



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ
Κατεύθυνση: *Μοριακή Οικολογία και Ανίχνευση*
Γενετικά Τροποποιημένων Οργανισμών

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ
ΚΑΤΑ ΤΗ ΣΥΓΚΟΜΠΟΣΤΟΠΟΙΗΣΗ
ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΕΚΚΟΚΚΙΣΜΟΥ ΒΑΜΒΑΚΟΣ
ΚΑΙ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΩΝ

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ Χ. ΕΥΘΥΜΙΟΥ

Επιβλέπων: Χατζηπαυλίδης Ι.
Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2012



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: Μοριακή Οικολογία και Ανίχνευση
Γενετικά Τροποποιημένων Οργανισμών

**ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ
ΚΑΤΑ ΤΗ ΣΥΓΚΟΜΠΟΣΤΟΠΟΙΗΣΗ
ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΕΚΚΟΚΚΙΣΜΟΥ ΒΑΜΒΑΚΟΣ
ΚΑΙ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Αικατερίνη Χ. Ευθυμίου

Αθήνα 2012

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων:

Χατζηπαυλίδης Ιορδάνης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Μέλη:

Κατινάκης Παναγιώτης, Καθηγητής ΓΠΑ

Ζερβάκης Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Περίληψη

Η κομποστοποίηση είναι η διαδικασία της βιολογικής αποικοδόμησης και σταθεροποίησης οργανικών υλικών, υπό συνθήκες που οδηγούν στην ανάπτυξη θερμοκρασιών της θερμόφιλης περιοχής, ως αποτέλεσμα της παραγόμενης θερμότητας. Το τελικό προϊόν, το κόμποστ, είναι ένα σταθερό προϊόν που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορες γεωργικές πρακτικές.

Στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας και των φυσικο-χημικών παραγόντων κατά τη συγκομποστοποίηση αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων. Τα Υγρά Απόβλητα Ελαιουργείας (ΥΑΕ) και τα Υπολείμματα Εκκοκκιστηρίου Βάμβακος (ΥΕΒ), τα οποία αποτελούν βασικά υποπροϊόντα της σύγχρονης ελληνικής γεωργικής παραγωγής, χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα. Η κατανόηση της μικροβιακής ποικιλότητας στα διάφορα στάδια της κομποστοποίησης είναι αναγκαία για να γίνει καλύτερη διαχείριση της διαδικασίας και να εκτιμηθεί η ποιότητα του τελικού προϊόντος.

Για τη μελέτη της διαδικασίας της συγκομποστοποίησης εκτιμήθηκαν οι φυσικο-χημικοί παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η υγρασία, το pH, η ηλεκτρική αγωγιμότητα, το ολικό άζωτο, το άζωτο των νιτρικών και αμμωνιακών ιόντων και η αναπνευστική δραστηριότητα. Η θερμόφιλη φάση διήρκεσε τέσσερις ημέρες και η μέγιστη θερμοκρασία που σημειώθηκε ήταν 59°C. Οι συνεχείς αλλαγές των φυσικο-χημικών παραγόντων κατά τη διαδικασία της κομποστοποίησης υπαγορεύουν δυναμικές αλλαγές και διαδοχή συγκεκριμένων ομάδων μικροοργανισμών. Η μικροβιακή ποικιλότητα μελετήθηκε με τη χρήση κλασικών τεχνικών καλλιέργειας. Εκτιμήθηκε ο αριθμός βιώσιμων μονάδων των ολικών, σποριογόνων, κυτταρινολυτικών, αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, μυκήτων και ακτινομυκήτων και απομονώθηκαν στελέχη από αυτούς τους μικροοργανισμούς από δείγματα κόμποστ. Μοριακές τεχνικές (υποκλωνοποίηση και φυλογενετική ανάλυση με βάση τα γονίδια που κωδικοποιούν για το 18S rRNA και την ITS περιοχή του ριβοσώματος) χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση τριών στελεχών μυκήτων που απομονώθηκαν από το κόμποστ και ανήκαν στο γένος *Aspergillus*. Τα στελέχη αυτά βρέθηκε ότι έχουν υψηλή ομολογία με τα είδη *A. fumigatus*, *A. flavus* και *A. niger* αντίστοιχα.

Λέξεις κλειδιά: κομποστοποίηση, Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείων, Υπολείμματα Εκκοκκισμού Βάμβακος, μικροβιακή ποικιλότητα, *Aspergillus*

Abstract

Composting is a dynamic process of degradation and stabilization of organic substrates carried out by a complex microbial community under conditions that allow high temperatures in the thermophilic region, as a result of biologically produced heat.

The goal of this study is to investigate the microbial diversity and the physico-chemical parameters affecting it, during the co-composting process of agro-industrial residues. Olive Mill Wastewaters (OMW) and Cotton gin wastes, two residues of the contemporary greek agriculture, were used as substrate for the preparation of the compost pile. Characterizing and understanding of microbial community structure and diversity is essential to improve and evaluate the composting process and the quality of the end product.

The physico-chemical parameters examined were temperature, moisture, pH, electrical conductivity, total nitrogen, ammonium and nitrate nitrogen and respiratory rate. The thermophilic stage of the process lasted four days and the maximum temperature was 59°C. Changes in the physico-chemical parameters during the process influence changes in microbial populations and its stage of the process is characterized by the activity of different microbial groups. Microbial diversity was studied using classical culture dependent methods. It was estimated the Colony Forming Units (CFU) of total, endospore-forming, cellulolytic, nitrogen-fixing bacteria, fungi and actinomycetes and several strains of these microbes were isolated in pure cultures. Molecular tools (sub-cloning and phylogenetic analyses based on the 18S rRNA gene and the ITS region of the fungal ribosome) were used to identify three fungal strains belonging to the genus *Aspergillus*. The strains showed high homology with *A. fumigatus*, *A. flavus* and *A. niger* species.

Key words: composting, Olive Mill Wastewaters, Cotton Gins Wastes, microbial diversity, *Aspergillus*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος	σ. 7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	σ. 8
1.1 Κομποστοποίηση	σ. 10
1.2 Η μικροβιολογία της κομποστοποίησης	σ. 11
1.2.1 Τα στάδια της κομποστοποίησης	σ. 15
1.3 Ο ρόλος των φυσικών και χημικών παραμέτρων	σ. 20
1.3.1 Οι πρώτες ύλες	σ. 20
1.3.2 Ο λόγος C/N	σ. 21
1.3.3 Το οξυγόνο και ο αερισμός	σ. 21
1.3.4 Η θερμοκρασία	σ. 22
1.3.5 Το pH	σ. 22
1.3.6 Η υγρασία	σ. 23
1.4 Πλεονεκτήματα κομποστοποίησης	σ. 24
1.5 Ωριμότητα κόμποστ	σ. 25
1.6 Συστήματα κομποστοποίησης	σ. 26
1.7 Ανάλυση μικροβιακών κοινοτήτων	σ. 27
1.7.1 Μέθοδοι για τη μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας	σ. 29
1.7.1.1 Βιοχημικές μέθοδοι	σ. 29
1.7.1.2 Μοριακές μέθοδοι	σ. 30
1.8 Τα Υγρά Απόβλητα Ελαιουργείας	σ. 33
1.8.1 Τα ΥΑΕ ως υπόστρωμα κομποστοποίησης	σ. 37

1.9 Τα Υπολείμματα Εκκοκιστηρίου Βάμβακος	σ. 38
1.9.1 Τα YEB ως υπόστρωμα κομποστοποίησης	σ. 38
1.10 Μύκητες	σ. 39
1.10.1 Ανάλυση ριβοσωμικού DNA	σ. 42
1.10.2 Μύκητες και Γονιδιωματική	σ. 44
1.10.3 Το γένος <i>Aspergillus</i>	σ. 46
1.11 Σκοπός της μεταπτυχιακής εργασίας	σ. 50
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	σ. 51
2.1 Υποστρώματα Κομποστοποίησης	σ. 51
2.2 Διαδικασία Παρασκευής Κομποστοσωρού	σ. 51
2.3 Δειγματοληψίες	σ. 52
2.4 Αναλύσεις φυσικών και χημικών παραμέτρων	σ. 53
2.4.1 Θερμοκρασία	σ. 53
2.4.2 Υγρασία	σ. 53
2.4.3 pH και Ηλεκτρική Αγωγιμότητα (Electrical Conductivity, EC)	σ. 53
2.4.4 Νιτρικό Άζωτο (N-NO ₃ ⁻)	σ. 54
2.4.5 Αμμωνιακό Άζωτο (NH ₄ ⁺ -N)	σ. 55
2.4.6 Ολικό Άζωτο	σ. 55
2.5 Μικροβιολογικές αναλύσεις	σ. 56
2.5.1 Παρασκευή θρεπτικών υλικών και προετοιμασία τρυβλίων	σ. 56
2.5.2 Εκτίμηση του μεγέθους των μικροβιακών πληθυσμών	σ. 56
2.5.2.1 Διαδοχικές αραιώσεις	σ. 57
2.5.2.2 Εμβολιασμός σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα	σ. 57
2.6 Αναλύσεις βιολογικών – βιοχημικών παραμέτρων	σ. 62
2.6.1 Έλεγχος δυνατότητας αζωτοδέσμευσης του κόμποστ	σ. 62

2.6.2 Εκτίμηση αναπνευστικής δραστηριότητας	σ. 62
2.7 Ταξινομική μελέτη στελεχών μυκήτων	σ. 63
2.8 Ταυτοποίηση στελεχών με τη χρήση μοριακών τεχνικών	σ. 64
2.8.1 Επιλογή στελεχών μυκήτων για ταυτοποίηση	σ. 64
2.8.2 Απομόνωση ολικού γενετικού υλικού (DNA)	σ. 64
2.8.2.1 Συλλογή καλλιέργειας	σ. 64
2.8.2.2 Απομόνωση DNA (genomic extraction)	σ. 65
2.8.2.3 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊκών οξέων	σ. 66
2.8.2.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	σ. 66
2.8.2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	σ. 67
2.8.2.6 Απομόνωση και καθαρισμός ζώνης	σ. 68
2.8.2.7 Τεχνητή σύνδεση σε πλασμιδιακό φορέα (ligation)	σ. 68
2.8.2.8 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i>	σ. 69
2.8.2.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τα μετασχηματισμένα κύτταρα	σ. 71
2.8.2.10 Προσδιορισμός της αλληλουχίας των δειγμάτων και φυλογενετική ανάλυση	σ. 73
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	σ. 74
3.1 Φυσικο-χημικές και μικροβιολογικές αναλύσεις	σ. 74
3.1.1 Φυσικο-χημικές Παράμετροι	σ. 74
3.1.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις	σ. 78
3.2 Ταξινομικό Μέρος	σ. 84
3.2.1 Περιγραφή των κυριότερων γενών μυκήτων	σ. 84
3.2.2 Περιγραφή των στελεχών μυκήτων που ταυτοποιήθηκαν	

με τη χρήση μοριακών τεχνικών	σ. 86
3.3 Μοριακές αναλύσεις	σ. 88
3.3.1 Ενίσχυση τμήματος 18S rDNA γονιδίου και ITS περιοχής	σ. 88
3.3.2 Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας 18S rDNA γονιδίου και ITS περιοχής	σ. 89
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	σ. 93
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	σ. 105
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	σ. 117
6.1 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α	σ. 117
6.2 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β	σ. 119
6.3 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ	σ. 124

Πρόλογος

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, στο Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών “Βιοτεχνολογία και Εφαρμογές στη Γεωπονία” με κατεύθυνση “Μοριακή Οικολογία και Ανίχνευση Γενετικά Τροποποιημένων Οργανισμών, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κ. Χατζηπαυλίδη Ιορδάνη.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους εκείνους που συνέβαλαν στο να φέρω εις πέρας την παρούσα εργασία. Καταρχάς, θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Χατζηπαυλίδη Ιορδάνη για την ανάθεση της εργασίας, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθόλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας και την καθοδήγηση, τις συμβουλές και τη βοήθεια σε όλη την πορεία της πειραματικής διαδικασίας και συγγραφής της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Κατινάκη Παναγιώτη για την καθοδήγηση, τη βοήθεια και εποικοδομητική κριτική καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας μου, καθώς και για τη συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή. Ευχαριστώ, επίσης, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ζερβάκη Γεώργιο για τις συμβουλές του και τη συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τη Διδάκτορα κ. Κεφαλογιάννη Ηώ για τις συμβουλές και τη συνεχή βοήθεια σε όλη τη διάρκεια του πειράματος και τη Διδάκτορα κ. Βενιεράκη Αναστασία για την ουσιαστική συμβολή της στη διεξαγωγή των μοριακών τεχνικών, τη βοήθεια και τις συμβουλές της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου Ξεξάκη Κωνσταντίνο και Σκιαδά Βασιλική για την ευχάριστη και εποικοδομητική συνεργασία, που ήταν πολύτιμη για την περάτωση της εργασίας αυτής, αλλά και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου και τους συμφοιτητές μου για τη βοήθειά τους και τη συνεργασία τους, που συνέβαλαν στη δημιουργία ευχάριστου κλίματος καθόλο το διάστημα που διήρκεσε η μεταπτυχιακή εργασία.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω πάνω από όλα στην οικογένειά μου για την υποστήριξη και συμπαράστασή της.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανάπτυξη της γεωργίας, που ήταν πάντοτε συνηφασμένη με την ανθρώπινη ζωή, αποτελεί μια παραγωγική δραστηριότητα αλλά και έναν παράγοντα προόδου μιας χώρας. Η ραγδαία, όμως, αύξηση του πληθυσμού της Γης και οι πολλαπλασιασμένες ανάγκες του για τροφή, οδήγησαν στην εντατικοποίηση της γεωργίας. Η εντατικοποίηση αυτή προκάλεσε αλλαγές στη χρήση της γης και επιπτώσεις στο περιβάλλον με τελικό αποδέκτη τον άνθρωπο. Έτσι, δημιουργήθηκε ένας φαύλος κύκλος αυξημένης γεωργικής παραγωγής και περιβαλλοντικών προβλημάτων.

Η γεωργική ανάπτυξη συνοδεύεται και από τη δημιουργία βιομηχανικών μονάδων, που ενασχολούνται με την κατεργασία και επεξεργασία γεωργικών προϊόντων, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση τεράστιου όγκου οργανικών υπολειμμάτων, τα οποία, εξαιτίας του λανθασμένου τρόπου διάθεσής τους, υποβαθμίζουν το περιβάλλον και, παράλληλα, παραμένουν ανεκμετάλλευτα. Η επεξεργασία τους, κατ' επέκταση, είναι αναγκαία για τον περιορισμό των περιβαλλοντικών προβλημάτων. Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θεσπίσει μια σειρά νόμων που υπαγορεύουν τί πρέπει να γίνεται με τα απόβλητα αυτά. Στην Οδηγία Πλαίσιο για τα Απόβλητα (2008/98/ΕΚ), αναφέρεται ότι όλα τα κράτη μέλη της Ε.Ε. οφείλουν να ανακυκλώνουν τουλάχιστον τα μισά από τα βιοαποικοδομήσιμα αστικά και άλλα απόβλητα μέχρι το 2020.

Η κομποστοποίηση των γεωργικών υπολειμμάτων προσέλκυε πάντοτε το ενδιαφέρον, αλλά τα τελευταία χρόνια, με την αυξανόμενη ανάγκη για μείωση της ποσότητας των παραγόμενων αποβλήτων, την αλλαγή της νομοθεσίας και γενικά, την πίεση της κοινής γνώμης για τα περιβαλλοντικά θέματα, έχει κερδίσει το παγκόσμιο ενδιαφέρον των ανθρώπων, οι οποίοι στρέφονται σε εναλλακτικές και οικολογικές μεθόδους διαχείρισης των αποβλήτων. Η κομποστοποίηση αποτελεί πλέον μια κύρια και σημαντική διαδικασία για την επεξεργασία της ολόενα και αυξανόμενης ποσότητας των αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων. Με την κομποστοποίηση μπορεί να μειωθεί σημαντικά ο όγκος των αποβλήτων και να παραχθεί ένα προϊόν χρήσιμο και ωφέλιμο σε διάφορες γεωργικές πρακτικές. Υπάρχει, ήδη, νομοθετική δέσμευση και στην Ελλάδα, για υποχρεωτική κομποστοποίηση όλο και μεγαλύτερου μέρους των οργανικών απορριμμάτων, βάσει συγκεκριμένων ποσοστών.

Η κομποστοποίηση έχει όμως, κερδίσει και το ενδιαφέρον των ερευνητών παγκοσμίως. Εκτός του ότι αποτελεί έναν αποτελεσματικό τρόπο διαχείρισης των αποβλήτων, συμβάλλει στην αντιμετώπιση του προβλήματος της υποβάθμισης της ποιότητας του εδάφους και στον αειφορικό κύκλο ανακύκλωσης της οργανικής ύλης. Η διάδοση του ενδιαφέροντος για κομποστοποίηση και χρήση του τελικού προϊόντος έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη εμπορικών πρακτικών για τη διάθεσή του.

Η συγκομποστοποίηση αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο διαχείρισης των στερεών (π.χ. υπολείμματα εκκοκκιστηρίου βάμβακος) και υγρών (π.χ. υγρά απόβλητα ελαιουργείας) αγροτοβιομηχανικών υπολειμμάτων, βασικών υποπροϊόντων της

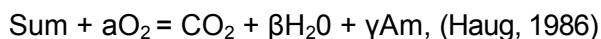
σύγχρονης ελληνικής γεωργικής παραγωγής. Στόχος της είναι η ουσιαστική μείωση της ποσότητάς τους και η μετατροπή τους σε ένα οργανικό κλάσμα (κόμποστ) που δεν επιβαρύνει το περιβάλλον.

Πολλές σύγχρονες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την παραγωγή κόμποστ σε μικρό χρονικό διάστημα με σκοπό τη χρήση του σε πολλές γεωργικές εφαρμογές. Η βελτιστοποίηση των παραγόντων που σχετίζονται με την κομποστοποίηση θα συμβάλλει στην ανάπτυξη καλύτερων βιομηχανικών πρακτικών. Η μελέτη της διαδικασίας άπτεται του αντικειμένου πολλών διαφορετικών επιστημονικών πεδίων, όπως της μικροβιολογίας, γεωπονίας, εδαφολογίας, φυτοπαθολογίας, και έχει ως στόχο τη μελέτη όλων των παραγόντων και των συνθηκών που αφορούν στη διαδικασία της κομποστοποίησης, προκειμένου να επιτευχθεί η διαχείρισή της με τον καλύτερο τρόπο.

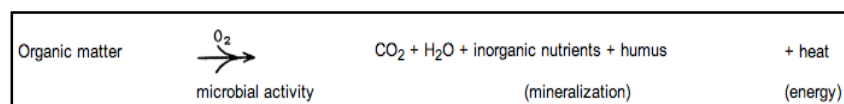
1.1 Κομποστοποίηση

Με τον όρο κομποστοποίηση εννοούμε τη διαδικασία της οξειδωτικής αποδόμησης και σταθεροποίησης οργανικών υλικών, φυτικής ή ζωικής προέλευσης, από μικροβιακούς πληθυσμούς, υπό συνθήκες που οδηγούν στην ανάπτυξη θερμοκρασιών της θερμόφιλης περιοχής. Το τελικό προϊόν της διαδικασίας είναι σταθερό, χωρίς παθογόνους παράγοντες και κατάλληλο για αποθήκευση και εφαρμογή στο έδαφος χωρίς δυσάρεστες περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Κατά συνέπεια η κομποστοποίηση αποτελεί μια εξειδικευμένη μορφή σταθεροποίησης αποβλήτων. Κάτω από αερόβιες συνθήκες, η διαλυτή οργανική ουσία οξειδώνεται σε CO₂ και H₂O. Ως αποτέλεσμα αυτής της αντίδρασης παράγεται βιομάζα.

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



όπου Sum=οργανική ουσία και Am=βιομάζα.



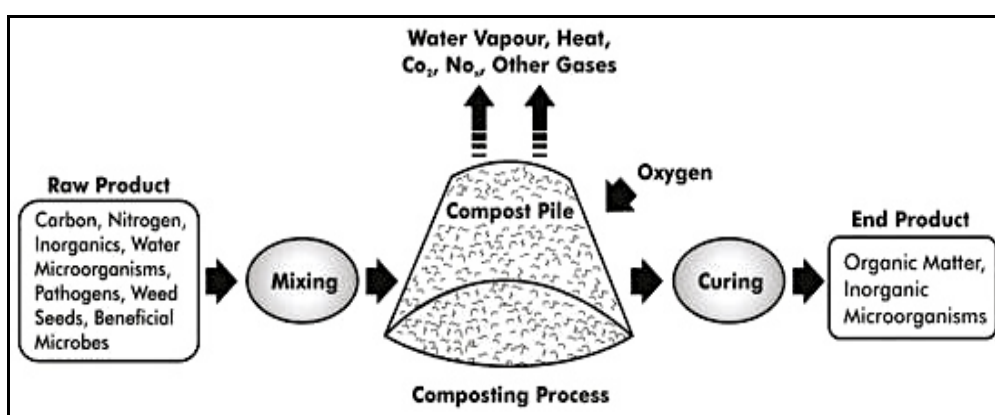
Η κομποστοποίηση είναι μια μικρού κόστους φυσική μέθοδος ανακύκλωσης της οργανικής ύλης που συμβάλλει στην αποτελεσματική διαχείριση των αποβλήτων και μετατρέπει ένα βιοαποικοδομήσιμο, στερεό, οργανικό υλικό σε ένα σταθερό προϊόν χουμποποίησης που μπορεί να επεξεργαστεί, να αποθηκευτεί και να χρησιμοποιηθεί χωρίς να έχει αρνητική επίδραση στο περιβάλλον (βελτίωση της ποιότητας του εδάφους, θετική επίδραση στην ανάπτυξη των φυτών, την ανθοφορία, την καταστολή φυτικών ασθενειών κ.ά.) (Rynk *et al.*, 1991). Επιπλέον, οι διάφορες κατηγορίες λυμάτων που χρησιμοποιούνται ως πρώτες ύλες στην κομποστοποίηση, όπως τα αστικά λύματα και η ιλύς βιολογικού καθαρισμού, περιέχουν πολλά παθογόνα είδη (ιούς, βακτήρια, μύκητες, πρωτόζωα, νηματώδεις), τα οποία καταστρέφονται κατά τη διαδικασία (Dumontet *et al.*, 1999).

Η πορεία της κομποστοποίησης κατά τα αρχικά στάδια εξελίσσεται γρήγορα, καθώς υπάρχει άφθονη πρώτη ύλη για να αποικοδομηθεί από τους μικροοργανισμούς, ενώ στη συνέχεια, όταν έχουν διασπαστεί οι εύκολα αποδομήσιμες ενώσεις, ακολουθεί η φάση της αργής ανάπτυξης, καθώς οι μικροοργανισμοί πρέπει να εκκρίνουν εξειδικευμένα ένζυμα για να διασπάσουν τις πιο επίμονες ενώσεις. Σήμερα, όμως, στις οργανωμένες μονάδες κομποστοποίησης, πραγματοποιείται μια *ελεγχόμενη* διαδικασία αποσύνθεσης των οργανικών ουσιών για τη μετατροπή τους σε ένα σταθερό προϊόν χουμποποίησης.

Εφόσον αναφερόμαστε σε μια βιολογική διαδικασία, η μελέτη των μικροβιακών πληθυσμών που συνδέονται με αυτή είναι αναγκαία. Από το 1947-1948,

οπότε έγιναν οι πρώτες μελέτες για τη μικροβιολογία του κόμποστ, ξεκινώντας από τα αερόβια μεσόφιλα και θερμόφιλα βακτήρια από τους Forshyth και Webley μέχρι σήμερα, έχει σημειωθεί τεράστια πρόοδος στις γνώσεις για τη μικροβιακή οικολογία της κομποστοποίησης και τους παράγοντες που την καθορίζουν και συμπληρώνονται συνεχώς με τη χρήση των σύγχρονων μοριακών μεθόδων ανάλυσης. Οι γρήγορες και δραστικές αλλαγές στις περιβαλλοντικές συνθήκες και οι αλλαγές στην ποιότητα του υλικού δημιουργούν συνθήκες επιλεκτικές για την ανάπτυξη ορισμένων οργανισμών και καθιστούν τη διαδικασία της κομποστοποίησης ένα χρήσιμο σύστημα δοκιμής των μικροβιακών και οικολογικών θεωριών και μελέτης της μικροβιακής ποικιλότητας (Peters *et al.*, 2000).

Για την καλύτερη κατανόηση της διεργασίας παρατίθεται το παρακάτω σχηματικό διάγραμμα (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας κομποστοποίησης.

Η αρχική μη επεξεργασμένη πρώτη ύλη μετατρέπεται σε ένα σταθερό υλικό. Η διαδικασία απαιτεί την τροφοδότηση της μάζας με οξυγόνο και υγρασία. Κατά την εξέλιξη της πορείας υπάρχει απώλεια θερμότητας και μάζας, επειδή απομακρύνεται αμμωνία, διοξείδιο του άνθρακα, μονοξείδιο του αζώτου και νερό, λόγω εξάτμισης.

1.2 Η μικροβιολογία της κομποστοποίησης

Η πορεία της κομποστοποίησης τυπικά χωρίζεται σε δύο φάσεις: την ενεργή - θερμόφιλη και τη φάση ωρίμανσης. Η πρώτη χαρακτηρίζεται από αυξημένη μικροβιακή δραστηριότητα, η οποία οδηγεί σε αποσύνθεση των βιοαποικοδομήσιμων υλικών, και η δεύτερη είναι η φάση χουμοποίησης, όπου τα εναπομείναντα οργανικά υλικά μετατρέπονται σε χουμικές ενώσεις. Καθώς η κομποστοποίηση είναι μια βιολογική διεργασία, κυρίαρχος είναι ο ρόλος των μικροοργανισμών, οι οποίοι αποικοδομούν την πρώτη ύλη και συμμετέχουν ενεργά στον κύκλο του άνθρακα και του αζώτου. Κατά την αποσύνθεση του υλικού, ο άνθρακας ενσωματώνεται στους μικροοργανισμούς σε ανηγμένη μορφή. Στη συνέχεια, οξειδώνονται οι οργανικές ενώσεις και παράγεται διοξείδιο του άνθρακα. Πρώτα, αποσυντίθενται οι εύκολα αποδομήσιμες ουσίες και έπειτα οι περισσότερο επίμονες, όπως η λιγνίνη, η κυτταρίνη, οι πολυφαινόλες κ.ά.

Η διαδικασία της κομποστοποίησης χαρακτηρίζεται από συνεχείς αλλαγές της θερμοκρασίας, του pH, των θρεπτικών, των επιπέδων οξυγόνου, αζώτου και των άλλων φυσικο-χημικών παραγόντων. Οι παράγοντες αυτοί υπαγορεύουν δυναμική αλλαγή και διαδοχή συγκεκριμένων μικροβιακών κοινοτήτων, έτσι ώστε κάθε στάδιο να χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένους μικροοργανισμούς (Gray *et al.*, 1971, De Bertoldi *et al.*, 1983, Tiquia *et al.*, 2005). Είδη που ανήκουν στα γένη Μυκήτων *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Monilia*, *Helminthosporium*, *Coccidioides*, *Scedosporium*, Ακτινομυκήτων *Nocardia*, και Βακτηρίων *Bacillus*, *Lactobacilli*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*., έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί σε δείγματα κόμποστ (Ashraf *et al.*, 2007).

Κατά την έναρξη της κομποστοποίησης παρατηρούνται βακτήρια που παράγουν αμμωνία, τα οποία αυξάνονται ραγδαία τις δύο πρώτες εβδομάδες και στη συνέχεια ο αριθμός τους μειώνεται. Τη θέση τους καταλαμβάνουν τα αυτότροφα νιτροποιητικά βακτήρια, που ανιχνεύονται στο σωρό μέχρι το τέλος της διαδικασίας. Τα κυτταρινολυτικά βακτήρια δραστηριοποιούνται κατά τη θερμόφιλη φάση και τη φάση που ακολουθεί αυτής, αλλά ο ρυθμός ανάπτυξής τους είναι μικρός, επειδή στο τελευταίο στάδιο επικρατούν οι κυτταρινολυτικοί μύκητες και ακτινομύκητες (Riffaldi *et al.*, 1986).

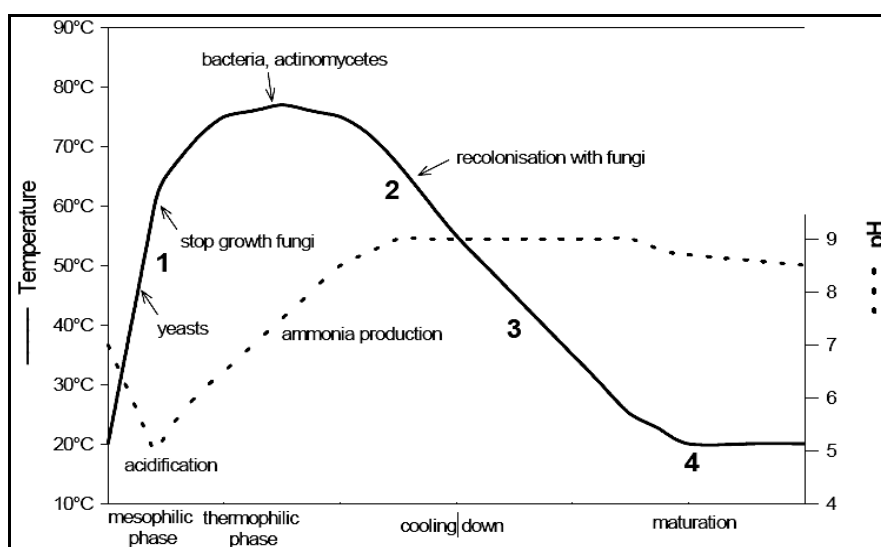
Παρόλο που οι μύκητες είναι οι κυριότεροι αποικοδομητές του οργανικού υλικού σε όλα τα χερσαία οικοσυστήματα, η συμβολή τους στη διαδικασία της κομποστοποίησης θεωρείται μικρή συγκρινόμενη με αυτή των βακτηρίων (Miller, 1996), καθώς στη θερμόφιλη φάση, η θερμοκρασία είναι πολύ υψηλή (>65°C) για την επιβίωσή τους, μερικές φορές τόσο υψηλή που μπορεί να προκληθεί αυτόματη καύση (Peters *et al.*, 2000, Ryskeboer *et al.*, 2003). Οι μύκητες χρησιμοποιούν διάφορες πηγές άνθρακα, κυρίως λιγνινοκυτταρινούχα πολυμερή, αποικοδομούν πολύπλοκα πολυμερή, όπως αρωματικές ενώσεις και μπορούν να επιβιώσουν σε ακραίες συνθήκες (χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης οξυγόνου, ξηρικές συνθήκες). Επιπλέον, αυξάνουν τη γονιμότητα του εδάφους, όταν το κόμποστ χρησιμοποιείται ως λίπασμα, συμβάλλουν στην καταστολή των ασθενειών των φυτών και δημιουργούν συνθήκες ευνοϊκές για την καρποφορία μανιταριών (Straatsma & Samson, 1993).

Μύκητες έχουν απομονωθεί και από τις τέσσερις φάσεις της κομποστοποίησης, αλλά φαίνεται να επικρατούν κυρίως στην αρχική και μέση μεσόφιλη φάση, δηλαδή, πριν και μετά τη θερμόφιλη (De Bertoldi *et al.*, 1983, Ryskeboer *et al.*, 2003). Τα κυριότερα γένη μυκήτων που έχουν βρεθεί στη μεσόφιλη φάση της κομποστοποίησης είναι τα εξής: *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Emericella*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mortierella*, *Mucor*, *Penicillium*, *Pseudallescheria*, *Scopulariopsis* και *Trichoderma*. Στελέχη μυκήτων που ανήκουν στα γένη *Absidia*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Coprinus*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Scytalidium* και *Thermomyces*, έχουν απομονωθεί από δείγμα κόμποστ σε υψηλότερες θερμοκρασίες (Ryskeboer *et al.*, 2003, Anastasi *et al.*, 2005, Bonito *et al.*, 2010). Στα παθογόνα είδη που έχουν βρεθεί συμπεριλαμβάνονται τα εξής: *Aspergillus* sp., *Phialophora richardsii*, *Geotrichum candidum*, *Trichophyton*

sp., *Epidermophyton* sp., *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *Cryptococcus neoformans*, και *Trichosporon* sp., ωστόσο είναι περισσότερο συνδεδεμένα με κόμποστ που περιέχει ως υπόστρωμα λυματολάσπη (sewage sludge) (De Bertoldi *et al.*, 1983).

Όσο μεγιστοποιείται ο ρυθμός της βιοαποικοδόμησης, λόγω της αυξανόμενης δράσης των μικροοργανισμών, αυξάνεται η θερμοκρασία, προκαλούνται αλλαγές στην τιμή του pH και υπάρχει διαδοχή μικροβιακών ειδών, δηλαδή άλλα είδη είναι κυρίαρχα και άλλα είδη εξαφανίζονται ανάλογα με το στάδιο της διαδικασίας (Hultman *et al.*, 2009). Οι αλλαγές στην τιμή του pH κατά τα αρχικά στάδια συνοδεύονται από αλλαγές στη σύνθεση των βακτηριακών πληθυσμών (Schloss *et al.*, 2003a) και κάθε στάδιο χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένους πληθυσμούς βακτηρίων (Miller, 1996).

Για την καλύτερη κατανόηση της πορείας της κομποστοποίησης και της διαδοχής των μικροοργανισμών, παρατίθεται το παρακάτω σχηματικό διάγραμμα (εικόνα 2).



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της πορείας της κομποστοποίησης και της διαδοχής των μικροοργανισμών (Προσαρμογή από Beffa, 2002).

1. αποικοδόμηση διαλυτών ουσιών (σάκχαρα, αμινοξέα, λιπαρά οξέα)
2. διάσπαση πολυμερών (κυτταρίνη, πηκτίνη, πρωτεΐνες, ημικυτταρίνες)
3. αποσύνθεση μικροβιακών κυττάρων, παραγωγή αντιβιοτικών
4. σχηματισμός χούμου.

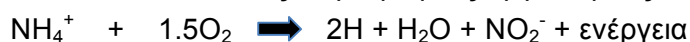
Ο κύκλος του αζώτου

Το ολικό περιεχόμενο σε άζωτο συνήθως μειώνεται κατά τη διάρκεια της κομποστοποίησης, κυρίως λόγω της πτητικότητας της αμμωνίας. Αυτή η απώλεια αζώτου εκτιμάται σε απόλυτες τιμές. Σε επίπεδο ξηρού βάρους, αντίθετα, το ολικό άζωτο αυξάνεται, εξαιτίας της ανοργανοποίησης (**mineralization**) ή αμμωνιοποίησης,

δηλαδή της μετατροπής των οργανικών μορφών του N σε ανόργανες ή ορυκτές μορφές (ανόργανο N, αμμωνία, αμμώνιο) και την ταυτόχρονη απώλεια διοξειδίου του άνθρακα και νερού, με αποτέλεσμα τη μείωση του λόγου C/N. Στη μετατροπή αυτή συμμετέχουν βακτήρια, μύκητες και ακτινομύκητες. Επιπλέον, οι μικροοργανισμοί αυτοί χρησιμοποιούν κάποιο ποσοστό από το ορυκτό N που παράγεται και το ενσωματώνουν, μια διαδικασία που λέγεται ακινητοποίηση (**immobilization**). Οι διαδικασίες της αμμωνιοποίησης και της ακινητοποίησης μπορεί να συμβαίνουν ταυτόχρονα, ανάλογα με την αναλογία C:N και άλλων συνθηκών.

Εκτός από την απώλεια αζώτου λόγω εξάτμισης της αμμωνίας, μερική επανάκτηση συμβαίνει λόγω της δράσης των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων (*nitrogen-fixing bacteria*). Πολλά είδη αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων έχουν βρεθεί σε δείγματα κόμποστ της μεσόφιλης φάσης. Η βιολογική αζωτοδέσμευση εμποδίζεται από την παρουσία αμμωνίας και τις υψηλές θερμοκρασίες και η δράση του ενζυμικού συμπλόκου της νιτρογενάσης είναι εντονότερη, κυρίως στις τελευταίες φάσεις της κομποστοποίησης (φάση πτώσης της θερμοκρασίας - 2η μεσόφιλη - και φάση ωρίμανσης).

Η νιτροποίηση (**nitrification**) είναι η διαδικασία της οξειδωσης της αμμωνίας σε νιτρικά, από τα αυτότροφα χημειοσυνθετικά βακτήρια του γένους *Nitrosomonas* και *Nitrobacter*. Τα βακτήρια αυτά είναι αερόβια και παίρνουν την απαιτούμενη ενέργεια οξειδώνοντας την αμμωνία σε νιτρικά, δηλαδή η διαδικασία είναι μια αερόβια μικροβιακά ελεγχόμενη αντίδραση. Κατά την αντίδραση αυτή απελευθερώνονται δύο ιόντα υδρογόνου για κάθε μόριο νιτρικών που σχηματίζεται. Η διαδικασία αυτή επηρεάζεται κυρίως από τη θερμοκρασία. Σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 40°C ο ρυθμός της νιτροποίησης είναι πολύ χαμηλός. Επίσης, τα υπερβολικά ποσά αμμωνίας εμποδίζουν τη διαδικασία, γιατί εμποδίζουν την ανάπτυξη των νιτροποιητικών βακτηρίων, κυρίως αυτών του γένους *Nitrobacter*. Η νιτροποίηση που πραγματοποιείται από ετερότροφα βακτήρια ή μύκητες θεωρείται ότι επηρεάζεται λιγότερο από τους παράγοντες αυτούς και η παραγωγή νιτρικών στην αρχή γίνεται αποκλειστικά από τους ετερότροφους οργανισμούς.

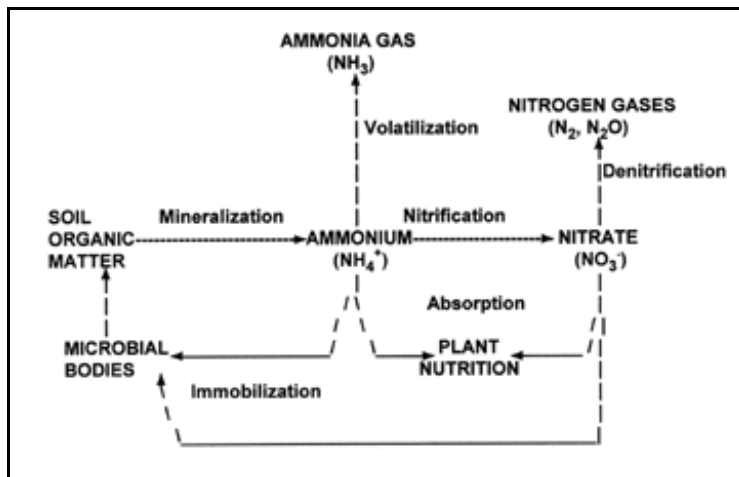


Τα νιτροζοποιητικά βακτήρια του γένους *Nitrosomonas* μετατρέπουν το αμμώνιο (η αμμωνία σε ουδέτερο pH έχει τη μορφή αμμωνιακού ιόντος) σε νιτρώδη.



Τα νιτροποιητικά βακτήρια του γένους *Nitrobacter* μετατρέπουν τα νιτρώδη σε νιτρικά.

Το άζωτο των αμμωνιακών και νιτρικών απελευθερώνεται ως αέριο N μέσω εξάτμισης και απονιτροποίησης. Η απονιτροποίηση (**denitrification**) είναι μια αερόβια αντίδραση που ελέγχεται από τους μικροοργανισμούς και περιλαμβάνει την αναγωγή των νιτρικών σε μοριακό άζωτο και N₂O κατά την αναερόβια οξείδωση της οργανικής ύλης. Το N₂O ανάγεται σε N₂, το οποίο επιστρέφει στην ατμόσφαιρα. Τα παραπάνω αποτελούν το βιογεωχημικό κύκλο του αζώτου, ο οποίος απεικονίζεται σχηματικά παρακάτω (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Ο βιογεωχημικός κύκλος του αζώτου.

1.2.1 Τα στάδια της κομποστοποίησης

Συνοπτικά τα στάδια είναι τα εξής:

1^ο στάδιο

Κατά το στάδιο αυτό, παρατηρείται αύξηση της θερμοκρασίας σε τιμές που χαρακτηρίζουν τη μεσόφιλη φάση ($T < 40^{\circ}\text{C}$) και έχει μικρή διάρκεια. Αρχικά, βιοαποικοδομούνται οι εύκολα αποικοδομήσιμες ενώσεις και σημειώνεται μείωση του pH. Επικρατούν μεσόφιλα βακτήρια ($25 < T < 45^{\circ}\text{C}$) που παράγουν οργανικά οξέα, όπως *Lactobacillus* spp. και *Acetobacter* spp., λόγω του γρήγορου ρυθμού πολλαπλασιασμού τους και της υψηλής αρχικής υγρασίας του υλικού (Strom *et al.*, 1985). Έχουν απομονωθεί μεσόφιλα είδη μυκήτων, αλλά και θερμοφιλα και θερμοανθεκτικά βακτήρια και μύκητες, καθώς η θερμοκρασία πλησιάζει τα όρια της μεσόφιλης-θερμόφιλης φάσης. Οι ακτινομύκητες αυξάνονται πολύ πιο αργά συγκριτικά με τα βακτήρια και τους μύκητες και έτσι δεν είναι ανταγωνιστικοί στη διεκδίκηση θρεπτικών που βρίσκονται σε μεγάλη ποσότητα, όπως συμβαίνει στα αρχικά στάδια της αποικοδόμησης (Beffa *et al.*, 1995).

Στο στάδιο αυτό, σημειώνεται ραγδαία αλλαγή του pH, της θερμοκρασίας και των συγκεντρώσεων O_2 και CO_2 . Η τιμή του pH μειώνεται, ως αποτέλεσμα της παραγωγής οργανικών οξέων από την αποικοδόμηση των σακχάρων και των πρωτεϊνών. Ο σωρός στο στάδιο αυτό δεν έχει υποστεί ακόμα μείωση στο μέγεθός του και έτσι, στα εσωτερικά, απομονωμένα από το εξωτερικό περιβάλλον, στρώματα αρχίζει και αυξάνεται η θερμοκρασία, λόγω της αύξησης των μικροοργανισμών και της συνεχούς μεταβολικής δραστηριότητάς τους και τα όριά της τείνουν να ξεπεράσουν τα όρια αντοχής των μεσόφιλων μικροοργανισμών.

