτων 6-8 φορές και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
 - Προσθήκη 300 µl buffer A3 που εξουδετερώνει το αλκαλικό περιβάλλον που είχε δημιουργηθεί στα προηγούμενα βήματα και προετοιμάζει το DNA για την δέσμευσή του στην μεμβράνη πυριτίου.
 - Ανακίνηση για 6-8 φορές.
3. Καθαρισμός λυμμένων κυττάρων
 - Φυγοκέντρηση για 5 min στις 13200 rpm.
4. Πρόσδεση DNA
 - Μεταφορά των δειγμάτων σε NucleoSpin στήλες που περιέχουν μεμβράνη πυριτίου.
 - Φυγοκέντρηση για 1 min στις 13200 rpm και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
5. Πλύση μεμβράνης πυριτίου
 - Προσθήκη 500 µl buffer AW που έχει προθερμανθεί στους 50°C
 - Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στις 13200 rpm.
 - Απομάκρυνση του εκπλύματος
 - Προσθήκη 600 µl buffer A4 που περιέχει αιθανόλη.
 - Φυγοκέντρηση για 1 min στις 13200 rpm, απομάκρυνση του εκπλύματος

6. Ξήρανση μεμβράνης

- Φυγοκέντρωση για 2 min στις 13200 rpm και απομάκρυνση του εκπλύματος

7. Έκλυση DNA

- Προσθήκη 50 µl buffer AE (5 mM Tris/HCl, pH 8,5).
- Επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρωση για 1 min στις 13200 rpm και παραλαβή του εκπλύματος που περιέχει το DNA.

2.6.6 Προετοιμασία των δειγμάτων για αλληλούχιση

Για κάθε βακτήριο προωθήθηκαν τρεις κλώνοι για αλληλούχιση. Η ανάλυση των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε και προς τις δύο κατευθύνσεις (5' προς 3' και 3' προς 5') ώστε να παραλάβουμε την πλήρη αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA που έχει συνολικό μέγεθος 1500 bp. Η επεξεργασία των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με τα προγράμματα Chromas και MEGASTAR. Ακολούθησε ομοπαράθεση των αλληλουχιών των βακτηρίων με αλληλουχίες από την βάση δεδομένων National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) χρησιμοποιώντας το on-line εργαλείο BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Altschul 1997)

2.7 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων DGGE

Κάθε πηκτή DGGE φωτογραφήθηκε με υψηλής ανάλυσης ψηφιακή φωτογραφική μηχανή. Οι φωτογραφίες μετατράπηκαν σε κατάλληλης μορφής αρχεία (.bmp) και ψηφιοποιήθηκαν. Στην συνέχεια η ψηφιακή απεικόνιση της κάθε πηκτής χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση δεδομένων πολλαπλών μεταβλητών (Multivariate Statistical Analysis) με σκοπό να αξιολογήσουμε τα αποτελέσματα που είχε η εφαρμογή του κασιόγαρου στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας της κομπόστας αλλά και τις διαφορές της κοινότητας μεταξύ των σταδίων της κομποστοποίησης. Από την ανάλυση των πηκτών, προέκυψαν δεδομένα δυαδικής μορφής (binary dataset) χρησιμοποιώντας το πακέτο ανάλυσης για πηκτές ηλεκτροφόρησης Cross Checker 2.8v. Τα δυαδικής μορφής δεδομένα στηρίζονται στην παρουσία ή απουσία συγκεκριμένων ζωνών DNA σε κάθε γραμμή της πηκτής DGGE. Η παρουσία της επιλεγμένης ζώνης DNA σε μια γραμμή χαρακτηρίζεται από τον αριθμό 1 (presense) ενώ η απουσία της ζώνης από την γραμμή χαρακτηρίζεται από τον αριθμό 0 (absence).

Ο αριθμός των μεταβλητών (κάθε ζώνη DNA αναγνωρίζεται και ως μια εξαρτημένη μεταβλητή) είναι ιδιαίτερα μεγάλος που καθιστά αδύνατη την απευθείας ανάλυση των δεδομένων χωρίς μετατροπή. Κατά συνέπεια ακολουθήθηκε μία μέθοδος στατιστικής ανάλυσης που συμπυκνώνει τον αριθμό των μεταβλητών αλλά και την παραλλακτικότητα που εμπεριέχουν σε πέντε κύριες μεταβλητές ή νέους άξονες συντεταγμένων (coordinates) και ονομάζεται Principal coordinate analysis (PCoA). Οι τιμές που προκύπτουν

ονομάζονται άδηλοι φορείς (latent vectors) ή νέες συντεταγμένες (coordinates).

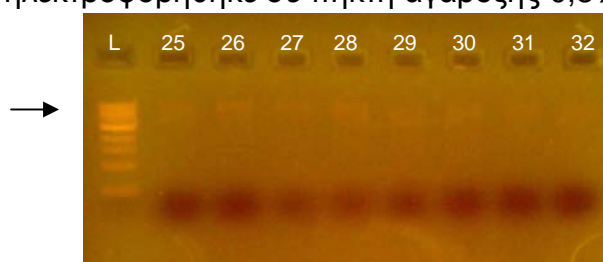
Τα δυαδικής μορφής δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν και για ανάλυση της ομοιότητας ή διαφοράς των αποτυπαμάτων της βακτηριακής κοινότητας στα διάφορα δείγματα compost με την στατιστική μέθοδο ανάλυσης κατά συστάδες (Cluster analysis). Για κάθε πηκτή κατασκευάστηκαν δένδρογράμματα χρησιμοποιώντας τον συντελεστή Jaccard και την Αστάθμιστη Μέθοδο ομάδας ζευγαριού με Αριθμητικό Μέσο Όρο ή αλγόριθμο UPGMA (unweighted paired group with arithmetic means). Πρόκειται για μια μέθοδο που ομαδοποιεί τις ακολουθίες και σε κάθε στάδιο συγχωνεύει δύο συστάδες, δημιουργώντας συγχρόνως και ένα νέο κόμβο. Ο αλγόριθμος ενώνει επαναληπτικά τις δύο κοντινότερες συστάδες (ομάδες ειδών), ωστόσο μείνει μία συστάδα. Σε κάθε βήμα, οι κοντινότερες 2 συστάδες συνδυάζονται σε μία υψηλότερου επιπέδου συστάδα. Η απόσταση μεταξύ οποιωνδήποτε δύο συστάδων A και B υπολογίζεται ως ο μέσος όρος όλων των αποστάσεων μεταξύ των ζευγαριών των αντικειμένων. Για όλες τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο Genstat 11.0v.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αποτελέσματα εξαγωγής DNA από κομπόστα και βακτήρια

3.1.1 Εξαγωγή DNA από κομπόστα

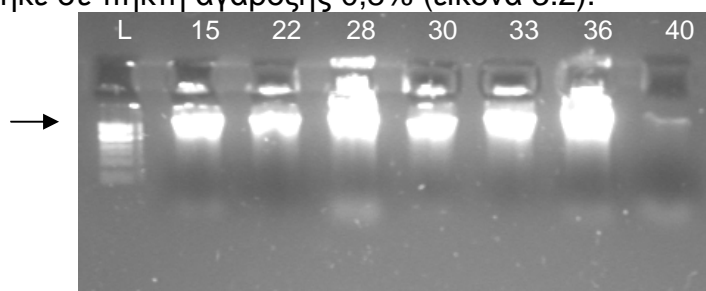
Αρχικά πραγματοποιήθηκε εξαγωγή DNA από τα δείγματα του compost. Για τον έλεγχο της απόδοσης της εξαγωγής, μια ποσότητα από τα δείγματα DNA ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αгарόζης 0,8% (εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 0,8% δειγμάτων DNA από το compost. L: N 3232L, 1Kb DNA ladder, New England BioLabs. Γραμμές 25-28: DNA από δείγματα compost με κασίγαρο από το στάδιο της ωρίμανσης, Γραμμές 29-32: DNA από δείγματα compost χωρίς κασίγαρο (M) επίσης από το στάδιο ωρίμανσης. Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 5 μ l DNA.

3.1.2 Εξαγωγή DNA από βακτήρια

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε εξαγωγή DNA από τα βακτήρια τα οποία απομονώθηκαν από τα διάφορα στάδια της κομποστοποίησης. Για τον έλεγχο της απόδοσης της εξαγωγής, μια ποσότητα από τα δείγματα DNA ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αгарόζης 0,8% (εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 0,8% δειγμάτων DNA από βακτήρια που απομονώθηκαν στα διάφορα στάδια της κομποστοποίησης. L: N 3232L, 1Kb DNA ladder, New England BioLabs. Γραμμές 15-36: DNA βακτηρίων που απομονώθηκαν στο 2^ο θερμόφιλο στάδιο, Γραμμή 40: DNA βακτηριού που απομονώθηκε στο στάδιο επώασης. Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 5 μ l DNA.

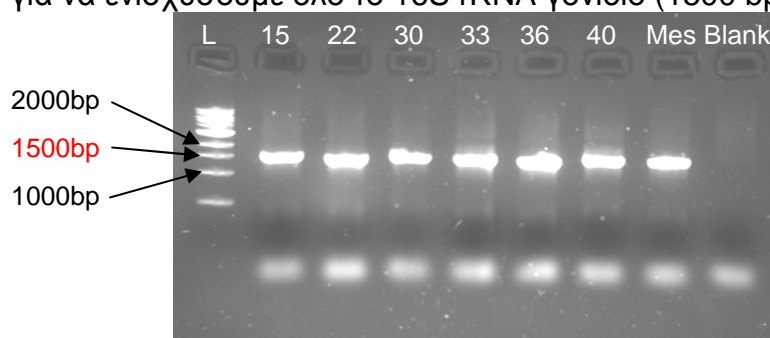
3.2 Αποτελέσματα Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

3.2.1 Ενίσχυση του γονιδίου *nifH* στα βακτήρια με PCR

Μετά από πολλές δοκιμές τόσο στις θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες όσο και στην αναλογία των αντιδραστηρίων δεν κατέστη δυνατή η ενίσχυση του γονιδίου *nifH* τόσο από τα βακτήρια που απομονώθηκαν όσο και από τα δείγματα κομπόστας. Η αποτυχία αυτή μπορεί να οφείλεται στο χαμηλό ποσοστό παρουσίας αζωτοδεσμευτών στην μικροβιακή κοινότητα της κομπόστας. Η επιβεβαίωση της ικανότητας των απομονωθέντων βακτηρίων να αζωτοδεσμεύουν θα βοηθήσει στην εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων για την αποτυχία ενίσχυσης του *nifH* γονιδίου.

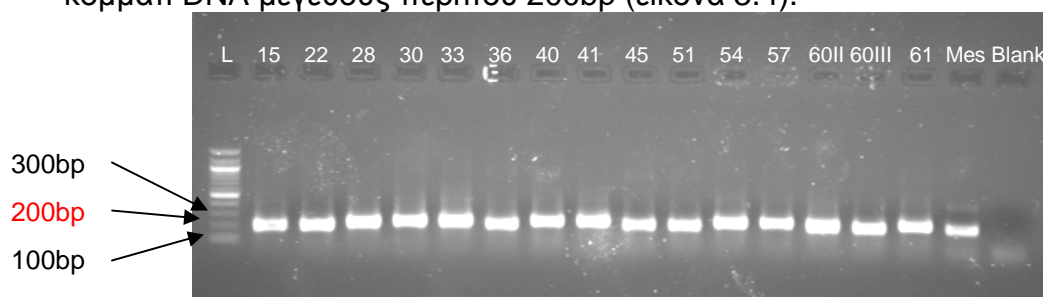
3.2.2 Ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA στα βακτήρια με PCR

Ακολούθησε ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA στα βακτήρια που απομονώθηκαν. Έτσι πραγματοποιήθηκε PCR με το ζεύγος εκκινητών 8f-1512r για να ενισχύσουμε όλο το 16S rRNA γονίδιο (1500 bp) (εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 1% PCR προϊόντων της 16S rRNA περιοχής στα βακτήρια με του εκκινητές 8f – 1512r. L:N 3232L, 1Kb DNA ladder, New England BioLabs. Γραμμές 15-40: PCR προϊόν βακτηρίων, Mes: προϊόν PCR από στέλεχος του βακτηρίου *Mesorhizobium loti* (θετικό control), Blank:αρνητικό control. Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 5 μl προϊόν.