2^ο στάδιο

Κατά το στάδιο αυτό, η θερμοκρασία κυμαίνεται μεταξύ $40-80^{\circ}\text{C}$ (θερμόφιλη φάση). Στο στάδιο αυτό η θερμότητα που απελευθερώνεται από τη μεταβολική

δραστηριότητα των μικροοργανισμών, επειδή υπάρχει σημαντική ποσότητα οργανικού υλικού, συσσωρεύεται και συγκρατείται λόγω χαμηλής θερμικής αγωγιμότητας. Ως αποτέλεσμα, αυξάνεται η θερμοκρασία. Η αύξηση αυτή επιταχύνει το ρυθμό του μεταβολισμού των μικροβιακών πληθυσμών, έως ότου η τιμή της φτάσει σε τόσο υψηλά επίπεδα που είναι ανασταλικά για την περαιτέρω αύξηση ή και επιβίωσή τους. Οι θερμοφιλοι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται και με τη βιολογική τους δραστηριότητα παράγουν ακόμα μεγαλύτερες ποσότητες θερμότητας, έτσι ώστε η θερμοκρασία τείνει να ξεπεράσει τους 60°C. Η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών αυτών στις υψηλές θερμοκρασίες οφείλεται στην αντοχή των ενζυμικών τους συστημάτων. Εκτός από τη θερμοκρασία, αυξάνεται και η τιμή του pH, λόγω της αποδόμησης των οργανικών οξέων και της συσσώρευσης αλάτων κατά την εξάτμιση του νερού.

Οι θερμοφιλοι και οι θερμοανθεκτικοί μύκητες επικρατούν επειδή είναι ικανοί να διασπούν πολυπλοκότερες ουσίες, όπως πολυσακχαρίτες, και έχουν άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης στους 40-50°C. *Absidia ramosa*, *Mucor pusillus*, *Chaetomium thermophilum*, *Talaromyces thermophilis*, *Aspergillus fumigatus*, *Humicola insolens*, *Thermoascus aurantiacus* είναι ορισμένα θερμοφιλα είδη που έχουν απομονωθεί από δείγμα κόμπποστ (De Bertoldi *et al.*, 1983). Οι ακτινομύκητες είναι πιο ανθεκτικοί στην υψηλή θερμοκρασία, σε σχέση με τους μύκητες και ο αριθμός και η ποικιλότητά τους αυξάνονται στους 50-60°C. Στις θερμοκρασίες αυτές αυξάνονται και τα θερμοφιλα βακτήρια (Beffa, 2002). Η ποικιλότητα γενικά μειώνεται όταν η θερμοκρασία υπερβεί τους 60°C, οπότε μειώνεται δραστικά η μικροβιακή δραστηριότητα (Strom, 1985, McKilney & Vestal, 1985). Αν η θερμοκρασία ξεπεράσει την τιμή αυτή, οι μικροβιακοί πληθυσμοί θα εξακολουθήσουν να υπάρχουν σε λανθάνουσα μορφή σπορίων, ανθεκτικών δομών όπως τα σκληρώτια των μυκήτων κ.ά.

Θερμοφιλα σποριογόνα είδη, όπως τα είδη του γένους *Bacillus* (στελέχη *B. stearothermophilus* είναι τα μόνα που έχουν ανιχνευτεί σε θερμοκρασίες μέχρι 69°C) (Storm, 1985) και *Clostridium* (τα κυριότερα βακτήρια που διασπούν την κυτταρίνη, Tiquia *et al.*, 2005), αλλά και μη σποριογόνα θερμοφιλα, όπως τα είδη του γένους *Thermus* (τα μόνα βακτήρια που έχουν ανιχνευτεί σε θερμοκρασία 70-80°C, *T. aquaticus*, *T. thermophilus*, Blanc *et al.*, 1999), είναι οι μικροοργανισμοί που κυριαρχούν σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 60°C, ενώ έχουν βρεθεί και μεθανογόνα Αρχαία. Επιπλέον, στη φάση αυτή έχουν βρεθεί αυτότροφα βακτήρια, που δεν ήταν σποριογόνα και αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες 60-80°C, με άριστο 70-75°C και έχουν ομοιότητα με στελέχη του γένους *Hydrogenobacter*, που είναι χημειολιθότροφα και αυτότροφα υπερθερμοφιλα βακτήρια που έχουν βρεθεί μόνο σε θερμοπηγές (Beffa *et al.*, 1996). Οι μύκητες επιβιώνουν σε λανθάνουσα κατάσταση, καθώς υπάρχουν με τη μορφή σπορίων ή σκληρωτίων που αποτελούν θερμοανθεκτικές μορφές, ενώ μπορεί να υπάρχουν και ακτινομύκητες αλλά σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση, ώστε δε διαδραματίζουν κάποιο ενεργό ρόλο στην αποικοδόμηση και ανοργανοποίηση. Τα θερμοφιλα (60-80°C) και μεσόφιλα (30-40°C) βακτήρια αποικοδομούν τις ημικυτταρίνες, και ποικίλες οργανικές ενώσεις, όπως υδατάνθρακες, οργανικά οξέα, πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, λιπίδια, αλκοόλες, οξειδώνουν τα αέρια (CH₄, H₂, CO) και

ανάγουν το ανόργανο θείο (H_2S , $S_2O_3^{-2}$, SO_3^{-2}) (Beffa *et al.*, 1995, Ichii *et al.*, 2000, Peters *et al.*, 2000, Dees & Ghiorse, 2001, Beffa, 2002, Schloss *et al.*, 2003a, Cho *et al.*, 2008).

Η θερμοκρασία στο στάδιο αυτό πρέπει να φτάσει σε μία ορισμένη τιμή (να ξεπεράσει το κατώφλι των $60^\circ C$) για να εξασφαλιστεί η θανάτωση των παθογόνων μικροοργανισμών και η παραγωγή ασφαλούς τελικού προϊόντος. Η θερμοκρασία ορισμένες φορές, δεν μπορεί να φτάσει στα επίπεδα αυτά, κυρίως όταν η ποσότητα του υλικού που χρησιμοποιείται για την κομποστοποίηση είναι μικρή και η επιρροή της εξωτερικής θερμοκρασίας δεν είναι ευνοϊκή για το ξεκίνημα της διαδικασίας (Haug, 1986). Όσο υπάρχουν διαθέσιμες πηγές θρεπτικών και ενέργειας οι μικροοργανισμοί συνεχίζουν τη δράση τους και όταν αρχίζουν να εξαντλούνται πεθαίνουν και η θερμοκρασία του σωρού αρχίζει να πέφτει, δίνοντας τη θέση τους και πάλι στους μεσόφιλους.

3^ο στάδιο

Το στάδιο αυτό αποτελείται από δύο φάσεις, τη φάση πτώσης της θερμοκρασίας (cooling phase) και τη φάση ωρίμανσης (mature phase). Στο στάδιο αυτό, οι πηγές ενέργειας έχουν μειωθεί σημαντικά, και αδυνατούν να καλύψουν τις ενεργειακές απαιτήσεις των μικροοργανισμών (Gray *et al.*, 1971). Το μέγεθος του σωρού έχει μειωθεί σημαντικά και σε συνδυασμό με την χαμηλή παραγωγή ενέργειας, υπάρχουν απώλειες θερμότητας προς τον περιβάλλοντα χώρο. Επομένως, η θερμοκρασία μειώνεται συνεχώς.

Οι δύο τελευταίες φάσεις χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη μεσόφιλων και θερμοανθεκτικών ειδών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των ειδών της τάξης *Bacteroidetes* και Gram θετικών βακτηρίων (HGCGPB), όπως είδη του γένους *Arthrobacter* (Cho *et al.*, 2008). Τα βακτήρια επιτελούν μια σειρά μεταβολικών διεργασιών, στο στάδιο αυτό, που είναι σημαντικές για την ωρίμανση και τη βελτίωση της ποιότητας του κόμποστ, όπως:

- αποικοδόμηση των εναπομεινουσών απλών ή πολύπλοκων οργανικών ενώσεων,
- οξειδωση και μετατροπή των ανηγμένων ανόργανων αζωτούχων και θειούχων ενώσεων για την παραγωγή νιτρικών και θειικών αντίστοιχα,
- παραγωγή πολύπλοκων χουμικών ενώσεων (π.χ. εξω-πολυσακχαριδίων) από τον πολυμερισμό απλών οργανικών ενώσεων,
- αζωτοδέσμευση και παραγωγή αμμωνίας και μετατροπή σε νιτρικά από τα νιτροποιητικά βακτήρια,
- καταστολή των φυτοπαθογόνων μυκήτων με την παραγωγή αντιμυκητιακών ουσιών,
- δέσμευση μετάλλων (Mg^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} κ.ά.) και σχηματισμό αδρανών υλικών,
- αποτοξικοποίηση βαρέων μετάλλων με σχηματισμό ανόργανων αλάτων (Beffa, 2002).

Οι μεσόφιλοι οργανισμοί κυριαρχούν και πάλι έως ότου καταναλωθούν όλες οι διαθέσιμες πηγές ενέργειας. Στο τελευταίο αυτό στάδιο, υπάρχει μεγάλος αριθμός πολύπλοκων ενώσεων, που δεν έχουν διασπαστεί κατά τα προηγούμενα στάδια. Οι δύσκολα αποδομήσιμες ενώσεις μεταβολίζονται κυρίως από τους μύκητες και ακτινομύκητες, οι οποίοι αποικοδομούν αποτελεσματικά ενώσεις, όπως η κυτταρίνη, το άμυλο, η πηκτίνη, η λιγνίνη, εκκρίνοντας εξειδικευμένα εξωκυτταρικά ένζυμα. Η αποικοδόμηση της κυτταρίνης είναι έντονη καθόλη τη διάρκεια της κομποστοποίησης, κυρίως, όμως στο τελευταίο στάδιο με τη δράση των μυκήτων. Στο τελευταίο στάδιο τα κυτταρινολυτικά βακτήρια μειώνονται και αυξάνεται ο αριθμός των κυτταρινολυτικών μυκήτων, οι οποίοι επωφελούνται από τη μείωση της θερμοκρασίας, του pH και της υγρασίας. Αυτοί οι τρεις παράγοντες επηρεάζουν θετικά και τη δράση των ακτινομυκήτων. Η λιγνίνη αποικοδομείται μέσω μιας αερόβιας ενζυμικής μετατροπής και περιορίζεται στη δράση των ανώτερων μυκήτων και κυρίως των Βασιδιομυκήτων. Κυτταρινολυτικά και λιγνινολυτικά είδη μυκήτων έχουν απομονωθεί από κόμποστ: *Alternaria tenuis*, *Aspergillus amstelodami*, *Geotrichum candidum*, *Cladosporium herbarum*, *Cephalosporium* sp., *Chaetomium* sp., *Trichoderma viridae*, *Coprinus cinereus*, *Pleurotus ostreatus*, *Polyporus versicolor*. Είδη ακτινομυκήτων των γενών *Streptomyces*, *Thermomonospora* καθώς και το είδος *Thermoactinomyces vulgaris* έχουν βρεθεί σε κόμποστ. Ο πληθυσμός τους είναι τόσο μεγάλος στο στάδιο αυτό που η ανάπτυξή τους μπορεί να γίνει αντιληπτή από το ωχροκίτρινο χρώμα που δίνουν στην επιφάνεια του σωρού. Η μεταβολική δραστηριότητά τους είναι βασική για τη χουμοποίηση του οργανικού υλικού και την παραγωγή αρωματικών ενώσεων, όπως η γεωσμίνη (geosmin), ουσία που δίνει στο χώμα τη χαρακτηριστική του οσμή. Η μικροβιακή δραστηριότητα μειώνεται σταδιακά και πραγματοποιείται με πολύ αργούς ρυθμούς.

Συνολικά, πρέπει να αναφερθεί ότι η μικροβιακή δραστηριότητα επηρεάζεται από τους φυσικο-χημικούς παράγοντες, όπως είναι τα επίπεδα του οξυγόνου, το pH, τα θρεπτικά υλικά, το λόγο C/N, την περιεχόμενη υγρασία, τη θερμοκρασία. Σε θερμοκρασίες 35 - 40°C μεγιστοποιείται η βιολογική δραστηριότητα, σε θερμοκρασίες 45 - 55°C μεγιστοποιείται ο ρυθμός βιοαποικοδόμησης, ενώ θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 55°C συμβάλλουν στην εξυγίανση του υποστρώματος, καθώς θανατώνονται οι παθογόνοι μικροοργανισμοί (Stentiford, 1996).

Κατά το τελευταίο στάδιο της πορείας ενδείκνυται η εκ νέου διαβροχή του υλικού με ταυτόχρονη αναμόχλευσή του (γύρισμα). Με αυτή την πρακτική εξασφαλίζεται η ανάμιξη και ομογενοποίηση του οργανικού υλικού, καθιστώντας περισσότερα θρεπτικά διαθέσιμα στους μικροοργανισμούς, αλλά και η διατήρηση των αερόβιων συνθηκών, επιτρέποντας την ανταλλαγή αερίων και απομακρύνοντας τυχόν παγιδευμένα αέρια προϊόντα (CO₂, NH₃, NO). Επιπλέον, με τη διαβροχή του υλικού αυξάνεται το περιεχόμενο σε υγρασία για τις απαιτήσεις των μικροοργανισμών. Κατά συνέπεια, ανανεώνονται οι πηγές θρεπτικών και αυξάνεται και πάλι η μικροβιακή δραστηριότητα. Η θερμοκρασία αρχίζει να αυξάνεται και ξεκινάει μία νέα θερμοφιλή φάση, Η διάρκεια της είναι μικρότερη, όμως, από την προηγούμενη, λόγω της

μικρότερης διαθεσιμότητας υλικών, όπως επίσης και η μέγιστη θερμοκρασία που επιτυγχάνεται είναι μικρότερη. Έπειτα, ακολουθεί μια νέα μεσόφιλη φάση.

Στον Πίνακα 1 καταγράφεται το μέγεθος του πληθυσμού – κατά προσέγγιση – των διαφορετικών ομάδων μικροοργανισμών που δραστηριοποιούνται κατά τη διαδικασία της κομποστοποίησης και στον Πίνακα 2 παρουσιάζεται η κατανομή τους στις τέσσερις διαφορετικές φάσεις της διαδικασίας.

Πίνακας 1: Μέγεθος πληθυσμού - κατά προσέγγιση - των διαφορετικών μικροοργανισμών κατά την κομποστοποίηση (Προσαρμογή από Miller, 1993).

Οργανισμός	Μέγεθος πληθυσμού
Βακτήρια - μεσόφιλη φάση	$10^9 - 10^{13}$ / g υποστρώματος
Βακτήρια - θερμόφιλη φάση	$10^8 - 10^{12}$ / g υποστρώματος
Ακτινομύκητες - θερμόφιλη φάση	$10^7 - 10^9$ / g υποστρώματος
Ακτινομύκητες - μεσόφιλη φάση	$10^8 - 10^{12}$ / g υποστρώματος
Μύκητες - μέση τιμή στο σύνολο	$10^5 - 10^8$ / g υποστρώματος

Πίνακας 2: Κατανομή των μικροοργανισμών στις 4 φάσεις της κομποστοποίησης (Fogarty & Tuovinen, 1991).

Πληθυσμός	Κατανομή πληθυσμού			
	Μεσόφιλη	Θερμόφιλη	Μεσόφιλη	Ωρίμανσης
Βακτήρια - μεσόφιλα		---	+++	+
Βακτήρια - θερμόφιλα	-	+++	---	-
Ακτινομύκητες - μεσόφιλοι		---	+++	+
Ακτινομύκητες - θερμόφιλοι	-	+++	---	-
Μύκητες - μεσόφιλοι		---	+++	+
Μύκητες - θερμόφιλοι	-	+++	---	-

-: καμία ανάπτυξη, +: αργή ή μικρή αλλαγή, ---: μείωση, +++: αύξηση στο μέγεθος του πληθυσμού.

1.3 Ο ρόλος των φυσικών και χημικών παραμέτρων

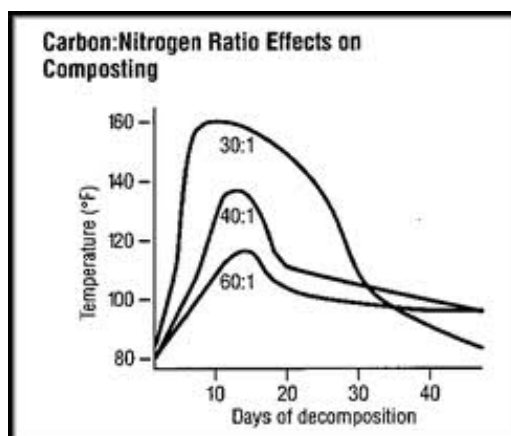
1.3.1 Οι πρώτες ύλες

Η φύση και τα χαρακτηριστικά της πρώτης ύλης είναι καθοριστικά για την πορεία της κομποστοποίησης. Ως πρώτες ύλες χρησιμοποιούνται υπολείμματα βιομηχανιών ξύλου (φλοιοί δένδρων, ροκανίδια, πριονίδια κ.ά.), αστικά απορρίμματα (λυματολάσπες, οργανικό κλάσμα σκουπιδιών κ.ά.), γεωργικά υπολείμματα (υπολείμματα εκκοκκισμού βάμβακος, άχυρο, πυρηνόξυλο, υπολείμματα καλλιέργειας μανιταριών, πράσινα απόβλητα κ.ά.), υλικά ζωοτεχνικών μονάδων (κοπριά ορνιθοτροφείων, χοιροστασίων, βουστασίων κ.ά.). Οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται περισσότερο στην κομποστοποίηση είναι υλικά με υψηλό περιεχόμενο αζώτου, όπως τα αστικά και τα πράσινα απορρίμματα. Όταν χρησιμοποιούνται γεωργικά απόβλητα ως πρώτη ύλη στην κομποστοποίηση, το περιεχόμενο σε λιγνίνη και κυτταρίνη αποτελεί το σημαντικότερο μέρος της βιομάζας και επομένως η διάσπασή τους είναι βασική για τη διαδικασία της κομποστοποίησης (Yu *et al.*, 2007).

Ο κατάλληλος συνδυασμός πρώτων υλών μπορεί να εξασφαλίσει την αποτελεσματικότερη διαδικασία κομποστοποίησης (συγκομποστοποίηση). Υλικά που αποτελούν επιβλαβή απόβλητα, όπως για παράδειγμα τα υγρά απόβλητα ελαιουργείας, όταν συνδυαστούν με κάποιο από τα παραπάνω, σε ένα σύστημα συγκομποστοποίησης, μπορούν να διαχειριστούν αποτελεσματικά, εξαλείφοντας το πρόβλημα της διάθεσής τους. Άλλο παράδειγμα αποτελούν τα αστικά απόβλητα που μπορούν να συγκομποστοποιηθούν με βιολογική ιλύ. Σε αυτές τις περιπτώσεις, επιλέγεται κατάλληλος συνδυασμός, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του κάθε ξεχωριστού υποστρώματος, ώστε να εξασφαλίζεται η καλύτερη εκμετάλλευση των ιδιοτήτων τους, με στόχο την αποτελεσματικότερη διαδικασία αποδόμησης της οργανικής ουσίας. Τα ροκανίδια ξύλου (wood chip), για παράδειγμα, χρησιμοποιούνται στην κομποστοποίηση μαζί με κάποιο οργανικό υπόστρωμα, επειδή βελτιώνουν το λόγο C/N. Επιπλέον, λόγω της άκαμπτης δομής τους χρησιμεύουν ως διογκωτικοί παράγοντες (Bulking agents), όπως και το πριονίδι (sawdust), το άχυρο (straw), τα υπολείμματα εκκοκκισμού βάμβακος κ.ά. Οι διογκωτικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται προκειμένου να διασφαλιστεί μια δυναμική διαδικασία κομποστοποίησης και να επιταχυνθεί η αποικοδόμηση των οργανικών αποβλήτων. Προσδίδουν τρισδιάστατη δομή στο υλικό και αυξάνουν τον ελεύθερο χώρο για αερισμό. Αποτελούν σημαντικά φυσικο-χημικά συστατικά που εκτός του ότι προωθούν τον αερισμό, παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση από τους μικροοργανισμούς, αυξάνοντας το πορώδες και τη δυνατότητα απορρόφησης νερού, παρέχοντας υπόστρωμα ανάπτυξης και ρυθμίζοντας την περιεκτικότητα του σωρού σε υγρασία (Nagao *et al.*, 2008).

1.3.2 Ο λόγος C/N

Ο λόγος C/N αποτελεί δείκτη χουμοποίησης και δείκτη δραστηριότητας των μικροοργανισμών. Αναφέρεται στην ικανότητα των μικροβιακών κοινοτήτων να αποικοδομούν την οργανική ύλη. Όταν ο λόγος είναι χαμηλός (<20), επιταχύνεται η μικροβιακή αύξηση και η αποσύνθεση του υλικού, αλλά το άζωτο βρίσκεται σε περίσσεια και υπάρχει κίνδυνος ποσότητα αζώτου να χαθεί με τη μορφή αμμωνίας, προκαλώντας, για παράδειγμα, προβλήματα οσμών. Η συσσώρευση αμμωνίας συνδέεται με αναερόβιες διεργασίες και προκαλεί γενικά υποβάθμιση του σωρού και προβλήματα φυτοτοξικότητας. Όταν ο λόγος είναι υψηλός (>50) η διαθέσιμη ποσότητα αζώτου για τη μικροβιακή θρέψη είναι μικρή, οπότε επιβραδύνεται η διαδικασία έως ότου υπάρξει περισσότερο διαθέσιμο άζωτο. Η βέλτιστη αναλογία του λόγου C/N κυμαίνεται μεταξύ 25 - 40, αλλά η τιμή του εξαρτάται και από το είδος του υποστρώματος κομποστοποίησης. Κατά τη διαδικασία της κομποστοποίησης μειώνεται ο λόγος, γιατί χάνεται άνθρακας ως διοξείδιο του άνθρακα και αυξάνεται το άζωτο, λόγω ανοργανοποίησης και δέσμευσης από τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Μεταβολές του λόγου C/N κατά την πορεία της κομποστοποίησης.

1.3.3 Το οξυγόνο και ο αερισμός

Η κομποστοποίηση είναι εξ ορισμού μία αερόβια διαδικασία. Επαρκείς ποσότητες οξυγόνου πρέπει να παρέχονται στο σωρό για να αντισταθμίζονται οι ποσότητες που χρησιμοποιούν οι μικροοργανισμοί για την αποικοδόμηση. Η ύπαρξη επαρκούς ποσότητας οξυγόνου είναι απαραίτητη για την επιβίωση των αερόβιων μικροβιακών πληθυσμών (βακτήρια, ακτινομύκητες, μύκητες). Τα επίπεδα του οξυγόνου καθορίζονται από το ρυθμό κατανάλωσής του, τη θερμοκρασία, το μέγεθος των πόρων, καθώς επίσης και το περιεχόμενο σε υγρασία (Miller, 1993). Οι αναερόβιες συνθήκες πρέπει να αποφεύγονται, γιατί οδηγούν σε μειωμένο ρυθμό παραγωγής θερμότητας και στην παραγωγή ανεπιθυμητών ενδιάμεσων μεταβολιτών που προκαλούν δυσάρεστες οσμές (π.χ. προπιονικό και βουτυρικό οξύ, θειούχες ενώσεις, αμμωνία), συσσώρευση τοξικών ουσιών (φυτοτοξικότητα) και παραγωγή μεθανίου και διοξειδίου του αζώτου.

Ο αερισμός του σωρού, μπορεί να γίνει με το γύρισμα - αναστροφή του σωρού και τη μεταφορά ροής αέρα παθητικά ή με μηχανικό τρόπο. Με την πρακτική του αερισμού του σωρού, μειώνεται η υψηλή θερμοκρασία που αναπτύσσεται, καθώς απελευθερώνεται η συσσωρευμένη θερμότητα. Οι διογκωτικοί παράγοντες, που προαναφέρθηκαν, δημιουργούν διάκενα αερισμού στο εσωτερικό και έτσι αυξάνεται ο αερισμός και διατηρείται η ροή του αέρα. Επίσης, αυξάνουν το πορώδες και την ικανότητα απορρόφησης νερού (Nagao *et al.*, 2008).

1.3.4 Η θερμοκρασία

Η θερμοκρασία αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα για την εκτίμηση του ρυθμού της κομποστοποίησης. Η θερμοκρασία επιδρά άμεσα στους μικροβιακούς πληθυσμούς, οι οποίοι καθορίζουν το ρυθμό της αποικοδόμησης των πρώτων υλών. Συγκεκριμένα, καθορίζει τη διατήρησή τους στη μάζα του σωρού και την ανάπτυξη συγκεκριμένων ειδών και επηρεάζει τη δραστηριότητά τους. Επομένως, σχετίζεται άμεσα με το ρυθμό αποδόμησης της οργανικής ύλης. Η θερμογένεση είναι μία από τις σημαντικότερες ιδιότητες της διαδικασίας της κομποστοποίησης, ως αποτέλεσμα της δραστηριότητας των μικροοργανισμών. Ο μέγιστος ρυθμός αποδόμησης επιτυγχάνεται σε θερμοκρασία μεταξύ 45 και 55°C. Σε κάθε διαδικασία κομποστοποίησης, η θερμοκρασία στη θερμόφιλη φάση πρέπει να ξεπεράσει τους 60°C για την παραγωγή ενός τελικού προϊόντος σταθερού, μη τοξικού και χωρίς παθογόνους οργανισμούς (Kane & Mullins, 1973). Με βάση την τιμή της η διαδικασία χωρίζεται σε τρία στάδια: στη μεσόφιλη, τη θερμόφιλη και τη φάση πτώσης της θερμοκρασίας και ωρίμανσης του κόμποστ.

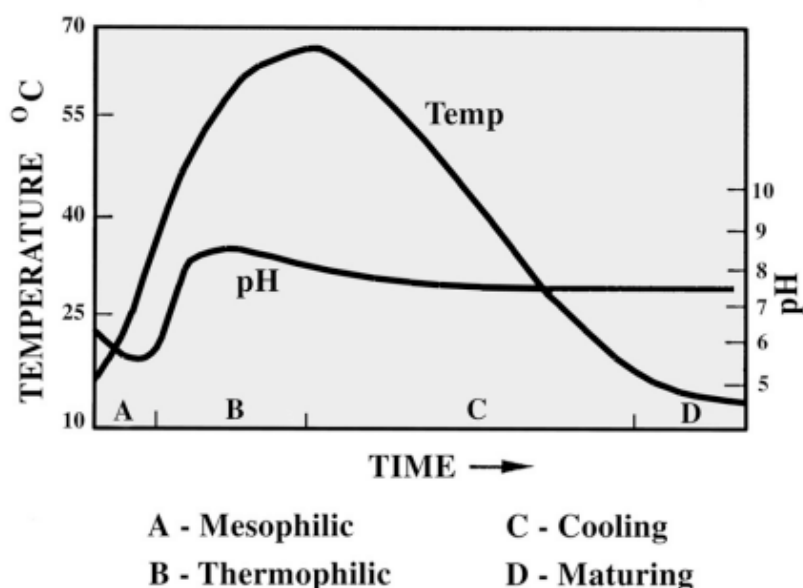
Η τιμή της θερμοκρασίας καθορίζεται από δύο παράγοντες, το περιβάλλον και την ένταση και διάρκεια της μικροβιακής δραστηριότητας. Στα ανοιχτά συστήματα κομποστοποίησης, πρέπει να εξασφαλίζεται η μόνωση του σωρού, για την αποφυγή των απωλειών θερμότητας προς το περιβάλλον, αλλά για τον ίδιο λόγο, θα πρέπει και η ελεύθερη επιφάνεια του σωρού να είναι μικρή. Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος κατά την έναρξη της διαδικασίας είναι καθοριστική για τη μέγιστη τιμή που θα σημειωθεί στη θερμόφιλη φάση. Από την άλλη πλευρά, κατά τη διάρκεια της κομποστοποίησης, η θερμοκρασία που αναπτύσσεται, αυξάνεται ή μειώνεται ως αποτέλεσμα της μικροβιακής δραστηριότητας. Στα αρχικά στάδια, ο αυξημένος αριθμός μικροοργανισμών και η έντονη μεταβολική τους δράση, που είναι επακόλουθο της μεγάλης ποσότητας οργανικού υλικού, παράγουν θερμότητα. Ένα μέρος της χάνεται και ένα μέρος προορίζεται για την αύξηση της θερμοκρασίας. Σταδιακά, με τη μείωση του αριθμού των μικροοργανισμών και του μεταβολικού τους ρυθμού μειώνεται και η θερμοκρασία. Η κομποστοποίηση ολοκληρώνεται αποτελεσματικότερα και γρηγορότερα, όταν επικρατούν συνθήκες που ευνοούν τη θερμόφιλη αποδόμηση της οργανικής ύλης.

1.3.5 Το pH

Το pH είναι δείκτης αποδόμησης της οργανικής ουσίας και προσδιορισμού της αποσάθρωσής της. Συνδέεται στενά με την ύπαρξη των μικροβιακών πληθυσμών στο

κόμποστ, διότι η τιμή του καθορίζει τη μικροβιακή ποικιλότητα. Τα βακτήρια προτιμούν ουδέτερο pH, οι μύκητες τιμές μεταξύ 4 και 6 και οι ακτινομύκητες περιορίζουν τη δράση τους σε ελαφρά αλκαλικά περιβάλλοντα. Οι οργανικές ενώσεις που μπορούν να κομποστοποιηθούν έχουν pH που κυμαίνεται μεταξύ 3 και 11, ενώ οι βέλτιστη τιμή κυμαίνεται μεταξύ 5.5 και 8 (De Bertoldi *et al.*, 1983).

Η τιμή του pH κατά το αρχικό στάδιο είναι χαμηλή (4.5 - 6.5), λόγω της συσσώρευσης οργανικών οξέων, οπότε αυτό το όξινο περιβάλλον επιτρέπει την επικράτηση των μυκήτων. Αργότερα, αρχίζουν και αυξάνονται οι μικροοργανισμοί που διασπούν τα οξέα, με συνέπεια την αύξηση της τιμής του pH και την επακόλουθη αύξηση του αριθμού των βακτηρίων στο σωρό. Η αύξηση οφείλεται επίσης και στην αύξηση της αλατότητας, λόγω εξάτμισης του νερού, καθώς και στην απελευθέρωση της αμμωνίας, λόγω διάσπασης των αζωτούχων ενώσεων. Η παρατεταμένη υψηλή τιμή στο pH του σωρού υποδεικνύει ότι καθυστερεί η ωρίμανση του κόμποστ (Εικόνα 6).



Εικόνα 5: Μεταβολές στη θερμοκρασία και το pH στις 4 φάσεις της κομποστοποίησης.

1.3.6 Η υγρασία

Η υγρασία είναι καθοριστικός παράγοντας για τη διαδικασία της κομποστοποίησης. Όπως και η θερμοκρασία, έτσι και η υγρασία επιδρά άμεσα στους μικροβιακούς πληθυσμούς άρα και στο ρυθμό της αποικοδόμησης των πρώτων υλών. Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε ένα υδάτινο στρώμα που δημιουργείται στην επιφάνεια των σωματιδίων του υλικού (water film) και επομένως, η πρόσληψη των θρεπτικών είναι δυνατή μόνο αν αυτά είναι υδατοδιαλυτά. Όμως, και η μεγάλη περιεκτικότητα σε υγρασία αποτελεί μειονέκτημα, καθώς το οξυγόνο στο νερό διαχέεται πολύ πιο αργά σε σχέση με τον αέρα, επομένως πιθανόν να προκληθούν αναερόβιες συνθήκες.

Το νερό παράγεται στο κόμποστ από τη διάσπαση του οργανικού υλικού, όμως αυτό αντισταθμίζεται από τις απώλειες μέσω εξάτμισης, λόγω της αυτο-

θέρμανσης του σωρού. Η μέγιστη περιεκτικότητα του σωρού σε υγρασία εξαρτάται από τις ιδιότητες των πρώτων υλών. Γενικά, πρέπει να κυμαίνεται σε ποσοστό 45 - 60%, ώστε να μην ευνοείται η επικράτηση αναερόβιων συνθηκών (ανοξία) ή μερικώς αναερόβιων συνθηκών (υποξία). Η διαβροχή και ανάμιξη του σωρού ενδείκνυται για την αποτελεσματικότερη διαχείριση της διαδικασίας. Εντούτοις, ακόμα και υπό άριστες συνθήκες, είναι δυνατόν να δημιουργηθούν αναερόβια μικροπεριβάλλοντα.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3) αναφέρονται οι ιδανικές συνθήκες για την ταχεία αερόβια αποικοδόμηση του οργανικού υλικού κατά την κομποστοποίηση.

Πίνακας 3: Συγκεντρωτικός πίνακας ιδανικών συνθηκών για την κομποστοποίηση.

Παράμετρος	Αποδεκτές τιμές	Ιδανικές τιμές
C/N	20 - 40:1	25 - 35:1
Υγρασία (%)	40 - 65	45 - 60
pH	5.5 - 9.0	5.5 - 8.0
Θερμοκρασία στη θερμοφιλή φάση (°C)	43 - 66	54 - 60
O ₂ (%)	>5	>10

1.4 Πλεονεκτήματα κομποστοποίησης

Η παρασκευή του κόμποστ και η χρήση του στη γεωργία έχει πολλά πλεονεκτήματα. Καταρχήν, με τη φυσική αυτή μέθοδο, αξιοποιείται (μέσω ανακύκλωσης) πολύτιμη οργανική ύλη, με στόχο τη μακροπρόθεσμη αύξηση της γονιμότητας των εδαφών. Με την εφαρμογή του κόμποστ στο έδαφος, επιστρέφουν σε αυτό σημαντικές ποσότητες θρεπτικών συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν σε προηγούμενη γεωργική διαδικασία, έτοιμα προς χρήση σε κάποια άλλη φυτική καλλιέργεια. Το έδαφος εμπλουτίζεται φυσικά, βελτιώνονται οι χημικές του ιδιότητες και επάγεται μια αύξηση της μικροβιακής βιομάζας και ποικιλότητας (Chander *et al.*, 2002). Κατ' επέκταση μειώνεται η χρήση χημικών λιπασμάτων, που έχει ως επακόλουθο την πτώση των τιμών των αγροτικών προϊόντων. Επιπλέον, ανοίγει θέσεις εργασίας σε χώρες με έντονη γεωργική δραστηριότητα, όπως η Ελλάδα.

Το κόμποστ αποτελεί φθινό εδαφοβελτιωτικό με μεγάλη απόδοση, σε αντίθεση με τα βιομηχανικά λιπάσματα, τα οποία εκτός του υψηλού κόστους τους, δεν απορροφώνται πλήρως από το έδαφος στο οποίο εφαρμόζονται και ενέχουν πάντα τον κίνδυνο να καταλήξουν σε υδάτινους αποδέκτες και να προκαλέσουν φαινόμενα ευτροφισμού. Ακόμα, με την κομποστοποίηση καθίστανται χρήσιμα τα γεωργικά υπολείμματα, τα οποία χωρίς επεξεργασία δεν είναι ωφέλιμα για τον άνθρωπο και το περιβάλλον. Συγκεκριμένα, λιγνινοκυτταρινούχα υπολείμματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή εδώδιμων μανιταριών, αφού υποστούν κομποστοποίηση, ώστε να απελευθερωθούν μεγαλύτερες ποσότητες κυτταρίνης και

λιγνίνης. Επιπλέον, καθόλη τη διάρκεια της κομποστοποίησης, με τις συνεχείς μεταβολές της θερμοκρασίας, η οποία στα θερμοφιλά στάδια μπορεί να ξεπεράσει και τους 60°C, επιτυγχάνεται καταστροφή του παθογόνου φορτίου των υπολειμμάτων.

1.5 Ωριμότητα κόμποστ

Για να μπορέσει να εφαρμοστεί με επιτυχία το κόμποστ στο έδαφος ως βελτιωτικός παράγοντας, πρέπει να εξασφαλισθεί ότι το τελικό προϊόν είναι σταθερό, μη τοξικό και δεν περιέχει φυτοπαθογόνους παράγοντες. Ως μέτρο ωριμότητας του σωρού θεωρείται ο ρυθμός αναπνοής των μικροοργανισμών που βρίσκονται στο σωρό. Η μέτρηση της παραγωγής CO₂ και κατανάλωσης O₂ απαιτεί ιδιαίτερους χειρισμούς και πολύ χρόνο. Παρόλα αυτά είναι αξιόπιστος δείκτης σταθερότητας του τελικού προϊόντος. Ένας άλλος δείκτης είναι η οργανική σύσταση του σωρού και συγκεκριμένα τα χουμικά σωματίδια (Haninmen *et al.*, 1995; Saviozzi *et al.*, 1998). Ακόμα, ως δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί ο λόγος C/N, η αλλαγή της θερμοκρασίας, η ηλεκτρική αγωγιμότητα, η ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων, η σύνθεση του μικροβιακού πληθυσμού και η μέτρηση των οργανικών οξέων. Επειδή το κάθε κόμποστ έχει διαφορετικά χαρακτηριστικά, τα οποία εξαρτώνται από την αρχική του σύσταση αλλά και τη μέθοδο κομποστοποίησης, η χρήση πολλών δεικτών αντί ενός είναι προτιμότερη, σε ό,τι αφορά την ωρίμανση του προϊόντος.

Στο ώριμο κόμποστ επικρατούν μεσαίες θερμοκρασίες και δεν παρατηρείται αναθέρμανση. Οι μικροοργανισμοί έχουν αποικοδομήσει τα περισσότερα οργανικά υλικά με αποτέλεσμα να μειώνεται ο μεταβολικός τους ρυθμός. Η αναπνευστική δραστηριότητα, επομένως, αναμένεται να είναι μικρότερη στο τέλος της διαδικασίας σε σχέση με τα υπόλοιπα στάδιά της. Επιπλέον, η συγκέντρωση των αμμωνιακών στο τέλος της διαδικασίας είναι αρκετά μειωμένη σε σχέση με την αρχική, εξαιτίας της αποικοδόμησης των πρωτεϊνών του κόμποστ. Οι οσμές που οφείλονται στις δυσδιάσπαστες ενώσεις των υπολειμμάτων και χαρακτηρίζουν το αρχικό προϊόν πρέπει να απουσιάζουν από το ώριμο κόμποστ. Η φυτοτοξικότητα θα πρέπει να βρίσκεται εντός των επιτρεπτών ορίων, όπως αυτά ορίζονται από τη σχετική νομοθεσία της κάθε χώρας. Ο έλεγχός της γίνεται με βιοδοκιμές (Morel *et al.*, 1985), μέσω ελέγχου της βλαστητικής ικανότητας των σπόρων κάποιου φυτού, όπως για παράδειγμα η τομάτα (*Lycopersicon esculentum*), το κάρδαμο (*Lepidium sativum*) και η κολοκυθιά (*Cucurbita pepo*). Επιπλέον, εκτιμώνται οι φυσικές και χημικές ιδιότητες του κόμποστ. Το τελικό προϊόν πρέπει να είναι πορώδες και τα τεμάχιά του να είναι μικρότερα των 10 ή 20mm, το pH του πρέπει να είναι κοντά στην ουδέτερη ζώνη και η ηλεκτρική αγωγιμότητά του να είναι μικρότερη από 4mS/cm. Ο λόγος C/N, εμπειρικά, πρέπει να είναι μικρότερος του 20. Τέλος, για να θεωρείται το κόμποστ έτοιμο προς χρήση, θα πρέπει να είναι απαλλαγμένο από τις περισσότερες ξένες προσμίξεις όπως πέτρες, γυαλιά κ.ά., ενώ βαρέα μέταλλα και άλλες εν δυνάμει επιβλαβείς ουσίες να είναι κάτω των επιτρεπτών ορίων.

1.6 Συστήματα κομποστοποίησης

Η βασική διάκριση των συστημάτων γίνεται με κριτήριο τη χρήση αντιδραστήρα ή όχι για την προσθήκη του υλικού και επομένως, διακρίνονται στα κλειστά (Reactor or enclosed systems or container κόμπποστίng) και τα ανοιχτά (Open systems) συστήματα. Υπάρχουν, όμως και τα μικτά συστήματα που αποτελούν συνδυασμό των δύο προηγούμενων.

Τα **συστήματα ανοιχτού τύπου**, ανάλογα με το σύστημα αερισμού που χρησιμοποιείται, χωρίζονται σε:

- στατικά συστήματα με δυναμικές συνθήκες αερισμού (aerated static piles)
- αναδευόμενα συστήματα χωρίς δυναμικό αερισμό (windrows)
- μικτά συστήματα

Κομποστοποίηση σε αναδευόμενα συστήματα χωρίς δυναμικό αερισμό (windrows)

Το κόμπποστ τοποθετείται σε σωρούς ή μακριές σειρές, με ύψος δύο έως 5 μέτρα και πλάτος στη βάση 4 έως 8 μέτρα, ανάλογα με το μηχανισμό ανάδευσης. Σε αυτό το σύστημα, ο έλεγχος του αερισμού και της υγρασίας είναι πολύ μικρός και εξαρτάται, σε ό,τι έχει να κάνει με τον αερισμό, από τα αρχικά χαρακτηριστικά των υλικών, τη γεωμετρία του χώρου εναπόθεσής τους, την απόσταση ανάμεσα στους διάφορους σωρούς, ενώ για την υγρασία, από την κατάλληλη προστασία των σωρών από τη βροχή με τοποθέτηση των σωρών κάτω από τέτοιο υλικό που επιτρέπει ταυτόχρονα και τη διαφυγή των υδρατμών. Για τον αερισμό τους εξαρτώνται αποκλειστικά από τυχαίες εσωτερικές ανακατατάξεις μάζας και διάχυσης αερίων. Από αρκετούς, πλέον, δε θεωρείται ως κανονικό σύστημα κομποστοποίησης, αφού σε μεγάλο μέρος του, οι διαδικασίες είναι αναερόβιες.

Κομποστοποίηση σε τάφρους και δεξαμενές, ανοιχτού και κλειστού τύπου

Σε αυτή την τεχνική ο αερισμός είναι τεχνητός, μιας και η φύση της εγκατάστασης δεν επιτρέπει το φυσικό αερισμό του κόμπποστ. Έτσι, ο αέρας θα πρέπει να διοχετεύεται με κάποιο τρόπο στο σωρό. Για το λόγο αυτό τοποθετούνται ειδικοί αναδευτήρες είτε στα πλαϊνά τοιχώματα ή στην οροφή των συστημάτων αυτών, οπότε επιτυγχάνεται αερισμός λόγω της αναμόχλευσης του υλικού. Το κόμπποστ παραμένει για μικρό χρονικό διάστημα στις δεξαμενές και τις τάφρους (6 ως 8 εβδομάδες) και ακολουθεί περαιτέρω επεξεργασία σε εξωτερικές εγκαταστάσεις. Η θερμοκρασία μπορεί να ελέγχεται μέσω του αερισμού, και έτσι να επιτυγχάνονται τα διάφορα στάδια κομποστοποίησης.