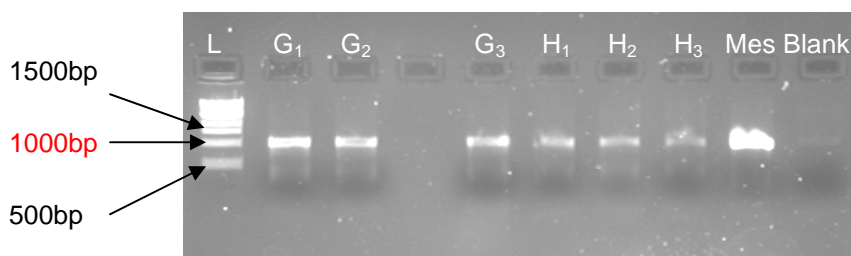
Στην δεύτερη PCR (PCR εσωτερικής ένθεσης) χρησιμοποιήσαμε τους εκκινητές Muyzer F (357f-GC) και Muyzer R (534r) οι οποίοι ενισχύουν ένα κομμάτι DNA μεγέθους περίπου 200bp (εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 1,2% προϊόντων PCR εσωτερικής ένθεσης του 16S rRNA γονιδίου των απομονωθέντων βακτηρίων με τους εκκινητές 357f+GC – 534r. L: N 3231S, 100bp DNA ladder, New England BioLabs. Γραμμές 15-61: PCR εσωτερικής ένθεσης απομονωθέντων βακτηρίων 15, 22, 28, 30, 36, 40, 41, 45, 51, 54 και 57, 60II, 60III, 61, Mes: PCR προϊόν από βακτηριακό στέλεχος *Mesorhizobium loti* (θετικό control), Blank: αρνητικό control. Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 5 μl προϊόν.

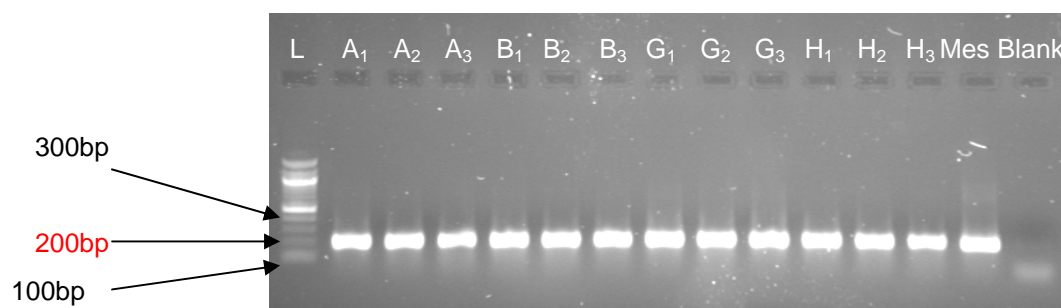
3.2.3 Ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA στη βακτηριακή κοινότητα της κομπόστας με PCR

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε PCR ενίσχυση επιλεγμένης περιοχής μεγέθους περίπου 1000bp του 16S rRNA γονιδίου από την βακτηριακή κοινότητα στα διάφορα δείγματα compost. Σε αυτή την PCR χρησιμοποιήσαμε τους εκκινητές 63f-1087r (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 1% PCR προϊόντων της 16S rRNA περιοχής στην βακτηριακή κοινότητα της κομπόστας με τους εκκινητές 63f-1087r. L: N 3232L, 1Kb DNA ladder, New England BioLabs. Γραμμές G₁-G₃: PCR προϊόν σταδίου ωρίμανσης (M), H₁-H₃: PCR προϊόν σταδίου ωρίμανσης (OMW), Mes: PCR προϊόν από βακτηριακό στέλεχος *Mesorhizobium loti* (θετικό control), Blank: αρνητικό control. Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 5 μl προϊόν.

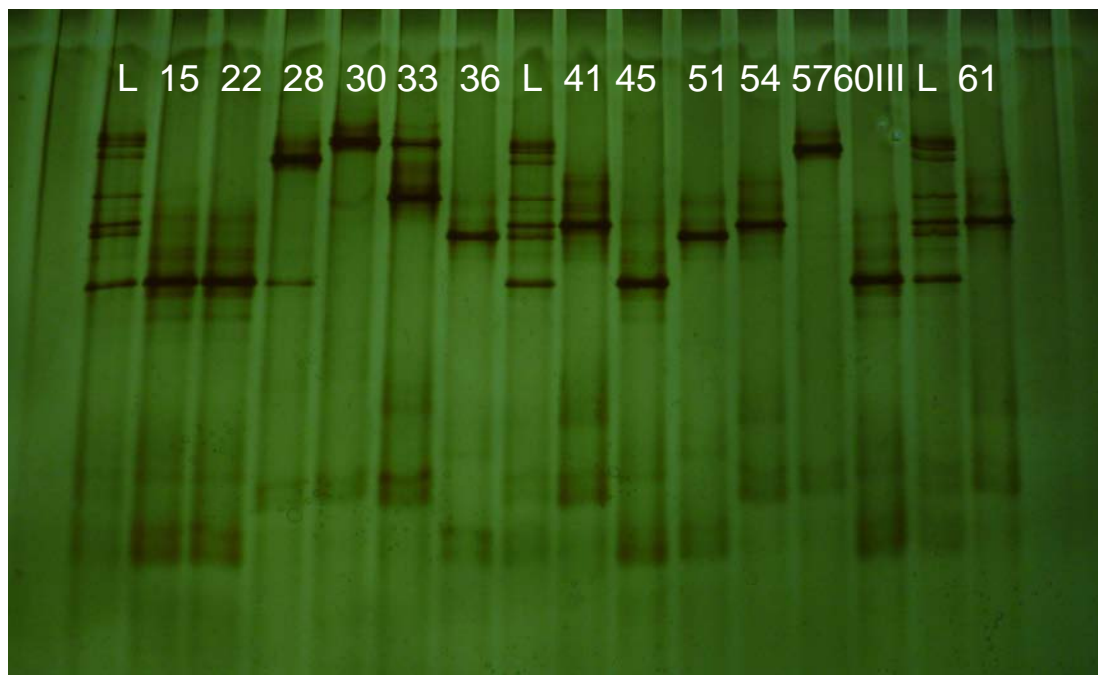
Στην PCR εσωτερικής ένθεσης που ακολούθησε χρησιμοποιήσαμε τους εκκινητές Muzyer F (357f-GC) και Muzyer R (534r) οι οποίοι ενισχύουν ένα κομμάτι γύρω στις 200bp (εικόνα 3.6).



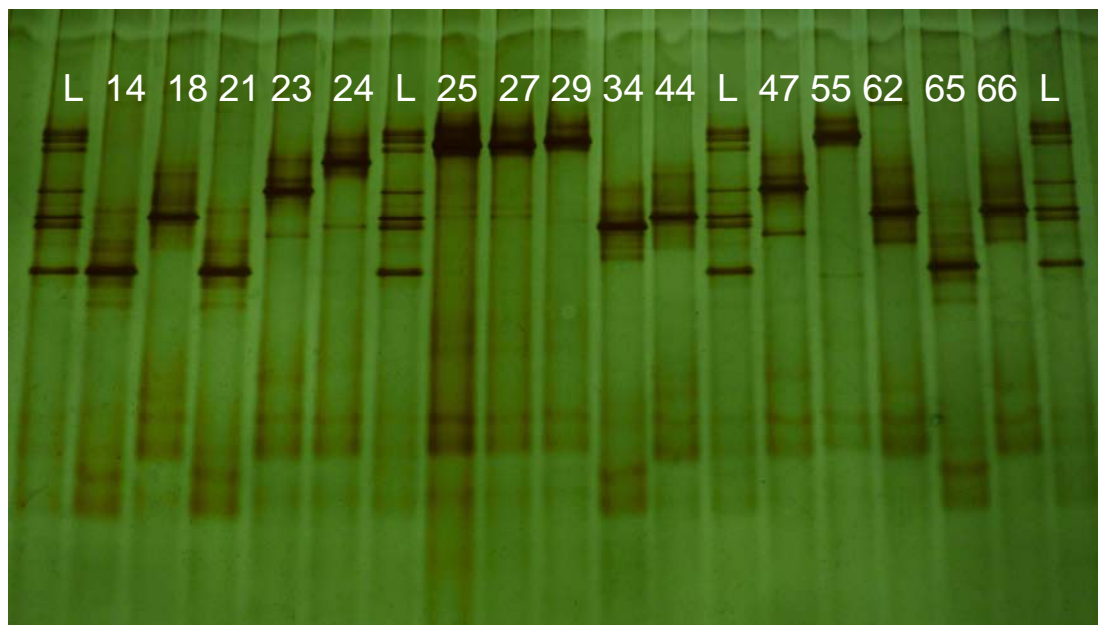
Εικόνα 3.6. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 1,2% προϊόντων PCR εσωτερικής ένθεσης της 16S rRNA περιοχής στην βακτηριακή κοινότητα του compost με τους εκκινητές 357f+GC – 534r. L: N 3231S, 100bp DNA ladder, New England BioLabs. A1-A3: προϊόν PCR εσωτερικής ένθεσης 1ου θερμόφιλου σταδίου (M), B1-B3: προϊόν PCR εσωτερικής ένθεσης 1ου θερμόφιλου σταδίου (OMW), G1-G3: προϊόν PCR εσωτερικής ένθεσης σταδίου ωρίμανσης (M), H1-H3: προϊόν PCR εσωτερικής ένθεσης σταδίου ωρίμανσης (OMW), Mes: προϊόν PCR από το βακτηριακό στέλεχος *Mesorhizobium loti* (θετικό control), Blank: αρνητικό control. Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 5 μl προϊόν.

3.3. Αποτελέσματα Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) και στατιστική ανάλυση

3.3.1 Προκαταρκτική ομαδοποίηση απομονωθέντων βακτηρίων



Εικόνα 3.7. Εικόνα πηκτής DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 45-65% όπου παρουσιάζονται τα μοριακά αποτυπώματα από τα προϊόντα PCR από την V3 περιοχή του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων που απομονώθηκαν από διάφορα στάδια της κομποστοποίησης. Όπου L ladder που αποτελεί ανάμιξη προϊόντων από την περιοχή V3 του 16S rRNA γονιδίου όλων των παραπάνω βακτηρίων (20 ng/μl για κάθε βακτήριο) .