Κομποστοποίηση σε βιοαντιδραστήρες

Οι βιοαντιδραστήρες είναι αποκλειστικά κλειστά συστήματα με πολύ καλό τεχνητό αερισμό. Για την επίτευξη ομοιογένειας στο τελικό προϊόν, ο σωρός αναδύεται

ανά τακτά διαστήματα εντός του βιοαντιδραστήρα, ή απομακρύνεται από αυτόν, αναδεύεται εξωτερικά και επανατοποθετείται. Η δράση αναερόβιων μικροοργανισμών, κυρίως μεθανιογόνων βακτηρίων, κατά την κομποστοποίηση στο βιοαντιδραστήρα, μπορεί να προκαλέσει πρόβλημα. Για αυτόν το λόγο, συνήθως, προηγείται μία περίοδος αναερόβιας ζύμωσης του υλικού, πριν την τοποθέτησή του στο βιοαντιδραστήρα.

1.7 Ανάλυση μικροβιακών κοινοτήτων

Στο παρελθόν, η ανάλυση των μικροβιακών πληθυσμών σε δείγματα εδάφους γινόταν με μεθόδους που βασίζονταν στην καλλιέργεια των δειγμάτων (culture-based techniques) σε διάφορα εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα. Ωστόσο, λόγω της εκλεκτικότητας των θρεπτικών μέσων, δεν ήταν τόσο αποτελεσματικές. Στελέχη που δεν ήταν κυρίαρχα στο έδαφος πιθανώς ευνοούνταν και αναπτύσσονταν υπό εργαστηριακές συνθήκες σε σχέση με κυρίαρχα είδη που δεν ευνοούνταν. Πολλά είδη μικροοργανισμών που απαντώνται στο έδαφος, όπως και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις, δεν αναπτύσσονται στο εργαστήριο, όπως συμβαίνει για παράδειγμα με είδη που αποτελούν μέρος μιας πολύπλοκης κοινωνίας, και δεν μπορούν να καλλιεργηθούν (DeLong, 2002). Μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό, μικρότερο του 0.1%, των μικροβιακών πληθυσμών που υπάρχουν στο έδαφος μπορεί να καλλιεργηθεί με τις συνήθεις εργαστηριακές τεχνικές (Amann *et al.*, 1995). Προκειμένου να ξεπεραστεί το εμπόδιο αυτό, νέες τεχνικές (culture independent), όπως η ανάλυση των φωσφολιπιδίων των λιπαρών οξέων (PLFA) και τεχνικές που βασίζονται σε φυσιολογικά χαρακτηριστικά, επινοήθηκαν.

Στις μέρες μας, με την πρόοδο που έχει σημειωθεί είναι δυνατόν να εξαχθούν συμπεράσματα για την παρουσία ή όχι οργανισμών από τους οποίους κανένας δεν καλλιεργήθηκε ή ταυτοποιήθηκε με κάποιον άλλον τρόπο. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένα τεράστιο βήμα για τη σύγχρονη έρευνα στο πεδίο της Μικροβιακής Οικολογίας και με τις τεχνικές που εφαρμόζονται έχουν αποκαλυφθεί πολλά χαρακτηριστικά γνωρίσματα της δομής και των αλληλεπιδράσεων των μικροβιακών πληθυσμών. Οι μοριακές τεχνικές ανάλυσης των μικροβιακών κοινοτήτων έχουν συνεισφέρει στην κατανόηση της ποικιλότητάς τους και προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα, επειδή επιτρέπουν τη μελέτη ειδών που δεν μπορούν να καλλιεργηθούν, είναι ταχύτερες, πιο ευαίσθητες και ακριβείς στην ταυτοποίηση, και έχουν μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα. Είναι γενικώς αποδεκτό ότι η ταυτοποίηση και ταξινόμηση των μικροοργανισμών πρέπει να προκύπτει από φυλογενετικές αναλύσεις που βασίζονται στην αλληλουχία του rDNA (Pace *et al.*, 1986).

Οι μοριακές τεχνικές που βασίζονται στο DNA είναι αναγκαίες για την ανάλυση των μικροβιακών κοινοτήτων του κόμποστ, επειδή εκτός των άλλων δίνουν στοιχεία για τη διαδοχή και την δραστηριότητα των μικροοργανισμών κατά την πορεία της κομποστοποίησης. Ειδικότερα, αυτές βασίζονται στη μικρή υπομονάδα του rRNA γονιδίου. Τα γονίδια που ελέγχουν τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του rRNA

μεταλλάσσονται αργά δια μέσου των εκατομμυρίων ετών της εξελικτικής πορείας και έτσι, το rRNA λειτουργεί ως δείκτης της συγγένειας των οργανισμών. Είναι εξαιρετικά μόρια για την εξακρίβωση της ταυτότητας ενός στελέχους αλλά και για να γίνουν συγκρίσεις στις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ διαφορετικών στελεχών, καθώς έχουν σταθερή λειτουργικότητα, είναι οικουμενικώς καταναμημένα και έχουν μετρίως διατηρημένη αλληλουχία σε ένα ευρύ φάσμα φυλογενετικών αποστάσεων.

Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς η μικρή υπομονάδα αποτελείται από ένα μόριο rRNA με συντελεστή καθίζησης 16S, ενώ στους ευκαρυωτικούς από ένα μόριο rRNA με συντελεστή καθίζησης 18S. Ως εκ τούτου, για τη μελέτη της ποικιλότητας και την ταυτοποίηση προκαρυωτικών οργανισμών μελετάμε τις αλληλουχίες των γονιδίων που κωδικοποιούν για το 16S rRNA, ενώ στους ευκαρυωτικούς τις αλληλουχίες των γονιδίων που κωδικοποιούν για το 18S rRNA και κυρίως τις ITS (Internal transcribed spacer regions) μεταξύ της μικρής και μεγάλης υπομονάδας του ριβοσώματος, οι οποίες μεταβάλλονται με υψηλή συχνότητα, ακόμα και σε στενά συγγενικά είδη. Οι διαφορές στην αλληλουχία που κωδικοποιεί το rRNA αντανακλούν φυλογενετικές διαφορές.

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας ενός στελέχους σε αμιγή καλλιέργεια γίνεται με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Η ίδια τεχνική, όμως, χρησιμοποιείται και για τη μοριακή ανίχνευση μικροοργανισμών σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα, όπως το κόμπροστ και τη φυλογενετική ανάλυση ενός φυσικού, ετερογενούς πληθυσμού. Η διαδικασία περιλαμβάνει λύση των κυττάρων του φυσικού δείγματος ή της αμιγούς καλλιέργειας. Τα γονίδια αυτά απομονώνονται, αναλύονται ως προς την αλληλουχία τους και σχηματίζεται ένα φυλογενετικό δένδρο, το οποίο αποκαλύπτει τα διάφορα ριβοσωματικά RNA που υπάρχουν στον πληθυσμό και, βάσει αυτού, εξάγονται συμπεράσματα για την παρουσία ή όχι μικροοργανισμών από τους οποίους κανένας δεν καλλιεργήθηκε ή ταυτοποιήθηκε με καμία από τις κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές. Κατά την εκχύλιση το γενετικό υλικό καθαρίζεται για την απομάκρυνση πρωτεϊνών, χουμικών οξέων και άλλων ενώσεων, που πιθανώς επηρεάζουν την ανάλυση του DNA, καθώς εκχυλίζονται μαζί με αυτό. Στη συνέχεια, κατασκευάζονται βιβλιοθήκες κλώνων και οι αλληλουχίες των γονιδίων που απομονώνονται αναλύονται με τη βοήθεια αλγορίθμων ανάλυσης αλληλουχιών, όπως ο BLAST του NCBI και συγκρίνονται με τις ήδη υπάρχουσες σε γενετικές βάσεις δεδομένων, όπως το RDP (Ribosomal Database Project) και κατασκευάζονται φυλογενετικά δένδρα που απεικονίζουν τις εξελικτικές σχέσεις των διαφορετικών ειδών. Οι βιβλιοθήκες με κλώνους του 16S rRNA γονιδίου, είναι χρήσιμο εργαλείο για την ποιοτική ανάλυση της μικροβιακής ποικιλότητας και για την ανάλυση των φυλογενετικών σχέσεων μικροοργανισμών από διαφορετικά περιβάλλοντα (Guo *et al.*, 2007).

Εντούτοις, ο συνδυασμός και των δύο μεθόδων ανάλυσης των μικροβιακών κοινοτήτων, δηλαδή των μοριακών τεχνικών και αυτών που βασίζονται στην καλλιέργεια των δειγμάτων - culture independent και culture based - είναι προτιμότερος. Η μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας που βασίζεται μόνο σε τεχνικές

καλλιέργειας, αποτυγχάνει να ανιχνεύσει και να ταυτοποιήσει πλήρως όλη τη μικροχλωρίδα και αυτό έχει αποδειχτεί και σε μελέτες σε δείγματα κόμπους (Palmisano *et al.*, 1993). Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την ανάλυση της rDNA ακολουθίας δείγματος βακτηρίων που έχει καλλιεργηθεί και των κλωνοποιημένων ακολουθιών δείγματος DNA που έχει απομονωθεί από δείγμα κόμπους δείχνουν ότι δεν υπάρχουν επικαλύψεις μεταξύ τους (Dees & Ghiorse, 2001, Schloss *et al.*, 2002).

1.7.1 Μέθοδοι που έχουν εφαρμοστεί σε πειράματα κομποστοποίησης για τη μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας

Η ανάλυση των μικροβιακών πληθυσμών κατά τη διαδικασία της κομποστοποίησης την τελευταία δεκαετία έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών, με στόχο την ποσοτική και ποιοτική ανάλυσή τους. Η δομή της μικροβιακής κοινότητας στις υπάρχουσες μελέτες βασίζεται τόσο σε μεθόδους καλλιέργειας (culture-based), όσο και σε άλλες, όπως η λιπιδική ανάλυση (PLFA), αλλά και όσες βασίζονται στην τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, DGGE ανάλυση, πολυμορφισμός SSCP, quantitative PCR και μικροσυστοιχίες DNA, αν και δεν καταλήγουν όλες στον ακριβή προσδιορισμό σε επίπεδο γένους και είδους. Ενδεικτικά αναφέρονται ορισμένες από αυτές, καθώς και αποτελέσματα ερευνητικών εργασιών σε κόμπους από διάφορα υποστρώματα. Παρακάτω, αναφέρονται ορισμένες από τις μεθόδους που έχουν εφαρμοστεί για τη μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας σε πειράματα κομποστοποίησης.

1.7.1.1 Βιοχημικές μέθοδοι

Επιλεκτική ανάπτυξη σε θρεπτικά υποστρώματα (Plate counts)

Καλλιέργεια δείγματος σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα και μέτρηση ζωντανών κυττάρων. Η μέθοδος είναι γρήγορη και όχι ακριβή, όμως έχει πολλά μειονεκτήματα. Σε δείγμα από κόμπους που περιείχε πριονίδι, ροκανίδια, φύλλα και γρασίδι, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων και εναιώρημα επιστρώθηκε σε τρυβλία με εκλεκτικό θρεπτικό υλικό με σκοπό την ταυτοποίηση των μυκήτων που υπήρχαν στο κόμπους. Τα είδη που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν ήταν: *Aspergillus nidulans*, *A. terreus*, *Clostridium* sp. και *Trichoderma* sp. (Ashraf *et al.*, 2007).

Πρότυπο λιπαρών οξέων (Fatty acid methyl ester analysis, FAME - Phospholipid fatty acid analysis, PLFA)

Τα λιπαρά οξέα αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό ποσοστό της βιομάζας των κυττάρων και το πρότυπό τους χαρακτηρίζει μια ταξινομική ομάδα. Είναι μια ποιοτική μέθοδος, καθώς, οι αλλαγές στον τύπο των λιπαρών οξέων σηματοδοτούν μεταβολές στις ομάδες των μικροοργανισμών που συγκροτούν τη μικροβιακή κοινότητα,

επιτρέπει, όμως και την εκτίμηση της συνολικής βιομάζας, μετρώντας το συνολικό PLFA (Klamer & Baath, 1998). Στους μύκητες, για παράδειγμα, υπάρχει το λινολεϊκό και ολεϊκό οξύ: το λινολεϊκό έχει αυξημένη συγκέντρωση στους Ασκομύκητες και Βασιδιομύκητες, ενώ το ολεϊκό στους Ζυγομύκητες (Harwood and Russel 1984, Klamer & Baath, 2004).

Προφίλ κινόνης (quinone profile)

Οι κινόνες είναι μεταφορείς των ηλεκτρονίων της αναπνευστικής αλυσίδας. Ο κυρίαρχος τύπος κινόνης σε μια ομάδα μικροοργανισμών είναι διαφορετικός από αυτόν σε μια άλλη. Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση του μοριακού τύπου κινόνης και την εκτίμηση της συνολικής βιομάζας στο δείγμα, μετρώντας τη συνολική κινόνη, και την ποικιλότητα της μικροβιακής κοινότητας (Yu *et al.*, 2007).

Εκτίμηση του αριθμού κυττάρων μπορεί να γίνει επίσης, με χρώση των βακτηρίων με χρωστικές που βάφουν το νουκλεϊκό οξύ, όπως DAPI, acridine orange, παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο φθορισμού και καταμέτρησή τους (Narihito *et al.*, 2003).

1.7.1.2 Μοριακές μέθοδοι

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Η τεχνική της PCR (Mullis *et al.*, 1987, Mullis & Faloona, 1987) είναι η πλέον εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδος ενίσχυσης ακολουθιών DNA και RNA *in vitro* και *in situ*. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται σε ορισμένα χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA: το εκμαγείο του DNA αποδιατάσσεται στους 94°C σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες. Δύο ειδικές αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων, οι εκκινητές (primers), καθορίζουν τα σημεία έναρξης της αντιγραφής, καθώς υβριδοποιούνται σε συγκεκριμένες θέσεις πάνω στην κάθε αλυσίδα του εκμαγείου, λειτουργώντας σαν εναρκτήρια τμήματα για τη σύνθεση του DNA, η οποία ξεκινά με την προσθήκη δεοξυνουκλεοτιδίων και μιας DNA πολυμεράσης, η οποία είναι ανθεκτική στις υψηλές θερμοκρασίες (Taq polymerase). Η πολυμεράση αυτή έχει απομονωθεί από το θερμοανθεκτικό βακτήριο *Thermus aquaticus*, και έχει άριστη θερμοκρασία δράσης στους 72°C, δραστηριότητα που παραμένει σε υψηλά επίπεδα μετά από επανειλημμένη αύξηση της θερμοκρασίας στους 94°C. Η πολυμεράση επιμηκύνει τα εναρκτήρια τμήματα σε θερμοκρασία μέχρι 72°C και όλο το μείγμα θερμαίνεται στους 94°C, ώστε να αποδιαταχθούν τα δίκλωνα τμήματα που συντέθηκαν. Οι κύκλοι σύνθεσης και αποδιάταξης επαναλαμβάνονται, εφόσον υπάρχει περίσσεια ολιγονουκλεοτιδίων, και συσσωρεύονται τα προϊόντα της αντίδρασης. Σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται ο αριθμός των αντιγράφων της αλληλουχίας - στόχου και έτσι με τους επαναλαμβανόμενους κύκλους, η αλληλουχία – στόχος πολλαπλασιάζεται εκθετικά. Η εξειδίκευση της μεθόδου εξαρτάται από τη θερμοκρασία υβριδισμού και την εξειδίκευση των θέσεων υβριδισμού των εκκινητών στο εκμαγείο του DNA.

Δείγμα από κόμποστ που περιείχε ροκανίδια και σκυλοτροφή αναλύθηκε για τη μελέτη της ποικιλότητας των βακτηρίων. Το 16S rRNA γονίδιο ενισχύθηκε με PCR και καθολικούς εκκινητές. Από την ανάλυση των κλώνων βρέθηκαν τα εξής είδη: *Cerasibacillus* spp., *Gracilibacillus* spp., *Bacillus* spp., *Bacillus thermocloacae*, είδη των οικογενειών *Paenibacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Nocardioseae*, *Flavobacteriaceae* και άγνωστα είδη της οικογένειας *Bacillaceae* (Nagao *et al.*, 2008).

Δείγματα από τρία διαφορετικά κόμποστ αστικών, πράσινων και βιομηχανικών αποβλήτων αναλύθηκαν για την ταυτοποίηση των μυκήτων σε επίπεδο είδους, τη μελέτη της διαδοχής των ειδών και της σύνθεσης της μικροβιακής κοινότητας. Με PCR ενισχύθηκε η ITS περιοχή του rDNA και από τον προσδιορισμό των αλληλουχιών των προϊόντων της PCR προέκυψαν τα εξής είδη: *Candida rugosa*, *Candida pararugosa*, *Issatchenkia orientalis*, *Pichia fermentans*, *Candida inconspicua*, *Candida ethanolica*, *Pichia manshurica*, *Pichia fermentans*, *Pichia membranifaciensis*, *Geotrichum candidum* (Hultman *et al.*, 2009).

Μικροσυστοιχίες DNA (DNA microarrays)

Οι μικροσυστοιχίες χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και αναγνώριση των ειδών ή για να εκτιμηθεί η μικροβιακή ποικιλότητα. Κάθε συστοιχία περιέχει χιλιάδες αλληλουχίες DNA, που αναλόγως με τον τύπο, μπορεί να είναι είτε ένα ειδικό γονίδιο στόχος (π.χ. *nifH*, λειτουργικές συστοιχίες, FGAs – Functional Gene Arrays) είτε γονιδιωματικό DNA από περιβαλλοντικό δείγμα ή καθαρή καλλιέργεια (συστοιχίες ανάλυσης γονιδιωμάτων μικροβιακών κοινοτήτων, CGAs – Community Genome Arrays) είτε γονίδια rRNA (φυλογενετικές συστοιχίες, PGAs – Phylogenetic Arrays). Οι λειτουργικές συστοιχίες περιέχουν ιχνηλάτες για γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα και βοηθούν στην ποσοτικοποίηση της λειτουργίας μέσω ανίχνευσης του mRNA (Hultman *et al.*, 2009).

PCR-DGGE (Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση με πήκτωμα διαβάθμισης - Denaturing gradient gel electrophoresis) ανάλυση ή TGGE (thermal-GGE)

Τμήματα DNA που έχουν ίδιο μήκος αλλά διαφορετική αλληλουχία αναλύονται μέσω ηλεκτροφόρησης. Ο διαχωρισμός τους βασίζεται στο ότι κάθε κομμάτι έχει διαφορετικό σημείο αποδιάταξης που εμφανίζεται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με κλινές αυξανόμενης συγκέντρωσης αποδιατακτικού παράγοντα (π.χ. ουρία, φορμαμίδιο) (Muyzer, 1999). Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό της ποικιλομορφίας, αλλά και της αφθονίας των μικροοργανισμών.

Στελέχη βακτηρίων που ανήκουν στο Φύλο *Bacteroidetes*, που περιλαμβάνει ποικιλία ειδών που αποικοδομούν μακρομόρια, όπως πρωτεΐνες, άμυλο, κυτταρίνη και χιτίνη, απομονώθηκαν με τη μέθοδο αυτή από κόμποστ που αποτελούσαν από κοπριά βοοειδών και πριονίδι. Επίσης, απομονώθηκε ένα στέλεχος *Rhizobium* sp. (*α-Proteobacteria*), ένα στέλεχος που ανήκει στα *Actinobacteria* και ένα στέλεχος που ανήκει στα *Fibrobacteres* (Green *et al.*, 2004).

Μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας κατά τη συγκομποστοποίηση υγρών αποβλήτων ελαιουργείας και κοπριάς με τη χρήση της RT-PCR για την ενίσχυση του 16S rDNA και ανάλυση των προϊόντων με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα διαβάθμισης (DGGE) είχε τα εξής αποτελέσματα: στο αρχικό στάδιο της διαδικασίας βακτήρια του φύλου *Proteobacteria* ήταν κυρίαρχα, αλλά βρέθηκαν και αλληλουχίες βακτηρίων που ανήκαν στα φύλα *Actinobacteria*, *Firmicutes* και *Acidobacteria*. Στην πορεία της διαδικασίας μειώθηκαν τα *Betaproteobacteria*, ενώ οι υπόλοιπες αλληλουχίες που ανιχνεύτηκαν ταξινομήθηκαν στην κλάση *Gammaproteobacteria*, στην κλάση *Alphaproteobacteria* και στα φύλα *Actinobacteria*, *Firmicutes* και *Bacteroidetes* (Vivas *et al.*, 2009).

Δείγματα κόμποστ αναλύθηκαν για τη μελέτη των πληθυσμών βακτηρίων. Με PCR ενισχύθηκε η V3 περιοχή του 16S rRNA γονιδίου και τα προϊόντα PCR διαχωρίστηκαν με DGGE. Τα επικρατέστερα είδη που προσδιορίστηκαν, ανήκαν στην τάξη *Bacillales*, που γενικότερα αφθονούν στο κόμποστ, σε αντίθεση με είδη της τάξης *Lactobacillales*, που σε ελάχιστες αναφορές βρέθηκαν να είναι κυρίαρχα και η αφθονία τους εξαρτάται από τον τύπο του διογκωτικού παράγοντα που χρησιμοποιείται ως συστατικό στο κόμποστ, επειδή αυτός επηρεάζει τη συγκέντρωση οξυγόνου και τη διατήρηση της θερμότητας στον αντιδραστήρα. Βρέθηκαν τα εξής είδη: *Cerasibacillus* spp., *Gracilibacillus* spp., *Bacillus* sp., *Bacillus fortis*, *Bacillus thermocloacae* και συγγενικά είδη, *Thermobifida fusca*, *Staphylococcus lentus*, *Oceanobacillus* sp., *Virgibacillus* spp., *Atopostipes suicloacalis*, *Atopococcus tabaci* και άγνωστα είδη της οικογένειας *Paenibacillaceae*, *Bacillaceae* και *Sphingobacteriaceae* (Watanabe *et al.*, 2010).

Ανάλυση διαγονιδιακής ριβοσωμικής περιοχής (Ribosomal intergenic spacer analysis, RISA και Automated ribosomal intergenic spacer analysis, ARISA)

Η διαγονιδιακή περιοχή (Intergenic spacer - IGS) μεταξύ των 16S και 23S rDNA πολλαπλασιάζεται με PCR, τα προϊόντα αποδιατάσσονται και διαχωρίζονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Στη RISA, η αλληλουχία πολυμορφισμού εντοπίζεται χρησιμοποιώντας χρώση αργύρου, ενώ στην ARISA ο εκκινητής φέρει φθορίζουσα σήμανση και εντοπίζεται αυτόματα. Η ARISA για την ανάλυση μυκήτων (F-ARISA) βασίζεται στη χρήση εκκινητών που στοχεύουν στον πολυμορφισμό της ITS περιοχής του 18S rRNA γονιδίου (Ranjard *et al.*, 2001). Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε δείγμα κόμποστ από ροκανίδια και σκυλοτροφή. Τα πιο κοινά γένη που προσδιορίστηκαν, ήταν τα εξής: *Pichia*, *Geotrichum*, *Backusella* και *Amylomyces* ή *Rhizopus*. Έδειξαν επίσης ότι η δομή της μικροβιακής κοινότητας τις πρώτες 48 ώρες ήταν διαφορετική σε σχέση με το διάστημα 60-96 ώρες. Επιπλέον, εφαρμόστηκε η τεχνική της PCR και RFLP ανάλυσης για το 18S rRNA γονίδιο και βρέθηκαν αλληλουχίες που παρουσίαζαν ομοιότητα μεγαλύτερη από 99% με τα εξής γένη: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida*, *Galactomyces*, *Williopsis hamigera*, *Neurospora*, *Mucor* και *Backusella* (Hansgate *et al.*, 2005).

PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

Αποτελεί μια μέθοδο γενετικής αποτύπωσης των διαφορετικών μικροβιακών κοινοτήτων που υπάρχουν σε ένα δείγμα. Το δείγμα ενισχύεται μέσω PCR με φθορίζοντες εκκινητές και προϊόντα υπόκεινται σε πέψη με επιλεγμένες περιοριστικές ενδονουκλεάσες και έτσι παράγονται τμήματα DNA διαφορετικών μεγεθών τα οποία ανιχνεύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ή μη-αποδιατακτικής πολυακρυλαμίδης. Η χρήση του φθορίζοντος εκκινητή περιορίζει την ανάλυση μόνο στα θραύσματα που φέρουν τον εκκινητή στο τελικό άκρο τους μετά την πέψη. Ανάλυση κόμποστ με χρήση PCR RFLPs έδειξε ότι βρέθηκαν αλληλουχίες ταξινομικών μονάδων (taxa) που δεν παρουσίαζαν συγγένεια με ήδη γνωστά είδη, γεγονός που υποδεικνύει ότι η πλειονότητα των ειδών βακτηρίων που σχετίζονται με το κόμποστ δεν έχει πλήρως μελετηθεί και ταυτοποιηθεί (Guo, 2007).

Επιλέγοντας την κατάλληλη μέθοδο, από το πλήθος των μεθόδων που έχουν εφαρμοστεί σε δείγματα κόμποστ, και με σωστό σχεδιασμό της πειραματικής διαδικασίας, είναι δυνατή η ανάλυση των μικροοργανισμών και άρα, η ταυτοποίηση των μικροβιακών κοινοτήτων που σχετίζονται με την ωριμότητά του, με στόχο τη μελέτη της σύστασης των μικροβιακών πληθυσμών στο ώριμο κόμποστ, αλλά και με την προοπτική της απομόνωσης μικροοργανισμών που θα καταστέλουν τις ασθένειες των φυτών ή βακτηρίων που θα προωθούν την ανάπτυξή τους. Επίσης, επιβεβαιώνει την απομάκρυνση των παθογόνων κατά την πορεία της κομποστοποίησης (Boehm *et al.*, 1993). Επιπλέον, είναι δυνατή η εκτίμηση των χαρακτηριστικών μικροοργανισμών και της διαδοχής που παρουσιάζουν κατά την πορεία της κομποστοποίησης. Η διαδοχή των μικροοργανισμών ενδεχομένως να παρουσιάζει διαφορές υπό διαφορετικές συνθήκες κομποστοποίησης. Η διαδικασία, όμως, χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένες συνθήκες, όπως η αύξηση της θερμοκρασίας, η παραγωγή χουμικών ενώσεων, ο σχηματισμός σταθερού υποστρώματος, οι οποίες επιτρέπουν την ανάπτυξη συγκεκριμένων ομάδων και ειδών μικροοργανισμών, που γενικά απαντώνται κατά την πορεία της κομποστοποίησης (Ishii *et al.*, 2000).

1.8 Τα Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείων

Στη βιομηχανία επεξεργασίας του ελαιόκαρπου το κύριο προϊόν είναι το ελαιόλαδο. Τα υγρά παραπροϊόντα αποτελούν προϊόντα χωρίς εμπορική αξία, αλλά πλούσια σε πολύτιμα συστατικά όπως σάκχαρα, πρωτεΐνες, υπολείμματα λαδιού, φαινολικές ουσίες, χρωστικές και χλωροφύλλες. Τα Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείων (ΥΑΕ) αποτελούσαν και αποτελούν πάντα ένα από τα μεγαλύτερα οικολογικά προβλήματα στην Ελλάδα, με μεγαλύτερες ποσότητες να παράγονται από τα ελαιουργεία της Πελοποννήσου και της Κρήτης. Στη διεθνή βιβλιογραφία τα ΥΑΕ αναφέρονται ως *olive mill waste-water* (OMW), *olive press waste-water*, *olive vegetation water*, *olive vegetable water* (OVW) (Fiestas & Borjia 1992). Η εξαιρετικά υψηλή τοξικότητά τους, σε συνδυασμό με το επίσης υψηλό ρυπαντικό φορτίο που περιέχουν, τα καθιστούν πολύ επικίνδυνα για το περιβάλλον και όταν καταλήγουν

στους αποδέκτες προκαλούν διαταραχές όπως, φυτοτοξικότητα, μεταβολή του χρώματος των υδάτων, τοξική μόλυνση του υδροφόρου ορίζοντα και καταστροφή της υδρόβιας ζωής, εξαιρετικά δυσάρεστες οσμές κ.ά. Παράγονται κυρίως από φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία τριών φάσεων και αποτελούν το υγρό κλάσμα του χυμού του ελαιοκάρπου, μαζί με το νερό που χρησιμοποιείται στην έκπλυση του καρπού, στη μάλαξη και στη φυγοκέντρωση του τόσο στον οριζόντιο φυγοκεντρικό διαχωριστήρα όσο και στον ελαιοδιαχωριστήρα, από τον οποίον παραλαμβάνεται το ελαιόλαδο. Αντιθέτως, τα ελαιοτριβεία δύο φάσεων παράγουν πολύ μικρή ποσότητα υγρών αποβλήτων, καθώς το κύριο υποπροϊόν της διαδικασίας είναι ημι-στερεό.

Οι παραδοσιακές μέθοδοι επεξεργασίας του ελαιολάδου εκτιμάται ότι παράγουν 400-600 λίτρα λύματα ανά τόνο επεξεργασμένων ελιών. Τα επίπεδα των λυμάτων είναι ακόμα υψηλότερα όταν προέρχονται από ελαιοτριβείο που ακολουθεί τη διαδικασία των τριών φάσεων. Από την άλλη πλευρά, στα ελαιοτριβεία των δύο φάσεων παράγονται ελάχιστα ΥΑΕ, όμως το ημιστερεό υποπροϊόν έχει υψηλή περιεκτικότητα σε υγρά, με αποτέλεσμα να έχει και υψηλό κόστος επεξεργασίας. Συνολικά, σε ευρωπαϊκό επίπεδο, εκτιμάται ότι παράγονται 4.6 εκατομμύρια τόνοι ΥΑΕ το χρόνο, εκ των οποίων το 80-83% είναι νερό. Το οργανικό φορτίο αποτελεί το 15-18%, ενώ τα ανόργανα στοιχεία αποτελούν το 2%. Τα ποσοστά αυτά διαφοροποιούνται ανάλογα με το κλίμα, τις μεθόδους συγκομιδής, τις διαδικασίες εξαγωγής ελαιόλαδου κ.ά.

Τα ΥΑΕ έχουν σκούρο κιτρινοπράσινο προς καφέ-μαύρο χρώμα, με χαρακτηριστική έντονη οσμή, η οποία οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση πτητικών οξέων. Είναι όξινα, θολά, με υψηλή επιφανειακή τάση και πλούσια σε οργανικό και ανόργανο υλικό (Μπαλατσούρας, 1997). Ο όγκος και η ποιότητά τους εξαρτάται από την ποικιλία του ελαιοκάρπου, το βαθμό ωριμότητάς του και το χρόνο αποθήκευσής του πριν την λιοτρίβηση. Εξαρτάται επίσης, από τη μέθοδο παραλαβής του ελαιολάδου και την ποσότητα νερού που χρησιμοποιείται κατά τις διάφορες φάσεις της διαδικασίας. Ενδεικτικά, από 100kg ελαιοκάρπου παράγονται περίπου, 20kg ελαιόλαδο, 4kg ελαιόφυλλα, 40kg ελαιοπυρήνα και περίπου 100kg υγρών αποβλήτων (Κουτσαυτάκης & άλ. 1999).

Τα οξέα, οι ανόργανες και οργανικές ουσίες που υπάρχουν στα ΥΑΕ επηρεάζουν αρνητικά την ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων των εδαφών, που είναι η ικανότητα του εδάφους να ανταλλάσσει κατιόντα και χρησιμοποιείται ως μέσο μέτρησης της γονιμότητας του εδάφους. Όμως, στα ΥΕΑ εντοπίζονται πολλά ιχνοστοιχεία τα οποία μπορούν να δράσουν θετικά για τον εμπλουτισμό του εδάφους. Οι οργανικές ουσίες που περιέχονται σε αυτά χωρίζονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: α) τις άμεσα διασπούμενες, που είναι συνήθως απλές σε δομή και σε αυτές περιλαμβάνονται απλά σάκχαρα, αμινοξέα και άλλα, β) τα βιοαποδομήσιμα πολυμερή, ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους, οι οποίες όμως μπορούν να αποικοδομηθούν από πληθώρα μικροοργανισμών και τέτοιες είναι οι πρωτεΐνες και οι ημικυτταρίνες και, γ) δύσκολα βιοδιασπώμενα πολυμερή όπως λιπαρά και κυρίως φαινολικές ενώσεις (Οιχαλιώτης & Ζερβάκης, 1999).

Τα ΥΕΑ έχουν πολύ υψηλό ρυπαντικό οργανικό φορτίο το οποίο για να αποδομηθεί χρειάζεται μεγάλες ποσότητες οξυγόνου. Ενδεικτικά οι Tamburino *et al.*, (1999) αναφέρουν ότι η ρυπογόνος δύναμη των ΥΕΑ που παράγονται ετησίως στην Ιταλία εκτιμώνται σε 200.000 τόνους/χρόνο, εκφρασμένη σε χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD), (2.000.000 τόνους/χρόνο με $100\text{kg}/\text{m}^3$ COD), αντιστοιχεί σε ρυπογόνο δύναμη βοθρολυμάτων που παράγονται επί τρεις μήνες από έναν αστικό πληθυσμό 20.000.000 ανθρώπων (με παραγωγή $40\text{kg COD}/\text{yr}/\text{άνθρωπο}$).

Οι κύριες περιβαλλοντικές επιπτώσεις των ΥΕΑ είναι: α) η μείωση του αερισμού του εδάφους, αφού οι λιπαρές ουσίες που περιέχουν φράζουν τους εδαφικούς πόρους, δημιουργώντας αναερόβιες συνθήκες β) ο περιορισμός της φωτοσύνθεσης στους υδάτινους αποδέκτες και η αισθητική υποβάθμιση, εξαιτίας του σκούρου χρώματος και των πολλών αιωρούμενων σωματιδίων, γ) η πρόκληση φαινομένων ευτροφισμού λόγω δέσμευσης του οξυγόνου από τη χημική αλλά και βιολογική οξείδωση των ΥΕΑ και, δ) η πρόκληση φυτοτοξικότητας με αποτέλεσμα την καταστροφή πολλών φυτικών οργανισμών, εξαιτίας των φαινολικών ενώσεων, των πτητικών οργανικών οξέων και των πολυαλκοολών που περιέχουν.

Η ρύπανση από τα ΥΑΕ αποτελεί μείζων πρόβλημα. Τα τελευταία σαράντα χρόνια έχει απασχολήσει πλήθος ερευνητών, σε Πανεπιστήμια και Ερευνητικά Κέντρα των σημαντικότερων ελαιοπαραγωγικών χωρών της Μεσογείου, στη κατεύθυνση εξεύρεσης βιώσιμων μεθόδων διαχείρισής τους. Η εναπόθεση των ΥΕΑ στο έδαφος είναι μια οικονομική λύση διαχείρισης του τεράστιου όγκου τους, ιδιαίτερα στις Μεσογειακές χώρες, και ανάκτησης των ιχνοστοιχείων και οργανικών ενώσεών τους (Saviozzi, 1991), όμως υπάρχει περίπτωση να προκαλέσει ρύπανση του εδάφους εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης οργανικών οξέων και φαινολών. Τα κυριότερα μειονεκτήματα της μεθόδου διάθεσης των ΥΑΕ στο έδαφος σχετίζονται: με τις υψηλές βροχοπτώσεις σε πολλές ελαιοπαραγωγικές περιοχές την ίδια περίοδο που παράγονται τα ΥΑΕ, της επακόλουθης δημιουργίας ανεπιθύμητων συνθηκών αναεροβίωσης στους εδαφικούς αποδέκτες, στην ύπαρξη, σε πολλές περιπτώσεις, αγρών με υπέδαφος αποτελούμενο από ασβεστολιθικά πετρώματα, διαπερατό σε ρυπαντικά συστατικά, που μπορεί να οδηγηθούν στους υδροφόρους ορίζοντες, και τέλος στην εκτεταμένη ημιορεινή μορφολογία του εδάφους στις κύριες ελαιοπαραγωγικές ζώνες πράγμα που επιδεινώνει την δυνατότητα μεταφοράς των ΥΑΕ στους τελικούς αποδέκτες (Ehalotis *et al.*, 2003). Επιπλέον, προκαλούν φυτοτοξικότητα (Paredes *et al.*, 2000), ενώ παρεμποδίζουν την αύξηση πολλών εδαφογενών ειδών βακτηρίων και μυκήτων, όπως *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Chaetomium*, *Geotrichum*, *Rhizopus*, *Rhizoctonia* (Saiz-Jimenez & Gomez-Alacorn, 1986). Ωστόσο, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον οι έρευνες για την επίδραση των ΥΑΕ στην επισχετικότητα του εδάφους (soil suppressiveness) έναντι εδαφογενών φυτοπαθογόνων. Τα ΥΑΕ εμφάνισαν παρεμποδιστική δράση στην ανάπτυξη φυτοπαθογόνων μυκήτων του γένους *Phytophthora* και *Fusarium*, *in vitro* και σε πειράματα με φυτά (Argeiti *et al.*, 2000).

Οι πρακτικές για τη μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων των ΥΑΕ αφορούν στη μείωση του οργανικού τους φορτίου και στη μείωση της συνολικής μάζας

τους. Στην Ελλάδα έχει καταβληθεί μεγάλη προσπάθεια από επιστημονικής και τεχνολογικής πλευράς για την εύρεση οικολογικών, περιβαλλοντικά φιλικών τρόπων για την επίλυση του προβλήματος, ιδιαίτερα στην Κρήτη. Οι τεχνολογίες που έχουν αναπτυχθεί μπορούν να διαχωριστούν σε φυσικο-χημικές (εξάτμιση, υδρόλυση, οξείδωση), σε μεθόδους βιολογικής επεξεργασίας (αερόβιες και αναερόβιες), αλλά και σε πιο σύγχρονες, που βασίζονται στο φιλτράρισμα των ΥΑΕ με ειδικό φίλτρο καθαρισμού για την απομάκρυνση των τοξικών φαινολών και την επεξεργασία τους με σκοπό τη μετατροπή τους σε ένα βιολογικά καθαρό προϊόν, υψηλής αξίας, με παράλληλη εκμετάλλευση των αντιοξειδωτικών τους ουσιών. Ενδεικτικά, αναφέρονται ορισμένες μέθοδοι, όπως η επεξεργασία που βασίζεται στο φαινόμενο της αντίστροφης ώσμωσης και στη χρήση ειδικών μεμβρανών για την αποτοξικοποίηση, απόσπηση και μείωση του ρυπαντικού φορτίου τους, η χρήση βασιδιομυκήτων λευκής σήψης, όπως είδη του γένους *Pleurotus*, για τον αποχρωματισμό των ΥΑΕ, τη μείωση της φυτοτοξικής τους δράσης, με ταυτόχρονη παραγωγή βιομάζας ή εδώδιμων μανιταριών (Zervakis *et al.*, 1996), η αναερόβια ζύμωση για την παραγωγή βιοαερίου κ.ά (Μπαλατσούρας, 1997), η αερόβια επεξεργασία για την παραγωγή υγρού βιολιπάσματος (Balis *et al.*, 1996, Chatzipavlidis *et al.*, 1996).

Στον Πίνακα 4 αναφέρονται τα κύρια φυσικο-χημικά χαρακτηριστικά των ΥΑΕ.

Πίνακας 4: Κύρια φυσικο-χημικά χαρακτηριστικά των ΥΑΕ, ανάλογα με τον τρόπο παραγωγής (Προσαρμογή από Aktas *et al.*, 2001, Azbar *et al.*, 2004, και Niaounakis & Halvadakis, 2006).

Παράμετρος	Πιεστήρια (παραδοσιακή μέθοδος)	Φυγόκεντρηση τριών φάσεων
pH	4.2 - 7.0	4.7 - 5.3
Ολικά στερεά (TS), g/L	28 - 126	14 - 45
Πολυφαινόλες (g/L)	6.2	2.7
Έλαια (g/L)	2.26	5.78
COD (g/L)	6.4 - 162	25 - 78
BOD (g/L)	1.5 - 100	13 - 44
Ολικός Φώσφορος (g P/L)	1.1	0.16
K (g/L)	17100	9800
Na (g/L)	400	160
Ca (g/L)	2240	1350
Mg (g/L)	2720	1650
Ολικό άζωτο (g/L)	43.7+/- 33.9	78.8 +/- 39.6
Πηκτίνες/Τανίνες (%)	1.0	0.37
Πολυαλκόολες (%)	1.0 - 1.5	1.0
Σάκχαρα (%)	4.5	1.5
Οργανικά Συστατικά (%)	4-16	
Ηλεκτρική Αγωγιμότητα (dS/m)_	8-22	

1.8.1 Τα ΥΑΕ ως υπόστρωμα κομποστοποίησης

Η κομποστοποίηση αποτελεί μια δυναμική μέθοδο αερόβιας βιολογικής επεξεργασίας για την αποτελεσματική διαχείριση των ΥΑΕ. Στα μειονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγεται η ανάγκη πλήρους και αυτοματοποιημένου ελέγχου των συνθηκών που επηρεάζουν την διαδικασία όπως θερμοκρασία, υγρασία, O_2/CO_2 που ανεβάζουν σημαντικά το κόστος εφαρμογής (Οιχαλιώτης & Ζερβάκης 1999). Πολλές μελέτες και πειράματα κομποστοποίησης έχουν διεξαχθεί από διάφορες επιστημονικές ομάδες, χρησιμοποιώντας ΥΑΕ μαζί με άλλα υλικά, όπως στερεά παραπροϊόντα ελαιουργείας, αστικά λύματα, απόβλητα καλλιέργειας βάμβακος, άχυρο σιτηρών, κοπριά πουλερικών και διάφορα αγροτοβιομηχανικά υποπροϊόντα, και έδειξαν ότι τυπικά, σε μερικές εβδομάδες, το κόμπποστ έχει πλήρως απαλλαχθεί από τις φυτοτοξικές ιδιότητες (Tomati *et al.*, 1996, Monteoliva-Sanchez *et al.*, 1996, Paredes *et al.*, 1996, Papadimitriou *et al.*, 1997, Vlyssides *et al.*, 1999, Paredes *et al.*, 2001, Roig *et al.*, 2001, Filippi *et al.*, 2002, Paredes *et al.*, 2002, Γεωργακάκης και Χριστοπούλου, 2003, Montemurro *et al.*, 2004, Paredes *et al.*, 2004, Alburquerque *et al.*, 2005, Paredes *et al.*, 2005, Hachicha *et al.*, 2008, Altieri & Esposito, 2010, Rigane & Medhioub, 2011). Υποδεικνύεται ότι η χρήση ΥΑΕ απαιτεί κάποιο απόβλητο λιγνοκυτταρινικής σύστασης, ως διογκωτικό υλικό και ενδεχομένως άλλα υλικά ως πηγή αζώτου για την επίτευξη ιδανικών συνθηκών (επαρκής λόγος C/N και φυσική δομή) για τη διαδικασία της κομποστοποίησης και για την παραγωγή ασφαλούς τελικού προϊόντος (Tomati *et al.*, 1996, Vlyssides *et al.*, 1996, Paredes *et al.*, 2000, Paredes *et al.*, 2005, Plaza *et al.*, 2005). Έχουν γίνει διάφορα πειράματα μελέτης των επιπτώσεων της εφαρμογής κόμπποστ από ΥΑΕ σε καλλιέργειες φυτών, αλλά τα αποτελέσματα είναι αντιφατικά, σε σύγκριση με την προσθήκη ανόργανου λιπάσματος (Cabrera, 1990, Galli, 1994 - Paredes, 2005, Papafotiou *et al.*, 2004).