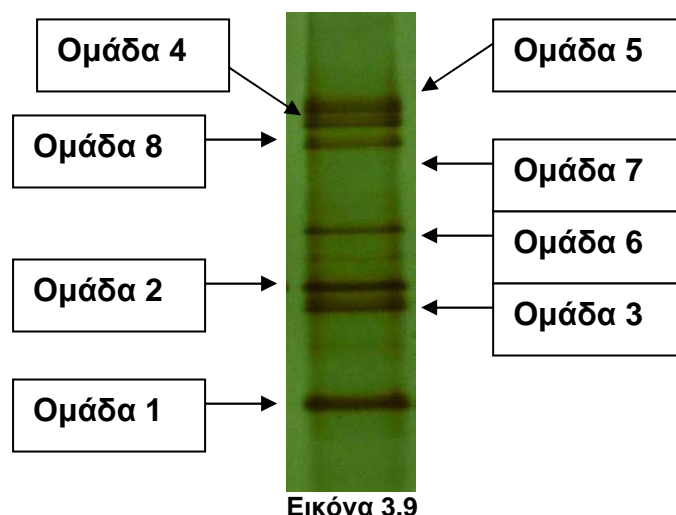
Εικόνα 3.8. Εικόνα πηκτής DGGE με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 45-65% όπου αναλύθηκαν τα προϊόντα PCR από την V3 περιοχή 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων που απομονώθηκαν από διάφορα στάδια της κομποστοποίησης. Όπου L ladder που αποτελεί ανάμιξη προϊόντων PCR από την περιοχή V3 του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων (20 ng/μl για κάθε βακτήριο) από την εικόνα 3.7.

Στις εικόνες 3.7 και 3.8 παρατηρούμε το μοριακό αποτύπωμα DGGE των βακτηρίων που απομονώθηκαν από διάφορα στάδια της κομποστοποίησης. Παρατηρούμε ότι όλα τα βακτήρια εκτός του 33 (Εικόνα 3.7) έδωσαν μία ζώνη στην πηκτική DGGE που αποτελεί επιπλέον απόδειξη ότι είναι αμιγή. Με βάση αυτή την αξιολόγηση επιλέχθηκαν τα αμιγή βακτήρια που προωθήθηκαν για αλληλούχιση του 16S rRNA γονιδίου τους ώστε να ταυτοποιηθούν. Τα βακτήρια ομαδοποιήθηκαν αρχικά με βάση τα μοριακά τους αποτυπώματα σε πηκτική DGGE (πίνακας 3.1). Έτσι βακτήρια των οποίων η ζώνη στην πηκτική DGGE παρουσιάζει ταυτόσημη κινητικότητα θεωρήθηκαν ότι αποτελούν το ίδιο βακτηριακό στέλεχος και συνεπώς ένα έως τέσσερα βακτήρια από κάθε ομάδα προωθήθηκαν για αλληλούχιση ανάλογα με τον αριθμό των βακτηρίων σε κάθε ομάδα.

Ομάδα 1	14, 15 ,21, 22 , 45 , 60III ,65
Ομάδα 2	18 , 41 ,44, 54 , 61 ,62,66
Ομάδα 3	34 , 36 ,51
Ομάδα 4	25, 27 , 30
Ομάδα 5	29 ,55, 57
Ομάδα 6	23 ,47
Ομάδα 7	24
Ομάδα 8	28

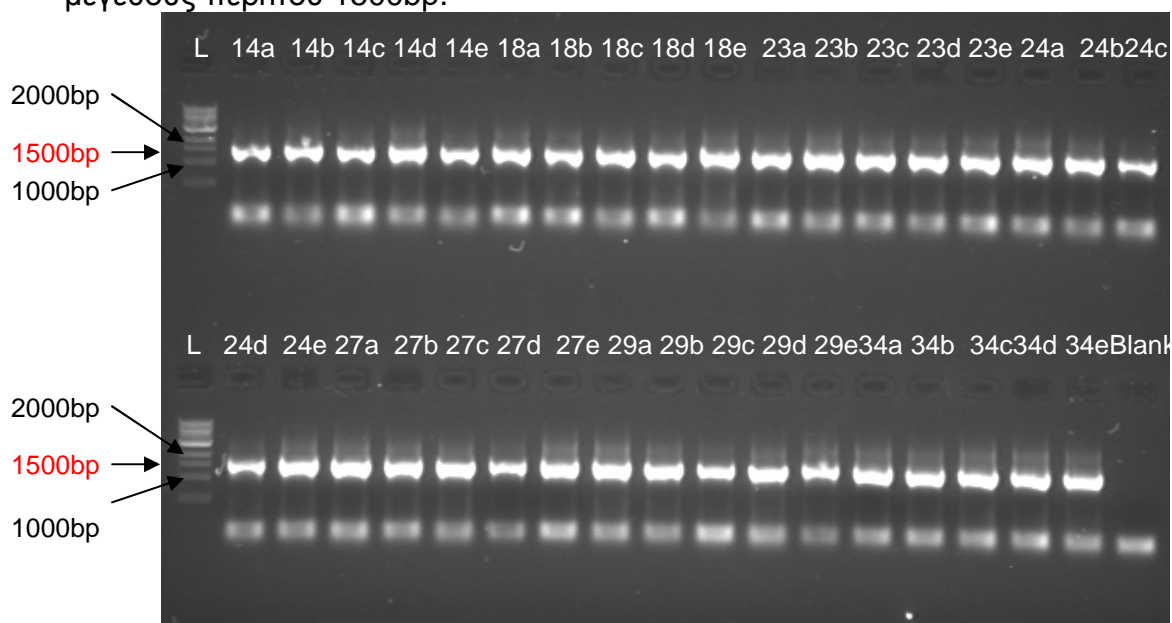
Πίνακας 3.1. Ομαδοποίηση βακτηρίων με βάση το μοριακό τους αποτύπωμα σε πηκτική DGGE. Τα βακτήρια με τα έντονα γράμματα είναι αυτά που στάλθηκαν για αλληλούχιση.

Στην εικόνα 3.9 παρουσιάζεται ο ladder σε μεγέθυνση και τα βελόνια δείχνουν το αποτύπωμα των ομάδων των βακτηρίων.



3.3.2 Αλληλούχιση επιλεγέντων βακτηρίων

Πραγματοποιήθηκε αρχικά ένθεση και μετασχηματισμός των PCR προϊόντων που προέκυψαν για όλο το 16S rRNA γονίδιο για τα επιλεγμένα βακτήρια. Με την μέθοδο colony PCR αξιολογήθηκε εάν τα βακτηριακά κύτταρα *E. coli* κατέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μετά την κλωνοποίηση. Στην colony-PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 8f -1512r για την ενίσχυση όλου του ενθέματος που είναι το γονίδιο 16S rRNA συνολικού μεγέθους περίπου 1500bp.



Εικόνα 3.10. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 1% colony PCR με το ζεύγος εκκινητών 8f-1512r. L: N 3232L, 1Kb DNA ladder, New England BioLabs. Γραμμές 14, 18, 23, 24, 27, 29, και 34: προϊόν PCR από τα απομονωθέντα βακτήρια. Τα γράμματα a-e που ακολουθούν τους αριθμούς αντιστοιχούν σε 5 κλώνους για κάθε βακτήριο, Blank: αρνητικό control. Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 5 μl προϊόν.

Οι αλληλουχίες του 16S rRNA γονιδίου των απομονωθέντων βακτηρίων αφού παραλήφθησαν ελέχθησαν αρχικά για λάθη με κατάλληλα προγράμματα επεξεργασίας και στην συνέχεια αξιολογήθηκε η ομολογία τους με αλληλουχίες της βάσης δεδομένου του National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) με το on-line εργαλείο BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Altschul 1997). Στον πίνακα 3.2 παρουσιάζονται για καθένα από τα απομονωθέντα βακτήρια τα τρία στελέχη με την υψηλότερη ομολογία για το γονίδιο 16S rRNA.

Βακτήριο	Ταυτοποίηση	Identities	
15	Uncultured Ochrobactrum sp. clone p4 16S ribosomal RNA gene	1439/1449(99%)	gb AY851688.1
	Ochrobactrum anthropi gene for 16S rRNA	1438/1449(99%)	dbj AB120120.1
	Ochrobactrum intermedium 16S rRNA gene (partial)	1435/1445(99%)	emb AJ242583.2
18	Xanthomonas sp. BJQ-H4 16S ribosomal RNA gene	1500/1504(99%)	gb FJ600362.1
	Xanthomonas sp. BJQ-BAI3 16S ribosomal RNA gene	1500/1504(99%)	gb FJ600360.1
	Stenotrophomonas maltophilia strain pp5c 16S ribosomal RNA gene	1502/1509(99%)	gb GQ360071.1
22	Uncultured Ochrobactrum sp. clone p4 16S ribosomal RNA gene	1434/1437(99%)	gb AY851688.1
	Ochrobactrum anthropi gene for 16S rRNA	1433/1437(99%)	dbj AB120120.1
	Ochrobactrum intermedium 16S rRNA gene (partial)	1430/1433(99%)	emb AJ242583.2
23	Stenotrophomonas maltophilia strain PSM-2 16S ribosomal RNA gene	1499/1511(99%)	gb FJ906801.1
	Stenotrophomonas sp. EC-S105 gene for 16S rRNA	1499/1511(99%)	dbj AB200253.1
	Stenotrophomonas maltophilia partial 16S rRNA gene	1488/1496(99%)	emb AJ293470.1
24	Pseudomonas putida 16S ribosomal RNA gene	1495/1501(99%)	gb AF291048.1 AF291048
	Pseudomonas plecoglossicida gene for 16S rRNA	1493/1498(99%)	dbj AB009457.1
	Pseudomonas sp. S27 16S ribosomal RNA gene	1494/1502(99%)	EU747694.1
27	Pseudomonas sp. S-JS-8 16S ribosomal RNA gene	1490/1498(99%)	gb FJ529034.1
	Pseudomonas sp. BFXJ-8 16S ribosomal RNA gene	1493/1502(99%)	gb EU013945.1
	Uncultured Pseudomonas sp. clone YJQ-12 16S ribosomal RNA gene	1489/1497(99%)	gb AY569288.1
28	Flavobacterium sp. WB3.2-27 partial 16S rRNA gene	1444/1470(98%)	emb AM934658.1
	Flavobacterium sp. Asd M3-5 16S rRNA gene	1447/1478(97%)	emb FM955862.1
	Flavobacterium sp. WB 2.4.2 partial 16S rRNA gene	1442/1471(98%)	emb AM167563.1
29	Pseudomonas aeruginosa strain WJ-1 16S ribosomal RNA gene	1492/1497(99%)	gb FJ948174.1
	Pseudomonas aeruginosa strain MML2212 16S ribosomal RNA gene	1492/1497(99%)	gb EU344794.1
	Pseudomonas aeruginosa strain NK 2.1B-1 16S ribosomal RNA gene	1492/1497(99%)	gb EU352760.1
30	Pseudomonas sp. W15Feb9B 16S ribosomal RNA gene	1484/1491(99%)	gb EU680989.1
	Pseudomonas sp. W15Feb1 16S ribosomal RNA gene	1484/1491(99%)	gb EU680979.1