Έχει ενδιαφέρον να αναφερθεί ότι κατά τη συγκριτική μελέτη κομποστοποίησης δύο σωρών, εκ των οποίων ο ένας περιείχε ΥΕΒ και λυματολάσπη (sewage sludge) και ο δεύτερος είχε επιπλέον ΥΑΕ εξήχθησαν τα εξής αποτελέσματα: α) και στους δύο σωρούς η θερμοκρασία διατηρήθηκε στους 55°C ή λίγο μεγαλύτερη για 15 ημέρες, γεγονός που συνέβαλε στην εξυγίανση του τελικού προϊόντος, λόγω της καταστροφής των παθογόνων σπορίων, β) η βιοαπικοδόμηση του οργανικού υλικού ήταν μεγαλύτερη στο δεύτερο σωρό, λόγω πιθανώς της παρατεταμένης θερμόφιλης φάσης, αλλά και της μεγαλύτερης ποσότητας εύκολα αποδομήσιμων οργανικών ενώσεων στο αρχικό υλικό (ΥΑΕ), γ) αυξήθηκε η τιμή του pH και της ηλεκτρικής αγωγιμότητας (EC), λόγω της διάσπασης όξινων ενώσεων, όπως καρβοξυλικές και φαινολικές, της ανοργανοποίησης ενώσεων, όπως πρωτεΐνες, αμινοξέα και πεπτιδία, σε αμμωνία και της σχετικής αύξησης της συγκέντρωσης των ιόντων, λόγω των απωλειών μάζας του σωρού - ακολούθως η τιμή του pH μειώθηκε, επειδή άρχισε η διαδικασία της νιτροποίησης, δηλαδή της οξειδωσης της αμμωνίας σε νιτρικό, δ) στο δεύτερο σωρό η ηλεκτρική αγωγιμότητα ήταν αυξημένη ακόμα και κατά την αρχή της διαδικασίας, λόγω των διαλυτών αλάτων που περιέχουν τα ΥΑΕ. Το τελικό προϊόν εφαρμόστηκε στο έδαφος και μελετήθηκαν οι επιπτώσεις του στις ιδιότητες του

εδάφους, καθώς και σε καλλιέργειες του φυτού *Beta vulgaris*, μετά από προσθήκη αυξανόμενης συγκέντρωσης κόμποστ και συγκριτικά με την προσθήκη ορισμένης συγκέντρωσης ανόργανων λιπασμάτων (N_2 , P_2O_3 , K_2O). Το τελικό προϊόν από το σωρό με τα ΥΑΕ χαρακτηριζόταν από μικρότερη συγκέντρωση σε οργανικό υλικό και νιτρικά, υψηλότερες τιμές ηλεκτρικής αγωγιμότητας. Επιπλέον, ήταν σταθερό, είχε μικρότερη σύσταση σε τοξικά βαρέα μέταλλα και δεν προκάλεσε προβλήματα φυτοτοξικότητας, ενώ η προσθήκη αυξανόμενης συγκέντρωσης στο έδαφος είχε αυξανόμενη θετική επίδραση στη γονιμότητά του. Το σοβαρό μειονέκτημα, ωστόσο, ήταν ότι παράλληλα αύξησε την αλατότητα του εδάφους, γεγονός που πιθανόν δημιουργεί προβλήματα, όταν προστεθεί σε αυξημένες συγκεντρώσεις στο έδαφος (Paredes *et al.*, 2005).

1.9 Τα Υπολείμματα Εκκοκκιστηρίου Βάμβακος

Στην Ελλάδα, η καλλιέργεια βάμβακος αποτελεί μία από τις σημαντικότερες αγροτικές δραστηριότητες με πολύ μεγάλη ετήσια παραγωγή της τάξεως των 500.000 τόνων και εξαγωγές παγκοσμίως. Καλλιεργούμενες εκτάσεις βάμβακος υπάρχουν σε όλο τον κύριο κορμό της χώρας μας, δηλαδή τη Μακεδονία, τη Θεσσαλία και τη Στερέα Ελλάδα. Λόγω της εκτεταμένης καλλιέργειάς του, δημιουργείται το πρόβλημα διαχείρισης των υπολειμμάτων εκκοκκισμού βάμβακος (ΥΕΒ), τα οποία συσσωρεύονται σε μεγάλες ποσότητες έξω από τα εργοστάσια εκκοκκισμού. Σε αυτά περιλαμβάνονται φλοιοί, φύλλα, τεμάχια του φυτού, μικρού μήκους ίνες βαμβακιού, που αποτελούν το 15% περίπου της συνολικής συγκομιδής.

Η απόθεση ακατέργαστων ΥΕΒ στο έδαφος θεωρείται ακατάλληλη, επειδή μπορεί να προκαλέσει την ακινητοποίηση του αζώτου, λόγω των φυτοτοξικών ενώσεων που έχει το φρέσκο οργανικό υλικό (Grasser, 1985) και επειδή έχουν βρεθεί σε αυτό σπόρια παθογόνων ασθενειών (Gordon *et al.*, 2001). Οι κυριότερες χρήσεις τους μέχρι τώρα ήταν η καύση τους στα εργοστάσια παραγωγής ενέργειας της Δ.Ε.Η. μαζί με λιγνίτη και πιο πρόσφατα σε εγκαταστάσεις καλλιέργειας εδώδιμων μανιταριών με λιγνινολυτικά ένζυμα, όπως το *Pleurotus ostreatus*.

1.9.1 Τα ΥΕΒ ως υπόστρωμα κομποστοποίησης

Οι φυσικές ιδιότητες των ΥΕΒ τα καθιστούν κατάλληλη πρώτη ύλη για κομποστοποίηση, η οποία μπορεί να αποτελέσει μια ορθολογική μέθοδο διαχείρισης με στόχο την παραγωγή ενός προϊόντος με υψηλή προστιθέμενη και ευεργετικές ιδιότητες για το έδαφος (Tejada *et al.*, 2001). Το ινώδες κλάσμα των υπολειμμάτων περιέχει σημαντικές ποσότητες αζώτου, φωσφόρου και καλίου, καθώς και από άλλα ιχνοστοιχεία. Επιπλέον η αναλογία C/N είναι 22:1 και είναι ικανοποιητική για τη χρήση του ως υπόστρωμα κομποστοποίησης, χωρίς να απαιτείται η προσθήκη πηγής αζώτου. Τα ΥΕΒ συνεισφέρουν, επίσης, στη διόγκωση και συμπίεστικότητα του σωρού, ενώ παράλληλα τα υπόλοιπα υπολείμματα δημιουργούν ένα πλέγμα με πολλούς θαλάμους αερισμού, συμβάλλοντας έτσι στην ύπαρξη αερόβιων συνθηκών

στο σύνολο του κόμποστ. Το τελικό προϊόν της κομποστοποίησης των ΥΕΒ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εδαφο-βελτιωτικό ή υπόστρωμα για την ανάπτυξη φυτών, χωρίς να προκαλεί προβλήματα τροφοπενίας αζώτου σε αυτά (Thomasson, 1990). Τα ΥΕΒ έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία, ως πρώτη ύλη, σε αρκετά πειράματα συγκομποστοποίησης με άλλα οργανικά υλικά, όπως ζαχαρότευτλα (Diaz *et al.*, 2002), φλοιούς ρυζιού (Parafotiou *et al.*, 2001) και ΥΑΕ (Monteoliva *et al.*, 1996, Paredes *et al.*, 2002, 2005).

Στον Πίνακα 5 αναφέρονται τα κύρια φυσικο-χημικά χαρακτηριστικά των ΥΑΕ.

Πίνακας 5: Κύρια φυσικο-χημικά χαρακτηριστικά των ΥΕΒ (Προσαρμογή από Μπαλή, 1994).

Παράμετρος	Τιμή
Ολικό άζωτο κατά Kjeldahl (%)	2.01
Οργανικός άνθρακας (%)	35.81
pH	6.10
φυσική υγρασία (%)	10.00
Ηλεκτρική Αγωγιμότητα (dS/m)	22.50
Υδατοϊκανότητα (%)	81.00
Πορώδες (%)	93.00
Πυκνότητα στερεών (g/cm ³)	1.03

1.10 Μύκητες

Σύμφωνα με τη θεωρία του Whittaker (1969), που αποτελεί τη βάση στην οποία στηρίχτηκαν μεταγενέστερες απόψεις, οι ζωντανοί οργανισμοί, με βάση το επίπεδο οργάνωσης και τον τρόπο διατροφής τους, διακρίνονται σε 5 Βασίλεια. Οι μύκητες (fungi) ανήκουν σε ένα ξεχωριστό Βασίλειο, στο Βασίλειο *Fungi*, αν και σύμφωνα με τα πιο σύγχρονα δεδομένα που βασίζονται σε μελέτες σε μοριακό επίπεδο, οι μύκητες έχουν πολυφυλετική καταγωγή και ορισμένες κατώτερες ομάδες τοποθετούνται στα Βασίλεια *Chromista* και *Protozoa* (Kirk *et al.*, 2008). Οι μύκητες είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί με ευρεία κατανομή στη φύση (αέρας, νερό, χύμα, οργανική ύλη σε αποσύνθεση) και είναι ετερότροφοι οργανισμοί, δηλαδή, δεν είναι σε θέση να συνθέσουν μόνοι τους τις οργανικές ουσίες που χρειάζονται. Οι τύποι μυκήτων που απαντώνται συνήθως είναι νηματοειδείς, κοινοκυτταρικοί ή πολυκύτταροι, αλλά υπάρχουν και μονοκύτταροι τύποι. Στους τελευταίους ανήκουν οι ζύμες (π.χ. *Saccharomyces cerevisiae*), που αποτελούνται από κύτταρα σφαιρικά ή ελαφρώς επιμηκυσμένα που πολλαπλασιάζονται με εκβλάστηση ή σχάση.

Οι μύκητες είναι αερόβιοι οργανισμοί και το οξυγόνο είναι απαραίτητο για τη βλάστηση των σπορίων τους και την ανάπτυξη του μυκηλίου τους, μπορούν, ωστόσο, να ανεχτούν χαμηλές συγκεντρώσεις ή απουσία οξυγόνου για περιορισμένο διάστημα. Οι περισσότεροι είναι σαπροτροφικοί, δηλαδή προσλαμβάνουν θρεπτικά συστατικά από τη νεκρή ύλη. Εκκρίνουν υδρολυτικά ένζυμα με τα οποία διασπών τα υποστρώματα και απορροφούν τα θρεπτικά συστατικά με τη μορφή διαλύματος. Χρησιμοποιούν οργανικά υλικά ως πηγή άνθρακα, ηλεκτρονίων και ενέργειας και το

γλυκογόνο είναι το πρωταρχικό αποταμιευτικό υλικό. Οι περισσότεροι είναι μεσόφιλοι, εντούτοις υπάρχουν και είδη που δεν αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 20°C και χαρακτηρίζονται ως ψυχρόφιλοι και άλλοι που αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες από 40°C έως και πάνω από 50°C και χαρακτηρίζονται ως θερμόφιλοι. Ορισμένα σπόρια μυκήτων, όπως τα χλαμυδοσπόρια και ορισμένες εξειδικευμένες διαφοροποιήσεις του θαλλού, του σώματος, δηλαδή, των μυκήτων, όπως τα σκληρώτια, αντέχουν σε θερμοκρασίες υψηλότερες από ότι ο θαλλός. Οι μύκητες χρησιμοποιούν υδατάνθρακες και αζωτούχες ενώσεις για να συνθέσουν αμινοξέα και πρωτεΐνες. Αναπτύσσονται συνήθως οπουδήποτε υπάρχει υψηλή υγρασία, επειδή είναι ουσιώδης για τη βλάστηση των σπορίων τους, αλλά απαντώνται και σε περιβαλλόντα με πολύ χαμηλή υγρασία. Το pH του υποστρώματος και το φως επηρεάζουν, επίσης, την ανάπτυξή τους. Ελάχιστοι μύκητες αναπτύσσονται σε pH μικρότερο του 3 ή μεγαλύτερο του 9, ενώ το άριστο κυμαίνεται μεταξύ 5 - 6.5. Σχεδόν 100.000 είδη μυκήτων (Kirk *et al.*, 2008) είναι γνωστά μέχρι σήμερα, αλλά εκτιμάται ότι ο αριθμός των ειδών που υπάρχουν στη φύση ξεπερνά το 1.5 εκατομμύριο είδη (Hawksworth 1991, 2001).

Σήμερα το Βασίλειο περιλαμβάνει επτά Φύλα: α) *Blastocladiomycota*, β) *Chytridiomycota*, γ) *Glomeromycota*, δ) *Microsporidia*, ε) *Neocalli-mastigomycota*, στ) *Ascomycota*, η) *Basidiomycota*. Το κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων αποτελείται από ένα πλέγμα μικροινιδίων χιτίνης βυθισμένων σε ένα άμορφο υπόστρωμα από υδατανθρακούχα πολυμερή, πρωτεΐνες και γλυκοπρωτεΐνες, λιπίδια ή και άλλα πιο σπάνια υλικά, που μπορεί να καλύπτουν εξωτερικά το τοίχωμα. Το μυκήλιο είναι το βλαστητικό σώμα του μύκητα και στους κατώτερους μύκητες είναι κοινοκυτικό, δηλαδή αποτελείται από υφές που δε φέρουν εγκάρσια τοιχώματα, ενώ στους ανώτερους, το μυκήλιο αποτελείται από υφές που χωρίζονται μεταξύ τους με εγκάρσια τοιχώματα, που ονομάζονται διαφράγματα ή σέπτα. Τα σέπτα παρουσιάζουν διαφορές ανάμεσα στις ομάδες των ανώτερων μυκήτων, αυξάνουν την ανθεκτικότητα των υφών και αποτελούν ένα μηχανισμό άμυνας του κυττάρου κατά των μηχανικών βλαβών. Οι υφές, επίσης, εκκρίνουν εξοκυτταρικά ένζυμα με τα οποία οι μύκητες διασπούν τις οργανικές ύλες του υποστρώματος σε απλούστερα συστατικά τα οποία προσλαμβάνουν με απορρόφηση. Η αναπαραγωγή των μυκήτων είναι είτε αγενής, η οποία δεν περιλαμβάνει καρυογαμία (ένωση πυρήνων) και γίνεται με μιτωτικές διαιρέσεις που οδηγούν στην παραγωγή μιτοσπορίων είτε εγγενής, η οποία περιλαμβάνει καρυογαμία και μείωση και οδηγεί στην παραγωγή μειοσπορίων. Η αγενής αναπαραγωγή γίνεται με σπόρια που παράγονται σε κλειστά αναπαραγωγικά όργανα, τα σποριάγγεια ή με κονίδια, δηλαδή, σπόρια που παράγονται στις κορυφές ή στις πλευρές διαφοροποιημένων υφών που ονομάζονται κονιδιοφόροι. Τα κονίδια ποικίλουν στο χρώμα, το μέγεθος, το σχήμα, τον αριθμό, τη διάταξη των κυττάρων τους, καθώς και τον τρόπο παραγωγής τους (π.χ. φιαλιδοσπόρια, αρθροσπόρια). Η εγγενής αναπαραγωγή περιλαμβάνει τη συγχώνευση των δύο πυρήνων σε ένα διπλοειδή ζυγώτη (καρυογαμία) και τη μειωτική διαίρεση.

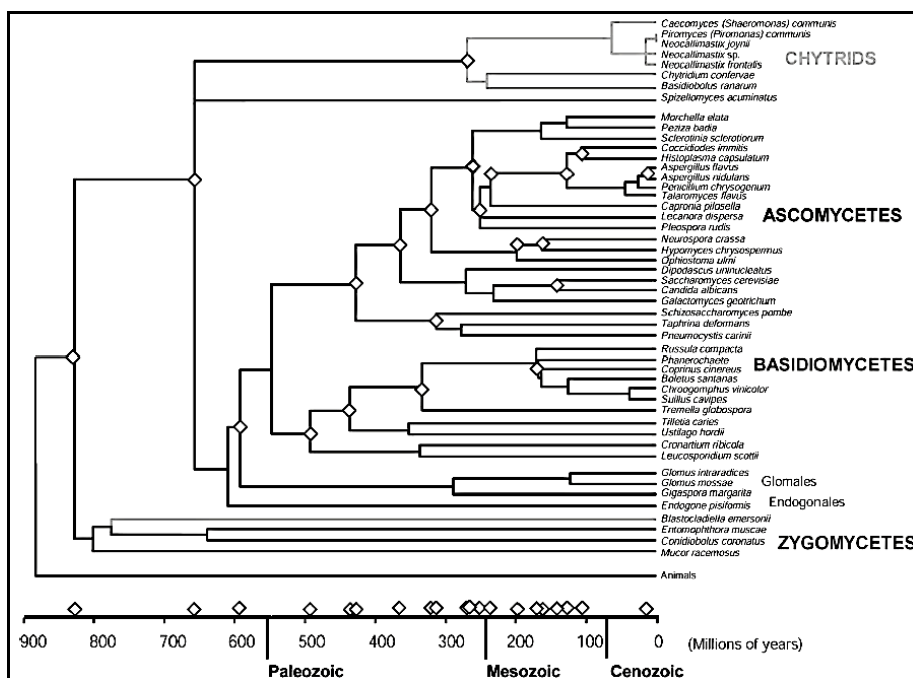
Οι μύκητες επηρεάζουν όλες τις μορφές ζωής, θετικά ή αρνητικά. Ο βασικός οικολογικός ρόλος των μυκήτων είναι η συμμετοχή τους, ως ετερότροφοι οργανισμοί,

στην αποσύνθεση της οργανικής ύλης και άρα στην ανακύκλωση του αζώτου, του CO₂ κ.ά. Αποικοδομούν πολύπλοκα οργανικά υλικά του περιβάλλοντος και τα καθιστούν κατάλληλα, ώστε να χρησιμοποιηθούν από άλλους οργανισμούς και είναι οι κύριοι αποικοδομητές σε όλα τα χερσαία οικοσυστήματα. Επιπλέον, ως συμβιωτικοί οργανισμοί συμβάλλουν στην ανάπτυξη άλλων οργανισμών, λόγω των βιοτικών αλληλεπιδράσεων με τα φύκη (λειχήνες), τα ανώτερα φυτά και τα έντομα (ενδο /εξω - συμβιωτικοί). Μύκητες για παράδειγμα συμβιώνουν με τις ρίζες ανώτερων φυτών (μυκόρριζες) και συγκεντρώνοντας ιόντα, ρυθμίζουν την μεταφορά τους στις ρίζες των φυτών, διευκολύνοντας έτσι την ανάπτυξή τους.

Από την άλλη πλευρά, οι μύκητες επηρεάζουν τον άνθρωπο με διάφορους τρόπους, θετικά και αρνητικά. Αξιοποιούνται για την παραγωγή φαρμάκων, όπως η κορτιζόνη και η εργομετρίνη, αντιβιοτικών, όπως η πενικιλίνη, πρωτεΐνων και εδωδιμων μανιταριών (καρποσώματα ορισμένων Βασιδιομυκήτων και Ασκομυκήτων). Επιπλέον, αξιοποιούνται για τη βιοεξυγίανση του εδάφους, την επεξεργασία βιομηχανικών αποβλήτων, τη βιολογική καταπολέμηση επιβλαβών για τις καλλιέργειες οργανισμών (π.χ. έντομα, νηματώδεις σκώληκες), καθώς και ως βιολογικοί δείκτες ρύπανσης. Χρησιμοποιούνται ακόμα, για την παρασκευή προϊόντων ζύμωσης, όπως ψωμί, κρασί, μύρα, τυρί κ.ά. (π.χ. είδη των γενών *Saccharomyces*, *Penicillium*) και για την εμπορική παραγωγή πολλών οργανικών οξέων, όπως το κιτρικό οξύ. Ορισμένα είδη μυκήτων χρησιμοποιούνται ως επιστημονικά εργαλεία σε έρευνες που πραγματοποιούνται από τους κλάδους της Βιοχημείας, της Μικροβιολογίας, της Μοριακής Βιολογίας και της Γενετικής, λόγω της ικανότητάς τους να αναπτύσσονται και να αναπαράγονται γρήγορα στο εργαστήριο (όπως τα είδη *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae*). Είναι υπεύθυνοι, εντούτοις, και για την πρόκληση πολλών ασθενειών στον άνθρωπο, τα φυτά και τα ζώα. Ένα σημαντικό ποσοστό της συνολικής παραγωγής αγροτικών προϊόντων χάνεται ετησίως εξαιτίας των παθογόνων μυκήτων, που προσβάλλουν τα καλλιεργούμενα φυτά (π.χ. οι σκωριομύκητες προσβάλλουν τα σιτηρά), καθώς αποτελούν τη συντριπτική πλειονότητα φυτοπαθογόνων οργανισμών. Επίσης, υπάρχουν είδη που είναι παθογόνα για τον άνθρωπο και προκαλούν αλλεργίες, δερματοπάθειες, πνευμονοπάθειες (π.χ. σύνδρομο άρρωστου κτιρίου) κ.ά.

Σύμφωνα με τα πιο σύγχρονα δεδομένα, πριν από 1 δισεκατομμύριο χρόνια ένας πληθυσμός υδρόβιων, μονοκύτταρων ευκαρυωτών που σχημάτιζαν σποριάγγεια με ζωοσπόρια που έφεραν εμπρόσθιο μαστίγιο, χωρίστηκε σε δύο εξελικτικές γραμμές, αυτή των ζώων και αυτή των μυκήτων (Stajich *et al.*, 2009). Στα 900 εκατομμύρια χρόνια της εξελικτικής τους ιστορίας οι Μύκητες παρουσιάζουν τεράστια βιολογική ποικιλότητα (Εικόνα 6). Η κυτταρική φυσιολογία και γενετική τους μοιράζεται κοινά χαρακτηριστικά με τα ζώα και τα φυτά, συμπεριλαμβανομένων των πολυκύτταρων κυτταρικών δομών, της ανάπτυξης και διαφοροποίησης, του κυτταρικού κύκλου, του κερκαδικού ρυθμού, των ενδοκυτταρικών σημάτων, της μεθυλίωσης του DNA και της τροποποίησης της χρωματίνης. Οι κοινές ρίζες των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τις λειτουργίες αυτές, καθιστούν τη μελέτη των γονιδίων αυτών στους μύκητες πολύ σημαντική για την βιολογία του ανθρώπου (Galagan *et al.*, 2005).

Παρά τη μεγάλη σημασία και τη χρησιμότητά τους, λίγες είναι γνώσεις για τις εξελικτικές τους σχέσεις (Schmidt *et al.*, 2009) συγκριτικά με άλλους οργανισμούς, κυρίως επειδή έχουν απλή εμφάνιση, που είναι κοινή για πολλά διαφορετικά είδη και γένη και δύσκολα αναγνωρίζεται στη φύση, δεν μπορούν να σχηματίσουν απολιθώματα, παρά μόνο σε σπάνιες περιπτώσεις και παρουσιάζουν τεράστια γενετική απόκλιση. Οι γνώσεις για το γονιδιώμα τους, προέρχονταν από την αλληλούχιση της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* (1996), και μόλις την περασμένη δεκαετία ξεκίνησε η ουσιαστική έρευνα στο πεδίο της γονιδιωματικής των υφομυκήτων. Μέχρι σήμερα ο αριθμός των τρέχοντων προγραμμάτων αλληλούχισης υφομυκήτων (**filamentous fungi**) (λιγότερα από 260 στελέχη και είδη) είναι σημαντικά μικρότερος από των βακτηρίων ή αρχαίων (περισσότερα από 1800 στελέχη και είδη) (Liolios *et al.*, 2008). Παρά τις ομοιότητες στη μορφολογία και φυσιολογία, συγγενικά είδη διαφέρουν πολύ σε επίπεδο γονιδιώματος.



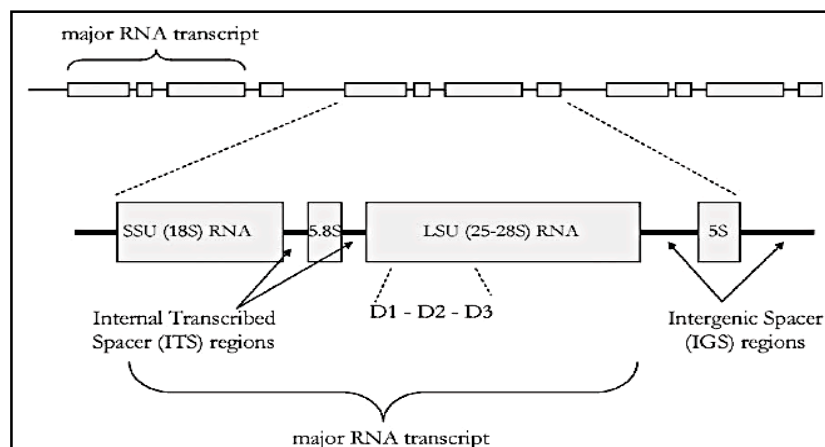
Εικόνα 6: Φυλογένεση στο Βασίλειο των Μυκήτων (Galagan *et al.*, 2011).

1.10.1 Ανάλυση ριβοσωμικού DNA

Οι μοριακοί τύποι που χρησιμοποιούνται στην ταξινόμηση και τις φυλογενετικές αναλύσεις περιλαμβάνουν το πυρηνικό και μιτοχονδριακό ριβοσωμικό DNA - rDNA (18S, 28S, ITS-Internal transcribed spacer regions, mtSSU, mtLSU), όπως επίσης και γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, όπως οι RNA πολυμεράσες (RPB1, RPB2), η β-τουμπουλίνη, η η-ακτίνη, η ATPάση, που είναι ένα προσδεμένο στη μεμβράνη ενζυμικό σύμπλοκο που συνθέτει και υδρολύει ATP (ATP6) και ο παράγοντας επιμήκυνσης EF (TEF1a). Γενετικοί τύποι που εξελίσσονται αργά είναι περισσότερο κατάλληλοι για μοριακές και φυλογενετικές αναλύσεις, σε σχέση με τύπους με υψηλούς ρυθμούς εξέλιξης. Στους τελευταίους ανήκουν οι ITS περιοχές τους ριβοσωμικού rDNA, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη διάκριση των ταξινομικών

μονάδων σε επίπεδο γένους και είδους. Οι μη κωδικές περιοχές των γενετικών τόπων που σχετίζονται με το ριβόσωμα, χαρακτηρίζονται από μεγάλη μεταβλητότητα, γεγονός που δυσκολεύει τη στοίχιση των ταξινομικών μονάδων με μακρινή συγγένεια. Κατ' επέκταση, είναι αναγκαίο να βρεθούν γενετικοί τόποι που θα είναι συντηρημένοι, ώστε να δίνουν αξιόπιστα αποτελέσματα στοίχισης των διαφορετικών στελεχών, αλλά παράλληλα, να μεταβάλλονται με ρυθμό κατάλληλο για να μετρηθεί η εξελικτική απόσταση και να βρεθούν οι φυλογενετικές σχέσεις. Σύγκριση των γονιδιωμάτων τριών ειδών του γένους *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. oryzae*) ανά ζεύγη, έδειξε ότι παρουσιάζουν μόνο 68% ομοιότητα στην αμινοξική αλληλουχία (Galagan *et al.*, 2005), γεγονός που υποδηλώνει μια εξελικτική απόσταση συγκρίσιμη με αυτήν μεταξύ ανθρώπων και ψαριών (Dujon *et al.*, 2004). Ένα από τα περιοριστικά προβλήματα στις μελέτες είναι ότι πολλά από τα είδη δεν απομονώνονται σε καθαρή καλλιέργεια υπό εργαστηριακές συνθήκες (Schmidt *et al.*, 2009).

Το ριβωσομικό DNA χρησιμοποιείται, συχνότερα, στην ταξινόμηση και τις φυλογενετικές αναλύσεις. Τα γονίδια που ελέγχουν τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του rDNA μεταλλάσσονται αργά δια μέσου των εκατομμυρίων ετών της εξελικτικής πορείας και έτσι, το rDNA λειτουργεί ως δείκτης της συγγένειας των οργανισμών. Τα γονίδια αυτά, των οποίων ο αριθμός ποικίλει, απαντώνται ομαδοποιημένα και συγκροτούν μια γονιδιακή συστοιχία (gene cluster, Εικόνα 7). Η απουσία ποικιλότητας μεταξύ των αλληλουχιών των μορίων rRNA υποδεικνύει ότι είτε όλα τα αντίγραφα είναι πανομοιότυπα είτε ότι οι διαφορές τους δεν ανιχνεύονται, επειδή βρίσκονται κάτω από το όριο της ευαισθησίας της μεθόδου που τις προσδιορίζει. Στο γονιδίωμα των μυκήτων, τα γονίδια του rDNA περιέχονται σε σειρά σε μία ή περισσότερες συστοιχίες. Επειδή αυτή η νουκλεοτιδική περιοχή υπάρχει σε όλα τα ζωντανά κύτταρα, επιτελώντας μια ζωτικής σημασίας λειτουργία στο κύτταρο, και τα γονίδια μεταλλάσσονται αργά, λειτουργεί ως δείκτης της συγγένειας των οργανισμών. Η περιοχή αυτή περιλαμβάνει ακολουθίες DNA πολύ συντηρημένες, αλλά και άλλες που χαρακτηρίζονται από μεγάλη μεταβλητότητα. Γενικά, σε αυτή τη γονιδιακή συστοιχία, οι κωδικές περιοχές είναι υψηλά συντηρημένες μεταξύ των διαφορετικών οργανισμών, επιτρέποντας τη σύγκριση οργανισμών που είναι περισσότερο απομακρυσμένοι, ενώ οι μη-κωδικές περιοχές, που εξελίσσονται γρήγορα, έχουν μεγαλύτερη μεταβλητότητα, επιτρέποντας τη διάκριση των πιο συγγενικών οργανισμών (π.χ. εντός του γένους).



Εικόνα 7: Γονιδιακή συστοιχία rDNA.

Μεταξύ των γονιδίων που κωδικοποιούν για το rRNA, το μικρότερο από αυτά (5S) χρησιμοποιήθηκε αρχικά στις ταξινομικές μελέτες. Συγκεκριμένα, επειδή είναι μικρό σε μέγεθος και πολύ συντηρημένο, είναι πιο χρήσιμο για το διαχωρισμό λιγότερο συγγενικών (απομακρυσμένων) οργανισμών.

Το γονίδιο για το 18S που κωδικοποιεί για τη μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος είναι χρήσιμο για την ταξινόμηση και φυλογένεση σε επίπεδο τάξεων ή υψηλότερο από αυτό. Χρησιμοποιείται για παράδειγμα, για το καθορισμό των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των Βασιδιομυκήτων, Ασκομυκήτων, Χυτριομυκήτων, ή για την ταυτοποίηση μυκήτων από περιβαλλοντικό δείγμα στο οποίο υπάρχουν Βακτήρια, Ακτινομύκητες ή Αρχαία.

Η μεγάλη υπομονάδα του ριβοσώματος περιλαμβάνει περιοχές που εξελίσσονται αργά και περιοχές που εξελίσσονται γρήγορα. Στις τελευταίες ανήκουν οι D1, D2 (26S rDNA), οι οποίες παρουσιάζουν μεγάλη μεταβλητότητα σε επίπεδο γένους (δηλαδή βοηθάει στο διαχωρισμό των ειδών ενός γένους) (Hrabovsky & Siegfried, 2009).

Οι ITS περιοχές του ριβοσωμικού DNA των μυκήτων είναι μη-κωδικές περιοχές αλληλουχίες με μεγάλη μεταβλητότητα και έχουν μεγάλη σημασία για τη διάκριση των ειδών με την PCR. Είναι αυτές που χρησιμοποιούνται περισσότερο στην ταξινόμηση και φυλογένεση. Στη βάση δεδομένων International Nucleotide Sequence Database (ISND) έχουν καταχωρηθεί περισσότερες από 100.000 αλληλουχίες της ITS περιοχής (Nilsson *et al.*, 2009). Είναι μια περιοχή μήκους 650 ζευγών βάσεων και περιλαμβάνει τις ITS1 και ITS2 υποπεριοχές που περιβάλλουν την κωδική αλληλουχία 5.8S και παρεμβάλλονται μεταξύ των αλληλουχιών που κωδικοποιούν για το rRNA της μικρής (Small SubUnit-coding sequence, SSU) και της μεγάλης υπομονάδας (Large SubUnit-coding sequence, LSU) του ριβοσώματος (White *et al.*, 1990). Ο μεγάλος αριθμός αντιγράφων ITS ανά κύτταρο (περισσότερα από 250) καθιστά την περιοχή αυτή ιδανική για τη χρήση της ως στόχο για την κατασκευή εκκινητών και την αλληλούχιση δειγμάτων με χαμηλή συγκέντρωση DNA (όπως π.χ. περιβαλλοντικά δείγματα από το χώμα) (Nilsson *et al.*, 2009). Οι πρώτοι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για την ανίχνευση μυκήτων στόχευαν στην ITS περιοχή του rRNA γονιδίου και κυρίως στις περιοχές ITS1 και ITS4, που είναι τμήμα της ITS2, και ενισχύουν τις ITS1 και ITS2 ακολουθίες. Οι εκκινητές αυτοί ενισχύουν πολλούς στόχους στο γονιδίωμα και είναι αποτελεσματικοί στην ενίσχυση DNA από καθαρή καλλιέργεια, όχι, όμως, τόσο σε περιβαλλοντικό δείγμα, καθώς, σε αυτή την περίπτωση δεν μπορεί να ξεχωρίσει το DNA φυτικής προέλευσης.

1.10.2 Μύκητες και Γονιδιωματική

Ο όρος “Γονιδιωματική” (genomics) εισήχθηκε τη δεκαετία του 1980 παράλληλα με την επινόηση τεχνικών αλληλούχισης μεγάλης κλίμακας και περιλαμβάνει την πειραματική και υπολογιστική ανάλυση μεγάλης κλίμακας, σε επίπεδο ολόκληρου γονιδιώματος και με μεθόδους υψηλής παραγωγικότητας (high-

throughput). Χρησιμοποιώντας ισχυρούς υπολογιστές, αναλύονται αλληλουχίες εκατοντάδων εκατομμυρίων νουκλεοτιδίων με σκοπό την άντληση πληροφοριών με βιολογική σημασία. Η κατανόηση της γενετικής πληροφορίας που είναι αποθηκευμένη στις αλληλουχίες του DNA γίνεται με τη χρήση αλγορίθμων (Βιοπληροφορική). Η ανάλυση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την ταυτοποίηση γονιδίων και την κατανόηση της λειτουργίας τους. Όταν αναπτύχθηκε ο κλάδος της Βιοπληροφορικής η οποία εστιάζεται στο χαρακτηρισμό των γονιδιωμάτων χρησιμοποιώντας υπολογιστικά μοντέλα και ερμηνεύει τα δεδομένα των πρωτογενών αναλύσεων, αποτέλεσε ένα χρήσιμο εργαλείο παροχής δεδομένων και ανάλυσης για τους ερευνητές. Με τη χρήση υπολογιστικών μοντέλων χαρακτηρίζονται τα λειτουργικά γνωρίσματα των γονιδίων και τα δεδομένα αποθηκεύονται σε βάσεις δεδομένων (π.χ. βάσεις με πληροφορίες για το πρότυπο έκφρασης του γονιδιώματος κ.ά.).

Μέχρι σήμερα, έχουν αναπτυχθεί πολλές βάσεις δεδομένων για συγκεκριμένους τομείς, εξειδικευμένες για συγκεκριμένους οργανισμούς που είναι αδιαλείπτως προσβάσιμες μέσω του διαδικτύου. Το Βασικό Υπολογιστικό Εργαλείο Αναζήτησης Τοπικών Στοιχίσεων ή αλγόριθμος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), που χρησιμοποιείται από το 1990, είναι ένα αποτελεσματικό εργαλείο για τη γρήγορη σύγκριση και στοίχιση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Η βασική αρχή είναι ότι αναλύει “λέξεις”, δηλαδή σύντομα τμήματα νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μήκους 4 ή 11 νουκλεοτιδίων, περιορίζοντας την πολυπλοκότητα των στοιχίσεων αλληλουχίας και το χρόνο. Αυτές οι αντιστοιχίσεις είναι το πρώτο βήμα για να υπολογιστούν στοιχίσεις μεγαλύτερου μήκους. Το Εθνικό Κέντρο Βιοτεχνολογικών Πληροφοριών (National Centre for Biotechnology Information) παρέχει διάφορα προγράμματα BLAST για διαφορετικούς τύπους συγκρίσεων μεταξύ αλληλουχιών. Το πρόγραμμα *blastn* χρησιμοποιείται για την αναζήτηση ομολόγων μιας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε μια βάση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.

Η Γονιδιωματική και η συγκριτική γονιδιωματική (δηλαδή η σύγκριση αλληλουχιών από διαφορετικούς οργανισμούς για την εξαγωγή συμπερασμάτων σε εξελικτικό και λειτουργικό επίπεδο) επικεντρώνεται τις στατικές πτυχές της πληροφορίας που είναι κωδικοποιημένη στο DNA και μπορούν να προβλέψουν μόνο τις πιθανές δυνατότητες του κυττάρου. Αντιθέτως, η Λειτουργική Γονιδιωματική που περιλαμβάνει και τη μεταγραφομική και πρωτεομική, επικεντρώνεται στις δυναμικές πτυχές της πληροφορίας, τη μεταγραφή, τη μετάφραση, τις αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών-DNA και των πρωτεϊνών μεταξύ τους, και αποκαλύπτει τις λειτουργικές αλλαγές που συμβαίνουν στο κύτταρο ως απόκριση στις αλλαγές του περιβάλλοντος. Έτσι, διασαφηνίζεται η σχέση γονιδιώματος και φαινοτύπου και η λειτουργία του DNA σε επίπεδο γονιδιώματος, RNA μεταγράφων και πρωτεϊνών. Καθορίζεται, λοιπόν, ποια γονίδια εκφράζονται ή ποιες πρωτεΐνες είναι λειτουργικές κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες.

Η ανάπτυξη της Λειτουργικής Γονιδιωματικής άρχισε το 1990 με την ανακάλυψη της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών. Από τότε, οι μικροσυστοιχίες χρησιμοποιούνται για τη διερεύνηση της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων, σε

διαφορετικές κυτταρικές διαδικασίες και σε απόκριση στις αλλαγές του περιβάλλοντος. Επιτρέπουν την ανάλυση των επιπέδων των μεταγράφων και του αριθμού των αντιγράφων χιλιάδων γονιδίων ταυτόχρονα και την έκφρασή τους κάτω από διαφορετικές συνθήκες σε πολλές διαφορετικές χρονικές στιγμές. Οι μικροσυστοιχίες έχουν χρησιμοποιηθεί για περισσότερα από 20 είδη μυκήτων για να ερευνηθεί ο μεταβολισμός, η ανάπτυξη, η παθογένεια, η συμβίωση, οι βιομηχανικές εφαρμογές κ.ά. (Breakspear & Momany, 2007). Η συγκριτική μεταγραφομική ανάλυση συγγενικών ειδών αποκαλύπτει ότι υπάρχουν σημαντικές, αλλά εκπληκτικά μικρές επικαλύψεις ανάμεσα σε γονίδια με συντηρημένους μηχανισμούς ρύθμισης της έκφρασής τους. Έχει δειχθεί ότι τα βιολογικά συστήματα είναι εξελικτικά συντηρημένα σε επίπεδο γονιδιώματος, όπως αποδεικνύεται από την παρουσία ορθόλογων δομικών πρωτεϊνών και μεταγραφικών παραγόντων στους διάφορους οργανισμούς. Παρόλα αυτά, η μεταγραφική ρύθμιση δεν μπορεί να εξηγηθεί μέσω συγκριτικής γονιδιωματικής. Η συγκέντρωση δεδομένων από ολόκληρο το γονιδίωμα, μεταγράφων και πρωτέωμα κάποιου είδους μύκητα, επιτρέπει την πλήρη περιγραφή του είδους. Ως εκ τούτου, η ικανότητα σύγκρισης πολλαπλών, σχετικών γονιδιωμάτων αυξάνει την πιθανότητα κατανόησης της εξέλιξης, των εξειδικευμένων μονοπατιών αποικοδόμησης και των δυνατοτήτων του μεταβολισμού τους, την κατανόηση της δυναμικής των ενζυμικών αντιδράσεων για την παραγωγή πιθανών ενζύμων και βιοενεργών ενώσεων, τον καθορισμό της πρωτεϊνικής λειτουργίας και γενικά στην αποσαφήνιση ολόκληρου του μεταβολικού και ρυθμιστικού δικτύου. Δεδομένης της μεγάλης σημασίας και οικονομικής τους αξίας, θα πρέπει να εξελιχθεί η τρέχουσα έρευνα στο πεδίο της γονιδιωματικής των μυκήτων (Baker *et al.*, 2008).

1.10.3 Το γένος *Aspergillus*

Το γένος *Aspergillus* απαντάται σε όλα τα ενδιαιτήματα. Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1729 από ένα καθολικό παπά και μυκητολόγο (F. Micheli), ο οποίος το ονόμασε έτσι επειδή θυμίζει το *aspergillum*, το θρησκευτικό σκεύος που χρησιμοποιούσαν στους αγιασμούς (Bennett & Klich, 1992). Είναι ένα από τα σημαντικότερα από οικονομικής απόψεως γένη και πολλές βιομηχανικές διεργασίες βασίζονται στα είδη του, τα οποία χρησιμοποιούνται για τη βιομηχανική παραγωγή οινόπνευματων, τροφίμων, φαρμάκων και ενζύμων. Από την άλλη πλευρά, τα είδη του γένους μπορεί να μολύνουν τα τρόφιμα ή να προκαλέσουν ποικίλες ασθένειες στα φυτά, τα ζώα και τον άνθρωπο. Επίσης είναι ικανά να παράγουν μυκοτοξίνες, με κυριότερη την αφλατοξίνη, που έχει ισχυρά καρκινογόνες ιδιότητες. Όταν στα είδη του γένους, που απαντώνται συνήθως, είναι παρόντα και το εγγενές και το αγενές στάδιο, δηλαδή όταν υπάρχουν επιπλέον κλειστοθήκια και ασκοσπόρια τότε, ανήκουν στα γένη Ασκομυκήτων *Emericella*, *Eurotium* ή *Neosartorya*.