	Pseudomonas putida isolate Tg 16S ribosomal RNA gene	1490/1500(99%)	gb EU275363.1
34	Agrobacterium sp. JS71 16S ribosomal RNA gene	1445/1450(99%)	gb AY174112.1
	Rhizobium sp. HGR13 16S ribosomal RNA gene	1446/1452(99%)	gb GQ483459.1
	Agrobacterium tumefaciens strain M5 16S ribosomal RNA gene	1447/1454(99%)	gb EF443163.1
36	Rhizobium sp. HGR13 16S ribosomal RNA gene	1448/1451(99%)	gb GQ483459.1
	Rhizobium sp. HGR4 16S ribosomal RNA gene	1448/1452(99%)	gb GQ483457.1
	Agrobacterium tumefaciens strain M5 16S ribosomal RNA gene	1449/1455(99%)	gb EF443163.1
41	Stenotrophomonas maltophilia strain pp5c 16S ribosomal RNA gene	1502/1507(99%)	gb GQ360071.1
	Stenotrophomonas maltophilia strain PSSB7 16S ribosomal RNA gene	1498/1503(99%)	gb FJ707375.1
	Stenotrophomonas maltophilia strain 1.22 16S ribosomal RNA gene	1496/1500(99%)	gb EF426435.1
45	Uncultured Ochrobactrum sp. clone p4 16S ribosomal RNA gene	1444/1451(99%)	gb AY851688.1
	Ochrobactrum anthropi gene for 16S rRNA	1443/1451(99%)	dbj AB120120.1
	Ochrobactrum intermedium 16S rRNA gene (partial)	1440/1447(99%)	emb AJ242583.2
54	Stenotrophomonas maltophilia strain PSSB7 16S ribosomal RNA gene	1499/1505(99%)	gb FJ707375.1
	Stenotrophomonas maltophilia strain pp5c 16S ribosomal RNA gene	1502/1510 (99%)	gb GQ360071.1
	Stenotrophomonas maltophilia strain YHYJ-1 16S ribosomal RNA gene	1501/1509 (99%)	gb FJ765513.1
57	Pseudomonas aeruginosa strain pY11T-3-1 16S ribosomal RNA gene	1493/1497 (99%)	gb EU331416.1
	Pseudomonas aeruginosa clone X13 16S ribosomal RNA gene	1490/1493 (99%)	gb AY631241.1
	Pseudomonas aeruginosa LESB58 complete genome sequence	1496/1502 (99%)	emb FM209186.1
60III	Uncultured Ochrobactrum sp. clone p3 16S ribosomal RNA gene	1489/1495 (99%)	gb AY851687.1
	Ochrobactrum sp. Ca-34 16S ribosomal RNA gene	1491/1501 (99%)	gb DQ647056.1
	Ochrobactrum anthropi partial 16S rRNA gene	1433/1434 (99%)	emb AM114410.1
61	Stenotrophomonas maltophilia strain PSSB7 16S ribosomal RNA gene	1499/1507 (99%)	gb FJ707375.1
	Xanthomonas sp. BJQ-H4 16S ribosomal RNA gene	1497/1505 (99%)	gb GQ360071.1
	Xanthomonas sp. BJQ-BAI3 16S ribosomal RNA gene	1497/1505 (99%)	gb FJ765513.1

Πίνακας 3.2. Ταυτοποίηση απομονωθέντων βακτηρίων με βάση της % ομολογία της αλληλουχίας του 16S RRNA γονιδίου τους με βακτηριακά στελέχη ή κλώνους που βρίσκονται στην βάση δεδομένων NCBI.

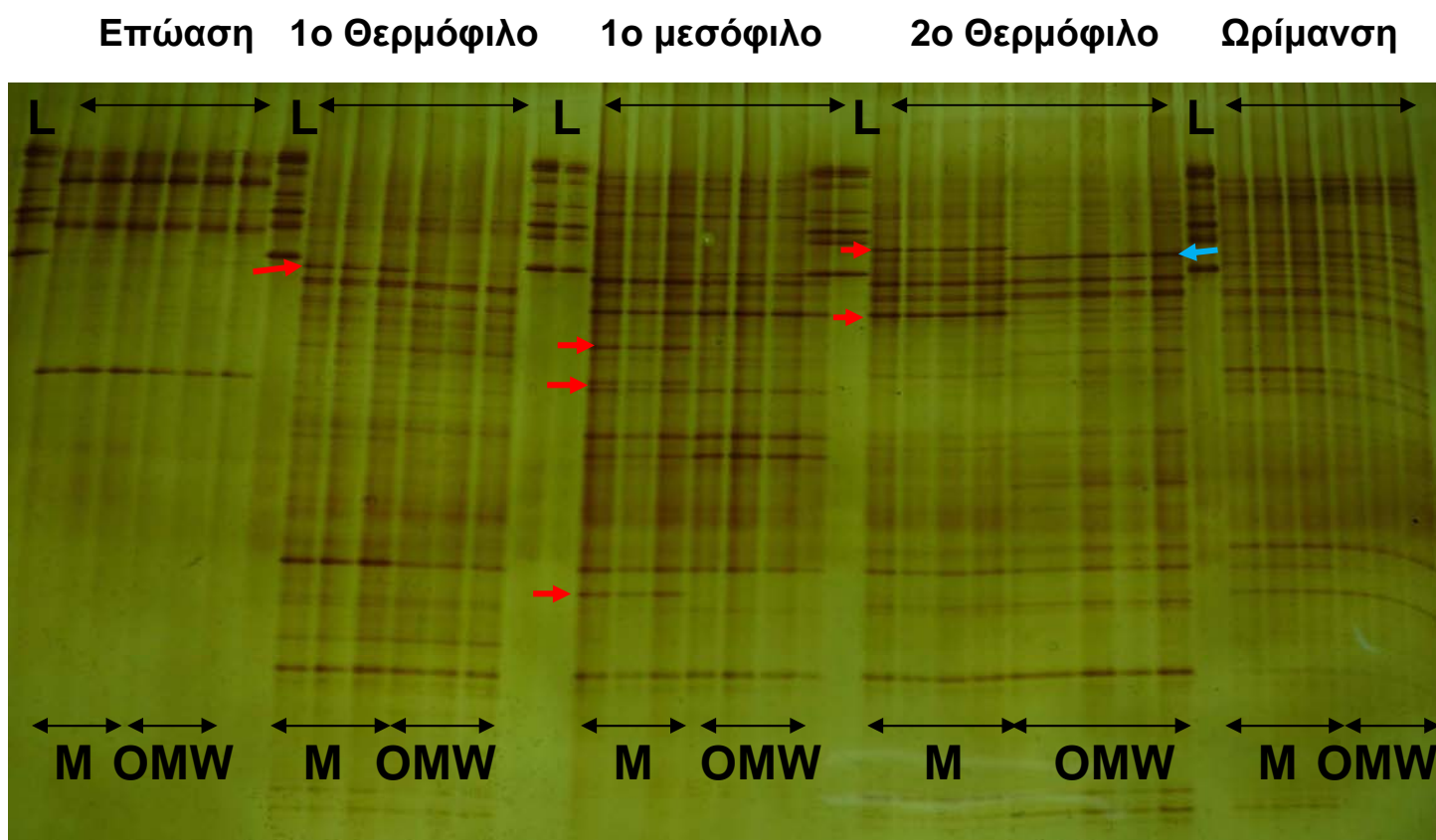
Στον πίνακα 3.3 με βάση και τον πίνακα 3.2 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι ομάδες των βακτηρίων και η ταυτοποίησή τους μαζί με τα βακτήρια που δεν στάλθηκαν για αλληλούχιση.

Ομάδες	Είδος βακτηρίου με την υψηλότερη % ομολογία
Ομάδα 1:14,15,21,22,45,60III,65	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
Ομάδα 2:18,41,44,54,61,62,66	<i>Stenotrophomonas maltophilia/Xanthomonas</i>
Ομάδα 3:34,36,51	<i>Agrobacterium/Rhizobium sp.</i>
Ομάδα 4:25,27,30	<i>Pseudomonas sp.</i>
Ομάδα 5:29,55,57	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Ομάδα 6:23,47	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Ομάδα 7:24	<i>Pseudomonas putida</i>
Ομάδα 8:28	<i>Flavobacterium sp.</i>

Πίνακας 3.3. Ταυτοποίηση βακτηρίων που δεν προωθήθηκαν προς αλληλούχιση αλλά ταυτοποιήθηκαν εμμέσως με βάση το μοριακό τους αποτύπωμα DGGE.

Συνεπώς, τα βακτήρια που απομονώθηκαν ανήκουν στα γένη *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas/Xanthomonas*, *Agrobacterium/Rhizobium*, *Flavobacterium* και *Ochrobactrum*.

3.3.3. Μεταβολές στην βακτηριακή κοινότητα του compost



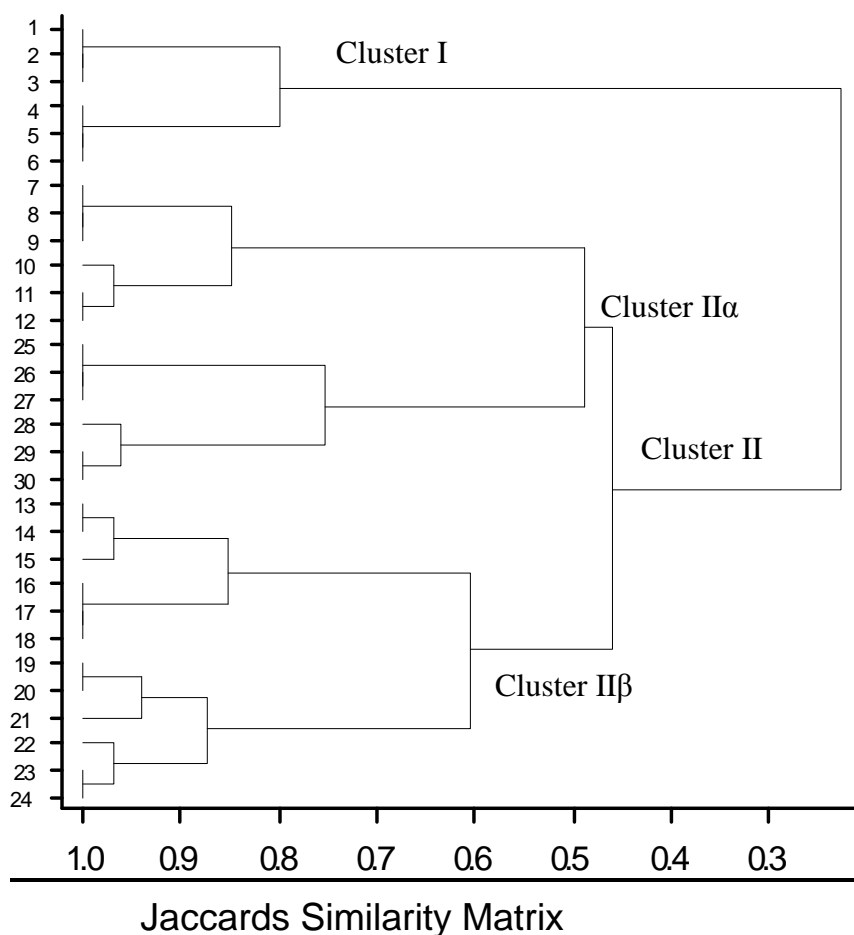
Εικόνα 3.11. Εικόνα πηκτής DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 40-70% όπου αναλύθηκαν τα προϊόντα PCR από την V3 περιοχή 16S rRNA γονιδίου της βακτηριακής κοινότητας της κομπόστας Όπου L ladder που αποτελεί ανάμιξη προϊόντων PCR από την περιοχή V3 του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων από την εικόνα 3.7. Όπου M είναι ο μάρτυρας δηλαδή η μεταχείριση χωρίς τον κασιγάρο και OMW είναι η μεταχείριση με τον κασιγάρο.

Τα αποτυπώματα της βακτηριακής κοινότητας στα διάφορα στάδια της κομποστοποίησης που δέχθηκαν ή όχι κασιγάρο παρουσιάζονται στην εικόνα 3.11. Παρατηρούμε ότι το αποτύπωμα της βακτηριακής κοινότητας μεταβάλεται σε σημαντικό βαθμό από στάδιο σε στάδιο κομποστοποίησης. Έτσι κατά το στάδιο της επώασης, με την έναρξη της κομποστοποίησης, παρατηρούμε ότι το μοριακό αποτύπωμα της βακτηριακής κοινότητας δεν είναι ιδιαίτερα περίπλοκο και αποτελείται από ζώνες που βρίσκονται στην περιοχή της πηκτής με χαμηλή συγκέντρωση αποδιατακτικών ουσιών, άρα βακτήρια με χαμηλή περιεκτικότητα σε G+C στην αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου. Αντίθετα, στα ακόλουθα στάδια και ιδιαίτερα στο 1^ο θερμόφιλο παρατηρείται μια αύξηση των ζωνών στην περιοχή της υψηλής συγκέντρωσης αποδιατακτικών ουσιών, άρα και εμφάνιση στην βακτηριακή κοινότητα βακτηρίων που χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε G+C.

Αναφορικά με την εφαρμογή του κασιγάρου στο compost, σε επιμέρους στάδια κομποστοποίησης (1^ο θερμόφιλο, μεσόφιλο και 2^ο θερμόφιλο) παρατηρήθηκαν ζώνες στο μοριακό αποτύπωμα των δειγμάτων compost που δεν δέχτηκαν εφαρμογή κασιγάρου οι οποίες εξαφανίζονται πλήρως στο αντίστοιχο αποτύπωμα compost που δέχτηκαν εφαρμογή κασιγάρου (ζώνες που επισημαίνονται με κόκκινα βελάκια στην εικόνα 3.11).

Αντίθετα, ένας μικρός αριθμός κυριάρχων ζωνών στο αποτύπωμα δειγμάτων compost που δέχτηκαν κασίγαρο εμφανίζονται με χαμηλότερη ένταση στα αντίστοιχα αποτυπώματα της βακτηριακής κοινότητας δειγμάτων που δεν δέχτηκαν εφαρμογή κασίγαρου (ζώνες που επισημαίνονται με γαλάζιο βέλακι στην εικόνα 3.11). Παρόλα αυτά, οι διαφορές των μοριακών αποτυπωμάτων μεταξύ των δύο μεταχειρίσεων σε κάθε στάδιο της κομποστοποίησης δεν είναι τόσο έντονες όσο αυτές μεταξύ των σταδίων κομποστοποίησης για την ίδια μεταχείριση.

Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της πηκτής DGGE της βακτηριακής κοινότητας όπως περιγράφηκε προηγουμένως οδήγησε στην δημιουργία δυαδικής μορφής δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Έτσι αρχικά η ομοιότητα μεταξύ των μεταχειρίσεων αλλά και των σταδίων κομποστοποίησης εξετάστηκε με ανάλυση κατά συστάδες (Cluster Analysis). Το δένδρογραμμα που δημιουργήθηκε με τον αλγόριθμο Jaccard παρουσιάζεται στην εικόνα 3.12.

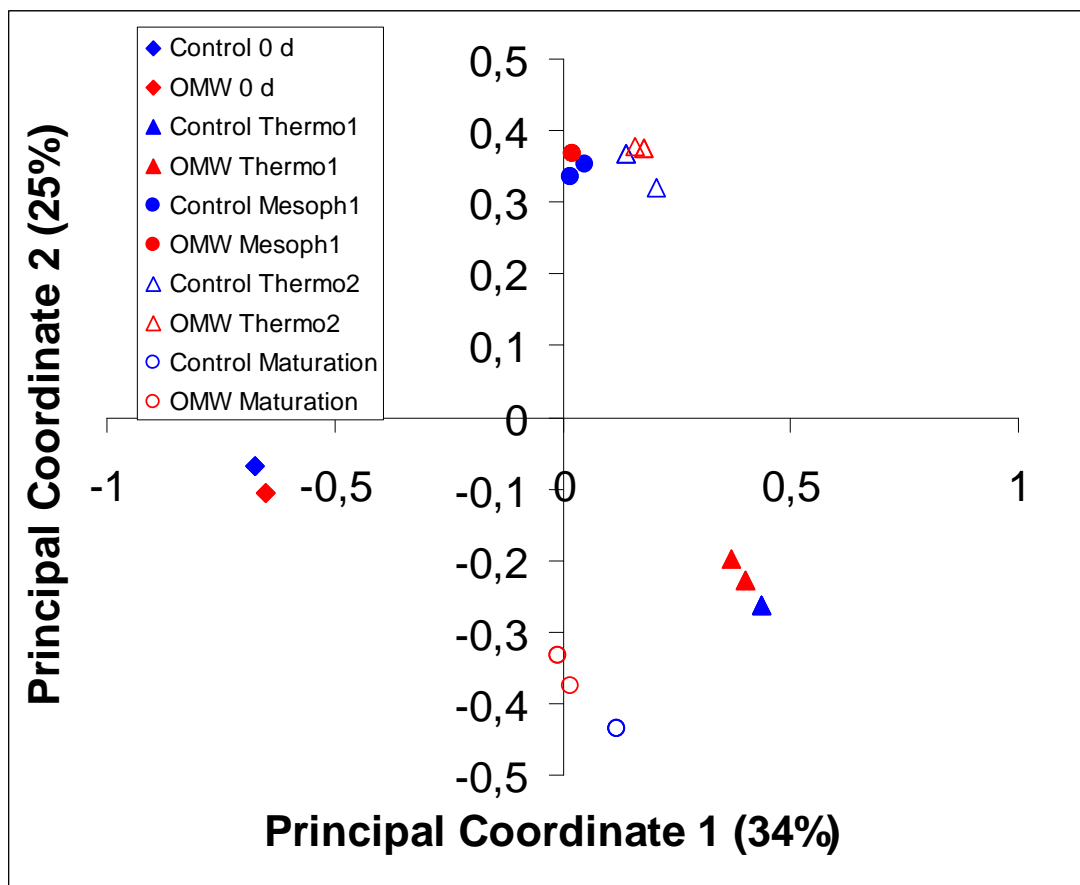


Εικόνα 3.12. Ανάλυση κατά συστάδες (Group average, Jaccard similarity index) του μοριακού αποτυπώματος της βακτηριακής κοινότητας της κομπόστας. Η αντιστοίχιση των αριθμών φαίνεται στον πίνακα 3.4.

Αρίθμηση	Μεταχείριση
1-3	Μάρτυρας 0 ημέρες
4-6	Κατσίγαρος 0 ημέρες
7-9	Μάρτυρας θερμόφιλο στάδιο 1
10-12	Κατσίγαρος θερμόφιλο στάδιο 1
13-15	Μάρτυρας Μεσόφιλο στάδιο 1
16-18	Κατσίγαρος Μεσόφιλο στάδιο 1
19-21	Μάρτυρας θερμόφιλο στάδιο 2
22-24	Κατσίγαρος θερμόφιλο στάδιο 2
25-27	Μάρτυρας Ωρίμανση
28-30	Κατσίγαρος Ωρίμανση

Πίνακας 3.4

Τα δείγματα από τα διάφορα στάδια κομποστοποίησης στις δύο μεταχειρίσεις ομαδοποιήθηκαν σε δύο κύριες συστάδες: Συστάδα I που περιλαμβάνει τα δείγματα που συλλέχθηκαν αμέσως με την έναρξη της κομποστοποίησης (0 ημέρες) και Συστάδα II όπου περιλαμβάνονται όλα τα υπόλοιπα δείγματα. Εντός της Συστάδας II τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν σε δύο δευτερεύουσες συστάδες, IIα και IIβ, με βάση το στάδιο κομποστοποίησης. Έτσι στην συστάδα IIα περιλαμβάνονται τα δείγματα από το 1^ο θερμόφιλο στάδιο και το στάδιο ωρίμανσης, ενώ στην συστάδα IIβ, που παρουσιάζεται και πιο συμπαγής, ομαδοποιήθηκαν τα δείγματα από το μεσόφιλο στάδιο και το 2^ο θερμόφιλο στάδιο. Εντός τόσο των κύριων όσο και των δευτερευόντων συστάδων τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν με βάση την μεταχείριση που δέχτηκαν δηλαδή την εφαρμογή ή όχι κατσίγαρου. Γενικότερα παρατηρήθηκε υψηλή επαναληψιμότητα μεταξύ των τριών επαναλήψεων σε όλες τις μεταχειρίσεις. Συνεπώς και οι δύο παράγοντες (κατσίγαρος και στάδιο κομποστοποίησης) επηρεάζουν την σύσταση της βακτηριακής κοινότητας της κομπόστας με τον στάδιο κομποστοποίησης να έχει την κύρια επίδραση.



Εικόνα 3.13. Principal Coordinate analysis του μοριακού αποτυπώματος της βακτηριακής κοινότητας στα διάφορα στάδια της κομποστοποίησης που δέχτηκαν την εφαρμογή ή όχι κατσίγαρου

Τα δυαδικής μορφής δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν για στατιστική ανάλυση πολυμεταβλητότητας με την μέθοδο Principal Coordinate Analysis (PCoA), και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.13. Η στατιστική επεξεργασία της πηκτής DGGE επιβεβαιώνει τα πρώτα συμπεράσματα από την οπτική ανάγνωση της πηκτής αλλά και της ανάλυσης κατά συστάδες. Έτσι τα δείγματα του ίδιου σταδίου κομποστοποίησης ομαδοποιήθηκαν μαζί ανεξάρτητα από την εφαρμογή ή όχι κατσίγαρου. Ειδικότερα, τα δείγματα του πρώτου σταδίου (0 ημέρες) διαφοροποιήθηκαν από τα δείγματα του 1^{ου} θερμόφιλου σταδίου ως προς το PCo1 που περιλαμβάνει και το μεγαλύτερο ποσοστό της παραλλακτικότητας (34%). Αντίθετα τα δείγματα του mesóφιλου και του 2^{ου} θερμόφιλου σταδίου ομαδοποιήθηκαν μαζί ανεξάρτητα από την εφαρμογή κατσίγαρου και διαχωρίστηκαν ξεκάθαρα από τα υπόλοιπα δείγματα, και ιδιαίτερα από τα δείγματα του σταδίου ωρίμανσης ως προς το PCo2.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας έδειξαν ότι η σύσταση της βακτηριακής κοινότητας του compost επηρεάζεται σε σημαντικό και καθοριστικό βαθμό από το στάδιο της κομποστοποίησης. Αντίθετα, η εφαρμογή κασίγαρου στο compost ως μεταχείριση διαβροχής κατά την διάρκεια της κομποστοποίησης προκαλεί λιγότερο σημαντικές μεταβολές. Έτσι η βακτηριακή κοινότητα μεταβάλλεται, ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν σε κάθε στάδιο κυρίως όσον αφορά τη θερμοκρασία. Σε παρόμοια συμπεράσματα για την βακτηριακή κοινότητα της κομποστοποίησης έχουν καταλήξει και άλλοι ερευνητές με βιοχημικές (Bolta et al., 2003, Steger et al., 2003) και μοριακές τεχνικές (Ishii et al., 2000, Riddech et al., 2002). Οι Ishii et al., 2000, χρησιμοποιώντας την μέθοδο DGGE παρατήρησαν μεγάλη ποικιλομορφία στην βακτηριακή κοινότητα του compost. Συγκεκριμένα, στο μεσόφιλο στάδιο κυριαρχούν κυρίως θετικά κατά Gram ζυμωτικά βακτήρια τα οποία αποδομούν τα εύκολα αποδομήσιμα υλικά ενώ στο θερμόφιλο στάδιο η βακτηριακή κοινότητα αποτελούνταν κυρίως από σποριογόνα βακτήρια του γένους *Bacillus*. Τέλος, στο στάδιο της ωρίμανσης που αναπτύσσονται και πάλι μεσόφιλα βακτήρια, αυτά δεν έχουν καμία σχέση με τα βακτήρια του μεσόφιλου σταδίου.