Η πρώτη αναφορά ασθένειας σε ζώο έγινε το 1815, ενώ σε άνθρωπο το 1842. Οι κύριες ασθένειες που προκαλεί στον άνθρωπο σχετίζονται με το άνω και κάτω μέρος του αναπνευστικού συστήματος. Σε ασθενείς με εξασθετισμένο ανοσοποιητικό σύστημα, σπόρια στελεχών του γένους *Aspergillus* που εισπνέονται, μπορούν να

προκαλέσουν αλλεργικές αντιδράσεις και σαπροτροφικό αποίκισμο σε προϋπάρχουσες κοιλότητες των πνευμόνων που έχουν προκληθεί από άλλες ασθένειες, όπως φυματίωση. Οξεία πνευμονική ασπεργίλλωση μπορεί να εμφανιστεί σε ασθενείς με ανοσοκαταστολή και είναι η δεύτερη πιο συχνή μορφή ευκαιριακής λοίμωξης από μύκητες. Στις περιπτώσεις αυτές, στο 90% των ασθενών είχαν χορηγηθεί κορτικοστεροειδή ή είχαν υποβληθεί σε κυτταροτοξικές χημειοθεραπείες.

Από τα 185 είδη *Aspergillus*, μόνο 16 είδη έχουν καταγραφεί ως παθογόνα για τον άνθρωπο. Από αυτά, ο *Aspergillus fumigatus* είναι υπεύθυνος για τις περισσότερες περιπτώσεις ασπεργίλλωσης παγκοσμίως. Ο *Aspergillus fumigatus* φαίνεται να σχετίζεται με τον Ασκομύκητα *Neosartorya fischeri*. Χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά το 1863 από τον Fresenius. Είναι από τα πλέον θερμόφιλα είδη και το φυσικό του ενδιαίτημα είναι η αποικοδομούμενη νεκρή οργανική ύλη, γι αυτό και απαντάται πολύ συχνά σε διάφορους τύπους κομποστοποιημένων υλικών. Η αλληλούχιση του γονιδιώματός του ξεκίνησε το 2001 και περιελάμβανε τη δουλειά πολλών φορέων έρευνας, όπως το Wellcome Trust Sanger Institute (Ηνωμένο Βασίλειο), το πανεπιστήμιο της Salamanca (Ισπανία) και το Institute of Genomic Research (Η.Π.Α.). Το 2005, ο Nierman και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν στο περιοδικό *Nature*, την αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος του *Aspergillus fumigatus*. Σε μονάδες κομποστοποίησης παρατηρήθηκε ιδιαίτερα μεγάλη συγκέντρωση спорίων *Aspergillus fumigatus* σε δείγματα αέρα που έφτανε τα $10^4 - 10^5$ CFU/m³ (Fischer *et al.*, 1998, Fischer *et al.* 1999, Browne *et al.*, 2001, Epstein *et al.*, 2001), χωρίς όμως να εντοπιστούν οι ισχυρές μυκοτοξίνες. Αυτές, φαίνεται, ότι δεν παράγονται φυσικά στο κόμποστ, αφού απομονώθηκαν μόνο από καθαρές καλλιέργειες (Fischer *et al.*, 1999). Πάντως εντοπίστηκαν αρκετοί άλλοι δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι μπορεί να σχετίζονται με καταστάσεις αλλεργικής αντίδρασης.

Τα είδη του γένους *Aspergillus section Nigri* ή μαύροι ασπέργιλλοι, έχουν ευρεία εξάπλωση και μεγάλη ικανότητα ανάπτυξης σε ποικίλα υποστρώματα. Αποτελούν μια σημαντική ομάδα μυκήτων στη βιομηχανία τροφίμων, την ιατρική μυκητολογία και τη βιοτεχνολογία. Από τη μία, προκαλούν σημαντικές αλλοιώσεις στα τρόφιμα, ενώ από την άλλη είναι χρήσιμοι σε διαδικασίες ζύμωσης για την παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων (όπως αμυλάσες και λιπάσες), και οργανικών οξέων (Varga *et al.* 2000). Εκτεταμένη είναι η χρήση πολλών ειδών σε βιοτεχνολογικές μελέτες, ως οργανισμοί πρότυπα και τους έχει δοθεί ο χαρακτηρισμός GRAS (Generally Regarded As Safe). Τα είδη του γένους έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν πολλά διαφορετικά υποστρώματα για την ανάπτυξή τους, εξαιτίας του ευέλικτου μεταβολικού δικτύου τους, που τους επιτρέπει την παραγωγή και έκκριση μεγάλης ποικιλίας ενζύμων. Στα σημαντικότερα ένζυμα περιλαμβάνονται όξινης- και γλυκο- αμυλάσες, ασπαραγινάσες, β-γαλακτοσιδάσες, γλυκοσιδάσες, λιπάσες, φωσφολιπάσες, πρωτεάσες, ημικυτταρινάσες και ξυλανάσες. Τα ένζυμα αυτά δρουν εξωκυτταρικά και είναι εξειδικευμένα στην αποικοδόμηση σύνθετων δομικών (π.χ. κυτταρίνη, ημικυτταρίνες, πηκτίνες) και αποταμιευτικών (π.χ. άμυλο) φυτικών πολυσακχαριτών. Παρά την εκτεταμένη χρήση τους σε ποικίλες εφαρμογές, πολλά είδη εκκρίνουν ωχρατοξίνες που προκαλούν σημαντικές απώλειες στη γεωργική παραγωγή.

Η ταξινόμηση των ειδών του γένους *Aspergillus* section *Nigri* παρουσιάζει ιδιαίτερα προβλήματα, επειδή τα είδη εμφανίζουν πολύ λεπτές διαφορές μεταξύ τους (Silva *et al.*, 2011). Η χρήση μοριακών τεχνικών αποκάλυψε πολλά κρυπτικά είδη που μέχρι τώρα θεωρούνταν ότι ανήκουν σε ήδη χαρακτηρισμένα είδη. Η σύγκριση της ITS περιοχής του ριβοσώματος μπορεί να διακρίνει μόνο τα είδη με μία ή δύο σειρές φιαλιδίων στην κεφαλή. Αντιθέτως, συγκρίνοντας τις αλληλουχίες των γονιδίων που κωδικοποιούν για τη β-τουμπουλίνη διαχωρίζονται όλα πλην ενός, ενώ με σύγκριση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την καλμοδουλίνη επιτυγχάνεται πλήρης διαχωρισμός των ειδών της ομάδας αυτής. Ο *Aspergillus tubinngensis* ανήκει στην ομάδα αυτή και για τον πλήρη χαρακτηρισμό του απαιτείται ανάπτυξη του στελέχους σε διαφορετικά υποστρώματα, μικροσκοπική παρατήρηση, βιοχημικές αναλύσεις των δευτερογενών μεταβολιτών του και μοριακή ανάλυση. Είναι είδος αρκετά συγγενικό με τα *A. piperis*, *A. costaricanensis*, *A. foetidus*, ενώ βρίσκεται πολύ κοντά με το πλέον μελετημένο είδος της ομάδας αυτής, το *Aspergillus niger* (Samson *et al.*, 2007).

Ο *Aspergillus flavus* είναι από τα πλέον άφθονα και ευρέως διασπαρμένα είδη μυκήτων στο έδαφος. Οι αφλατοξίνες που παράγει είναι από τις πιο καρκινογόνες ουσίες που παράγονται στη φύση (Jelinek *et al.*, 1989). Μέχρι στιγμής έχουν χαρακτηριστεί 29 γονίδια που εμπλέκονται στην παραγωγή αφλατοξινών. Είναι σαπροτροφικό είδος, ικανό να αναπτυχθεί σε ετερογενή οργανικά υποστρώματα, όπως φυτικά υπολείμματα, φύλλα δένδρων, σηπόμενο ξύλο, βαμβάκι, σωρούς κόμποστ, νεκρά έντομα και ζώα, αποθηκευμένους καρπούς, ακόμα και σε ανθρώπους και ζώα με εξασθετισμένο ανοσοποιητικό σύστημα (Klich, 1998). Γενικά είναι μεσόφιλο είδος, που όμως μπορεί να αναπτυχθεί εξίσου καλά και σε υψηλότερες θερμοκρασίες, γεγονός που συμβάλει στην παθογένειά του σε θερμόαιμους οργανισμούς. Σε φυσιολογικές συνθήκες απαντάται υπό τη μορφή μυκηλίου που σχηματίζει αγενή σπόρια. Αν όμως υπάρξει κάποια περιβαλλοντική καταπόνηση, μπορεί και σχηματίζει ανθεκτικές δομές, τα σκληρώτια. Είναι το δεύτερο σε σειρά υπεύθυνο είδος για τα κρούσματα ασπεργίλλωσης, μετά τον *Aspergillus fumigatus* (Denning *et al.*, 1991, Denning, 1998). Επίσης ευκαιριακά μολύνει και τα φυτά, με αποτέλεσμα να προκαλεί σημαντικές απώλειες στη γεωργική παραγωγή. Οι αφλατοξίνες που παράγει μπορούν να αλλοιώσουν την αποθηκευμένη σοδειά, αυξάνοντας τις επιπτώσεις του στον αγροτικό τομέα (St. Leger *et al.*, 2000). Είναι είδος συγγενικό με τον *Aspergillus parasiticus*, που επίσης παράγει αφλατοξίνες. Η αφλατοξίνη B1 είναι η πιο τοξική και περισσότερο καρκινογόνος. Το 1960, στην Αγγλία, 100.000 γαλοπούλες πέθαναν σε εκτροφεία επειδή οι ζωοτροφή που τους δόθηκε ήταν μολυσμένη με *Aspergillus flavus* (Allcroft *et al.*, 1961, Lancaster *et al.*, 1961). Ο *Aspergillus flavus* είναι επίσης συγγενικό είδος με το μη παθογόνο *Aspergillus oryzae* στο οποίο έχει δοθεί ο χαρακτηρισμός GRAS και χρησιμοποιείται σε πολλές διαδικασίες ζύμωσης στη βιομηχανία τροφίμων (Amaiike & Keller, 2011, Yu *et al.*, 2011). Το μέγεθος των γονιδιωμάτων τους είναι 36,8 και 36,7Mb αντίστοιχα, και είναι κατά 98% όμοια. Συγκεκριμένα, περισσότερο από το 95% των χαρακτηρισμένων γονιδίων είναι όμοια στα δύο είδη, με μόνο 319 μοναδικά γονίδια για το *Aspergillus flavus* και 420 για το *Aspergillus oryzae* (Payne *et al.*, 2006).

Η ταυτοποίηση των ειδών του γένους *Aspergillus* παροδιασιακά βασιζόταν στα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά της αποικίας που έχει καλλιεργηθεί σε ένα θρεπτικό υπόστρωμα, καθώς και στη μελέτη των χαρακτηριστικών στο μικροσκόπιο. Εντούτοις, μπορεί να απαιτείται πολύς χρόνος ή καλλιέργεια σε ειδικά υποστρώματα για το σχηματισμό των ειδικών χαρακτηριστικών (π.χ. αναπαραγωγικές δομές, έκκριση χρωστικών) στα οποία βασίζεται η ταυτοποίηση, και ενδεχομένως, εξαιτίας διαφόρων παραγόντων από τους οποίους επηρεάζονται, να μην υπάρξουν και ποτέ αυτά. Επομένως, η ύπαρξη γρήγορων μεθόδων που βασίζονται στην αλληλούχιση του DNA είναι πολύτιμη για την αναγνώριση των ειδών του γένους (Hinrikson *et al.*, 2005). Ο ρόλος της γονιδιωματικής προς αυτή την κατεύθυνση είναι πολύ σημαντικός. Η διαθεσιμότητα αλληλουχιών από διάφορα είδη του γένους επιτρέπει την ανάλυση των ειδών σε επίπεδο ολόκληρου γονιδιώματος και τις συγκρίσεις σε δια- και ενδο- ειδικό επίπεδο για την αποκάλυψη της ποικιλομορφίας των ειδών. Οι συγκρίσεις μεταξύ των ειδών *Aspergillus flavus* και *Aspergillus oryzae* είναι αξιοσημείωτες και όμοιες με αυτές από τη σύγκριση μεταξύ στελεχών του *Aspergillus fumigatus*, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο *Aspergillus oryzae* αποτελεί ένα διακριτό οικότυπο του *Aspergillus flavus* και όχι ένα ξεχωριστό είδος. Αυτό αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα που δείχνει ότι η γονιδιωματική μπορεί να επιλύσει τα ταξινομικά προβλήματα του γένους, λειτουργώντας ως πηγή νέων συγκριτικών δεδομένων, αλλά και ως ένα μέσο για την ανάπτυξη επιπρόσθετων διαγνωστικών εργαλείων.

Το 1965 που περιγράφηκε το γένος *Aspergillus* στη μονογραφία των Raper και Fennell, περιελάμβανε 165 είδη, κατανεμημένα σε 18 διαφορετικές ομάδες (sections), τα οποία έχουν περιγραφεί με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. Η αναγνώριση, όμως, των πιο κοινών και σημαντικών ειδών είναι συχνά προβληματική, εξαιτίας της μεγάλης διακύμανσης των μορφολογικών χαρακτήρων. Ως εκ τούτου, από τότε έχουν γίνει πολλές αναθεωρήσεις και τα τελευταία χρόνια έχουν περιγραφεί περισσότερα είδη - περισσότερα από 260 είδη (Samson *et al.*, 2009) - και έχουν αναπτυχθεί νέες μέθοδοι για την ταξινόμηση και ταυτοποίηση των στελεχών. Πολλά είδη μπορούν να διαχωριστούν μεταξύ τους με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, άλλα είδη, όμως, όπως τα είδη που μοιάζουν με το είδος *A. niger*, όχι. Παρόλα αυτά οι πληροφορίες από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά είναι ακόμα χρήσιμες και ο συνδυασμός τους με τις σύγχρονες μοριακές και αναλυτικές μεθόδους έχουν εισάγει την έννοια της πολυφασικής ταξινόμησης που συνδυάζει τους μορφολογικούς χαρακτήρες και την αλληλούχιση του DNA και βασίζεται στην αρχή ότι τα χαρακτηριστικά της μορφολογίας και φυσιολογίας είναι εξίσου σημαντικά με τα μοριακά δεδομένα (Samson *et al.*, 2006) και συμβάλλει στην επίλυση των ταξινομικών προβλημάτων.

1.11 Σκοπός της μεταπτυχιακής εργασίας

Η παρούσα μελέτη είχε ως σκοπό τη μελέτη των φυσικο-χημικών παραμέτρων και της μικροβιακής ποικιλότητας και διαδοχής κατά τη διαδικασία της συγκομποστοποίησης αγροτοβιομηχανικών προϊόντων. Παρασκευάστηκε, λοιπόν, ένας σωρός από ΥΑΕ και ΥΕΒ. Πραγματοποιήθηκαν φυσικο-χημικές αναλύσεις, ενώ για τη μελέτη των πληθυσμών των μικροοργανισμών, χρησιμοποιήθηκαν κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν μοριακές τεχνικές για την ταυτοποίηση ορισμένων στελεχών μυκήτων που απομονώθηκαν από διαφορετικές φάσεις της διαδικασίας της κομποστοποίησης. Η μελέτη διεξήχθη στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υποστρώματα Κομποστοποίησης

Στην παρούσα εργασία για τη μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας και των φυσικο-χημικών παραμέτρων κατά συγκομποστοποίηση αγροτοβιομηχανικών προϊόντων, δημιουργήθηκε ένας σωρός που περιείχε ως υπόστρωμα Υπολείμματα Εκκοκκιστηρίου Βάμβακος (ΥΕΒ) και Υγρά Απόβλητα Ελαιουργείας (ΥΑΕ). Τα ΥΕΒ προέρχονταν από Εκκοκκιστήριο Βάμβακος που βρίσκεται στη Θήβα και τα ΥΑΕ από το ελαιοτριβείο «Μεσογειακοί Ελαιώνες» που βρίσκεται στην Παιανία, Αττικής και παράγει ελαιόλαδο από ελιές ποικιλίας «Κορωνέικη».

2.2 Διαδικασία Παρασκευής Κομποστοσωρού

Για την παρασκευή του σωρού χρησιμοποιήθηκαν 70kg ΥΕΒ, τα οποία διαβρέχτηκαν με 210l ΥΑΕ, τα οποία προηγουμένως διηθήθηκαν για την απομάκρυνση των στερεών υπολειμμάτων. Παράλληλα με τη διαβροχή του υποστρώματος, έγινε ανάμιξη με τη χρήση κατάλληλων εργαλείων.

Ο σωρός τοποθετήθηκε σε κάδο κομποστοποίησης, διαστάσεων 80x80x90cm, στη διάτρητη βάση του οποίου τοποθετήθηκε πλέγμα, ενώ στα τοιχώματά του τοποθετήθηκε μονωτικό υλικό. Ο αερισμός του σωρού γινόταν μέσω παθητικής διάχυσης από τη βάση του κάδου και από ένα διάτρητο δικτυωτό πλέγμα σε μορφή σωλήνα που τοποθετήθηκε κάθετα στο κέντρο του, ώστε να διευκολύνεται η διάχυση του οξυγόνου σε όλη τη μάζα του σωρού.

Οι χειρισμοί που πραγματοποιήθηκαν καθόλη τη διάρκεια του πειράματος περιλαμβάνουν τα εξής:

- ομοιόμορφη διαβροχή των ΥΕΒ με τα ΥΑΕ για την παρασκευή σωρού (Εικόνα 8),
- γύρισμα, ανάμιξη και διαβροχή του υλικού του σωρού με νερό (200l) σε προκαθορισμένη χρονική στιγμή, για τον αερισμό του στο εσωτερικό (Εικόνα 9),
- δειγματοληψίες σε τέσσερις φάσεις της διαδικασίας,
- μέτρηση της θερμοκρασίας σε καθημερινή βάση.

Η παρασκευή του σωρού έλαβε χώρα στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.



Εικόνα 8: YEB πριν και μετά τη διαβροχή με τα YAE.



Εικόνα 9: Σωρός μετά το γύρισμα-διαβροχή.

2.3 Δειγματοληψίες

Κατά τη διάρκεια του πειράματος, πραγματοποιήθηκαν συνολικά τέσσερις δειγματοληψίες, σε τέσσερις διαφορετικές φάσεις της διαδικασίας κομποστοποίησης, ως εξής:

- 1) στην αρχή της διαδικασίας, αμέσως μετά τη διαβροχή και ανάμιξη του στερεού υποστρώματος με τα YAE.
- 2) στην πρώτη θερμοφιλή φάση.
- 3) μετά την πτώση της θερμοκρασίας (πριν την αναμόχλευση και τη δεύτερη διαβροχή του σωρού με νερό).
- 4) στη δεύτερη θερμοφιλή φάση.

Αναλυτικά, οι ημερομηνίες των δειγματοληψιών παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Ημερολόγιο δειγματοληψιών.

α/α	Ημερομηνία δειγματοληψίας	Χρόνος κομποστοποίησης (ημέρες)	Παρατηρήσεις
1	20/01/2011	0	Παρασκευή σωρού
2	26/01/2011	6	1η θερμοφιλή φάση
3	23/03/2011	62	Αναμόχλευση και διαβροχή
4	29/03/2011	68	2η θερμοφιλή φάση

Αμέσως μετά τη δειγματοληψία, πραγματοποιούνταν οι εργαστηριακές μετρήσεις και αναλύσεις που θα περιγραφούν παρακάτω. Ιδιαίτερα κατά τις δειγματοληψίες στη θερμοφιλή φάση, τα δείγματα διατηρούνταν στις αντίστοιχες θερμοκρασίες που είχε ο σωρός.

2.4 Αναλύσεις φυσικών και χημικών παραμέτρων

2.4.1 Θερμοκρασία

Η μέτρηση της θερμοκρασίας του σωρού έγινε με τη χρήση συμβατικού θερμομέτρου. Το θερμομέτρο τοποθετούταν κάθετα μέχρι τη μέση του σωρού και καταγραφόταν η τιμή της θερμοκρασίας μετά από 15 λεπτά. Ταυτόχρονα, καταγραφόταν η τιμή της θερμοκρασίας του περιβάλλοντα χώρου (θερμοκρασία εντός του θερμοκηπίου). Οι μετρήσεις γίνονταν τακτικά, σχεδόν σε καθημερινή βάση.

2.4.2 Υγρασία

Η υγρασία κάθε δείγματος προσδιορίστηκε ως επί τοις εκατό περιεκτικότητα (%), με βάση τη διαφορά βάρους μεταξύ νωπού και ξηρού δείγματος. Μετρήθηκε η απώλεια βάρους 30g νωπού δείγματος ύστερα από επώαση στους 60°C για 48 ώρες.

2.4.3 pH και Ηλεκτρική Αγωγιμότητα (Electrical Conductivity, EC)

Η ηλεκτρική αγωγιμότητα εκφράζει την ευκολία με την οποία το ηλεκτρικό ρεύμα διέρχεται από κάποιο αντικείμενο και αποτελεί το δυαδικό μέγεθος της ηλεκτρικής αντίστασης. Η ικανότητα αυτή εξαρτάται από την παρουσία ιόντων, το σθένος τους, την κινητικότητα τους, τη συγκέντρωσή τους, τη θερμοκρασία, το ιξώδες του διαλύματος και το μέγεθος της διαφοράς δυναμικού με την οποία γίνεται η μέτρηση. Τα διαλύματα των περισσότερων ανόργανων οξέων και βάσεων και όλων των αλάτων είναι σχετικά καλοί αγωγοί του ρεύματος. Αντίθετα, τα μόρια των οργανικών ενώσεων,

που δεν δίστανται όταν διαλυθούν στο νερό, άγουν ελάχιστα ή καθόλου το ηλεκτρικό ρεύμα. Η μονάδα μέτρησής της είναι το Siemens ανά μέτρο.

Το pH και η ηλεκτρική αγωγιμότητα προσδιορίστηκαν σε υδατικό διάλυμα με αναλογία 1:5. Σε γυάλινη φιάλη προστέθηκαν 40gr δείγματος και 200ml απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο για 90 λεπτά, στους 20°C και στις 150rev/min. Στη συνέχεια, 50ml διαλύματος φυγοκεντρήθηκαν στις 1500rpm / 5min και το υγρό κλάσμα διηθήθηκε υπό κενό. Στο διήθημα μετρήθηκε το pH με τη χρήση ηλεκτρονικού πεχαμέτρου και η ηλεκτρική αγωγιμότητα με τη χρήση ψηφιακού αγωγιμόμετρου.

2.4.4 Νιτρικό Άζωτο (N-NO₃⁻)

Ο προσδιορισμός του νιτρικού αζώτου έγινε με τη μέθοδο του καδμίου. Η μέθοδος βασίζεται στην αναγωγή των νιτρικών στο εκχύλισμα δείγματος σε νιτρώδη μετά τη διέλευση του εκχυλίσματος από στήλη επιχαλκωμένου καδμίου παρουσία NH₄Cl και pH 5-10. Τα νιτρώδη προσδιορίζονται χρωματογραφικά, μετρώντας την ένταση του αζω-χρωμοφόρου, που είναι ανάλογη της ποσότητας των νιτρικών που υπήρχαν στο δείγμα και η οποία προέκυψε από την προσθήκη σουλφανιλαμίνης, που αντιδρά με τα νιτρώδη και N-1-ναφθυλαιθυλενοδιαμίνης (N-(1-naphthyl)-ethylenediamine).

Εκχύλιση δείγματος: Ποσότητα δείγματος κόμποστ που αντιστοιχεί σε 10gr ξηρού δείγματος προστίθεται σε 100ml διαλύματος KCl 2M. Το διάλυμα αναδεύεται για 60min σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο και στη συνέχεια, μια ποσότητα από το υγρό κλάσμα του διαλύματος, φυγοκεντρείται έως ότου το υπερκείμενο γίνει διαυγές. Έπειτα το υπερκείμενο διηθείται και φυλάσσεται στο ψυγείο.

Προετοιμασία αναγωγικής στήλης: Χρησιμοποιούνται προχοϊδες που φέρουν επιχαλκωμένο κάδμιο ως 20cm και έχουν πληρωθεί με αραιό διάλυμα NH₄Cl ως 1cm πάνω από τη στήλη του καδμίου. Πριν τη χρήση, προστίθεται 1ml πυκνού NH₄Cl και η στάθμη του υγρού στην προχοϊδα χαμηλώνεται έως το ύψος του καδμίου και προστίθεται αραιό NH₄Cl μέχρι το στόμιο της προχοϊδας.

Ανάλυση εκχυλίσματος: Η στάθμη του αραιού NH₄Cl αφήνεται να χαμηλώσει, μέχρι να καλύψει την κορυφή της στήλης του καδμίου. Προστίθενται 1ml πυκνού NH₄Cl και 2-5ml από το εκχύλισμα. Το εκχύλισμα διέρχεται από τη στήλη και συλλέγεται σε ογκομετρική φιάλη. Προστίθεται συνεχώς αραιό διάλυμα NH₄Cl, μέχρι να συλλεχθούν 90ml εκχυλίσματος. Στην ογκομετρική φιάλη προστίθενται 2ml αντιδραστηρίου διαζωτικού και μετά από 5min 2ml αντιδραστηρίου σύζευξης. Μετά από 20min μετράται η ένταση του χρώματος (mg N-NO₃⁻/ml διαλύματος) σε φασματοφωτόμετρο UV στα 540nm.

Υπολογισμός:

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

όπου bI = η ένδειξη του μάρτυρα (χρήση μόνο των αντιδραστηρίων) και

R = η ένδειξη των δειγμάτων

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

όπου V1 = όγκος του εκχυλιστικού (ml KCl)

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

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

a = αραίωση (αν απαιτείται)

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

2.4.5 Αμμωνιακό Άζωτο (NH₄⁺-N)

Ο προσδιορισμός του αμμωνιακού αζώτου έγινε με τη μέθοδο της ινδοφαινόλης. Εκχύλιση δείγματος με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω, και προσθήκη 5ml εκχυλισματος σε ογκομετρική φιάλη. Στη συνέχεια, προστίθενται 2ml διαλύματος EDTA και το διάλυμα αναδεύεται. Μετά από 1min προστίθενται 4ml διαλύματος phenol-nitroprusside και 8ml διαλύματος υποχλωριώδους νατρίου. Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι τη χαραγή και ανάμιξη. Μετά από μία ώρα το διάλυμα αποκτά μπλε χρώμα. Η οπτική πυκνότητα του δείγματος φωτομετράται στα 636nm με τη χρήση φασματοφωτομέτρου.

Υπολογισμός:

$$C_{\text{καμπ}} = (bl - R) / 145,3 \text{ (}\mu\text{g / ml)},$$

όπου bl = η ένδειξη του μάρτυρα (χρήση μόνο των αντιδραστηρίων) και

R = η ένδειξη των δειγμάτων

$$C_{\text{NH}_4^+\text{-N}} [\text{ppm (}\mu\text{g / g ξηρού βάρους)}] = C_{\text{καμπ}} * V1(\text{ml}) * V3(\text{ml}) * a / V2(\text{ml}) * B \text{ (g)}$$

όπου V1 = όγκος του εκχυλιστικού (ml KCl)

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

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

a = αραίωση (αν απαιτείται)

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

2.4.6 Ολικό Άζωτο

Ο προσδιορισμός του ολικού αζώτου έγινε με τη μέθοδο Kjeldahl. Ως ολικό άζωτο θεωρείται το άθροισμα του ολικού οργανικού αζώτου κατά Kjeldahl (οργανικό άζωτο και αμμωνία), καθώς και οι ανόργανες μορφές αζώτου που περιέχονται στο δείγμα (άζωτο νιτρικών ιόντων και άζωτο νιτρωδών ιόντων).

Η μέθοδος περιλαμβάνει δύο στάδια: **α) στάδιο καύσης ή πέψης:** πέψη της οργανικής ουσίας με πυκνό και θερμό H₂SO₄, παρουσία καταλύτη CuSO₄/TiO₂, με

σκοπό τη μετατροπή του οργανικού αζώτου σε ανόργανο, υπό μορφή $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ και **β) στάδιο απόσταξης:** προσδιορισμός της NH_3 που παράγεται, από την αναγωγή των αμμωνιακών ιόντων παρουσία πυκνού διαλύματος αλκάλεως. Η παραγόμενη αμμωνία αποστάζεται και επαναδευσμεύεται ως αμμωνιακά ιόντα σε διάλυμα οξέως γνωστού όγκου και τίτλου. Η περίσσεια του θειϊκού οξέος τιτλοδοτείται με διάλυμα βάσεως και από την τιτλοδότηση υπολογίζεται η ποσότητα της NH_3 που έχει δεσμευθεί από το διάλυμα του θειϊκού οξέος, και άρα η ποσότητα του αζώτου στο δείγμα.

Για το πρώτο στάδιο, προστίθενται 0.5gr ξηρού δείγματος σε ειδικές φιάλες καύσης Kjeldahl και 20ml διαλύματος H_2SO_4 και σαλικυλικού. Έπειτα, προστίθενται 1gr $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ και μία ταμπλέτα σεληνίου. Οι φιάλες τοποθετούνται στη συσκευή χώνευσης Buchi και η χώνευση προχωράει έως ότου το διάλυμα καταστεί διαυγές (ελαφρώς πράσινο χρώμα).

Για το δεύτερο στάδιο, προστίθενται 30ml νερού και 130ml NaOH 8N στο διάλυμα που παραλαμβάνεται από την καύση και αφού έχει κρυώσει. Παράλληλα, σε κωνική φιάλη προστίθενται 100ml βορικού οξέος 20% για την παραλαβή της αμμωνίας. Οι φιάλες τοποθετούνται στη συσκευή απόσταξης Buchi για 3min. Σε κάθε φιάλη προστίθεται ο δείκτης και η αμμωνία τιτλοδοτείται με 0,5N NaOH.

Υπολογισμός:

$$\text{N\%} = \frac{[(\text{ml HCl για κάθε δείγμα} - 0.2) \cdot 0.05 \cdot 14 \cdot 100]}{(\text{βάρος δείγματος} \cdot 1000)}.$$

2.5 Μικροβιολογικές αναλύσεις

2.5.1 Παρασκευή θρεπτικών υλικών και προετοιμασία τρυβλίων

Η σύσταση των θρεπτικών υλικών που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις μικροβιολογικές αναλύσεις περιγράφεται παρακάτω.

Η παρασκευή τους γίνεται ως εξής: τα υλικά προστίθενται διαδοχικά σε κωνική φιάλη, τοποθετημένη πάνω σε ανακινούμενη θερμαινόμενη ή μη (ανάλογα με το θρεπτικό υλικό) πλάκα (stir plate) και αναδεύεται μέχρις ότου επιτευχθεί πλήρης διάλυση όλων των υλικών. Έπειτα, το μίγμα μεταφέρεται σε φιάλες, δοκιμαστικούς σωλήνες, σωλήνες universal κλπ. κατά περίπτωση, και αποστειρώνεται στο αυτόκαυτο. Το αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό αδειάζεται σε πλαστικά τρυβλία Petri εντός του θαλάμου νηματικής ροής (laminar flow hood). Αφού πήξει το υλικό, τα τρυβλία αποθηκεύονται.

2.5.2 Εκτίμηση του μεγέθους των μικροβιακών πληθυσμών

Για την αξιολόγηση του μικροβιακού πληθυσμού κατά την κομποστοποίηση εκτιμήθηκε το μέγεθος του πληθυσμού των: ολικών βακτηρίων, σποριογόνων

βακτηρίων, κυτταρινολυτικών βακτηρίων, ακτινομυκήτων και μυκήτων, με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων.

Η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων περιλαμβάνει τη δημιουργία εναιωρήματος με άγνωστο πληθυσμό μικροοργανισμών, συγκεκριμένης ποσότητας του προς ανάλυση δείγματος σε συγκεκριμένο όγκο αποστειρωμένου νερού ή θρεπτικού διαλύματος. Κατά τις διαδοχικές αραιώσεις το αρχικό εμβόλιο αραιώνεται σε μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων. Πραγματοποιούνται δεκαδικές αραιώσεις 1:10, 1:100, 1:1000 κ.ο.κ., όπως ακριβώς φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 10). Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, ύστερα από μια επιτυχή αραιώση θα περιέχεται μόνο το ένα δέκατο των μικροβιακών κυττάρων σε σχέση με το σωλήνα της αμέσως προηγούμενης αραιώσης. Στη συνέχεια, δείγματα από κάθε αραιώση εμβολιάζονται σε τρυβλία Petri με κατάλληλο θρεπτικό υλικό, όπου σχηματίζονται αποικίες, οι οποίες καταμετρούνται και έτσι υπολογίζεται ο πληθυσμός των μικροοργανισμών στο αρχικό δείγμα. Όλοι οι χειρισμοί γίνονται υπό ασηπτικές συνθήκες.

2.5.2.1 Διαδοχικές αραιώσεις

Σε κάθε δειγματοληψία, 10g νωπού δείγματος προστέθηκαν σε αποστειρωμένη φιάλη με 90ml διαλύματος Ringer. Το εναιώρημα ανακινήθηκε για 30min στις 300rev/min σε θάλαμο ανακίνησης (shaker). Μετά την καθίζηση των στερεών σωματιδίων του δείγματος, 1ml εναιωρήματος μεταφέρεται σε αποστειρωμένο φιαλίδιο τύπου universal που περιέχει 9ml διαλύματος Ringer. Η αραιώση αυτή λαμβάνεται ως 10^{-1} . Αφού γίνει καλή ανάδευση, 1ml εναιωρήματος από το πρώτο φιαλίδιο προστίθεται στο δεύτερο (αραίωση 10^{-2}) κ.ο.κ. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται έως την αραιώση 10^{-7} .

Η σύσταση του διαλύματος Ringer είναι η εξής: NaCl 9g/l, KCl 0.42g/l, CaCl₂ 0.48g/l, NaHCO₃ 0.2g/l, dH₂O 1l.

2.5.2.2 Εμβολιασμός σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα

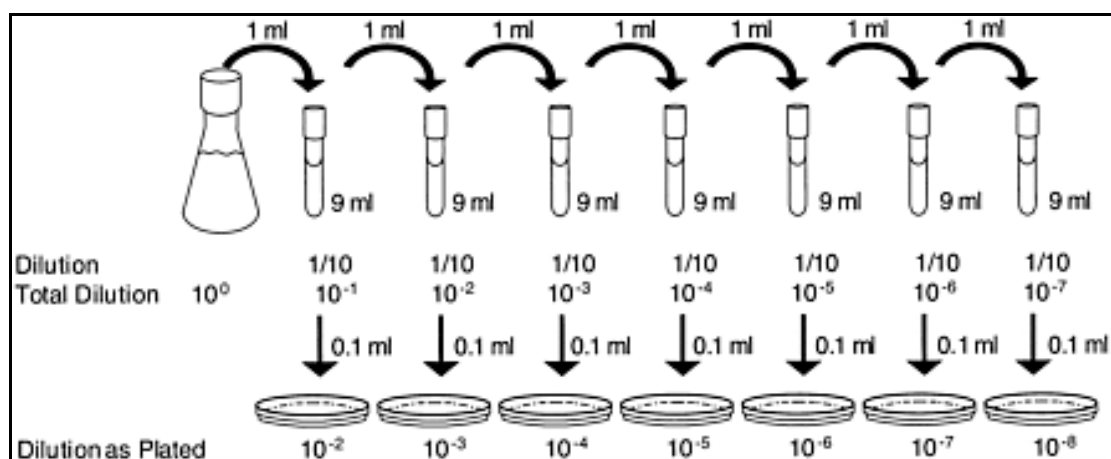
Ο εμβολιασμός έγινε με τη μέθοδο της διασποράς (plating) του εμβολίου σε τρυβλία με στερεοποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα. Από κάθε αραιώση, λήφθηκαν 100μl εναιωρήματος. Η διασπορά έγινε ομοιογενώς πάνω στο υλικό με τη χρήση αποστειρωμένης κεκαμένης γυάλινης ράβδου κατάλληλου σχήματος (διανομέας). Με αυτόν τον τρόπο διαχωρίζονται και απομακρύνονται τα κύτταρα μεταξύ τους, ώστε να αναπτυχθούν μεμονωμένες αποικίες. Τα τρυβλία επώαστηκαν σε κατάλληλο επωαστικό κλίβανο για 4 ημέρες στους 30°C, για την ανάπτυξη μεμονωμένων αποικιών. Εφόσον κάθε αποικία προέρχεται από ένα μοναδικό κύτταρο είναι δυνατόν καταμετρώντας τις αποικίες να υπολογισθεί το μέγεθος του μικροβιακού πληθυσμού. Επιπλέον, με αυτή τη μέθοδο είναι δυνατή η επιλογή μεμονωμένων αποικιών για την απομόνωσή τους σε καθαρή καλλιέργεια. Για την εκτίμηση του μεγέθους του πληθυσμού των διαφορετικών

ομάδων μικροοργανισμών, έγινε εμβολιασμός από 5 διαφορετικές διαδοχικές αραιώσεις. Από κάθε αραιώση εμβολιάσθηκαν 5 τρυβλία (επαναλήψεις) (Εικόνα 10).

α) Ολικά αερόβια βακτήρια

Για την καταμέτρηση και απομόνωση των ολικών βακτηρίων, έγινε εμβολιασμός σε θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar (NA) από τις αραιώσεις 10^{-4} - 10^{-8} .

Η σύσταση του NA είναι η εξής: Nutrient broth 8g/l, Agar 10g/l, dH₂O 1l.



Εικόνα 10: Η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων.

β) Σποριογόνα βακτήρια

Αφού έγινε η αρχική αραιώση (10^{-1}) η φιάλη επωάστηκε για 24 ώρες σε υδατόλουτρο στους 70°C. Για την καταμέτρηση και απομόνωση των σποριογόνων βακτηρίων, έγινε εμβολιασμός σε θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar (NA) από τις αραιώσεις 10^{-3} - 10^{-7} .

γ) Κυτταρινολυτικά βακτήρια

Για την καταμέτρηση και απομόνωση των κυτταρινολυτικών βακτηρίων, έγινε εμβολιασμός στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα CMC Agar (Carboxy-Methyl Cellulose Agar), με κυτταρίνη ως μοναδική πηγή άνθρακα, από τις αραιώσεις 10^{-4} - 10^{-8} . Η παρασκευή του υλικού γίνεται με ανάδευση των υλικών υπό θέρμανση.

Η σύσταση του CMC Agar είναι η εξής:

Carboxymethyl cellulose sodium salt 10g/l, l-asparagine 0.5g/l, yeast extract 0.5g/l, (NH₄)₂SO₄ 0.5g/l, K₃PO₄ 1g/l, KCl 0.5g/l, MgSO₄·7H₂O 0.2g/l, CaCl₂ 0.1g/l, Agar 18g/l, dH₂O 1l.

Μετά την επώαση των τρυβλίων και την ανάπτυξη αποικιών, προστίθεται σε αυτά διάλυμα ιωδίου, έτσι ώστε να καλυφθεί όλη η επιφάνεια του υποστρώματος. Μετά από 2-3 min παρατηρείται και μετράται η διαυγής ζώνη που έχει δημιουργηθεί γύρω από την αποικία των κυτταρινολυτικών ειδών. Οι αποικίες αυτές υδρολύουν την κυτταρίνη που υπάρχει στο υπόστρωμα και έτσι αυτό αποχρωματίζεται,

δημιουργώντας μια ζώνη, ενώ το υπόστρωμα που δεν έχει υδρολυθεί αποκτά διαφορετικό χρώμα.

δ) Αζωτοδεσμευτικά βακτήρια

Η εκτίμηση του πληθυσμού των ελεύθερα διαβιούντων αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων έγινε με τη μέθοδο του **πλέον πιθανού αριθμού** (Most Probable Number) (Alexander, 1965). Η μέθοδος αυτή αποτελεί μαθηματική προέκταση της βασικής μικροβιολογικής τεχνικής των διαδοχικών αραιώσεων και επιτρέπει τη στατιστική εκτίμηση της πυκνότητας ενός μικροβιακού πληθυσμού, με έμμεσο τρόπο, χωρίς να χρειάζεται δηλαδή άμεση καταμέτρηση κυττάρων ή αποικιών.

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για τους εμβολιασμούς ήταν το εκλεκτικό θρεπτικό διάλυμα Rennie (Rennie, 1980), το οποίο δεν περιέχει πηγή αζώτου και οι αραιώσεις 10^{-2} - 10^{-6} . Από κάθε αραιώση λήφθηκε 1ml εναιωρήματος και εμβολιάστηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 9ml διαλύματος Rennie.

Η σύσταση του Rennie είναι η εξής: K_2HPO_4 0,8g/l, KH_2PO_4 0,2g/l, NaCl 0,1g/l, Na_2Fe EDTA 28mg/l, $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$ 25mg/l, Yeast extract 100mg/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2g/l, $CaCl_2$ 0,06g/l, Μαννιτόλη 5g/l, Σακχαρόζη 5g/l, Γαλακτικό νάτριο 0,5ml (60% κ.ο.), βιοτίνη 5μg/l, PABA 5μg/l, dH_2O 1l, pH 7.0 (προσαρμογή με HCl).