Ανάλογες μεταβολές παρατηρήθηκαν και στα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Έτσι, από την οπτική ανάγνωση του προφίλ της βακτηριακής κοινότητας όπως αποτυπώθηκε με την μέθοδο DGGE φαίνεται στο στάδιο της επώασης μία κυριαρχία βακτηρίων με χαμηλή περιεκτικότητα G+C. Βακτήρια τα οποία έχουν χαμηλή περιεκτικότητα G+C και κυριαρχούν στο στάδιο της επώασης μπορεί να είναι του γένους *Pseudomonas* αφού αυτά αναπτύσσονται πολύ γρήγορα, χαρακτηρίζονται ως πλειοτροφικά και αρέσκονται να αποικίζουν σε οργανικά υλικά όπως είναι το compost. Αυτό επαληθεύεται και από άλλες μελέτες οι οποίες χρησιμοποίησαν την μέθοδο DGGE. Στελέχη του γένους *Pseudomonas* απομονώθηκαν από δείγματα της τρίτης μέρας της κομποστοποίησης (Székely et al., 2008).

Με την μετάβαση στο 1^ο θερμόφιλο στάδιο φαίνεται ότι έχουμε μια σημαντική μεταβολή στην σύνθεση της βακτηριακής κοινότητας με εμφάνιση βακτηρίων με υψηλή περιεκτικότητα G+C. Στο 1^ο θερμόφιλο στάδιο βακτήρια με υψηλή περιεκτικότητα G+C μπορεί να είναι του γένους *Bacillus* και ακτινοβακτήρια τα οποία είναι γνωστό ότι χαρακτηρίζονται από ανθεκτικότητα σε αντίξοες συνθήκες όπως είναι οι υψηλές θερμοκρασίες του θερμόφιλου σταδίου. Αυτό ενισχύεται και από τον Strom, (1985a) ο οποίος είχε βρει ότι στο θερμόφιλο στάδιο τα βακτήρια που κυριαρχούν είναι του γένους *Bacillus*. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι το 87% των θερμόφιλων βακτηρίων που απομονώθηκαν από τον Strom (1985a) ταυτοποιήθηκε ως *Bacillus* spp. Πρόσφατα επίσης οι Cho et al., (2008) παρατήρησαν ότι τα κυρίαρχα βακτήρια στο θερμόφιλο στάδιο της κομποστοποίησης είναι του γένους *Bacillus* ανεξάρτητα του είδους των οργανικών αποβλήτων που χρησιμοποιούνται. Επίσης, οι Yu et al., (2007) παρατήρησαν ότι τα ακτινοβακτήρια είναι υπεύθυνα για την αποδόμηση της λιγνίνης κατά το θερμόφιλο στάδιο.

Η μικροβιακή κοινότητα συνεχίζει να παρουσιάζει μια ανάλογη εικόνα μετά το 1^ο θερμόφιλο και στα επόμενα δύο στάδια (μεσόφιλο και 2^ο

θερμόφιλο). Από την στατιστική ανάλυση της βακτηριακής κοινότητας από το DGGE προκύπτει ότι το μεσόφιλο στάδιο και το 2^ο θερμόφιλο παρουσιάζουν μικρές διαφοροποιήσεις και σημαντική ομοιότητα. Η παρατήρηση αυτή είναι αναμενόμενη διότι στο 2^ο θερμόφιλο στάδιο η θερμοκρασία δεν ανέβηκε τόσο πολύ όσο στο 1^ο θερμόφιλο και ήταν γενικά ένα πιο ήπιο θερμόφιλο στάδιο με αποτέλεσμα να μην έχουμε δραστικές μεταβολές στην κοινότητα των βακτηρίων όπως συνέβη μεταξύ του σταδίου της επώασης και του 1^{ου} θερμόφιλου. Τέλος στο στάδιο της ωρίμανσης έχουμε μια πιο ομοιόμορφα κατανενημένη βακτηριακή κοινότητα. Με βάση άλλες μελέτες τα βακτήρια που συμμετέχουν στο στάδιο αυτό είναι τα ακτινοβακτήρια τα οποία έχουν απομονωθεί με καλλιέργεια σε τριβλίο (Peters et al., 2000, Ryckeboer et al., 2003) καθώς και βακτήρια του γένους *Arthrobacter* sp. (Ishii et al., 2000).

Όσον αφορά την επίδραση του κασίγαρου στην βακτηριακή κοινότητα του compost, παρατηρήθηκε μια μικρότερη επίδραση που εμφανίζεται ως ανάσχεση 5-6 ζωνών στα στάδια 1^ο θερμόφιλο, μεσόφιλο και 2^ο θερμόφιλο. Άρα η επίδραση του κασίγαρου είναι περιορισμένης έκτασης σε σχέση με το στάδιο της κομποστοποίησης και είναι κυρίως αρνητική. Η αρνητική επίδραση μπορεί να οφείλεται σε επιλεκτική τοξικότητα των πολυφαινολικών του κασίγαρου σε ορισμένα βακτήρια (Fiorentino et al., 2003, Isidori et al., 2005). Ως σήμερα δεν έχει μελετηθεί η επίδραση του κασίγαρου στην μικροβιακή κοινότητα που αναπτύσσεται κατά την διάρκεια της κομποστοποίησης αγροτικών και άλλων υλικών. Οι αναφορές που υπάρχουν μελέτησαν την επίδραση του κασίγαρου στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Η εφαρμογή του κασίγαρου οδηγεί σε εμπλουτισμό του εδάφους με υψηλές ποσότητες αποδομήσιμου οργανικού φορτίου καθώς και άλλα θρεπτικά στοιχεία ενώ από την άλλη είναι πιθανό να οδηγήσει σε τοξικότητα λόγω του αυξημένου φορτίου πολυφαινολικών. Πρόσφατες μελέτες με την χρήση της μεθόδου PLFAs έδειξαν ότι η προσθήκη κασίγαρου σε έδαφος προκάλεσε μείωση των θετικών κατά Gram βακτηρίων και αύξηση των αρνητικά κατά Gram βακτηρίων, των ακτινοβακτηρίων και των μυκήτων (Mechri et al., 2007). Πρόσφατη μελέτη από τους Rousidou et al., (2009) έδειξε ότι η ημερήσια άρδευση εδαφών με διαφορετικές δόσεις κασίγαρου επηρεάζουν την κοινότητα των μυκήτων σε σημαντικό βαθμό ενώ η κοινότητα των βακτηρίων παρουσίασε διαφοροποιήσεις ανάλογα με τον τύπο του εδάφους που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα. Περαιτέρω μελέτες (Karpouzas et al., 2009) έδειξαν ότι η ημερήσια άρδευση δύο διαφορετικού τύπου εδαφών με κασίγαρο οδήγησε σε σημαντικές μεταβολές στην κοινότητα των βασιδιομυκήτων οι οποίες περιορίζονταν όταν υπήρχε εξωγενής λίπανση με άζωτο. Πρόσφατες μελέτες από την ίδια ομάδα έδειξαν σημαντική επίδραση του κασίγαρου στην κοινότητα των νιτροποιητικών βακτηρίων ενώ για την κοινότητα των ακτινοβακτηρίων αυτή η επίδραση ήταν εξαρτώμενη από το είδος του εδάφους στο οποίο έγινε η εφαρμογή κασίγαρου (Karpouzas et al., 2010). Συνεπώς, από τις παραπάνω μελέτες προκύπτει ότι ο κασίγαρος παρουσιάζει περιορισμένη και παροδική άμεση τοξική δράση στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους λόγω των πολυφαινολικών. Οι έντονες μεταβολές που προκαλεί οφείλονται κυρίως στην μεγάλη περιεκτικότητα του σε αποδομήσιμη οργανική ύλη που εναποτίθεται στο έδαφος με την εφαρμογή του. Περαιτέρω μελέτες στο εργαστήριό μας θα στοχεύσουν στην απομόνωση και φυλογενετικό προσδιορισμό των βακτηρίων που φαίνεται να έχουν περιοριστεί από την εφαρμογή του κασίγαρου.

Τα βακτήρια που απομονώθηκαν ανήκουν στα γένη *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas/Xanthomonas*, *Agrobacterium/Rhizobium*, *Flavobacterium* και *Ochrobactrum*. Συκρίνοντας στην εικόνα 3.11 το Ladder (το οποίο αποτελεί ανάμειξη προϊόντων PCR των βακτηρίων αυτών) με τα αποτυπώματα DGGE των επιμέρους σταδίων παρατηρούμε ότι τα βακτήρια αυτά δεν φαίνεται να έχουν κάποιο σημαντικό οικολογικό ρόλο στα διάφορα στάδια της κομποστοποίησης. Παρατηρούμε ότι δεν υπάρχουν ζώνες στα στάδια της κομποστοποίησης οι οποίες να φαίνονται ξεκάθαρα ότι ταυτίζονται με ζώνες από το ladder. Ωστόσο, παρατηρώντας τα γένη των βακτηρίων γίνεται αντιληπτό ότι έχουν ορισμένα χαρακτηριστικά με τα οποία θα μπορούσαν να συμμετέχουν στην διαδικασία της κομποστοποίησης. Αρχικά, όλα τα γένη και είδη που απομονώθηκαν είναι βακτήρια τα οποία αναπτύσσονται έντονα και συχνά σε στερεά θρεπτικά μέσα. Επίσης κάποια από αυτά όπως τα βακτήρια των γενών *Pseudomonas* και *Agrobacterium* είναι πλειοτροφικά βακτήρια που αναπτύσσονται σε συνθήκες με υψηλή παροχή διαλυτού άνθρακα όπως είναι το compost. Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* μπορούν επίσης και να αναπτυχθούν σε ακραίες φυσικές και χημικές συνθήκες (Lindow, 1992). Επιπλέον στελέχη των γενών *Stenotrophomonas*, *Flavobacterium* και *Ochrobactrum* έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν στην αποσύνθεση ξενοβιοτικών μορίων, οργανικών ρυπαντών και άλλων οργανικών ουσιών (Topp et al., 1990, Binks et al., 1995, Takashi et al., 2008). Επίσης, στελέχη από τα παραπάνω γένη έχουν αναφερθεί ως αζωτοδεσμευτικά. Έτσι, οι Liba et al., (2005) παρατήρησαν ότι βακτήρια των γενών *Pseudomonas* και *Stenotrophomonas maltophilia* μπορούν και αζωτοδεσμεύουν. Επίσης το ίδιο παρατήρησαν οι Zehr et al., (2003) για βακτηριακά στελέχη των γενών *Rhizobium* και *Pseudomonas*. Οι Ngom et al (2004) ανέφεραν για πρώτη φορά την απομόνωση βακτηρίων του γένους *Ochrobactrum* που αζωτοδεσμεύει και έχει συμβιωτική σχέση με φυτά. Τέλος, βακτηριακά στελέχη που ανήκουν στα γένη *Ochrobactrum* και *Pseudomonas* συμμετέχουν στον κύκλο του θείου (Aguilar et al., 2008). Όλες οι παραπάνω διεργασίες όπως η αποδόμηση οργανικών ξενοβιοτικών ουσιών και φυσικών υποστρωμάτων, ο κύκλος του θείου και η αζωτοδέσμευση αποτελούν σημαντικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την διάρκεια της κομποστοποίησης.

Στην παρούσα εργασία φαίνεται τα βακτήρια που απομονώθηκαν να μην έχουν κάποιο σπουδαίο οικολογικό ρόλο, ωστόσο σε άλλες μελέτες για την κομποστοποίηση έχουν απομονωθεί βακτήρια που ανήκουν σε αυτά τα γένη. Συγκεκριμένα, με την χρήση συμβατικών μικροβιολογικών μεθόδων καλλιέργειας σε εκλεκτικά υποστρώματα απομονώθηκαν μεσόφιλα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* και *Xanthomonas* στο τέλος του θερμοφιλου σταδίου (Peters et al., 2000). Στελέχη *Pseudomonas* απομονώθηκαν και στο στάδιο της επώασης πρόσφατα από τους Székely et al., (2009). Οι Horisawa et al., (2008) χρησιμοποιώντας την μέθοδο DGGE ταυτοποίησαν στελέχη του είδους *Stenotrophomonas maltophilia* στην μικροβιακή κοινότητα κατά την διάρκεια της κομποστοποίησης. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν και από άλλους ερευνητές για βακτήρια του γένους *Stenotrophomonas* (Guo et al., 2007). Επίσης, οι Cho et al., (2008) είχαν απομονώσει από το μεσόφιλο στάδιο βακτήρια του γένους *Agrobacterium* κάτι που συμφωνεί και με τα δικά μας δεδομένα. Συνολικά τα βακτήρια που απομονώθηκαν ανήκουν στα Πρωτεοβακτήρια με εξαίρεση το στέλεχος 28 που ταυτοποιήθηκε ως

Flavobacterium. Τα πρωτεοβακτήρια μαζί με τα φύλα Firmicutes, Bacteroidetes και τα ακτινοβακτήρια είναι γενικά συχνά απαντώμενα βακτήρια σε στάδια της κομποστοποίησης (Cho et al., 2008).

Τελικά συμπεράσματα

- Το στάδιο της κομποστοποίησης επηρεάζει ουσιαστικά την σύσταση της βακτηριακής κοινότητας σε αντίθεση με την επίδραση του κασιόγαρου η οποία φαίνεται να είναι πολύ μικρότερη.
- Τα βακτήρια που απομονώθηκαν ανήκουν στα γένη *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas/Xanthomonas*, *Agrobacterium/Rhizobium*, *Flavobacterium* και *Ochrobactrum*. Εκτός από τα *Ochrobactrum* και *Flavobacterium* τα υπόλοιπα γένη βακτηρίων έχουν απομονωθεί στην διαδικασία της κομποστοποίησης και σε προηγούμενες μελέτες.

Συνέχιση της μελέτης

Συνέχιση της μελέτης περιλαμβάνει την δημιουργία βιβλιοθηκών κλώνων που σε συνδυασμό με την αξιολόγηση των κλώνων σε σύστημα DGGE θα οδηγήσει στην ταυτοποίηση των βακτηρίων που εμφανίζονται να επικρατούν στα διάφορα στάδια της κομποστοποίησης αλλά και των βακτηρίων εκείνων που φαίνεται να περιορίζονται από την εφαρμογή του κασιόγαρου.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abid Nozha and Sayadi Sami, 2006. Detrimental effects of olive mill wastewater on the composting process of agricultural wastes, *Waste Management*, 26: 1099-1107.
2. Acinas, S.G., J. Anton, and F. Rodriguez-Valera. 1999. Diversity of free-living and attached bacteria in offshore western Mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:514-522.
3. Adani F., P.I. Gevenini and F.Tambone, 1995. A new index of organic stability. *Compost Science and Utilization*, 3(2): 25-37.
4. Aguilar, J.R.P., Cabriaes, J.J.P., Vega, M.M., 2008. Identification and characterization of sulfur-oxidizing bacteria in an artificial wetland that treats wastewater from a tannery, *International Journal of Phytoremediation*, 10: 359-370.
5. Ahn, H.K., Richard, T.L., Choi, H.L., 2007. Mass and thermal balance during composting of poultry manure-wood shavings mixture at different aeration-rates. *Process Biochem.* 42:215-223.
6. Albrecht, R., Joffre, R., Le Petit, J., Terrom, G., Pirissol, C., 2009. Calibration of chemical and biological changes in co-composting of biowastes using nearinfrared spectroscopy. *Environmental Science and Technology*, 43: 804-811.
7. Bååth E, Anderson TH (2003) Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a PH gradient using physiological and PLFA- based techniques. *Soil Bio Biochem* 35: 955-963.
8. Bååth E, Frostegård A, Pennanen T, Fritze H (1995) Microbial community structure and PH response in relation to soil organic matter quality in wood ash fertilized, clear-cut or burned coniferous forest soils. *Soil Bio Biochem* 27: 229- 240.
9. Barth J., 2000. Stand und Perspektiven der Biologischen Abfalldehandlung in Europa. In: Wiemer, K. And M. Kern(eds), *Restabfalldehanblung IV*, Witzzenhausen, pp. 132-142.
10. Beffa T, Blanc M, Lyon PF, Vogt G, Marchiani M, Fischer JL, Aragno M (1996) Isolation of Thermus strains from hot composts (60 to 80 degrees C). *Appl Environ Microbiol.* 62: 1723-1727.
11. Binks, P.R., Nicklin, S., Bruce, N.C., 1995. Dagradaion of Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine (RDX) by *Stenotrophomonas maltophilia* PB1, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 1318-1322.

12. Blight EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
13. Bolta, S.V., Mihelic, R., Lobnik, F., Lestan, D., 2003. Microbial community structure during composting with and without mass inocula. *Compost Sci. Util.* 11: 6-15.
14. Borneman, J., and E. W. Triplett. 1997. Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and population shifts associated with deforestation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2647–2653.
15. Campbell, A.G. and R.R. Tripepi (1991), *Forest Products Journal*, 41:55-57.
16. Carpenter-Boggs, L., Kennedy, A.C. and Reganold, J.P. (1998) Use of phospholipid fatty acids and carbon source utilization patterns to track microbial community succession in developing compost. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(10): 4062-4064.
17. Cegarra, J., Peredes, C., Roig, A., Bernal, M.P., Garciü, D., Aragon, P., 1996. Use of olive mill waste water compost for crop production. *Int. Biodeter. Biodegr.* 38, 193-203.
18. Cho, Kye Man, Sun Mi Lee, Renukaradhya K. Math, Shah Md. Asrafur Islam, Devaiah M. Kambiranda, Jong Min Kim, Myoung Geun Yun, Ji Joong Cho, Jong Ok Kim, Young Han Lee, Hoon Kim and Han Dae Yun, 2008. Culture-independent analysis of microbial succession during composting of swine slurry and mushroom cultural wastes, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 18(12): 1874-1883.
19. Chroni, C., Kyriacou, A., Georgaki, I., Manios, T., Kotsou, M., Lasaridi, K., 2009. Microbial characterization during composting of biowaste, *Waste Management*, 29: 1520-1525.
20. D'Annibale, A., Casa, R., Pieruccetti, F., Ricci, M., Marabottini, R., 2004. *Lentinula edodes* removes phenols from olive-mill wastewater: impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere* 54, 887-894.
21. De Bertoldi ML, G. Vallini and A. Pera, 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.
22. De Bertoldi, M.D., Vallini, G., Pera, A., 1983. The biology of composting. *Waste Manage. Res.* 1: 157-176.
23. Epstein Eliot, *The science of composting*, 1997, CRC Press

24. Fiestas Ros De Ursinos J. A., Borja Padillar (1992) Use and treatment of olive mill wastewater: current situation and prospects in Spain, *Grasas y aceites* (Grasas aceites), 1992, vol.43, n^o2: 101-106.
25. Fiorentino, A., Gentili, A., Isidori, M., Monaco, P., Nardelli, A., Parrella, A., Temussi, F., 2003, Environmental effects caused by olive mill wastewaters: toxicity comparison of low-molecular-weight phenol components. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1005-1009.
26. 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. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4630-4636.
27. Flouri, F., Sotirchos, D., Ioannidou, S., Balis, C., 1996. Decolorization of olive oil mill liquid wastes by chemical and biological means. *Int. Biodeter. Biodegr.* 38, 189-192.
28. Frank Poly, Lionel Ranjard, Sylvie Nazaret, Francois Gourbière, Lucile Jocteur Monrozier, 2001. Comparison of nifH Gene Pool in Soils and Soil Microenvironments with Contrasting Properties, *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2255-2262.
29. Frostegård A, Tunlid A, Bååth E (1993b) Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to differing heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3605-3617.
30. Garcia-Barrionuevo A., Moreno, E., Quevedo-Sarmiento J, Gonzalez-Lopez, J., Ramos-Cormenza, A., (1992) Effect of wastewaters from olive oil mills on *Azotobacter* nitrogen fixation in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 24:281-283.
31. Golueke, C.G., Card, B.J. and McGauhey, P.H., 1954. A critical evaluation of inoculums in composting, *Applied Microbiology*, 2: 44-53.
32. Golueke C. G., 1972, *Composting – A study of the process and its principles*. Rodale Press, Emmaus, Pennsylvania, USA.: Rodale Press.
33. Guo, Y., Zhu, N., Zhu, S. And Deng, C., 2007. Molecular phylogenetic diversity of bacteria and its spatial distribution in composts, *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1344-1354.
34. Hachicha Salma, Cegarra Juan, Sellami Fatma, Hachicha Ridha, Drira Noureddine, Medhioub Khaled, Ammar Emna, 2009, Elimination of polyphenols toxicity from olive mill wastewater sludge by its co-composting with sesame bark, *Journal of Hazardous Materials*, 161,1131-1139.

35. Halet, D., Boon, N., Verstraete, W., 2006. Community dynamics of methanotrophic bacteria during composting of organic matter. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101: 297-302.
36. Hassen, A., Belguith, K., Jedidi, N., Cherif, M., Boudabous, A., 2001. Microbial characterization during composting of municipal solid waste. *Bioresource Technology*, 80(3): 217-225.
37. Haug R.T., 1986, Composting process design criteria, part 3, aeration. *BioCycle*, 26:53-57.
38. Hellmann, B., Zelles, L., Palojarvi, A. And Bai, Q. (1997). Emission of climate-relevant trace gases and succession of microbial communities during open-window composting. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(3): 1011-1018.
39. Herrmann, R.F. and Shann, J.F. (1997). Microbial community change during the composting of municipal solid waste. *Microbial Ecology*, 33: 78-85.
40. Hong, J.H., Matsuda, J., Ikeuchi, Y., 1983. High rapid composting of dairy cattle manure with crop and forest residues. *Trans. ASAE*, 26: 533-545.
41. Hongyan Yu, Guangming Zeng, Hongli Huang, Xingmei Xi, Renyou Wang, Danlian Huang, Guohe Huang, Jianbing Li, 2007. Microbial community succession and lignocellulose degradation during agricultural waste composting, *Biodegradation*, 18: 793-802.
42. Horisawa Sakae, Sakuma Yoh, Nakamura Yasunori, Doi Shuichi, 2008. Profiling of a microbial community under confined conditions in a fed-batch garbage decomposer by denaturing gradient gel electrophoresis, *Bioresource Technology*, 99: 3084-3093.
43. Jaouani, A., Sayadi, S., Vanthourhout, M., Penninckx, M.J., 2003. Potent fungi for decolourisation of olive oil mill wastewaters. *Enzyme Microb. Tech.* 33, 802-809.
44. Ipsilantis, I., Karpouzas, D.G., Ehaliotis, C., Papadopoulou, K.K., 2009, Effects of soil application of olive mill wastewater on the structure and function of the community of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry*, 41(12): 2466-2476.
45. Ishii, K., Fukui, M. and Takii, S., 2000. Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis, *Applied Microbiology*, 89: 768-777.
46. Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A., 2005, Model study on the effect of 15 phenolic olive mill wastewater constituents on seed germination and vibrio fischeri metabolism. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8414-8417.