Για κάθε αραιώση έγιναν εμβολιασμοί σε 5 δοκιμαστικούς σωλήνες και πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις. Οι σωλήνες επώαστηκαν για 7 ημέρες στους $30^\circ C$ ή και στους $50^\circ C$ όταν το δείγμα προερχόταν από τη θερμοφιλή φάση. Μετά την επώαση των 7 ημερών οι σωλήνες κλείστηκαν αεροστεγώς με αποστειρωμένα πώματα σιλικόνης και προστέθηκε σε αυτούς 1ml ακετυλένιο. Την επόμενη μέρα έγινε η δοκιμή ακετυλενίου (Hardy *et al.*, 1973). Η μέθοδος βασίζεται στην αναγωγή του ακετυλενίου σε αιθυλένιο, που καταλύεται από το ενζυμικό σύστημα της νιτρογενάσης που διαθέτουν οι αζωτοδεσμευτικοί μικροοργανισμοί. 1ml δείγματος από την αέρια φάση κάθε σωλήνα αναλύθηκε σε αέριο χρωματογράφο για να διαπιστωθεί η ύπαρξη αιθυλενίου. Ο αέριος χρωματογράφος ήταν τύπου Perkin – Elmer 8500 (GC) με ανιχνευτή φλόγας ιονισμού (FID), κολώνα χρωματογραφίας Poropak- R 2m και συνθήκες ανάλυσης: θερμοκρασία εισόδου $200^\circ C$, θερμοκρασία ανιχνευτή $200^\circ C$, θερμοκρασία φούρνου $60^\circ C$, φέρον αέριο He με ροή 20ml/min. Ως θετικοί λαμβάνονται οι σωλήνες στους οποίους ανιχνεύτηκε αιθυλένιο. Ο υπολογισμός του πληθυσμού των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων ανά g ξηρού βάρους κόμποστ σύμφωνα με τη μέθοδο του πλέον πιθανού αριθμού, βασίζεται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Σχηματική απεικόνιση του πίνακα των πλέον πιθανών αριθμών για δεκαδικές αραιώσεις και πέντε σωλήνες ανά αραιώση.

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

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

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

όπου: οι δείκτες 1,2,3 αντιστοιχούν στην πρώτη, δεύτερη και τρίτη αραιώση, τα a_1 , a_2 , a_3 είναι οι ποσότητες του αρχικού δείγματος στην ποσότητα του εμβολίου που χρησιμοποιήθηκε, τα n_1 , n_2 , n_3 οι αριθμοί των σωλήνων που εμβολιάστηκαν, τα p_1 , p_2 , p_3 οι σωλήνες με θετική ένδειξη και το x εκφράζει τον πλέον πιθανό αριθμό μικροοργανισμών που υπήρχε στην ποσότητα του εμβολίου που προστέθηκε στη μεσαία αραιώση. Πολλαπλασιάζοντας το x με τον συντελεστή αραιώσης έχουμε τον πλέον πιθανό αριθμό μικροοργανισμών στο αρχικό δείγμα.

ε) Ακτινομύκητες

Για την καταμέτρηση και απομόνωση των ακτινομυκήτων, έγινε εμβολιασμός στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Glycerol – Casein Agar (GCA) από τις αραιώσεις 10^{-3} - 10^{-7} .

Η σύσταση του GCA είναι η εξής:

Glycerol 10g/l, Casein Vitamin Free 0.3g/l, KNO₃ 2g/l, NaCl 2g/l, K₂HPO₄ 2g/l, MgSO₄·7H₂O 0.05g/l, CaCO₃ 0.02g/l, FeSO₄·7H₂O 0.01g/l, Agar 18g/l, Cycloheximide heat stable 50mg/l, dH₂O 1 , pH 7.0 (προσαρμογή με HCl).

στ) Μύκητες

Για την καταμέτρηση και απομόνωση των μυκήτων, έγινε εμβολιασμός σε θρεπτικό υπόστρωμα Potato Dextrose Agar (PDA) από τις αραιώσεις 10⁻²-10⁻⁶. Στο θρεπτικό υλικό προστέθηκε η χρωστική Rose Bengal πριν την αποστείρωση. Επίσης, μετά την αποστείρωση και αφού το υλικό είχε κρυώσει επαρκώς, προστέθηκε σε αυτό το αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη (1ml/l από αρχικό διάλυμα 0.03g/l).

Η σύσταση του PDA είναι η εξής:

Potato Dextrose Broth 24g/l, Rose bengal 33mg/l, Agar 18g/l, dH₂O 1l.

Απομόνωση σε καθαρή καλλιέργεια

Από τις αποικίες των μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία επιλέχτηκαν ορισμένες και απομονώθηκαν σε καθαρή καλλιέργεια σε τρυβλία με κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα, ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού. Καθαρές καλλιέργειες επιτεύχθηκαν με τη μέθοδο της γραμμικής διασποράς (streaking) σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την απομόνωση αερόβιων μικροοργανισμών (όχι όμως για νηματοειδείς, όπως οι μύκητες) και επιτρέπει την προοδευτική αραιώση του εμβολίου, ώστε τελικά να διαχωριστούν τα κύτταρα μεταξύ τους και καθένα να δώσει μια αποικία. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε για την απομόνωση των ολικών, σποριογόνων, κυτταρινολυτικών και αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων και ακτινομυκήτων. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 30°C. Για την απομόνωση των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, από τους θετικούς σωλήνες της δοκιμής του ακετυλενίου, εμβολιάστηκαν τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Rennie (με τη μέθοδο streaking). Οι μεμονωμένες αποικίες που προέκυψαν, ελέχθηκαν για την καθαρότητά τους και επαληθεύτηκε η αζωτοδεσμευτική τους ικανότητα (δοκιμή ακετυλενίου).

Στις αποικίες των βακτηρίων (ολικών, σποριογόνων, κυτταρινολυτικών, αζωτοδεσμευτικών) που απομονώθηκαν σε καθαρή καλλιέργεια έγινε καταγραφή της μορφολογίας της αποικίας στο στερεό υπόστρωμα και χρώση κατά Gram. Τα σποριογόνα βακτήρια υποβλήθηκαν σε χρώση του ενδοσπορίου (Schaeffer-Fulton spore stain method). Όλες οι καθαρές αποικίες διατηρήθηκαν σε διάλυμα γλυκερόλης 25% στους -80°C.

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

2.6 Αναλύσεις βιολογικών - βιοχημικών παραμέτρων

2.6.1 Έλεγχος δυνατότητας αζωτοδέσμευσης του κόμποστ

Η δυνατότητα αζωτοδέσμευσης ελέγχθηκε σε δείγματα κόμποστ αμέσως μετά τη δειγματοληψία. Συγκεκριμένα 10g δείγματος τοποθετήθηκαν σε σωλήνες τύπου universal, οι σωλήνες πωματίστηκαν και προστέθηκε σε αυτούς ακετυλένιο (συγκέντρωση 10%). Οι σωλήνες επωάστηκαν για 24 ώρες σε επωαστικό θάλαμο στους 30°C και στους 50°C (αν το δείγμα προερχόταν από τη θερμόφιλη φάση) και αμέσως μετά λήφθηκε 1ml από την αέρια φάση του σωλήνα για το τεστ του ακετυλενίου.

2.6.2 Εκτίμηση αναπνευστικής δραστηριότητας

Η αναπνευστική δραστηριότητα προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας μια παραλλαγή του ηλεκτρολυτικού αναπνευσσίμετρου των Birch & Friend (Manios & Balis, 1983, Εικόνα 11). Η μέθοδος βασίζεται στην ποσοτική αναπλήρωση του οξυγόνου που καταναλώνεται από το κόμποστ, με οξυγόνο που παράγεται ηλεκτρολυτικά. Η ποσότητα του καταναλισκόμενου οξυγόνου εκτιμάται από τον όγκο του υδρογόνου που παράγεται κατά την ηλεκτρόλυση, το οποίο μπορεί να συλλεχθεί και να ογκομετρηθεί.

50g δείγματος κόμποστ τοποθετείται σε σφαιρικές φιάλες και επωάζεται σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας 30°C και 50°C (αν το δείγμα προερχόταν από τη θερμόφιλη φάση). Η διάταξη του ηλεκτρολυτικού αναπνευσσίμετρου φαίνεται στην εικόνα.

Στο εσωτερικό της φιάλης τοποθετείται σωλινίσκος με 2ml διαλύματος KOH 4N και εντός αυτού, ένα κομμάτι διηθητικού χαρτιού, για αύξηση της επιφάνειας δέσμευσης του διαλύματος KOH και άρα η ικανότητα δέσμευσης CO₂. Η φιάλη σφραγίζεται με ειδικό πώμα που φέρει στρόφιγγα και σωλήνα που είναι συνδεδεμένος με το ηλεκτρόδιο έκλυσης οξυγόνου στο ποτήρι. Μέσα στο ποτήρι είναι τοποθετημένη μια ανεστραμμένη προχοΐδα συλλογής υδρογόνου, ενώ και τα δύο έχουν πληρωθεί με διάλυμα H₂SO₄ 0.2N. Στο άνοιγμα της προχοΐδας που βρίσκεται μέσα στο ποτήρι, υπάρχει προσαρμοσμένο το ηλεκτρόδιο παραγωγής υδρογόνου. Οι ακίδες Pt των ηλεκτροδίων συνδέονται με ηλεκτρική πηγή συνεχούς ρεύματος μέσω γεφυρών Hg. Το ηλεκτρόδιο του οξυγόνου, με τη στρόφιγγα της φιάλης ανοιχτή, κατεβάζεται μέχρι η ακίδα Pt να βυθιστεί στο διάλυμα του H₂SO₄ και τότε ξεκινά η ηλεκτρόλυση. Η στρόφιγγα κλείνει. Το ηλεκτρόδιο ανεβάζεται μέχρι να διακοπεί το ηλεκτρικό κύκλωμα. Η στιγμή αυτή θεωρείται ως χρονική στιγμή 0. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα καταγράφεται ο όγκος του υδρογόνου που συλλέγεται στην προχοΐδα. Οι όγκοι του υδρογόνου στην προχοΐδα επηρεάζονται από τη βαρομετρική πίεση B (mmHg), τη θερμοκρασία δωματίου (°C) και το ύψος του διαλύματος H₂SO₄ (cm). Επομένως, πρέπει να γίνουν οι απαραίτητες διορθώσεις, για την αναγωγή τους σε όγκους

κανονικών συνθηκών πίεσης και θερμοκρασίας (760 mmHg και 0°C). Οι διορθώσεις αυτές γίνονται εφαρμόζοντας τον παρακάτω τύπο:

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

όπου V_0 = διορθωμένος όγκος H_2 (760mmHg, 0°C)

V = όγκος H_2 στην προχοϊδα (ml) στο χρόνο t

B = βαρομετρική πίεση την στιγμή της ανάγνωσης του V

δ = τάση ατμών του διαλύματος 0.2 N H_2SO_4 (17mmHg)

h = ύψος της στήλης του H_2SO_4 στην προχοϊδα τη στιγμή της ανάγνωσης του V

q = πυκνότητα του διαλύματος 0.2N H_2SO_4 (1,012g/cm³)

d = πυκνότητα Hg (13.596g/cm³)

P_0 = κανονική ατμοσφαιρική πίεση (760mm Hg)

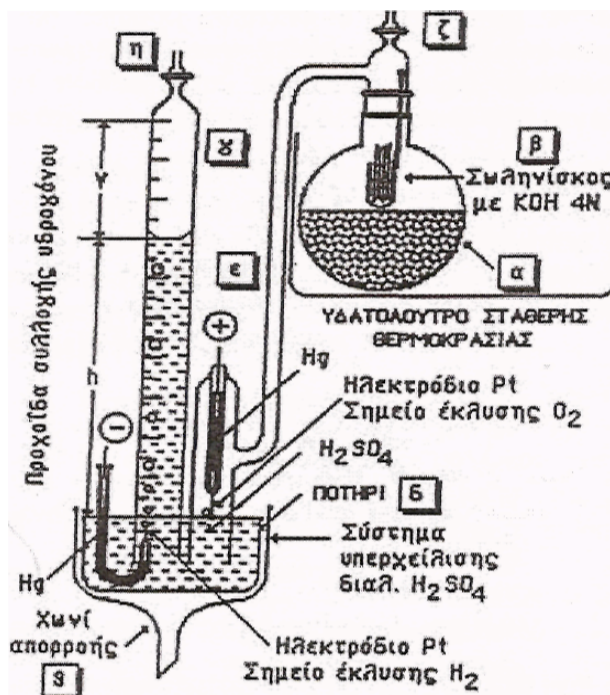
α = 1/273 = 0.00367

θ = θερμοκρασία του χώρου τη στιγμή της ανάγνωσης του V

Επομένως, ο τύπος αναπροσαρμόζεται ως εξής:

$$V_0 = [(B-17-0,7815x)(50-x)] / [760*(1+0.00367\theta)]$$

όπου x είναι η ανάγνωση της στήλης στο ύψος του μηνίσκου στην προχοϊδα.



Εικόνα 11: Ηλεκτρολυτικό αναπνευσίμετρο.

2.7 Ταξινομική μελέτη στελεχών μυκήτων

Τα στελέχη μυκήτων που απομονώθηκαν, αναγνωρίστηκαν σε επίπεδο γένους με μακροσκοπική παρατήρηση της αποικίας στο στερεοσκόπιο και με παρατήρηση σε διοφθάλμιο φωτονικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση μέχρι 1000x),

φτιάχνοντας παρασκεύασμα με τη χρήση της φλοξίνης, που χρωματίζει το κυτταρόπλασμα και διευκολύνει την παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Τα χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν ήταν:

α) τα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά της αποικίας όπως το χρώμα της άνω και κάτω επιφάνειας της αποικίας, η παραγωγή μεταβολιτών και η διάχυση ή μη στο θρεπτικό υπόστρωμα, η επιφάνεια, η μορφολογία, η υφή, το χρώμα και το πάχος ανάπτυξης της αποικίας και

β) τα μικροσκοπικά χαρακτηριστικά της αποικίας, όπως το σχήμα, το χρώμα, η διάταξη των αναπαραγωγικών δομών, όπως π.χ. των σπορίων, των κλειστοθηκίων, τα κονιδιογόνα κύτταρα, η μορφολογία των υφών κ.ά.

2.8 Ταυτοποίηση στελεχών με τη χρήση μοριακών τεχνικών

2.8.1 Επιλογή στελεχών μικήτων για ταυτοποίηση

Από τα στελέχη μικήτων που απομονώθηκαν από τις 4 φάσεις της κομποστοποίησης, επιλέχτηκαν 3 στελέχη που ανήκαν στο γένος *Aspergillus* και παρουσίαζαν ορισμένες διαφορές μεταξύ τους, ως προς τα ταξινομικά χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν (Πίνακας 8).

Πίνακας 8: Στελέχη μικήτων που ταυτοποιήθηκαν.

α/α	Κωδικός στελέχους	Περιγραφή
1	K1As1	1η δειγματοληψία - Παρασκευή σωρού Αραίωση: 10^{-6} (γ)
2	K3As4	3η δειγματοληψία - Γύρισμα και διαβροχή Αραίωση: 10^{-5} (β)
3	K4As8	4η δειγματοληψία - 2η θερμοφιλή φάση Αραίωση: 10^{-2} (α)

2.8.2 Απομόνωση ολικού γενετικού υλικού (DNA)

2.8.2.1 Συλλογή καλλιέργειας

Τα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό PDA. Ένα τμήμα της αποικίας αφαιρέθηκε με αποστειρωμένη ανατομική βελόνα και προστέθηκε σε φιάλη που περιείχε υγρό θρεπτικό υλικό Potato Dextrose Broth. Οι φιάλες επώαστηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο για 3 ημέρες στους 30°C στις 100rev/min. Το μυκήλιο αναπτύσσεται με τη μορφή pellet στην υγρή καλλιέργεια, η οποία συλλέχθηκε με τη χρήση αντλίας κενού και φίλτρων μικροπορώδους, αφού πρώτα ξεπλύθηκε με ddH₂O. Έπειτα, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους -80°C , οπότε το περιεχόμενο σε αυτά νερό

παγώνει και ξηράνθηκαν με τη διαδικασία της κρυοξήρανσης ή λυοφιλίωσης (freeze-drying). Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση DNA.

2.8.2.2 Απομόνωση DNA (genomic extraction)

Για την απομόνωση του γενετικού υλικού χρησιμοποιήθηκε το kit Genomic DNA from plant tissue και η απομόνωση έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο (με ορισμένες διαφορές) (NucleoSpin Plant II, Macherey Nagel).

- Δείγμα πριν τη λύση των κυττάρων

Σε erppendorf προστέθηκαν 50mg δείγματος και αιθανόλη (πλήρωση). Ακολούθησε καλή ανάδευση στο vortex και το δείγμα επώαστηκε στους -20°C (overnight). Την επόμενη μέρα το δείγμα αναδεύεται καλά στο vortex και φυγοκεντρείται στις 13.000rpm για 1min, για την καθίζηση του DNA και την αιώρηση της αιθανόλης. Ακολούθως αφαιρείται η υπερκείμενη αιθανόλη.

- Λύση

Προσθήκη 140-160mg sea sand, 200μl διαλύματος P11, καλή ανάδευση και ομογενοποίηση με τη χρήση εμβόλου. Προσθήκη 100μl διαλύματος P11, ομογενοποίηση με το έμβολο και καλή ανάδευση. Επώαση στους 65°C για 30min. Προσθήκη 100μl χλωροφορμίου, ανάδευση για 10sec και φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 20min.

- Φιλτράρισμα

Τοποθέτηση στήλης στο σωλήνα συλλογής και μεταφορά του υπερκείμενου στη στήλη. Φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 2min.

- Ρύθμιση συνθηκών δέσμωσης DNA

Προσθήκη 450μl διαλύματος PC, ανάδευση με πιπέτα και μεταφορά σε erppendorf.

- Δέσμωση DNA

Τοποθέτηση στήλης στο σωλήνα συλλογής και μεταφορά 700μl δείγματος. Φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 1min. Απόρριψη του διηθήματος και τοποθέτηση της στήλης σε νέο erppendorf.

- Ξέπλυμα και στέγνωμα της μεμβράνης

1^η πλύση: Προσθήκη 700μl διαλύματος PW2. Φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 1min. Απόρριψη του διηθήματος και επανατοποθέτηση της στήλης στο erppendorf.

2^η πλύση: Προσθήκη 200μl διαλύματος PW2. Φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 2min. Απόρριψη του διηθήματος και επανατοποθέτηση της στήλης στο erppendorf.

- Εκχύλιση DNA

Τοποθέτηση της στήλης σε νέο erpendorf και προσθήκη 50μl προθερμασμένου διαλύματος BE (65°C). Επώαση στο υδατόλουτρο 65°C για 5min. Φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 1min. Προσθήκη 50μl προθερμασμένου διαλύματος BE (65°C). Επώαση στο υδατόλουτρο 65°C για 5min. Φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 1min. Διατήρηση του δείγματος στους -20°C.

2.8.2.3 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊκών οξέων

Η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων (ng/μl) στο διάλυμα έκλουσης (Elution Buffer) προσδιορίστηκε φωτομετρώντας στα 260nm με τη χρήση σπεκτροφωτομέτρου (Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer). Ο λόγος της οπτικής πυκνότητας στα 260nm προς την οπτική πυκνότητα στα 280nm (OD_{260}/OD_{280}) προσδιορίζει την καθαρότητα του δείγματος. $OD_{260}/OD_{280} \geq 1.8$ σημαίνει ότι το δείγμα είναι καθαρό.

2.8.2.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Με τη μέθοδο της PCR ενισχύθηκαν δύο περιοχές του γενετικού υλικού των στελεχών με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών (primers). Ενισχύθηκε μια περιοχή του γονιδίου που κωδικοποιεί για το 18S rRNA, μήκους 746 ζεύγη βάσεων. Επίσης, ενισχύθηκε η ITS περιοχή του ριβοσωμικού DNA (rDNA) των μυκήτων, που το μήκος της κυμαίνεται από 565 έως 613 ζεύγη βάσεων. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι καταγεγραμμένες στον Πίνακα 9. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR χρησιμοποιήθηκε το kit DyNAzyme EXT DNA Polymerase (FINNZYMES).

Πίνακας 9: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του 18S rRNA και ITS.

Γονίδιο		Ονομασία	Νουκλεοτιδική Αλληλουχία (5' - 3')
18S rRNA	Forward	nu-SSU-0817	TTAGCATGGAATAATRRAATAGGA
	Reverse	nu-SSU-1563	ATTGCAATGCRCTATCCCCA
ITS	Forward	FungITS_F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	Reverse	FungITS_R	TCCTCCGCTTATTGATATGC

Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10: Συνθήκες πραγματοποίησης PCR (ίδιες και για τα δύο γονίδια).

Στάδιο	
Αρχική αποδιάταξη (initial denaturation)	94°C για 3min
Αποδιάταξη (denaturation)	94°C για 1min
Υβριδισμός εκκινητών* (annealing)	45°C για 1min
Επιμήκυνση (extention)	72°C για 1.30min
Τελική επιμήκυνση (final extention)	72°C για 10 min
Διατήρηση (hold)	4°C

Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια που παρουσιάζονται στον Πίνακα 11. Η συγκέντρωση του γενωμικού DNA που χρησιμοποιείται στην PCR πρέπει να είναι 50-60ng. Αναλόγως με την τιμή της συγκέντρωσης DNA που μετρήθηκε στο σπεκτροφωτόμετρο μετά την εκχύλιση του DNA, προσαρμόζεται η ποσότητα DNA που θα χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση καθώς και ο όγκος του ddH₂O.

Πίνακας 11: Αντιδραστήρια PCR και ποσότητες ανά αντίδραση.

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (μl)
10x PCR ρυθμιστικό διάλυμα (+MgCl ₂)	5
dNTPs (10 mM το καθένα)	1
Εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης (forward) (10 μM)	1
Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης (reverse) (10 μM)	1
DMSO	2
Ταq πολυμεράση (2U/μl)	0.5
ddH ₂ O (ανάλογα με τον τελικό όγκο)	38.5
Genomic DNA (50-60 ng)	1
Τελικός όγκος	50

2.8.2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Μετά την ενίσχυση των γονιδίων, τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης, με σκοπό την απομόνωση της ζώνης DNA που προέκυψε από την αντίδραση. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Η παρασκευή του έγινε ως εξής: 0.5g αγαρόζης προστέθηκαν σε 50ml διαλύματος TAE (1%). Το διάλυμα θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να είναι ομοιογενές. Στο διάλυμα, αφού κρυώσει, προστέθηκαν 5μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου (10mg/ml).

Το διάλυμα αναδεύτηκε και προστέθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης για να στεροποιηθεί. Έπειτα φορτώθηκαν 2μl χρωστικής φόρτωσης (loading dye), μικρή ποσότητα μοριακού μάρτυρα για να βρεθεί το μέγεθος που αντιστοιχεί σε κάθε ζώνη και μετά τα δείγματα. Με την παροχή τάσης (80V) από έναν προμηθευτή τάσεως, συσκευή τίθεται σε λειτουργία.

2.8.2.6 Απομόνωση και καθαρισμός ζώνης

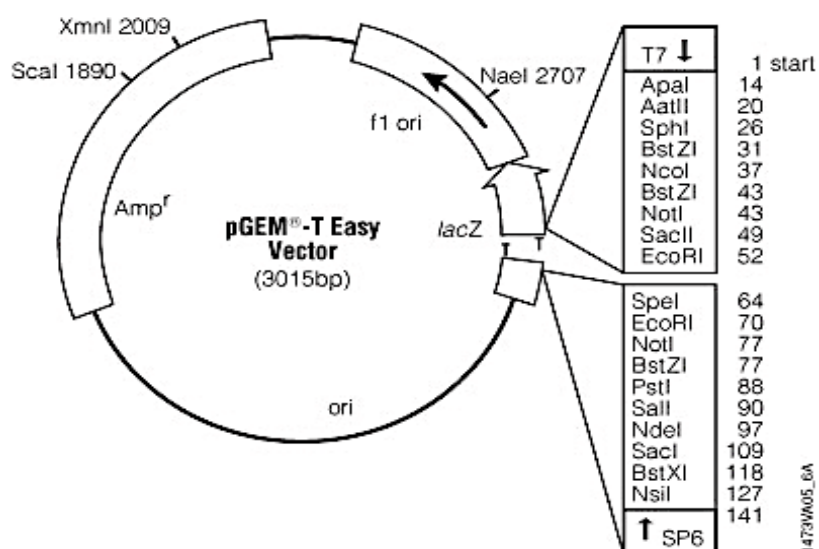
Σε μηχανήμα UV κόβονται οι ζώνες και προστίθενται σε eppendorf. Καταγράφεται το καθαρό βάρος κάθε ζώνης και έπειτα με τη χρήση του PCR clean-up Gel Extraction kit (Nucleospin Extract II- Macherey Nagel), γίνεται καθαρισμός του DNA από την αгарόζη, όπως ακριβώς περιγράφεται στο πρωτόκολλο.

2.8.2.7 Τεχνητή σύνδεση σε πλασμιδιακό φορέα (ligation)

Τα προϊόντα της PCR ενσωματώθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy (Promega) με την αντίδραση τεχνητής σύνδεσης (ligation). Ο φορέας αυτός είναι ευθυγραμμισμένος και φέρει μονόκλιωνα 3' άκρα με 2 βάσεις θυμίνης, που εμποδίζουν το πλασμίδιο να κυκλοποιηθεί, κάνοντας εύκολη την ενσωμάτωση του DNA που ενισχύθηκε με την PCR. Το πλασμίδιο διαθέτει τον υποκινητή *lac* και το γονίδιο *lacZ'* που κωδικοποιεί ένα λειτουργικό τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης (Εικόνα 12). Αν η ένθεση του DNA γίνει μέσα στο γονίδιο αυτό, και μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* με το πλασμίδιο αυτό αναπτυχθούν σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει τη χημική ένωση X-gal, τότε θα είναι δυνατή η επιλογή των ανασυνδυασμένων κλώνων βάσει χρώματος, αφού οι μη-ανασυνδυασμένοι κλώνοι θα υδρολύουν την X-gal, απελευθερώνοντας μια σχετικά αδιάλυτη κυανή χρωστική. Αυτές οι αποικίες είναι μπλε. Επίσης, ο φορέας φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι μόνο αναπτύσσονται σε θρεπτικό υπόστρωμα με αμπικιλίνη. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση ligation έχουν καταγραφεί στον Πίνακα 13. Στην αντίδραση η αναλογία των μορίων του φορέα προς των μορίων του DNA ένθεσης (insert) ήταν 1:3, ώστε κάθε φορέα να αντιστοιχούν 3 μόρια DNA και να εξασφαλιστεί η επιτυχής ενσωμάτωση. Επομένως, υπολογίστηκε η συγκέντρωση του DNA από τον εξής τύπο:

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

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με επώαση στους 4°C (overnight).



Εικόνα 12: Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης Pgem-T Easy (Promega).

Πίνακας 12: Αντιδραστήρια και ποσότητες ανά αντίδραση.

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (μl) για το K3As4	Όγκος ανά αντίδραση (μl) για τα K1As1, K4As8
Πλασμιδιακός φορέας	0.5	0.5
Ένζυμο T4 λιγάση (1U/μl)	0.5	0.5
2x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης	5	-
10x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης	-	2
PEG	-	1.2
ddH ₂ O (έως τελικό όγκο 10μl)	3	8.8
Ένθετο τμήμα DNA (Insert)	1	7
Total	10	20

2.8.2.8 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* (Transformation)

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό κυττάρων του στελέχους *E. coli* XI Blue. Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται δεκτικά (competent cells).

Παρασκευή δεκτικών κυττάρων:

Εμβολιασμός 5ml IB με δείγμα κυττάρων *E. coli* XI-Blue από στοκ γλυκερόλης και επώαση των κυττάρων στους 37°C (overnight).

Εμβολιασμός 1ml από την καλλιέργεια σε 50ml υγρού θρεπτικού υλικού LB (Lysogeny Broth) και επώαση στους 37°C για 2h ($OD_{600}=0.7$). Τοποθέτηση στον πάγο για 5 min και φυγοκέντρηση στις 4.500rpm για 15min στους 4°C.

Τοποθέτηση στον πάγο και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 50ml $CaCl_2$ 80mM.

Τοποθέτηση στον πάγο για 45min και φυγοκέντρηση στις 4.500rpm για 15min.

Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 5ml $CaCl_2$ 80mM και τοποθέτηση στον πάγο για 45min. Προσθήκη 15% γλυκερόλης (900μl glycerol στα 5ml κυττάρων).

Μεταφορά σε erpendorf (100μl) και επώαση στον πάγο μέχρι να γίνουν λευκά. Φύλαξη στους -80°C.

α) Μετασχηματισμός

Προσθήκη 100μl δεκτικών κυττάρων στο erpendorf που έγινε η αντίδραση ligation, ανάδευση και επώαση στον πάγο για 5min.

Τοποθέτηση στο υδατόλουτρο στους 42°C για 1min και 30sec ακριβώς, για να σπάσουν οι βακτηριακές μεμβράνες και να εισέλθουν τα πλασμίδια μέσα στα κύτταρα. Επώαση στον πάγο για 30sec.

Προσθήκη 200μl θρεπτικού υλικού LB και επώαση στο υδατόλουτρο στους 37°C για 1h.

Προσθήκη 50μl X-gal, η οποία υδρολύεται από τη β-γαλακτοσιδάση, παράγοντας μια ουσία μπλε χρώματος και 2μl IPTG (0.5M), που είναι επαγωγέας για την έκφραση της X-gal.

Διασπορά (plating) των κυττάρων σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB με αμπικιλίνη και επώασή τους σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C για 18 ώρες.

Η σύσταση του LB είναι η εξής:

Tryptone ή Peptone from casein 10g, NaCl 10g, yeast extract 5g, dH_2O 1l.

Οι αποικίες που θα αναπτυχθούν θα έχουν είτε λευκό χρώμα, αν ήταν επιτυχής ο ανασυνδυασμός των πλασμιδίων με το insert και η ενσωμάτωσή τους στα κύτταρα, επειδή η ένθεση του DNA έγινε μέσα στο γονίδιο που κωδικοποιεί για τη β-γαλακτοσιδάση είτε έχουν μπλε χρώμα, αν δεν έγινε επιτυχώς ο ανασυνδυασμός και ο μετασχηματισμός, οπότε η β-γαλακτοσιδάση παράγεται και υδρολύει την X-gal.

β) Επιλογή μοναδικής αποικίας

3 αποικίες επιλέγονται και καθεμία εμβολιάζεται σε universal που περιείχαν 5ml υγρό θρεπτικό υλικό LB και 5μl αμπικιλίνη και επωάζονται σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο (shaker) στους 37°C για 18 ώρες για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων.

2.8.2.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τα μετασχηματισμένα κύτταρα

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

α) Μέθοδος Βρασμού (Boiling Preparation)

Φυγοκέντρηση 1.5ml των μετασχηματισμένων κυττάρων που καλλιεργήθηκαν στο IB + αμπικιλίνη, στις 13.000rpm για 3min (3 φορές για κάθε δείγμα - 1 φορά για κάθε αποικία μετασχηματισμένων κυττάρων που επιλέχτηκε). Απόρριψη του υπερκείμενου.

Επαναδιάλυση της pellet των κυττάρων σε 150μl διαλύματος STET, παρουσία 2μl του ενζύμου λυσοζύμη (25mg/ml) και καλή ανακίνηση για την πλήρη διάλυση της pellet. Το δείγμα βράζεται για 45sec.

Φυγοκέντρηση για 20min στις 13.000rpm. Το ίζημα απομακρύνεται με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα. Το πλασμιδιακό DNA έχει μείνει στο υπερκείμενο, καθώς η λυσοζύμη προκάλεσε τη λύση των κυτταρικών μεμβρανών, οι πρωτεΐνες έχουν κατακρημνιστεί με το STET, με το βρασμό έχουν κροκιδωθεί και με τη φυγοκέντρηση κατακρημνίζονται, μαζί με τις αποδιαταγμένες μεμβράνες και το DNA πάνω σε αυτές.

Προσθήκη 180μl ισοπροπανόλης και ήπια ανάδευση. Φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 5min, για την κατακρήμιση του πλασμιδιακού DNA. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το erpendorf αφήνεται να στεγνώσει. Το ίζημα επαναδιαλύεται με την προσθήκη 20μl διαλύματος TE και με ανάδευση με την πιπέτα.

Πέψη του πλασμιδιακού DNA με την περιοριστική ενδονουκλεάση (EcoRI) και επώαση στους 37°C για 90min. Μετά την αντίδραση το προϊόν της πέψης ηλεκτροφορεύεται σε πήκτωμα αγαρόζης (1%) και επιλέγονται οι αρχικές καλλιέργειες που έδωσαν την καλύτερη εικόνα στην ηλεκτροφόρηση.

Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαδικασία πέψης περιγράφονται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13: Αντιδραστήρια και ποσότητες ανά αντίδραση.

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (μl)
Πλασμιδιακός DNA	4
EcoRI enzyme	0,5
10x buffer EcoRI	2

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (μl)
RNase	0,2
ddH ₂ O (έως τελικό όγκο 20 μl)	13.3
Total	20

β) QIA Prep

Η διαδικασία έγινε με τη χρήση Plasmid DNA Purification kit (Qiagen), σύμφωνα με το πρωτόκολλο (Εικόνα 13).

Φυγοκέντρηση 1.5ml των κυττάρων από τις καλλιέργειες που επιλέχθηκαν στις 13.000rpm για 3min, απόρριψη υπερκείμενου και προσθήκη στο erpendrof 1.5ml των κυττάρων της καλλιέργειας, επανάληψη της φυγοκέντρησης και απόρριψη του υπερκείμενου.

Προσθήκη 250μl διαλύματος A1 και διάλυση του ιζήματος στο vortex.

Προσθήκη 240μl διαλύματος A2 και ανακίνηση με το χέρι.

Προσθήκη 290μl διαλύματος A3 και ανακίνηση με το χέρι.

Φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 5min. Το υπερκείμενο μεταφέρεται στην στήλη και το σωλήνα συλλογής της μεθόδου και φυγοκεντρείται στις 13.000rpm για 1min. Ο σωλήνας συλλογής αδειάζεται.

Προσθήκη 600μl διαλύματος A4 και επανάληψη της φυγοκέντρησης στις 13.000rpm για 1min. Ο σωλήνας συλλογής αδειάζεται και φυγοκεντρείται ξανά στις 13.000rpm για 2min. Η στήλη μεταφέρεται σε ένα erpendorf και προστίθενται 50μl διαλύματος AE. Επώαση για 1-7min και φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 1min.

Πέψη του πλασμιδιακού DNA με την περιοριστική ενδονουκλεάση (EcoRI) και επώαση στους 37°C για 90min. Μετά την αντίδραση το προϊόν της πέψης ηλεκτροφορεύεται σε πήκτωμα αγαρόζης (1%) για να επαληθευτεί ότι έγινε σωστά η πέψη. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του πλασμιδιακού DNA με φωτομέτρηση στο σπεκτροφωτόμετρο. Στέγνωμα 1200ng πλασμιδιακού DNA για την αλληλούχιση.

Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαδικασία πέψης περιγράφονται στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14: Αντιδραστήρια και ποσότητες ανά αντίδραση.

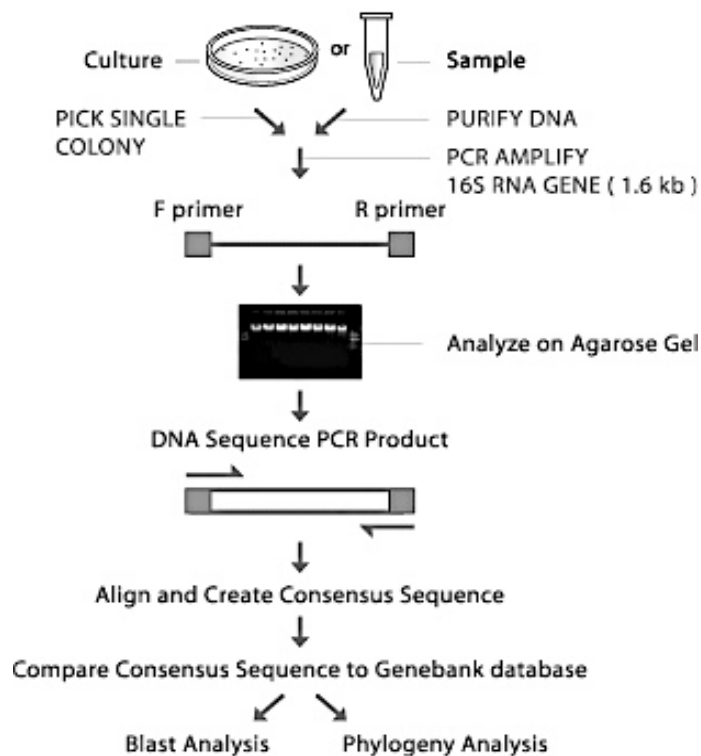
Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (μl)
Πλασμιδιακό DNA	2-4
EcoRI enzyme	0.5
10x buffer EcoRI	2

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (μl)
ddH ₂ O (έως τελικό όγκο 20 μl)	15.5-13.5
Total	20

* Η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA και άρα και του νερού (για την συμπλήρωση του τελικού όγκου) εξαρτάται από την τιμή της συγκέντρωσης που έδωσε στη φωτομέτρηση μετά την πρώτη πέψη.

2.8.2.10 Προσδιορισμός της αλληλουχίας των δειγμάτων και φυλογενετική ανάλυση

Τα δείγματα στάλθηκαν σε αναλυτικό εργαστήριο για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας τους (sequencing). Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν συγκρίθηκαν και αναλύθηκαν με αλληλουχίες που έχουν καταχωρηθεί στη βάση δεδομένων GenBank, με τη χρήση του αλγορίθμου BLAST του NCBI. Οι ακολουθίες ευθυγραμμίστηκαν με χρήση του αλγορίθμου ClustalW, που είναι ένα πρόγραμμα ευρείας χρήσης για την ευθυγράμμιση πολλαπλών αμινοξικών ή νουκλεοτιδικών αλληλουχιών DNA και του προγράμματος Mega 5.0. Η μέθοδος Neighbor Joining (Saitou & Nei, 1987) εφαρμόστηκε για την κατασκευή φυλογενετικών δενδρογραμμάτων χρησιμοποιώντας τις αλληλουχίες των στελεχών και κάποιες αλληλουχίες αναφοράς.



Εικόνα 13: Συνοπτική περιγραφή της διαδικασίας αλληλούχισης με τη μέθοδο της PCR.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Φυσικο-χημικές και μικροβιολογικές αναλύσεις

3.1.1 Φυσικο-χημικές Παράμετροι

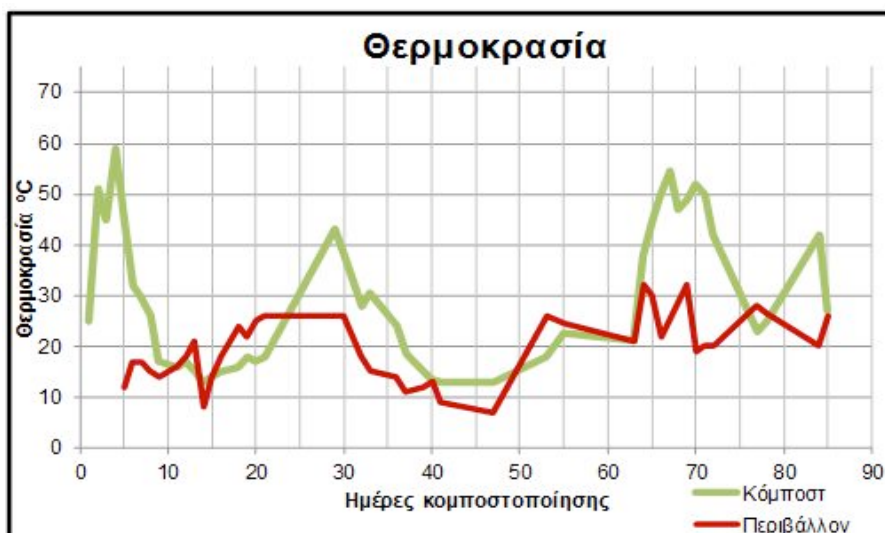
1. Θερμοκρασία

Η μέτρηση της θερμοκρασίας γινόταν καθημερινά. Η αρχική μεσόφιλη φάση διήρκεσε μόνο μία ημέρα, λόγω του έντονου ρυθμού αποσύνθεσης και της έκλυσης θερμότητας κατά τη μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών. Η πρώτη θερμοφιλη φάση διήρκεσε από τη 2η μέχρι την 5η ημέρα κομποστοποίησης. Η μέγιστη θερμοκρασία καθόλη τη διάρκεια της διαδικασίας μετρήθηκε την 4η ημέρα κομποστοποίησης, και ήταν 59°C. Ακολούθησε η δεύτερη μεσόφιλη φάση που διήρκεσε από την 6η ως την 64η ημέρα. Η δεύτερη θερμοφιλη φάση παρατηρήθηκε τις ημέρες 65 ως 72, ενώ μετά την 72η ημέρα ξεκίνησε η τρίτη μεσόφιλη φάση, ή φάση ωρίμανσης. Η διακύμανση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της κομποστοποίησης φαίνεται στο Διάγραμμα 1.

Πίνακας 15: Διάρκεια φάσεων κομποστοποίησης στο σωρό.

Φάσεις κομποστοποίησης	Διάρκεια φάσεων	Διακύμανση θερμοκρασίας (°C)
1η μεσόφιλη	0 - 1η ημέρα	25
1η θερμοφιλη	2η - 5η ημέρα	51 - 46 (μέγιστη: 59)
2η μεσόφιλη	6η - 64η ημέρα	32 - 38
2η θερμοφιλη	65η - 72η ημέρα	45 - 42 (μέγιστη: 54.4)
Φάση ωρίμανσης	Μετά την 72η ημέρα	23 - 27

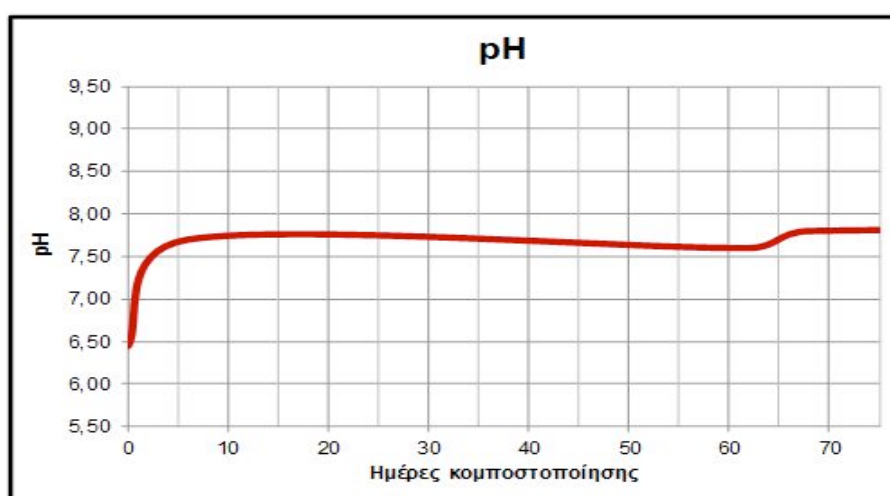
Κατά τη δεύτερη μεσόφιλη φάση παρατηρήθηκε μεγάλη διακύμανση της θερμοκρασίας του σωρού. Καθώς οι οργανικές ουσίες αποικοδομούνται από μία ομάδα μικροοργανισμών, η θερμοκρασία μειώνεται, μέχρι να δραστηριοποιηθεί η επόμενη ομάδα μικροοργανισμών που είναι ικανή να μεταβολίσει το υπάρχον οργανικό υλικό, οπότε αυξάνεται ξανά. Η μεταβολή της θερμοκρασίας δείχνει, δηλαδή, και τη διαδοχή των μικροοργανισμών στο κόμποστ. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η 2η θερμοφιλη φάση διήρκεσε επτά ημέρες (3 ημέρες επιπλέον από την πρώτη). Η παρατεταμένη αυτή διάρκεια μπορεί να αποδοθεί στο οργανικό φορτίο των ΥΑΕ, το οποίο χρειάζεται περισσότερο χρόνο για να αποικοδομηθεί από τους μικροοργανισμούς του κόμποστ, αλλά και στο γεγονός ότι κατά τα τελευταία στάδια της διαδικασίας συσσωρεύονται οι δύσκολα αποδομήσιμες ουσίες που αποσυντίθενται με πιο αργό ρυθμό.