47. Kandeler E, Tschirko D, Bruce KD, Stemmer M, Hobbs PJ, Bardgett RD, Amelung W (2000) Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil. *Biol. Fertil. Soils*, 32: 390-400.
48. Karpouzas, D.G., Rousidou, C., Papadopoulou, K.K., Bekris, F., Zervakis, G., Singh, B.K., Ehalotis, C., 2009, Effect of continuous olive mill wastewater applications, in the presence and absence of N fertilization, on the structure of rhizosphere soil fungal communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 70(3): 56-69.
49. Karpouzas, D.G., Ntougias, S., Iskidou, E., Rousidou, C., Papadopoulou, K.K., Zervakis, G., Ehalotis, C., 2009, Olive mill wastewater affects the structure of soil bacterial communities. *Applied Soil Ecology* (in press, doi: 10.1016/j.apsoil.2010.03.002).
50. Klamer, M. And Bååth, E. (1998) Microbial community dynamics during composting of straw material studied using phospholipid fatty acid analysis. *FEMS Microbiological Ecology*, 27: 9-20.
51. Kotsou, M., Mari, I., Lasaridi, K., Chatzipavlidis, I., Balis, C., Kyriacou, A., (2004) The effect of Olive mill wastewater on soil microbial communities and suppressiveness against *Rhizoctonia solani*. *Applied Soil Ecology* 26: 113-121.
52. Kuter, G. A., Hoitnik, H.A.J., Rossman, L.A., 1985. Effects of aeration and temperature on composting of municipal sludge in a full-scale vessel system. *J. Water Pollut. Contr. Fed.* 57: 309-315.
53. Li, X.J., Zhang, R.H., Pang, Y.Z., 2008. Characteristics of dairy manure composting with rice straw, *Bioresour. Technol.* 99: 359-367.
54. Liba, C.M., Ferrara, F.I.S., Manfio, G.P., Fantinatti-Garboggini, F., Albuquerque, R.C., Pavan, C., Ramos, P.L., Moreira-Filho, C.A. and Barbosa, H.R., 2006. Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones, *Journal of Applied Microbiology*, 101: 1076-1086.
55. Lindow, S.E. 1992. Environmental release of *Pseudomonads* : potential benefits and risks. In: *Pseudomonas- Molecular Biology and Biotechnology* ed. Galli, E., Silver, S. And Witholt, B. pp. 199-407. Washington, DC: American Society for Microbiology.
56. Macauley, B.J., Stone, B., Iiyama, K., Harper, E.R. and Miller, F.C., 1993. Compost research runs 'hot' and 'cold' at La Trobe University. *Compost Science Utilization*, 1: 6-12.

57. Marschner P, Kandeler E, Marschner B (2003) Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biol Biochem*, 35: 453-461.
58. McCartney, D., Tingley, J., 1998. Development of a rapid moisture content method for compost materials. *Compost. Sci. Util.* 6: 14-25.
59. Mechri, B., Echbili, A., Issaoui, M., Braham, M., Elhadj, S.B., Hammami, M., (2007) Short-term effects in soil microbial community following agronomic application of olive mill wastewaters in a field of olive trees. *Applied Soil Ecology* 36: 216-223.
60. Mechri, B., Mariem, F.B., Baham, M., Elhadj, S.B. & Hammami, M., 2008. Change in soil properties and the soil microbial community following land spreading of olive mill wastewater affects olive trees key physiological parameters and the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* 40: 152-161.
61. Mekki A., Dhouib A, Sayadi S (2006b) Changes in microbial and soil properties following amendment with treated and untreated olive mill wastewater. *Microbiological Research* 161: 93-101.
62. 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.
63. Mondini, C., Insam, H., 2003. Community level physiological profiling as a tool to evaluate compost maturity: a kinetic approach. *European Journal of Soil Biology*, 39: 141-148.
64. Moudjahidou Demba Diallo, Barbara Reinhold-Hurek, Thomas Hurek, 2008. Evaluation of PCR primers for universal nifH gene targeting and for assessment of transcribed nifH pools in roots of *Oryza longistaminata* with and without low nitrogen input, *Federation of European Microbiological Societies*, 65: 220-228.
65. Muyzer, G., De Waal, E. C., and Uitterlinden, A. G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695-700.
66. National Engineering Handbook, Environmental Engineering, Part 637, Chapter 2: Composting, February 2000.
67. Ngom Amy, Yasuyoshi Nakagawa, Hiroyuki Sawada, Junzo Tsukahara, Shiro Wakabayashi, Toshiki Uchiumi, Achara Nuntagij, Somsak Kotepong, Akihiro Suzuki, Shiro Higashi and Mikiko Abe, 2004. A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobactrum clade* isolated from root nodules of *Acacia mangium*, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 50: 17-27

68. Osborn A. Mark and Smith J. Cindy, *Molecular Microbial Ecology*, 2005, Bios Advanced Methods.
69. Ovreas, L. and Torsvik, V. (1998) Microbial diversity and community structure in two different agriculture soil communities. *Microb. Ecol.* 36, 303-315.
70. Palmisano, A.C. and Barlaz, M.A.: *Microbiology of solid waste*, p.224. CRC Press, New York, (1996).
71. Paredes, C., Cegarra, J., Roig, A., Sánchez-Monedero, M.A., Bernel, M.P., 1999. Characterization of olive mill wastewaters (alpechin) and its sludge for agricultural purposes. *Bioresource Technol.* 67, 111-115.
72. Peters S., Koschinsky S., Schwieger F., Tebbe C.C. (2000) Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 930-936.
73. Pichler, M., Ko gel-Knabner, I., 2000. Chemolytic analysis of organic matter during aerobic and anaerobic treatment of municipal solid waste. *Waste Manage.* 29: 1337-1344.
74. Rasapoor, M., Nasrabadi, T., Kamali, M., Hoveidi, H., 2009, The effects of aeration rates on generated compost quality, using aerated static pile method. *Waste Manage.* 29: 570-573.
75. Riddech, N., Klammer, S., Insam, H., 2002. Characterisation of microbial communities during composting of organic wastes. In: Insam, H., Riddech, N., Klammer, S. (Eds.), *Microbiology of composting*, Springer, pp.43-52.
76. Robleto, E. A., J. Borneman, and E. W. Triplett. 1998. Effects of bacterial antibiotic production on rhizosphere microbial communities from a culture-independent perspective. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:5020–5022.
77. Rousidou, C., Papadopoulou, K.K., Zervakis, G., Singh, B.K., Ehaliotis, C., Karpouzias, D.G., 2009. Fractioned land application of diluted olive mill wastewater induces changes in the structure of the soil microbial community, *European Journal of Soil Biology*, 46: 34-40.
78. Ryckeboer, J., Mergaert, J., Coosemans, J., Deprens, K., Swings, J., 2003. Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *Journal of Applied Microbiology* 94, 127–137.
79. Schulze, K.L., 1962. Continuous thermophilic composting. *Appl. Microbiol.* 10: 108-122.
80. Shaffer, B.T., Widmae, F., Porteous, L.A., Seidler, R.J., 2000. Temporal and spatial distribution of the nifH gene of N₂ fixing bacteria in forests and clearcuts in Western Oregon, *Microbial Ecology*, 39: 12-21.

81. Spencer John F.T., Ragout de Spencer Alicia L. (2004) Environmental Microbiology, Methods and Protocols, Humana Press.
82. Steger, K., Jarvis, A., Smars, S., Sundh, I., 2003, Comparison of signature lipid methods to determine microbial community structure in compost. J Microbiol. Methods, 55: 371-382.
83. Stendiford 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. 49-59,224-252.
84. Stendiford 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.
85. Strom P. F. 1985a. Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solid-waste composting. Appl. Environ. Microbiol., 50: 899-905.
86. Strom P.F., 1985b. Identification of thermophilic bacteria in solid-waste composting, Appl. Environ. Microbiol. 50(4): 906-913.
87. Székely, A.J., Sipos, R., Berta, B., Vajna, B., Hajdú, C., Márialigeti, K., 2009. DGGE and T-RFLP analysis of bacterial succession during mushroom compost production and sequence-aided T-RFLP profile of mature compost, Microb. Ecol., 57: 522-533.
88. Takashi Yamada, Yuhki Takahama, Yasuhiro Yamada, 2008. Biodegradation of 2,4,6- Tribromophenol by *Ochrobactrum sp.* Strain TB01, Biosci. Biotechnol. Biochem. 72(5): 1264-1271.
89. Tang, J.C., Kanamori, T., Inoue, Y., Yasuta, T., Yoshida, S., Katayama, A., 2004. Changes in the microbial community structure during thermophilic composting of manure aw detected by the quinone profile method. Process Biochemistry, 39: 1999-2006.
90. Tardioli S, Banne TG., Santori F (1997) Species-specific selection of soil fungal population after olive mill waste-water treatment. Chemosphere 34:2329-2336.
91. Tchobanoglous, Theissen and Vigil (1993), Integrated Solid Waste Management, McGraw Hill International.
92. Tiquia, S.M., Tam, N.F.Y., Hodgkiss, I.J., 1996. Microbial activities during composting of spent pig-manure sawdust litter at different moisture contents. Bioresour. Technol. 55: 201-206.

93. Tiquia, S.M., Wan, J.H.C., Tam, N.F.Y., 2002. Microbial population dynamics and enzyme activities during composting. *Compost Science and Utilization*, 10: 150-161.
94. Topp, E., Hanson, R.S., 1990. Degradation of Pentachlorophenol by a *Flavobacterium* species grown in continuous culture under various nutrient limitationst, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 541-544.
95. Torsvik, V. and Ovreas, L., 2002. Microbial diversity and functional in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 240-245.
96. Varma Ajit, Oelmuller Ralf, 2007, *Soil Biology, Advanced Techniques in Soil Microbiology*, Springer.
97. Whiteley, A. S. and Bailey, M. J. (2000) Bacterial community structure and physiology state within an industrial phenol bioremediation system. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2400-2407.
98. Widmer, F., Shaffer, B.T., Porteous, L.A., Seidler, R.J., 1999. Analysis of nifH Gene Pool Complexity in Soil and Litter at a Douglas Fir Forest Site in the Oregon Cascade Mountain Range. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 374-380.
99. Wu, L., Ma, L.Q., Martinez, G.A., 2000. Comparison of methods for evaluating stability and maturity of biosolids compost. *J. Environ. Qual.* 29: 424-429.
100. Zehr, J.P., Jenkins, B.D., Short, S.M., Steward, G.F., 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: A cross system comparison, *Environmental Microbiology*, 5(7): 539-554.
101. Zelles L, Rackwitz R, Bai QY, Beck T, Beese F (1995) Discrimination of microbial diversity by fatty acid profiles of phospholipids and lipopolysaccharides in differently cultivated soils. *Plant Soil* 170: 115-122.
102. Zmora-Nahum, S., Markovitch, O., Tarchitzky, J., Chen, Y., 2005. Dissolved organic carbon (DOC) as a parameter of compost maturity. *Soil Biol. Biochem.* 37: 2109-2116.