Διάγραμμα 1: Η διακύμανση της θερμοκρασίας κατά την κομποστοποίηση.

2. Οξύτητα (pH)

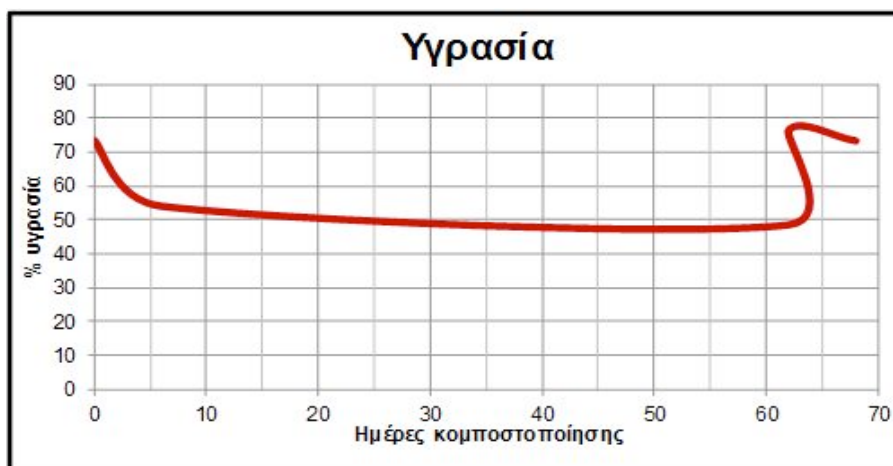
Ο σωρός είχε όξινο pH ($\text{pH}=6.45$) κατά την έναρξη της κομποστοποίησης (Διάγραμμα 2), γεγονός που οφείλεται στην ύπαρξη μεγάλων ποσοτήτων οργανικών οξέων και φαινολικών ενώσεων των ΥΑΕ (pH ΥΑΕ περίπου 5.5). Μετά τη θερμόφιλη φάση, το pH αυξήθηκε και έφτασε την τιμή 7.65. Η αύξηση αυτή αποδίδεται στη δράση των μικροοργανισμών, οι οποίοι αποικοδομούν τις οργανικές ενώσεις του σωρού και στην παραγωγή αμμωνίας, κατά την αμμωνιοποίηση και ανοργανοποίηση των αζωτούχων οργανικών ενώσεων. Στη συνέχεια, το pH μειώθηκε ελάχιστα, λόγω απομάκρυνσης της αμμωνίας, και μετά το γύρισμα και τη διαβροχή, η έναρξη της δεύτερης θερμόφιλης φάσης οδήγησε σε περαιτέρω αποικοδόμηση οργανικού υλικού και μικρή πάλι αύξηση του pH.



Διάγραμμα 2: Η διακύμανση του pH κατά την κομποστοποίηση.

3. Υγρασία

Η αρχική υγρασία του σωρού ήταν 75% (Διάγραμμα 3). Κατά την πρώτη μεσόφιλη και θερμόφιλη φάση το ποσοστό υγρασίας μειώθηκε στο 52%, γεγονός που αποδίδεται στην εξάτμιση λόγω της έντονης μικροβιακής δραστηριότητας και των υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύχθηκαν. Μετά την 6η ημέρα της κομποστοποίησης η υγρασία μειώθηκε ελάχιστα μέχρι την ημέρα, που έγινε το γύρισμα και η διαβροχή, οπότε από 48.53% έφτασε στο 76.34%.



Διάγραμμα 3: Η διακύμανση της υγρασίας κατά την κομποστοποίηση.

4. Ηλεκτρική αγωγιμότητα (EC)

Η ηλεκτρική αγωγιμότητα του σωρού παρουσίασε έντονη πτωτική τάση κατά τη διάρκεια της θερμόφιλης φάσης, ενώ αυξήθηκε κατά τη δεύτερη μεσόφιλη φάση μέχρι την ημέρα του γυρίσματος – διαβροχής (Διάγραμμα 4). Μετά τη δεύτερη θερμόφιλη φάση η ηλεκτρική αγωγιμότητα μειώθηκε κατακόρυφα. Η μείωση αυτή οφείλεται πιθανόν στην απομάκρυνση των υδατοδιαλυτών αλάτων, κυρίως αμέσως μετά το γύρισμα και τη διαβροχή του σωρού. Το εύρος της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στο σωρό κυμάνθηκε μεταξύ 3.74 και 5.87 mS/cm.



Διάγραμμα 4: Η διακύμανση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας κατά την κομποστοποίηση.

5. Το νιτρικό άζωτο ($\text{NO}_3^- - \text{N}$)

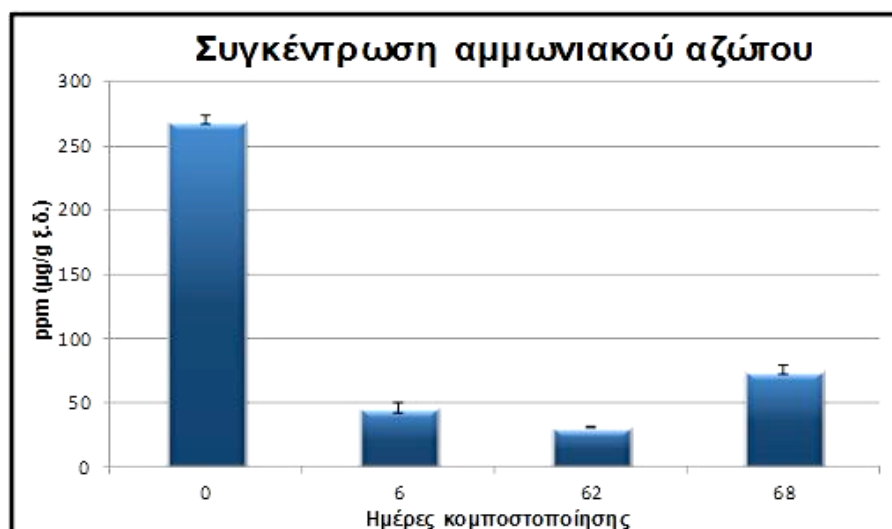
Η συγκέντρωση νιτρικού αζώτου μειώθηκε σημαντικά κατά την πρώτη θερμοφιλή φάση και παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα μέχρι τη μέρα του γυρίσματος και της διαβροχής. Μικρή αύξηση παρατηρήθηκε προς το τέλος της δεύτερης θερμοφιλής φάσης, ενώ παρέμεινε σχεδόν σταθερή μέχρι την έναρξη της φάσης ωρίμανσης (Διάγραμμα 5).



Διάγραμμα 5: Η συγκέντρωση του νιτρικού αζώτου κατά την κομποστοποίηση.

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

Η πορεία που ακολούθησε η συγκέντρωση του αμμωνιακού αζώτου είναι παρόμοια με αυτή του νιτρικού αζώτου. Η συγκέντρωση ήταν υψηλή, αρχικά, και μειώθηκε πολύ στην πρώτη θερμοφιλή φάση. Η περαιτέρω μείωση που παρατηρήθηκε είναι μικρή, ενώ μετά το γύρισμα και τη διαβροχή, η συγκέντρωση του αμμωνιακού αζώτου αυξήθηκε ελάχιστα (Διάγραμμα 6).

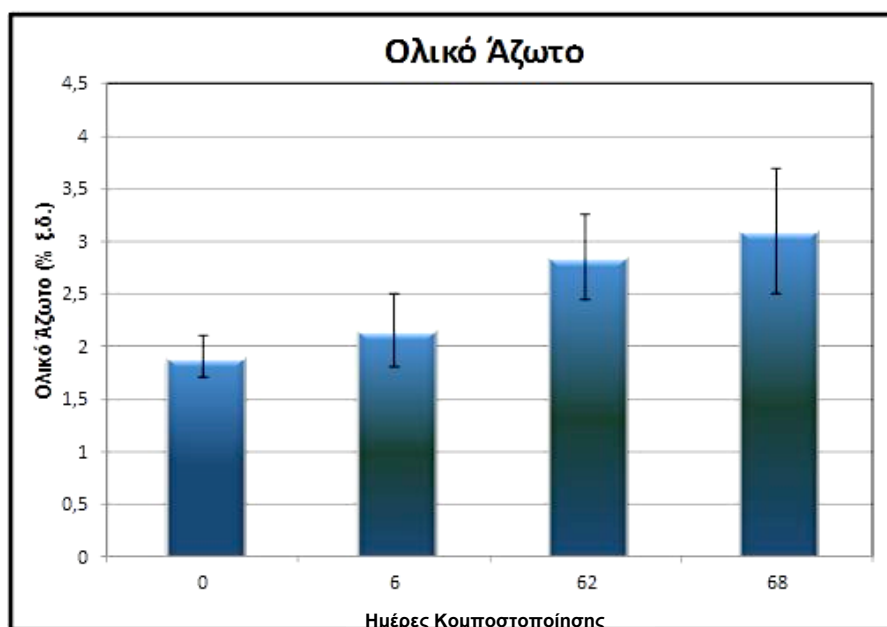


Διάγραμμα 6: Η συγκέντρωση του αμμωνιακού αζώτου κατά την κομποστοποίηση.

7. Ολικό άζωτο

Η συγκέντρωση του ολικού αζώτου κατά τη διάρκεια της κομποστοποίησης αυξήθηκε από 1.88% σε 3.07% την 68η ημέρα, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 7.

Η αυξημένη συγκέντρωση αζώτου σε όλη τη διαδικασία οφείλεται στη μείωση του βάρους του σωρού.

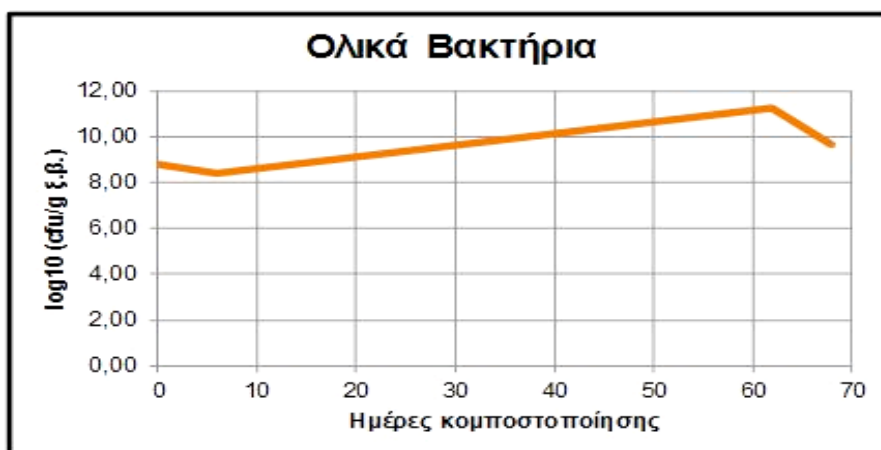


Διάγραμμα 7: Η συγκέντρωση του ολικού αζώτου κατά την κομποστοποίηση.

3.1.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις

1. Ολικά βακτήρια

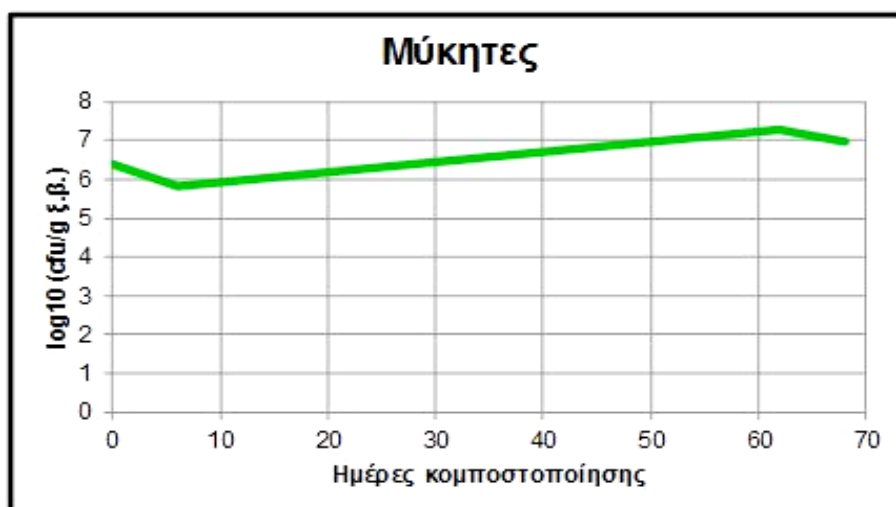
Η αρχική συγκέντρωση του πληθυσμού των ολικών βακτηρίων στο σωρό κατά την πρώτη θερμοφιλή φάση μειώθηκε, γεγονός που πιθανώς οφείλεται στην απότομη αύξηση της θερμοκρασίας. Πολλά βακτήρια δεν δύνανται να επιβιώσουν σε τόσο υψηλές θερμοκρασίες. Κατά τη δεύτερη μεσόφιλη φάση ο αριθμός των βακτηρίων άρχισε σταδιακά να αυξάνεται, καθώς η θερμοκρασία μειώθηκε. Η μέγιστη τιμή της συγκέντρωσης του πληθυσμού των βακτηρίων παρατηρήθηκε την 62η ημέρα (γύρισμα και διαβροχή). Η δεύτερη θερμοφιλή φάση που ακολούθησε μείωσε εκ νέου τον αριθμό των βακτηρίων, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύχθηκαν (Διάγραμμα 8). Το εύρος του πληθυσμού των βακτηρίων στο σωρό κυμάνθηκε από 2.67×10^8 έως 1.91×10^{11} CFU ανά γραμμάριο ξηρού βάρους.



Διάγραμμα 8: Η διακύμανση της συγκέντρωσης των ολικών βακτηρίων κατά την κομποστοποίηση.

2. Μύκητες

Η αρχική συγκέντρωση του πληθυσμού των μυκήτων μειώθηκε κατά την πρώτη θερμοφιλή φάση της κομποστοποίησης. Η μείωση αυτή είναι αναμενόμενη, αφού οι μύκητες είναι κυρίως μεσόφιλοι μικροοργανισμοί. Στη συνέχεια, κατά τη δεύτερη μεσόφιλη φάση, η συγκέντρωσή τους αυξήθηκε, ενώ κατά τη δεύτερη θερμοφιλή φάση παρατηρήθηκε εκ νέου μείωση (Διάγραμμα 9). Το εύρος του πληθυσμού των μυκήτων στο σωρό κυμαίνεται από 6.93×10^5 έως 1.84×10^7 CFU ανά γραμμάριο ξηρού βάρους.

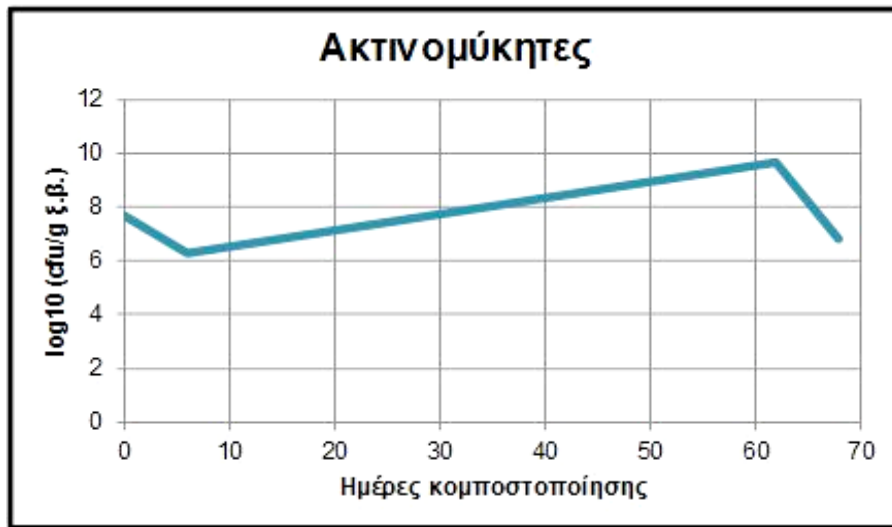


Διάγραμμα 9: Η διακύμανση της συγκέντρωσης των μυκήτων κατά την κομποστοποίηση.

3. Ακτινομύκητες

Η αρχική συγκέντρωση των ακτινομυκήτων ήταν μεγαλύτερη από αυτή των μυκήτων. Κατά την πρώτη μεσόφιλη και θερμοφιλή φάση παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσής τους. Κατά τη δεύτερη μεσόφιλη ο αριθμός τους αυξήθηκε, έως και τη δεύτερη θερμοφιλή φάση. Κατά τη διάρκεια της δεύτερης θερμοφιλής φάσης ο αριθμός τους μειώθηκε σημαντικά (Διάγραμμα 10). Το εύρος του πληθυσμού των

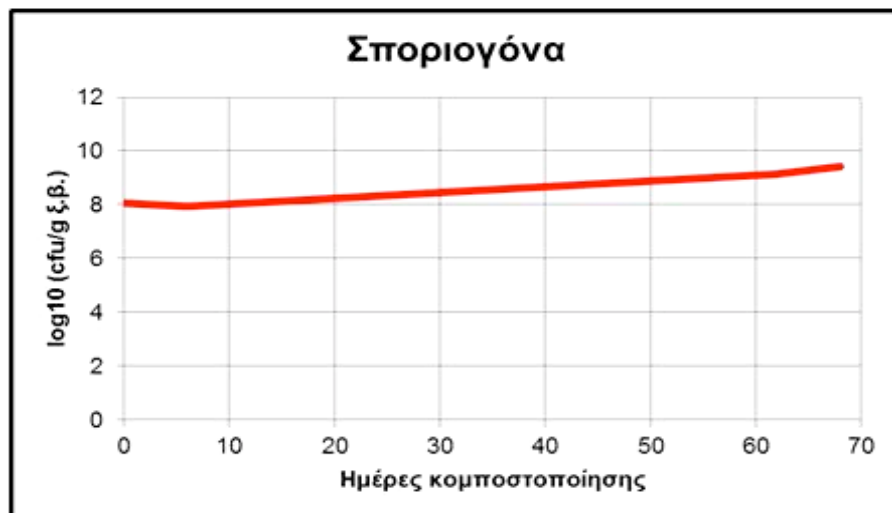
ακτινομυκήτων στο σωρό κυμαίνεται από 1.97×10^6 έως 4.53×10^9 CFU ανά γραμμάριο ξηρού βάρους.



Διάγραμμα 10: Η διακύμανση της συγκέντρωσης των ακτινομυκήτων κατά την κομποστοποίηση.

4. Σποριογόνα Βακτήρια

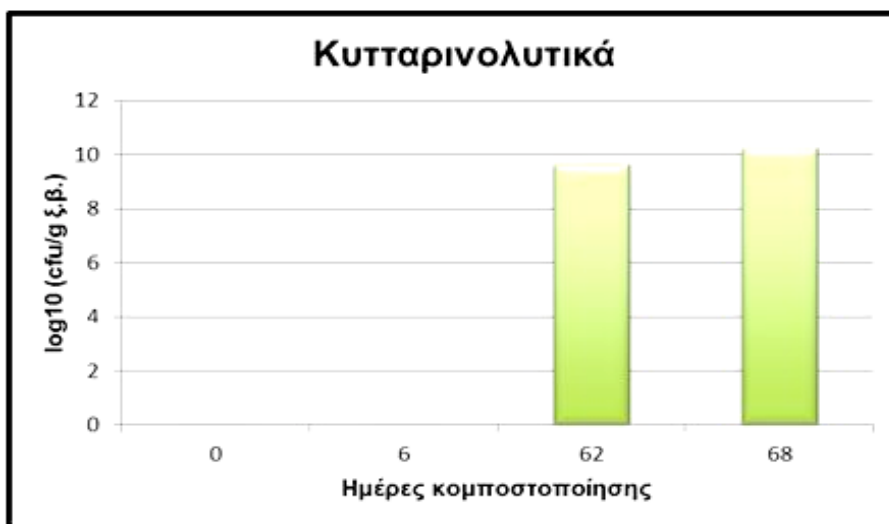
Τις πρώτες έξι ημέρες της κομποστοποίησης παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού των σποριογόνων βακτηρίων (8.39×10^7 CFU ανά γραμμάριο ξηρού βάρους). Από τη δεύτερη μεσόφιλη φάση, όμως, μέχρι το τέλος της διαδικασίας, ο αριθμός τους παρουσίασε μια μικρή αύξηση μέχρι να φτάσει τα 2.62×10^9 CFU ανά γραμμάριο ξηρού βάρους (Διάγραμμα 11).



Διάγραμμα 11: Η διακύμανση της συγκέντρωσης των σποριογόνων βακτηρίων κατά την κομποστοποίηση.

5. Κυτταρινολυτικά Βακτήρια

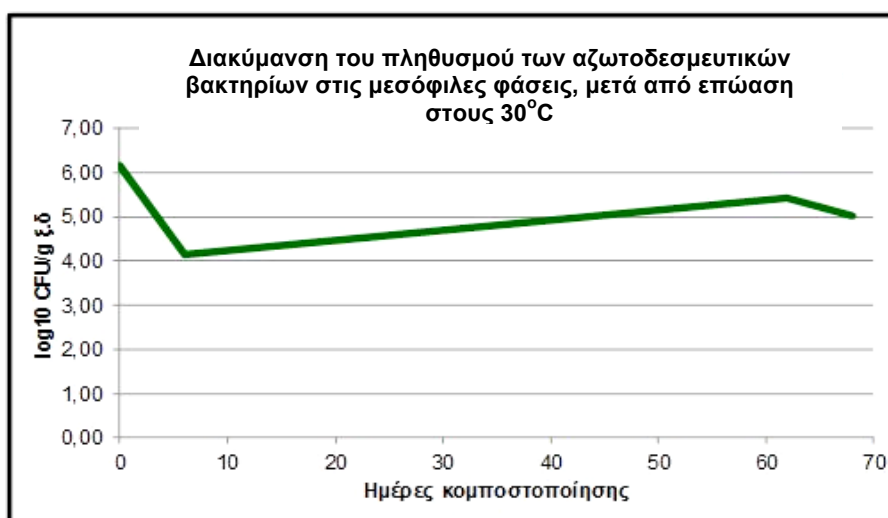
Στις δύο πρώτες δειγματοληψίες, που αντιστοιχούσαν στις δύο πρώτες φάσεις κομποστοποίησης, δεν βρέθηκαν κυτταρινολυτικά βακτήρια. Βρέθηκαν για πρώτη φορά στη 2η μεσόφιλη φάση, ενώ ο αριθμός τους αυξήθηκε ελάχιστα στη δεύτερη θερμόφιλη φάση (Διάγραμμα 12). Οι αποικίες μετρήθηκαν βάσει της ζώνης διαύγειας που δημιουργήθηκε σε τρυβλία με χρήση ιωδιούχου καλίου. Το εύρος του πληθυσμού τους κυμάνθηκε από 4.61×10^9 έως 1.73×10^{10} CFU ανά γραμμάριο ξηρού βάρους.



Διάγραμμα 12: Η διακύμανση της συγκέντρωσης των κυτταρινολυτικών βακτηρίων κατά την κομποστοποίηση.

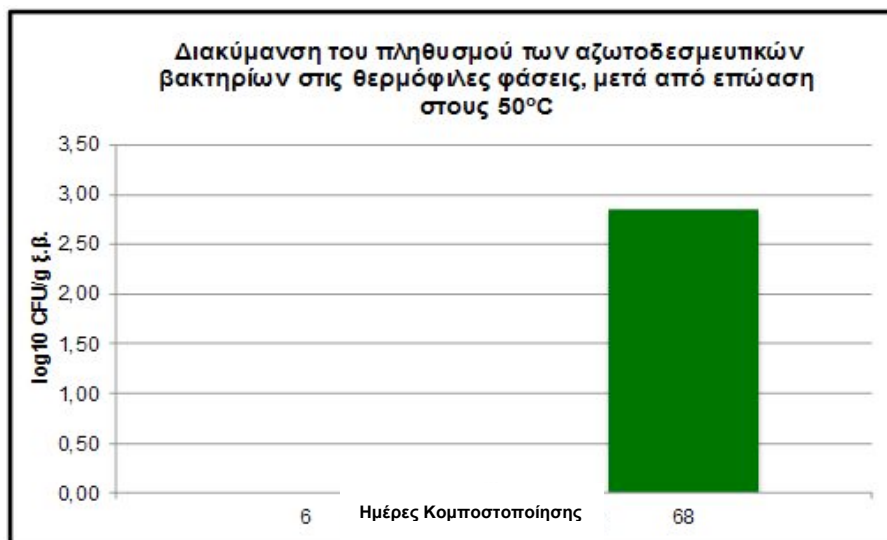
6. Αζωτοδεσμευτικά Βακτήρια

Στο τέλος της πρώτης θερμόφιλης φάσης, ο αριθμός των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων μειώθηκε δραστικά. Κατά τη δεύτερη μεσόφιλη φάση η συγκέντρωσή τους στο σωρό παρουσίασε μια αυξητική τάση, ενώ μετά τη διαβροχή η συγκέντρωσή τους παρέμεινε σχεδόν σταθερή. Το εύρος του πληθυσμού τους κυμάνθηκε από 1.40×10^4 μέχρι 1.43×10^6 CFU ανά γραμμάριο ξηρού βάρους (Διάγραμμα 13).



Διάγραμμα 13: Η διακύμανση της συγκέντρωσης των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων κατά την κομποστοποίηση, μετά από επώαση στους 30°C.

Όταν οι σωλήνες για την εκτίμηση του πληθυσμού των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων επώασθησαν στους 50°C (δειγματοληψία στις θεرمόφιλες φάσεις), παρατηρήθηκε ότι ενώ στην πρώτη θερμόφιλη σε κανένα σωλήνα δεν αναπτύχθηκαν αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, στη δεύτερη θερμόφιλη υπήρχε αύξηση του πληθυσμού των θερμόφιλων/θερμοανθεκτικών αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων (Διάγραμμα 14). Ο πληθυσμός που μετρήθηκε ήταν 0.07×10^4 CFU ανά γραμμάριο ξηρού βάρους.



Διάγραμμα 14: Η διακύμανση της συγκέντρωσης των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων κατά την κομποστοποίηση, μετά από επώαση στους 50°C.

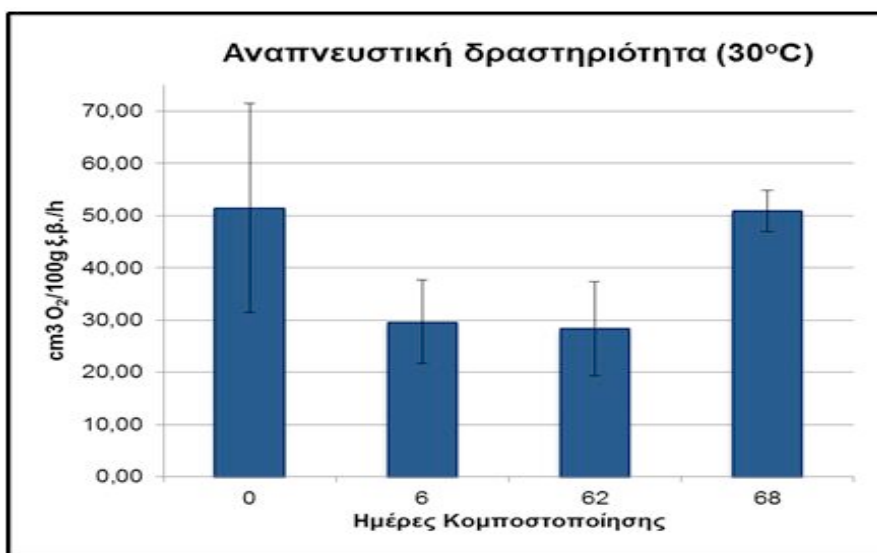
7. Αζωτοδεσμευτική ικανότητα δειγμάτων κόμποστ

Η ικανότητα αζωτοδέσμευσης ελέγχθηκε και απευθείας σε δείγμα από το σωρό, αλλά δεν υπήρξε κάποιο θετικό αποτέλεσμα στη δοκιμή του ακετυλενίου.

8. Αναπνευστική δραστηριότητα

Η αναπνευστική δραστηριότητα του σωρού αποτελεί ένδειξη της συνολικής μικροβιακής μεταβολικής δραστηριότητας στα επιμέρους στάδια της κομποστοποίησης. Καθόλη τη διάρκεια της διαδικασίας, η αναπνευστική δραστηριότητα μετρήθηκε στους 30°C, εκτός από τις δύο θερμόφιλες φάσεις, που μετρήθηκε και στους 50°C.

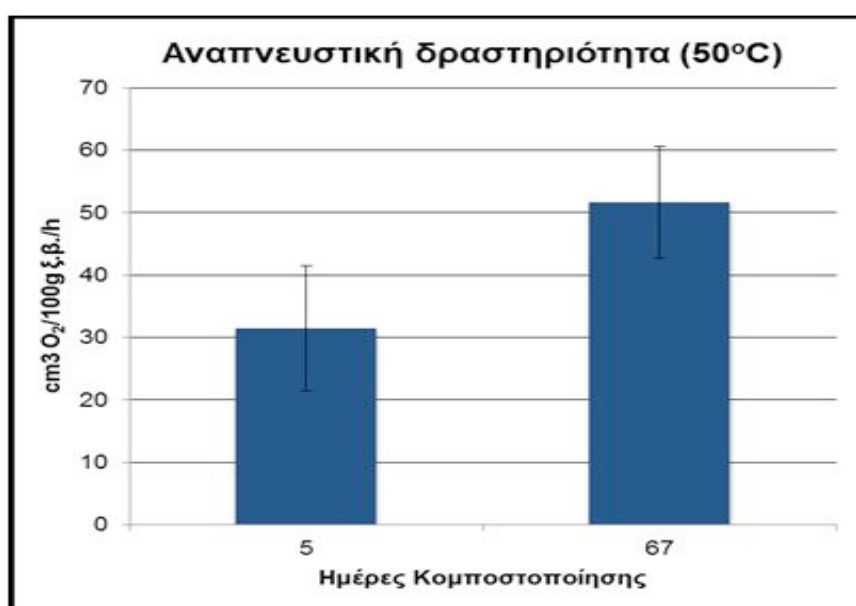
Στο Διάγραμμα 15 φαίνεται η διακύμανση της αναπνευστικής δραστηριότητας στις μεσόφιλες φάσεις κομποστοποίησης, ύστερα από επώαση των δειγμάτων στους 30°C.



Διάγραμμα 15: Η διακύμανση της αναπνευστικής δραστηριότητας στις μεσόφιλες φάσεις της κομποστοποίησης.

Η αρχική υψηλή αναπνευστική δραστηριότητα που παρατηρήθηκε, οφείλεται πιθανώς στην ύπαρξη ενδογενούς μικροχλωρίδας στα επιμέρους υποστρώματα. Κατά την πρώτη θερμοφιλή φάση, η αναπνευστική δραστηριότητα μειώθηκε. Αυτό αποδίδεται τόσο στις αντιμικροβιακές ουσίες των ΥΑΕ, όσο και στις υψηλές θερμοκρασίες που αναπτύχθηκαν στο σωρό, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την αναστολή του μεταβολισμού πολλών μικροοργανισμών ή και τον θάνατό τους. Κατόπιν, στη δεύτερη θερμοφιλή φάση παραμένει σταθερή, ενώ αυξάνεται σχεδόν στο διπλάσιο στο τέλος της δεύτερης θερμοφιλής φάσης.

Στο Διάγραμμα 16 φαίνεται η διακύμανση της αναπνευστικής δραστηριότητας στις δύο θερμοφιλες φάσεις κομποστοποίησης, ύστερα από την επώαση των δειγμάτων στους 50°C.



Διάγραμμα 16: Η διακύμανση της αναπνευστικής δραστηριότητας στις θερμοφιλες φάσεις της κομποστοποίησης.

3.2 Ταξινομικό Μέρος

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μεγαλύτερη έμφαση δόθηκε στους μύκητες που απομονώθηκαν από τον σωρό. Τα κυριότερα γένη μυκήτων που καταγράφηκαν ήταν:

Mucor, *Rhizopus*, *Emericella*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Trichoderma*.

Από τα στελέχη που αναπτύχθηκαν, 27 στελέχη επιλέχτηκαν από όλες τις φάσεις της διαδικασίας της κομποστοποίησης και απομονώθηκαν σε καθαρή καλλιέργεια. Τα στελέχη αυτά μεταφέρθηκαν σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες με στερεό θρεπτικό υλικό για τη συντήρησή τους. Τα στελέχη αυτά ανήκαν ως επί το πλείστον στο γένος *Aspergillus* και αυτά μελετήθηκαν ταξινομικά. Από τα 27 αυτά στελέχη, 3 στελέχη που ταυτοποιήθηκαν με μοριακές τεχνικές. Παρακάτω, περιγράφονται ενδεικτικά ορισμένα από τα κυριότερα γένη μυκήτων που καταγράφηκαν και αναφέρονται τα μικροσκοπικά και μακροσκοπικά χαρακτηριστικά των 3 στελεχών που ταυτοποιήθηκαν με τις μοριακές τεχνικές.

3.2.1 Περιγραφή των κυριότερων γενών μυκήτων (Barnett & Hunter, 1998)

Γένος *Mucor* Mich.

Υφές λευκές ή χρωματισμένες, με ύψος που ποικίλει. Σποριαγγειοφόροι συχνά διακλαδισμένοι, χωρίς απόφυση, καταλήγουν σε σποριάγγεια σφαιρικά, ποικίλου μεγέθους, με καλά αναπτυγμένο στυλίσκο (κολουμέλλα), δημιουργούμενα μεταξύ αντίθετα κατευθυνόμενων αναρτήρων. Ζυγοσποριάγγεια διαφόρων σχημάτων, λεία ή ελαφρώς διακοσμημένα. Χλαμυδοσπόρια παράγονται σε ορισμένα είδη. Απαντάται κυρίως, στο χώμα, σε φυτικό υλικό σε αποσύνθεση και σε αποθηκευμένα δημητριακά. Κάποια είδη του γένους χρησιμοποιούνται για την παραγωγή διατροφικών προϊόντων, ενώ άλλα προκαλούν ζυγομύκωση στον άνθρωπο.

Γένος *Rhizopus* Ehrenb.

Σποριαγγειοφόροι απλοί, με απόφυση, καταλήγουν σε σποριάγγεια που δημιουργούνται μεταξύ αντίθετα κατευθυνόμενων αναρτήρων, μεγάλου μεγέθους, λευκά όταν είναι νεαρά, τα οποία γίνονται καφέ-μαύρα όσο ωριμάζουν με πολλά ελλειψοειδή σπόρια. Στόλον υαλώδες με ριζοειδή. Χλαμυδοσπόρια παράγονται σε ορισμένα είδη. Προκαλεί σάπισμα στα φρούτα, ζυγομύκωση στον άνθρωπο και τα ζώα, ενώ χρησιμοποιείται επίσης, για τη βιομηχανική παραγωγή αλκοόλης, φουμαρικού και γαλακτικού οξέος.

Γένος *Emericella* Berk.

Κλειστοθήκια περιβαλλόμενα από παχύτοιχα κύτταρα Hülle. Ασκοσπόρια με χαρακτηριστικό σχήμα και κόκκινο-μωβ χρώμα. Κονιδιοφόροι συνήθως κοντοί, καφέ χρώματος. Κύστεις με στηρίγματα και φιαλίδια, από όπου σχηματίζονται πράσινα κονίδια σε σειρές.

Γένος *Alternaria* Nees

Κονιδιοφόροι σκουρόχρωμοι, κυρίως απλοί, περιορισμένης ή συμποδιακής ανάπτυξης, σχετικά κοντοί ή επιμήκεις. Κονίδια (ποροσπόρια) σκουρόχρωμα, τυπικά με εγκάρσια και επιμήκη σέπτα, ποικίλου σχήματος, ελλειψοειδή ή ωοειδή, συνήθως σχηματίζονται ακροπεταλικά σε ακραίο απλό ή διακλαδιζόμενο εξάρτημα. Τα είδη του γένους είναι παρασιτικά ή σαπροφοτικά στα φυτά και είναι ικανά να παράγουν μυκοτοξίνες.

Γένος *Aspergillus* Link.

Κονιδιοφόροι απλοί καταλήγουν σε μια σφαιρική κεφαλή (κύστη), με φιαλίδια είτε στην κορυφή είτε σε όλη την επιφάνειά της, που δίνουν γένεση σε κονίδια (φιαλιδόσπορια), μονοκύτταρα, σφαιρικά, συνήθως χρωματισμένα, που δημιουργούνται σε βασιπεταλικές αλυσίδες. Από τα σημαντικότερα από οικονομικής απόψεως γένη.

Γένος *Cladosporium* Link.

Κονιδιοφόροι επιμήκεις, ψηλοί, διακλαδιζόμενοι με ποικίλους τρόπους κοντά στην κορυφή (δεντρόμορφοι). Κονίδια (βλαστοσπόρια) μονοκύτταρα ή δικύτταρα, τυπικά λεμονοειδή ή ωοειδή έως κυλινδρικά και ακανόνιστα, ποικίλου μεγέθους, σε απλές ή διακλαδισμένες ακροπεταλικές αλυσίδες. Γένος παρασιτικό ή σαπροφοτικό στα φυτά.

Γένος *Fusarium* Link.

Μυκήλιο εκτεταμένο και βαμβακώδες στην καλλιέργεια, συχνά με αποχρώσεις του ρόζ, μωβ ή κίτρινου στο θρεπτικό μέσο. Κονιδιοφόροι ποικιλόμορφοι, λεπτοί και απλοί, ή παχύτεροι και κοντοί, ακανόνιστα διακλαδιζόμενοι ή φέρουν ένα σπονδύλωμα από φιαλίδια. Φιαλίδια μεμονωμένα ή συγκεντρώνονται σε σποροδοχεία. Κονίδια (φιαλιδόσπορια) υαλώδη, ποικιλόμορφα, κυρίως σε δύο είδη, συχνά βρίσκονται σε μικρές υγρές κεφαλές. Μακροκονίδια πολυκύτταρα, ελαφρώς καμπυλωτά ή κεκαμένα στις άκρες, συνήθως με σχήμα κανό. Μικροκονίδια μονοκύτταρα ωοειδή ή επιμήκη, μεμονωμένα ή σε αλυσίδες. Κάποια ενδιάμεσα κονίδια δικύτταρα ή τρικύτταρα, επιμήκη ή ελαφρώς καμπυλωτά. Γένος παρασιτικό σε ανώτερα φυτά ή σαπροτροφικό σε αποσυντιθέμενο υλικό φυτικής προέλευσης, προκαλεί ποικίλες φυτικές ασθένειες. Παχύτοιχα χλαμυδοσπόρια πολύ συχνά σε κάποια είδη. Τα είδη του γένους είναι ικανά να παράγουν μυκοτοξίνες, με κυριότερες τις τριχοθισίνες και τις φουμονισίνες.

Γένος *Geotrichum* Link.

Μυκήλιο λευκό με σέπτα (*septa*). Κονιδιοφόροι απόντες. Κονίδια (αρθροσπόρια) μονοκύτταρα, υαλώδη, κυλινδρικά με τετραγωνισμένα άκρα που στρογγυλοποιούνται με την ωρίμανση, σχηματιζόμενα από τεμαχισμό των υφών. Γένος σαπροφυτικό, απαντάται κυρίως στο χώμα. Οι τελειομορφές των ειδών ανήκουν στα γένη *Dipodascus* και *Galactomyces*.

Γένος *Penicillium* Link.

Κονιδιοφόροι μεμονωμένοι ή σε συννήματα, που διακλαδίζονται κοντά στην κορυφή και καταλήγουν σε ομάδες φιαλιδίων, αποκτώντας μορφή που θυμίζει σκούπα. Κονίδια (φιαλιδιοσπόρια) μονοκύτταρα, υαλώδη ή ελαφρώς χρωματισμένα, σφαιρικά ή ωειδή σε μάζες σε βασιπεταλικές αλυσίδες.

Γένος *Trichoderma* Pers.

Κονιδιοφόροι διακλαδισμένοι που φέρουν φιαλίδια μεμονωμένα ή σε ομάδες, από όπου παράγονται κονίδια (φιαλιδιοσπόρια) μονοκύτταρα, ωειδή, σε ακραίες συστάδες. Οι αποικίες είναι χαμηλές αλλά χαρακτηρίζονται από πολύ γρήγορη ανάπτυξη και από το γεγονός ότι συχνά εμφανίζονται σαν πράσινες κηλίδες και μάζες κονιδίων που δίνουν την εικόνα απομονωμένων αποικιών σαν μπαλώματα. Τα είδη του γένους απαντώνται κυρίως στο έδαφος, αλλά συχνά αναφέρονται και ως παρασιτικά και παθογόνα στα φυτά και είναι ικανά να παράγουν τις μυκοτοξίνες, τριχοθισίνες.

3.2.2 Περιγραφή των στελεχών μυκήτων που ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση μοριακών τεχνικών

♦**Φύλο: *Ascomycetes***

Κλάση: *Eurotiomycetes*

Τάξη: *Eurotiales*

Οικογένεια: *Trichocomaceae*

Γένος: *Aspergillus* (Link)

Section *Fumigati*

Στέλεχος: K1As1. 1η δειγματοληψία.

Χαρακτηριστικά καλλιέργειας:

Αποικία σε PDA στους 25°C σε αποχρώσεις του πράσινου, χακί και μπλε χρώματος, χαμηλή, επίπεδη, πυκνή, βελούδινη, λευκή στην περιφέρεια. Κάτω επιφάνεια αποικίας μπεζ χρώματος, απουσία χρωστικής διαχεόμενης στο υπόστρωμα.

Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά:

Ακανόνιστος κονιδιοφόρος, παχύς που λεπταίνει προς τη βάση και διευρύνεται προς την κύστη. Κύστη ροπαλοειδής, σχεδόν σφαιρική και διογκωμένη. Φιαλίδια παχειά και κοντά, πυκνά τοποθετημένα πάνω στην κύστη, σε 1 σειρά στο άνω μισό τμήμα της. Σπόρια σφαιρικά προς ελλειψοειδή και τραχειά.

Γένος: *Aspergillus* (Link)

Section *Flavi*

Στέλεχος: K3As4. 3η δειγματοληψία.

Χαρακτηριστικά καλλιέργειας:

Αποικία σε PDA στους 25°C σε αποχρώσεις του πράσινου σκούρου και κίτρινου χρώματος, χαμηλή, επίπεδη, πυκνή, χνουδωτή, λευκή στην περιφέρεια. Κάτω επιφάνεια αποικίας μπεζ προς κιτρινωπή, απουσία χρωστικής διαχεόμενης στο υπόστρωμα.

Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά:

Ομοιόμορφος κονιδιοφόρος, παχύς. Κύστη σφαιρική. Φιαλίδια σε 2 σειρές. Σπόρια σφαιρικά έως ωοειδή και λεία.

Γένος: *Aspergillus* (Link)

Section *Nigri*

Στέλεχος: K4As8. 4η δειγματοληψία.

Χαρακτηριστικά καλλιέργειας:

Αποικία σε PDA στους 25°C σε αποχρώσεις του καφέ και μαύρου χρώματος, χαμηλή, επίπεδη, πυκνή, χνουδωτή, λευκή στην περιφέρεια. Κάτω επιφάνεια αποικίας μπεζ προς κιτρινωπή, απουσία χρωστικής διαχεόμενης στο υπόστρωμα.

Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά:

Ομοιόμορφος κονιδιοφόρος, παχύς. Κύστη σφαιρική. Φιαλίδια μακρυά και παχειά, σε 2 σειρές γύρω από όλη την κύστη. Σπόρια σφαιρικά, με διακόσμηση, καφέ χρώματος.

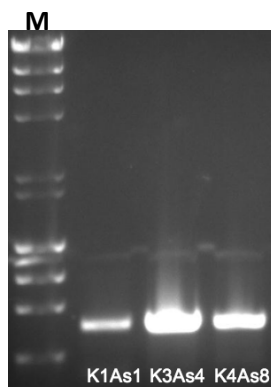
3.3 Μοριακές αναλύσεις

3.3.1 Ενίσχυση τμήματος 18S rDNA γονιδίου και της ITS περιοχής

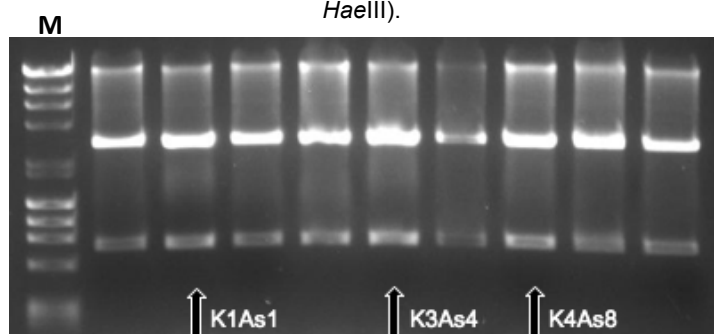
Τρία από τα στελέχη μυκήτων που απομονώθηκαν από το σωρό σε καθαρές καλλιέργειες ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση μοριακών τεχνικών (K1As1, K3As4, K4As8). Τα στελέχη αυτά απομονώθηκαν από διαφορετικές αραιώσεις κατά την 1η, 3η και 4η δειγματοληψία αντίστοιχα και επομένως, από 3 διαφορετικές φάσεις της διαδικασίας της κομποστοποίησης.

Και στα τρία στελέχη αναλύθηκαν τμήμα του συντηρημένου γονιδίου 18S rDNA, που κωδικοποιεί για το 18S rRNA της μικρής υπομονάδας (Small SubUnit-coding sequence) του ευκαρυωτικού ριβοσώματος και τμήμα της εξαιρετικά μεταβαλλόμενης ITS περιοχής που περιβάλλει την 5.8S κωδική περιοχή και παρεμβάλλεται μεταξύ των ακολουθιών που κωδικοποιούν για τη μικρή (SSU) και τη μεγάλη (LSU) υπομονάδα του ριβοσώματος και βρίσκονται σε σειρά και συγκροτούν μια γονιδιακή συστοιχία (gene cluster).

Με τη χρήση κατάλληλων εκκινήτων και της PCR οι περιοχές αυτές ενισχύθηκαν στα τρία στελέχη. Τα προϊόντα της PCR υποκλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy (Promega), μετασχημάτισαν κύτταρα *E. coli* και μετά την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας.



Εικόνα 14: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης των προϊόντων της PCR για την ενίσχυση του 18S rDNA γονιδίου (~746 bp). Με M σημειώνεται ο μάρτυρας των μοριακών μεγεθών (λ DNA *Hind*III και φX174 *Hae*III).



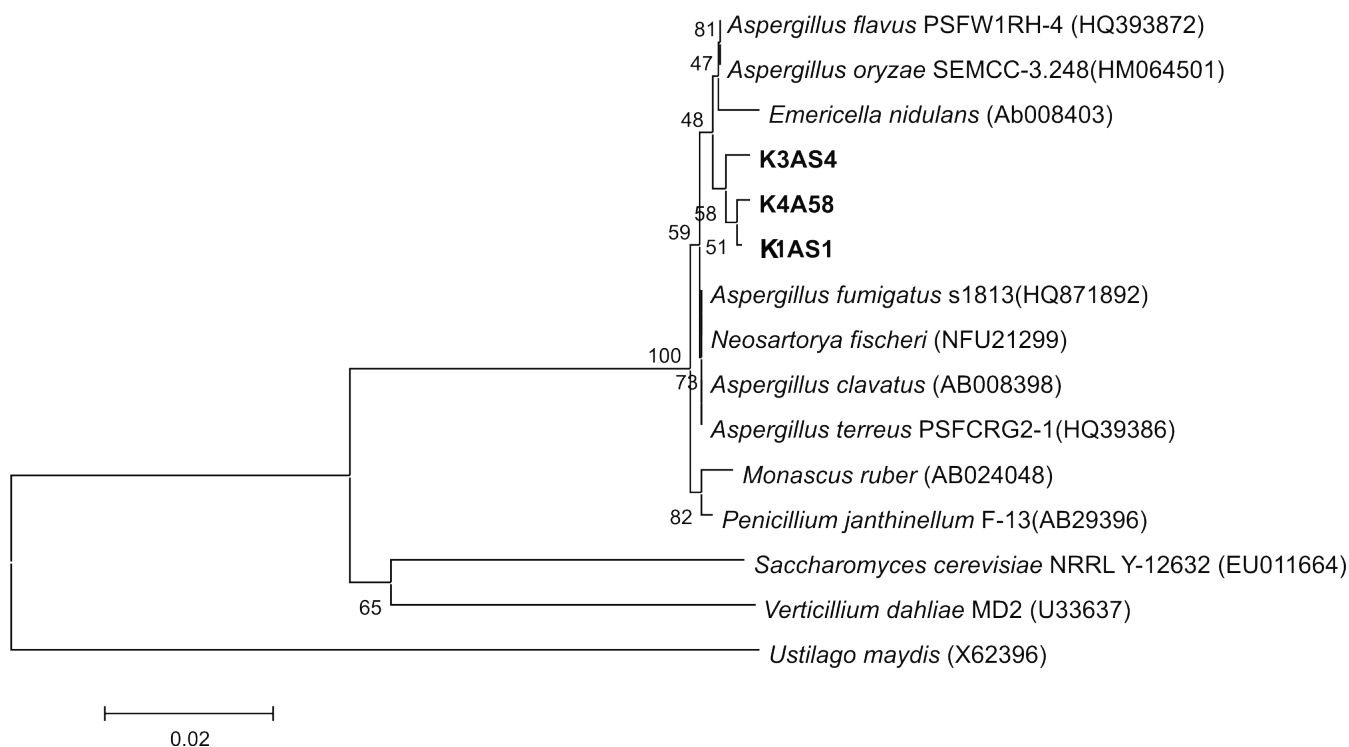
Εικόνα 15: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης των προϊόντων της πέψη των πλασμιδίων με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Eco*RI για την απομόνωση του ένθετου DNA (insert) (κλώνοι 18S).

3.3.2 Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας 18S rDNA και ITS

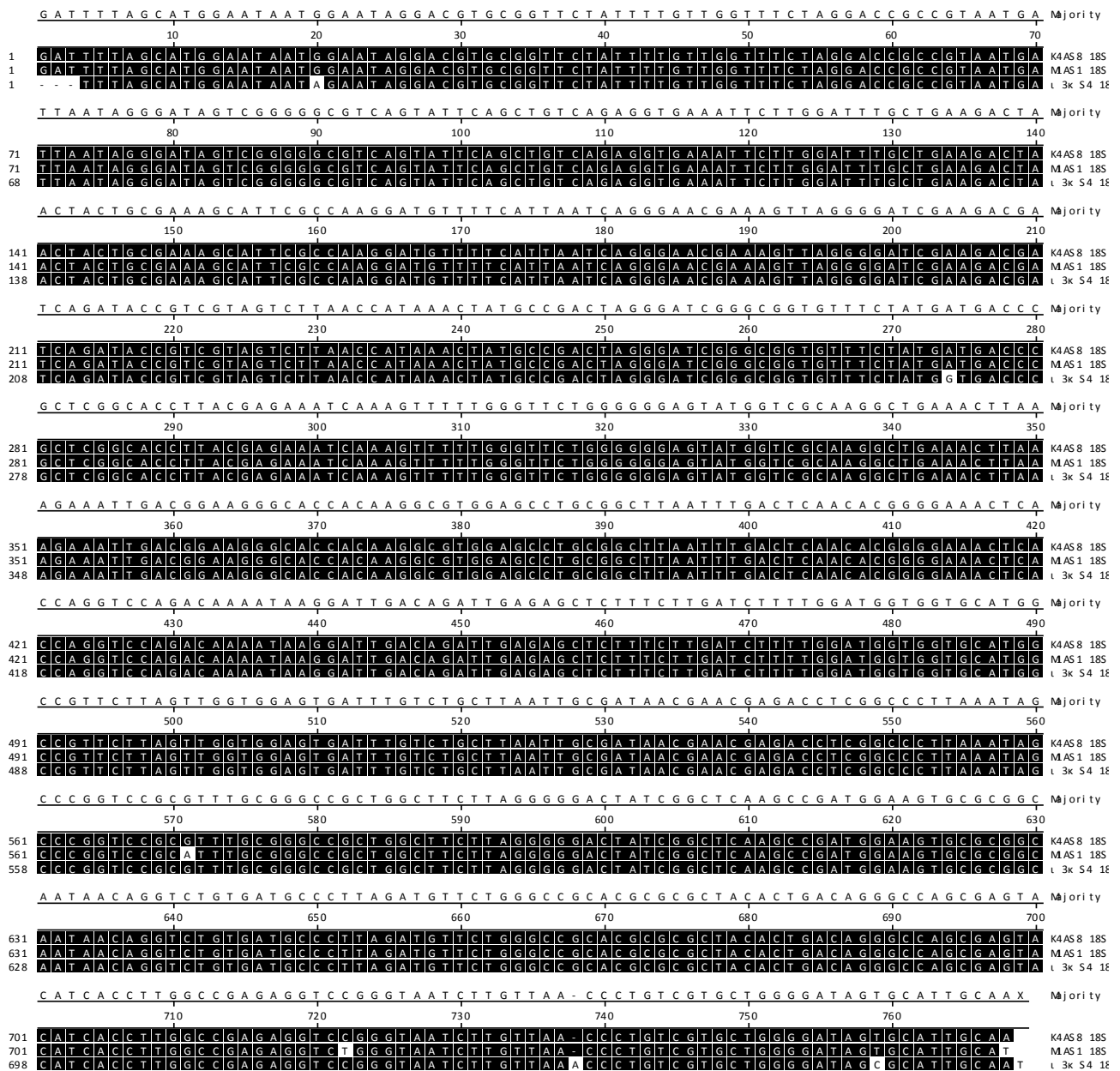
Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των γονιδίων στα 3 στελέχη έγινε από αναλυτικό εργαστήριο. Μόλις ολοκληρώθηκε, τα δεδομένα επεξεργάστηκαν σε υπολογιστή. Συγκεκριμένα, οι αλληλουχίες συγκρίθηκαν με αλληλουχίες καταχωρημένες στη βάση δεδομένων GenBank του NCBI (National Centre for Biotechnology Information). Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αλληλουχιών ήταν ο BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Το αποτέλεσμα της ανάλυσης ήταν ο εντοπισμός γονιδίων που κωδικοποιούν για το 18S rRNA και την ITS περιοχή του ριβοσώματος και παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με αντίστοιχα γονίδια οργανισμών που έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί και έχουν καταχωρηθεί στις βάσεις δεδομένων. Τα τρία στελέχη βρέθηκε ότι έχουν υψηλή ομολογία με τα είδη που ανήκουν του γένους *Aspergillus* που ανήκουν σε τρεις διαφορετικές ομάδες (sections): *Aspergillus* section *fumigati*, *A.* section *flavi* και *A.* section *nigri*, αντίστοιχα.

Το στέλεχος K1As1 έχει υψηλή ομολογία με το είδος *Aspergillus fumigatus*. Το στέλεχος K3As4 έχει υψηλή ομολογία με το είδος *Aspergillus flavus* και το στέλεχος K4As8 ανήκει στο section *nigri* και έχει υψηλή ομολογία με το είδος *Aspergillus tubingensis*.

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των τριών στελεχών για κάθε γονίδιο, ευθυγραμμίστηκαν χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο ClustalW και του προγράμματος Mega 5.0, με αντίστοιχα γονίδια συγγενικών ειδών, των οποίων οι αλληλουχίες είναι διαθέσιμες στο διαδίκτυο και προέκυψαν με τη χρήση του BLAST.



Εικόνα 16: Φυλογενετική ανάλυση του γονιδίου **18S rRNA** σύμφωνα με το πρόγραμμα Mega 5.0. Χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες συγγενών ειδών μυκήτων.



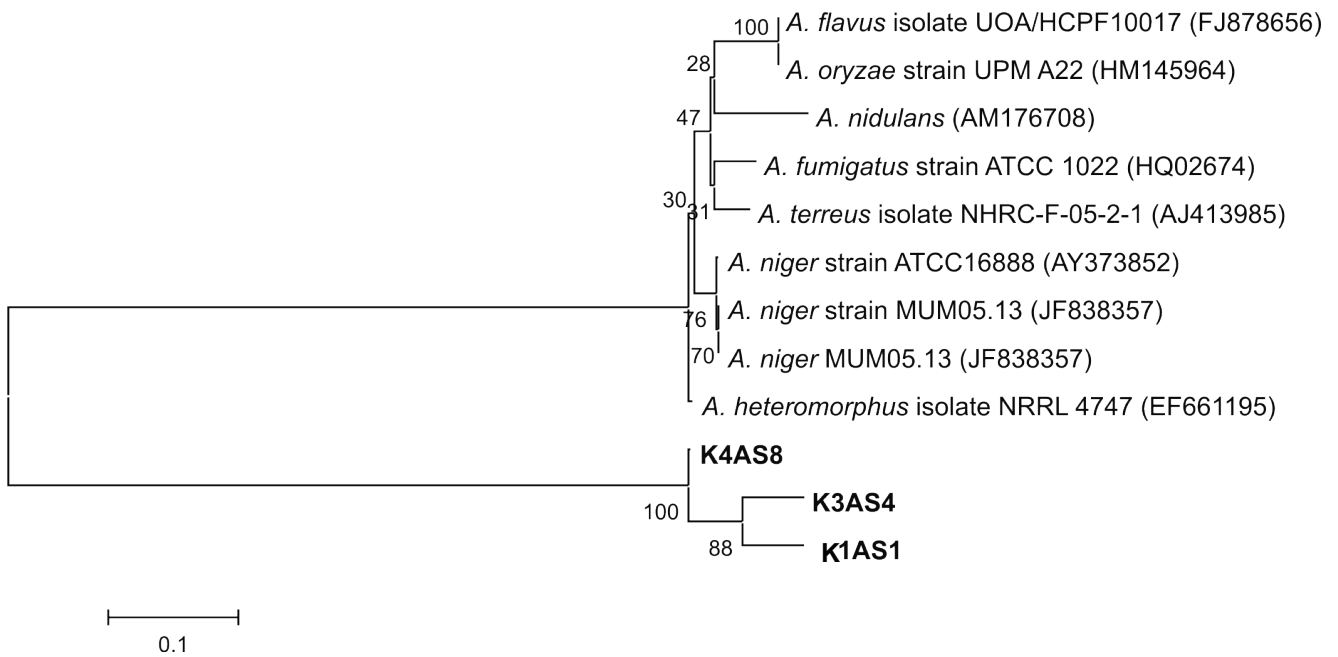
Εικόνα 17: Ευθυγράμμιση αλληλουχιών των γονιδίων **18S rRNA** των στελεχών K1As1, K3As4, K4As8, σύμφωνα με τον αλγόριθμο Clustal W για το πρόγραμμα LaserGene 7.0.

Percent Identity

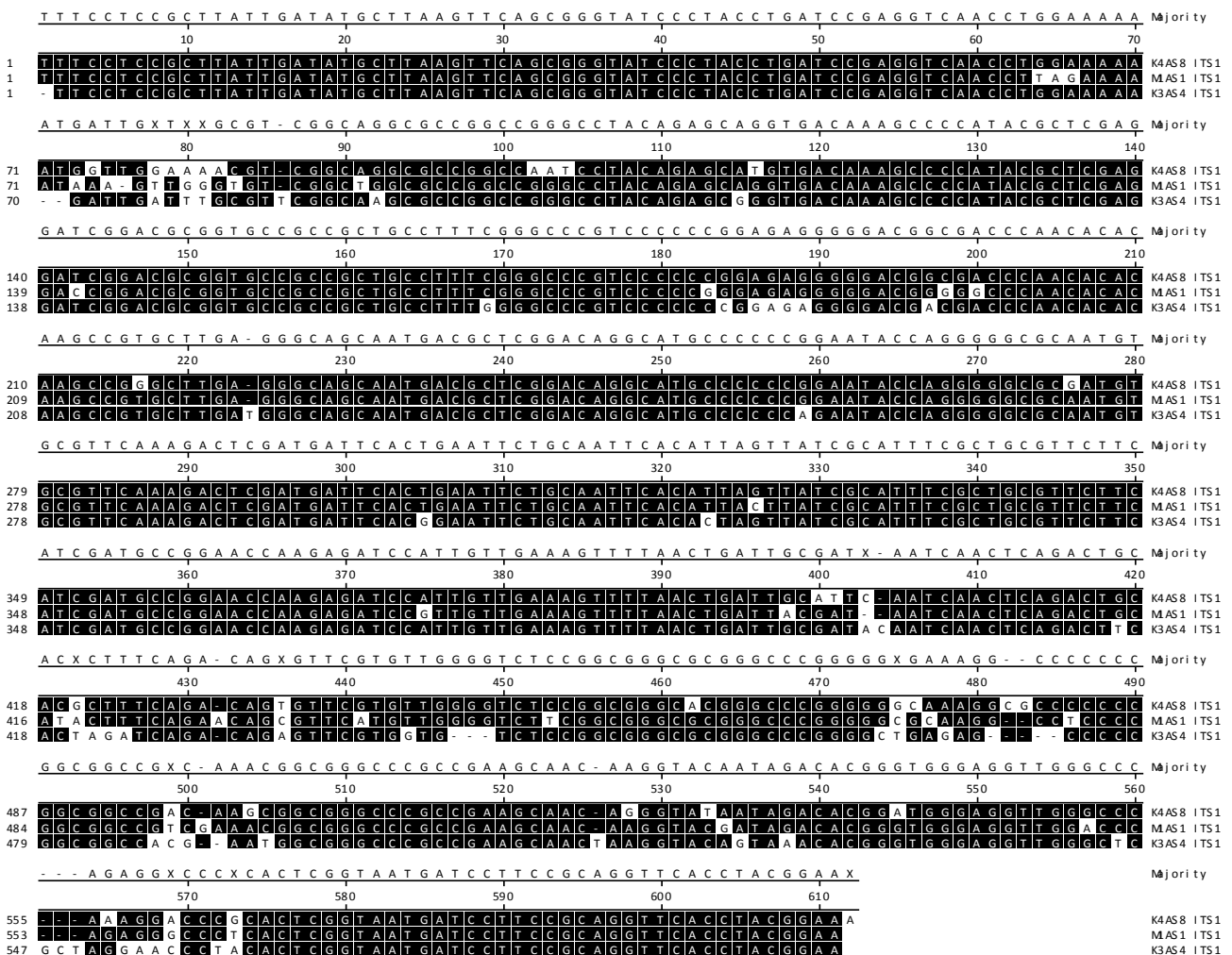
	1	2	3	
1		99.6	99.6	1
2	0.4		99.2	2
3	0.4	0.8		3
	1	2	3	

K4AS8 18S
K1AS1 18S
K3AS4 18S

Εικόνα 18: Νουκλεοτιδικές αποστάσεις αλληλουχιών μεταξύ των στελεχών K1As1, K3As4, K4As8, για το γονίδιο **18S rRNA**.



Εικόνα 19: Φυλογενετική ανάλυση της ITS1 περιοχής σύμφωνα με το πρόγραμμα Mega 5.0. Χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες συγγενών ειδών μυκήτων.



Εικόνα 20: Ευθυγράμμιση αλληλουχιών της ITS1 περιοχής των στελεχών K1As1, K3As4, K4As8, σύμφωνα με τον αλγόριθμο Clustal W για το πρόγραμμα LaserGene 7.0.

Percent Identity				
	1	2	3	
1		92.0	90.3	1
2	8.5		90.0	2
3	10.4	10.8		3
	1	2	3	

K4AS8 ITS1
K1AS1 ITS1
K3AS4 ITS1

Εικόνα 21: Νουκλεοτιδικές αποστάσεις αλληλουχιών μεταξύ των στελεχών K1As1, K3As4, K4As8, για την **ITS1** περιοχή.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η κομποστοποίηση είναι η διαδικασία της βιοαποικοδόμησης στερεών αποβλήτων, από τη δράση των μικροοργανισμών, και της μετατροπής τους σε ένα τελικό προϊόν (κόμποστ) που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως λίπασμα, υπόστρωμα για την καλλιέργεια μανιταριών, βιοκαύσιμο κ.ά (Peters *et al.*, 2000). Η διαδικασία αυτή γίνεται σε 4 φάσεις: μεσόφιλη, θερμόφιλη, φάση πτώσης της θερμοκρασίας (cooling phase) και φάση ωρίμανσης, και επηρεάζεται από ποικίλους φυσικο-χημικούς παράγοντες. Η θερμοκρασία είναι ο κυριότερος παράγοντας που καθορίζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, που είναι υπεύθυνοι για την αποικοδόμηση της οργανικής ύλης. Οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας καθορίζουν τη διαδοχή συγκεκριμένων ειδών μικροοργανισμών. Η κατανόηση της μικροβιακής ποικιλότητας στα διάφορα στάδια της κομποστοποίησης είναι αναγκαία για να καταστεί δυνατή η πρόβλεψη του βέλτιστου σταδίου εφαρμογής του τελικού προϊόντος και η καλύτερη διαχείριση της διαδικασίας της κομποστοποίησης.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι φυσικο-χημικοί παράγοντες και η μικροβιακή ποικιλότητα κατά τη συγκομποστοποίηση αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων. Τα Υγρά Απόβλητα Ελαιουργείας (ΥΑΕ) και τα Υπολείμματα Εκκοκκιστηρίου Βάμβακος (ΥΕΒ) χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα. Για τη μελέτη της διαδικασίας εκτιμήθηκαν οι φυσικο-χημικοί παράγοντες, καθώς και η μικροβιακή ποικιλότητα.

Τα ΥΑΕ παράγονται κατά την επεξεργασία του ελαιοκάρπου των ελαιοποιήσιμων ποικιλιών ελιάς, σε ελαιοτριβεία κλασσικού ή φυγοκεντρικού τύπου τριών φάσεων (three phase decanter). Στην Ελλάδα, όπου καλλιεργούνται περίπου 130 εκατομμύρια ελαιόδενδρα, παράγονται ετησίως περίπου 1,5 εκατομμύρια τόνοι υγρών αποβλήτων και 400.000 τόνοι στερεών υπολειμμάτων-παραπροϊόντων. Δυστυχώς το σύνολο σχεδόν των υγρών αποβλήτων οδηγείται χωρίς επεξεργασία σε χερσαίους και υδάτινους αποδέκτες. Τα κυριότερα προβλήματα που συνδέονται με τα απόβλητα αυτά είναι: το πολύ υψηλό οργανικό φορτίο που διαθέτουν, το οποίο δεν βιοαποδομείται εύκολα, η πολύ μεγάλη περιεκτικότητά τους σε φαινολικές ενώσεις καθώς και σε μικρού μοριακού βάρους λιπαρά και πτητικά οξέα, στα οποία αποδίδονται φυτοτοξικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες, η εποχικότητα παραγωγής τους μέσα σε 3-4 μήνες από τον Νοέμβριο έως το Φεβρουάριο καθώς και οι τεράστιες σε όγκο ποσότητες.

Η κομποστοποίηση είναι μια χρήσιμη μέθοδος για την αποτελεσματική αντιμετώπιση του προβλήματος των ΥΑΕ. Διάφορες ερευνητικές μελέτες σχετικά με την κομποστοποίηση των ΥΑΕ, καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η διαδικασία είναι αποδοτικότερη αν χρησιμοποιηθούν ως διογκωτικά υλικά άλλα απόβλητα που συνίστανται σε μεγάλο ποσοστό από λιγνίνη και κυτταρίνη και ίσως και άλλα υλικά που θα χρησιμεύσουν ως πηγή αζώτου, με σκοπό τη μείωση - εξάλειψη της φυτοτοξικότητας και την παραγωγή ενός τελικού προϊόντος σταθερού και

χομιοποιημένου, κατάλληλου για χρήση σε ποικίλες γεωργικές πρακτικές (Paredes *et al.*, 2005, Plaza *et al.*, 2005). Τα YEB έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε αρκετά πειράματα συκομποστοποίησης με άλλα οργανικά υλικά, συμπεριλαμβανομένων των YAE (Monteoliva *et al.*, 1996, Parafotiu *et al.*, 2001, Diaz *et al.*, 2002, Paredes *et al.*, 2002, 2005). Λειτουργούν πολύ καλά ως διογκωτικά υλικά, επειδή έχουν υψηλή απορροφητική ικανότητα και αποδίδουν καλή δομή και πορώδες στο μείγμα. Στην παρούσα εργασία έγινε διαβροχή των YEB με τα YAE για τη μελέτη της διαδικασίας της συκομποστοποίησης δύο αγροτοβιομηχανικών υπολειμμάτων, που αποτελούν βασικά υποπροϊόντα της σύγχρονης ελληνικής γεωργικής παραγωγής. Στόχος της διαδικασίας είναι η ουσιαστική μείωση της ποσότητάς τους και η μετατροπή τους σε ένα οργανικό κλάσμα (κόμποστ) που δεν επιβαρύνει το περιβάλλον.

Οι φυσικο-χημικοί παράγοντες που μελετήθηκαν είναι δείκτες της πορείας της διαδικασίας, καθώς και της ποιότητας του παραγόμενου κόμποστ.

Η θερμοκρασία αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα για την εκτίμηση του ρυθμού της κομποστοποίησης. Επιδρά άμεσα στους μικροβιακούς πληθυσμούς και άρα στο ρυθμό αποδόμησης της οργανικής ύλης, που επιτελείται από αυτούς. Συγκεκριμένα, καθορίζει τη διατήρησή τους στη μάζα του σωρού, την ανάπτυξη συγκεκριμένων ειδών και επηρεάζει τη δραστηριότητά τους. Η τιμή της θερμοκρασίας καθορίζεται από δύο παράγοντες, το περιβάλλον και την ένταση και διάρκεια της μικροβιακής δραστηριότητας. Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος κατά την έναρξη της διαδικασίας είναι καθοριστική για τη μέγιστη τιμή που θα σημειωθεί στη θερμόφιλη φάση. Κατά την πορεία της εξέλιξης της διαδικασίας οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας είναι αποτέλεσμα της μικροβιακής δραστηριότητας. Στο σωρό που παρασκευάστηκε, η διακύμανση της θερμοκρασίας συμφωνεί με τα πρότυπα που έχουν περιγραφεί σε κάθε διαδικασία. Στα αρχικά στάδια, ο αυξημένος αριθμός μικροοργανισμών και η έντονη μεταβολική τους δράση, που είναι επακόλουθο της μεγάλης ποσότητας οργανικού υλικού, παράγουν θερμότητα, ως αποτέλεσμα των ζυμώσεων. Σταδιακά, με τη μείωση του αριθμού των μικροοργανισμών και του μεταβολικού τους ρυθμού μειώνεται και η θερμοκρασία. Εντός δύο ημερών, λόγω αφθονίας του προς αποικοδόμηση υποστρώματος και της έντονης μικροβιακής δραστηριότητας για την αποσύνθεσή του, αυξήθηκε η θερμοκρασία σε επίπεδα της θερμόφιλης φάσης (40-50°C). Η θερμόφιλη φάση διήρκεσε 4 ημέρες και η μέγιστη θερμοκρασία που σημειώθηκε ήταν 59°C, και έτσι, έφτασε τα επίπεδα που απαιτούνται για την εξυγίανση του κόμποστ, καθώς θανατώνονται οι παθογόνοι μικροοργανισμοί (Stentiford, 1996). Μετά το γύρισμα, ξεκίνησε μια δεύτερη θερμόφιλη φάση, η οποία ήταν παρατεταμένη. Η θερμογένεση είναι μία από τις σημαντικότερες ιδιότητες της διαδικασίας της κομποστοποίησης, ως αποτέλεσμα της δραστηριότητας των μικροοργανισμών (Kane & Mullins, 1973) και έχει παρατηρηθεί, όπως και η παρατεταμένη θερμόφιλη φάση, και κατά την κομποστοποίηση των YAE (Mari *et al.*, 2005, Altieri *et al.*, 2010), μετά από κάθε προσθήκη YAE στο σωρό. Η θερμοκρασία επηρεάζει όχι μόνο το μεταβολισμό των μικροοργανισμών, αλλά και τη σύνθεση της μικροχλωρίδας. Η θερμοκρασία του σωρού θεωρείται ένας από το κυριότερους παράγοντες που καθορίζουν τον αριθμό των βακτηρίων (Cahyani *et al.*, 2003).

Το pH είναι δείκτης αποδόμησης της οργανικής ουσίας και προσδιορισμού της αποσάθρωσής της. Συνδέεται στενά με την ύπαρξη των μικροβιακών πληθυσμών στο κόμποστ, διότι η τιμή του καθορίζει τη μικροβιακή ποικιλότητα. Τα βακτήρια προτιμούν ουδέτερο pH, οι μύκητες τιμές μεταξύ 4 και 6 και οι ακτινομύκητες περιορίζουν τη δράση τους σε ελαφρά αλκαλικά περιβάλλοντα. Το pH στο αρχικό στάδιο ήταν όξινο (6.5), λόγω της συσσώρευσης των οργανικών οξέων που περιέχουν τα YAE. Μετά τη θερμόφιλη φάση, αρχίζουν και αυξάνονται οι μικροοργανισμοί που διασπούν τα οργανικά οξέα, με συνέπεια την αύξηση της τιμής του pH και την επακόλουθη αύξηση του αριθμού των βακτηρίων στο σωρό. Η αύξηση οφείλεται επίσης και στην αύξηση της αλατότητας, λόγω εξάτμισης του νερού, καθώς και στην απελευθέρωση της αμμωνίας, κατά την αμμωνιοποίηση και ανοργανοποίηση των αζωτούχων οργανικών ενώσεων. Στη συνέχεια, το pH μειώθηκε ελάχιστα, λόγω απωλειών αμμωνιακού αζώτου, και απελευθέρωσης ατόμων υδρογόνου από τη διαδικασία της νιτροποίησης, μέχρι τη μέρα που πραγματοποιήθηκε το γύρισμα, οπότε ξεκίνησε η δεύτερη θερμόφιλη φάση που οδηγεί σε περαιτέρω αποικοδόμηση οργανικού υλικού και μεγαλύτερη αύξηση του pH. Οι τιμές του pH κατά τη διάρκεια της κομποστοποίησης δεν παρουσίασαν μεγάλες διακυμάνσεις, αλλά κυμάνθηκαν στα επίπεδα που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Guardia *et al.*, 2002, Paredes *et al.*, 2002, Zhang *et al.*, 2011).

Η υγρασία είναι καθοριστικός παράγοντας για τη διαδικασία της κομποστοποίησης. Όπως και η θερμοκρασία, έτσι και η υγρασία επιδρά άμεσα στους μικροβιακούς πληθυσμούς άρα και στο ρυθμό της αποικοδόμησης των πρώτων υλών. Η αρχική υγρασία του σωρού ήταν 75%. Κατά την πρώτη μεσόφιλη και θερμόφιλη φάση το ποσοστό υγρασίας μειώθηκε στο 52%, γεγονός που αποδίδεται στην έντονη μικροβιακή δραστηριότητα και τις υψηλές θερμοκρασίες που αναπτύχθηκαν. Η ελάχιστη τιμή του ήταν 48.53%, επομένως ήταν εντός των επιτρεπτών ορίων (45-60%), ώστε να μην ευνοείται η επικράτηση αναερόβιων συνθηκών (ανοξία) ή μερικών αναερόβιων συνθηκών (υποξία). Μετά το γύρισμα και τη διαβροχή του σωρού αυξήθηκε σε ποσοστό 76.34%. Κατά τη δεύτερη θερμόφιλη φάση παρατηρήθηκε εκ νέου απότομη μείωση της υγρασίας, αλλά με χαμηλότερο ρυθμό σε σχέση με την πρώτη θερμόφιλη φάση, επειδή η αύξηση της θερμοκρασίας ήταν μικρότερη από ότι στην πρώτη θερμόφιλη φάση (μικρότερες μέγιστες θερμοκρασίες), αλλά και επειδή η μικροβιακή δραστηριότητα ήταν λιγότερο έντονη, λόγω της μικρότερης ποσότητας διαθέσιμου υλικού προς αποικοδόμηση και, κυρίως, της ύπαρξης ενώσεων που αποικοδομούνται με αργό ρυθμό.

Η ηλεκτρική αγωγιμότητα (EC) εκφράζει τη συγκέντρωση των αλάτων. Αρχικά, είχε υψηλή τιμή, λόγω των διαλυτών αλάτων που περιέχουν τα YAE (Paredes *et al.*, 2002, Plaza *et al.*, 2005, Rigane *et al.*, 2011). Παρουσίασε, όμως, πτωτική τάση κατά τη διάρκεια της θερμόφιλης φάσης, ενώ αυξήθηκε κατά τη δεύτερη μεσόφιλη φάση μέχρι την ημέρα του γυρίσματος. Η αύξηση οφείλεται στην αποσύνθεση του οργανικού υλικού (αποικοδόμηση των όξινων οργανικών ενώσεων, π.χ. καρβοξυλικές, φαινολικές), την αμμωνιοποίηση - ανοργανοποίηση αζωτούχων οργανικών ενώσεων και τη σχετική αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων, λόγω της απώλειας μάζας του σωρού (Paredes *et al.*, 2005). Μετά τη δεύτερη θερμόφιλη φάση η ηλεκτρική

αγωγιμότητα μειώθηκε κατακόρυφα. Η μείωση αυτή αποδίδεται στην αποικοδόμηση των υδατοδιαλυτών ενώσεων των ΥΑΕ από τη δράση των μικροοργανισμών κατά τις δύο θερμοφιλες φάσεις της κομποστοποίησης. Μετά το γύρισμα και τη διαβροχή του σωρού, όπως ήταν αναμενόμενο, αυξήθηκε και έφτασε την υψηλότερη τιμή της (5.87 mS/cm). Στο τέλος της διαδικασίας η τιμή της (4.87 mS/cm) είναι εντός των επιτρεπόμενων ορίων που καθορίζουν τις ποιοτικές προδιαγραφές για τη χρήση του τελικού προϊόντος σε γεωργικές πρακτικές (Μανίος και Μανιαδάκης, 2001).

Κατά την πορεία της κομποστοποίησης η συγκέντρωση του αζώτου (ολικό, αμμωνιακό, νιτρικό άζωτο) παρουσίασε διακυμάνσεις. Το ολικό άζωτο αυξήθηκε καθόλη τη διάρκεια της κομποστοποίησης, κυρίως λόγω της αύξησης της συγκέντρωσής του, η οποία προέρχεται από τη μείωση της μάζας του σωρού (Papadimitriou *et al.*, 1997, Paredes *et al.*, 2000, Anastasi *et al.*, 2005, Paredes *et al.*, 2005), αλλά και λόγω της δράσης των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων. Το αμμωνιακό άζωτο ήταν αρχικά αυξημένο, λόγω της ανοργανοποίησης του οργανικού αζώτου και την παραγωγή αμμωνίου. Στη συνέχεια, όμως, μειώθηκε σημαντικά, λόγω της οξείδωσής του σε νιτρικά (νιτροποίηση) από τη δράση των χημειολιθότροφων βακτηρίων του γένους *Nitrosomonas* και *Nitrobacter* στελέχη των οποίων έχουν απομονωθεί από δείγματα κόμποστ (Kowalchuk *et al.*, 1999, Yamamoto *et al.*, 2010) και της απώλειας του αζώτου των αμμωνιακών και νιτρικών λόγω εξάτμισης και απονιτροποίησης, αλλά και ακινητοποίησής του στους μικροοργανισμούς. Αυτή η πτωτική τάση του αμμωνιακού αζώτου έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες (Balis *et al.*, 1994, Paredes *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2011). Το νιτρικό άζωτο ήταν αρχικά αυξημένο, αλλά η συγκέντρωσή του ήταν μικρότερη από τη συγκέντρωση του αμμωνιακού αζώτου. Έπειτα, μειώθηκε λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας και της παραγόμενης αμμωνίας που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη και τη δράση των νιτροποιητικών μικροοργανισμών. Σε αυτό το γεγονός συνέβαλε και η αντιμικροβιακή δράση που χαρακτηρίζει τα ΥΑΕ. Επιπλέον, η μείωση αυτή μπορεί να εξηγηθεί και από την απουσία υποστρώματος για νιτροποίηση, λόγω της πτητικότητας της αμμωνίας. Γενικά, πρέπει να ελέγχεται ο λόγος του αμμωνιακού αζώτου προς το νιτρικό άζωτο, ώστε στο τελικό στάδιο να κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα για την εξασφάλιση ενός σταθερού τελικού προϊόντος, κατάλληλου για χρήση στο έδαφος, καθώς υψηλή τιμή του λόγου προσδίδει χαμηλή σταθερότητα (Vuorinen *et al.*, 1997).

Η αναπνευστική δραστηριότητα που αντανάκλα τη συνολική μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών, ήταν αυξημένη στην αρχή, επειδή, παρόλο που υπάρχει μικρή συγκέντρωση μικροοργανισμών, λόγω των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων των ΥΑΕ, στην αρχή υπάρχουν μεγάλες ποσότητες εύκολα αποδομήσιμων ενώσεων, οι οποίες αποσυντίθενται με γρήγορο ρυθμό. Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία μειώνεται η αναπνευστική δραστηριότητα, γιατί αναστέλεται ο μεταβολισμός των περισσότερων μικροοργανισμών που είναι ευαίσθητοι στις υψηλές θερμοκρασίες. Το γεγονός ότι και προς το τέλος της κομποστοποίησης μετρήθηκε έντονη αναπνευστική δραστηριότητα, στα ίδια επίπεδα με την αρχική, υποδεικνύει ότι υπάρχουν ακόμα οργανικά υλικά για αποικοδόμηση και ως εκ τούτου η διαδικασία δεν έχει ολοκληρωθεί.

Η κομποστοποίηση είναι μια βιολογική διεργασία και ο ρόλος των μικροοργανισμών, οι οποίοι αποικοδομούν την πρώτη ύλη και συμμετέχουν ενεργά στον κύκλο του άνθρακα και του αζώτου, είναι κυρίαρχος. Και στην περίπτωση των ΥΑΕ, που περιέχουν οργανικές ενώσεις και κυρίως οργανικά οξέα και φαινόλες, ο ρόλος των μικροοργανισμών στην αποικοδόμησή τους είναι πολύ σημαντικός. Η διαδικασία της κομποστοποίησης χαρακτηρίζεται από συνεχείς αλλαγές στη θερμοκρασία, το pH, των θρεπτικών, των επιπέδων οξυγόνου, αζώτου και των άλλων φυσικο-χημικών παραγόντων. Οι παράγοντες αυτοί υπαγορεύουν δυναμική αλλαγή και διαδοχή συγκεκριμένων μικροβιακών ομάδων, έτσι ώστε κάθε στάδιο να χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένους μικροοργανισμούς (Gray *et al.*, 1971, De Bertoldi *et al.*, 1983, Tiquia *et al.*, 2005). Όσο μεγιστοποιείται ο ρυθμός της βιοαποικοδόμησης, λόγω της αυξανόμενης δράσης των μικροοργανισμών, αυξάνεται η θερμοκρασία, προκαλούνται αλλαγές στην τιμή του pH και υπάρχει διαδοχή μικροβιακών ειδών: άλλα είδη είναι κυρίαρχα και άλλα είδη εξαφανίζονται ανάλογα με το στάδιο της διαδικασίας (Hultman *et al.*, 2009). Η ποικιλότητα των μεσόφιλων, θερμοφίλων και θερμοανθεκτικών αερόβιων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, ακτινομυκήτων, ζυμών και άλλων μυκήτων, έχει μελετηθεί κατά την κομποστοποίηση διαφόρων υποστρωμάτων και θεωρείται ότι είναι πολύ μεγάλη (Strom, 1985, Beffa *et al.*, 1996, Hassein *et al.*, 2002).

Ο πληθυσμός των βακτηρίων είναι αυξημένος στις πρώτες φάσεις, όπως αναφέρεται και στη διεθνή βιβλιογραφία. Οι αλλαγές στην τιμή του pH κατά τα αρχικά στάδια συνοδεύονται από αλλαγές στη σύνθεση των βακτηριακών πληθυσμών (Schloss *et al.*, 2003a) και κάθε στάδιο χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένους πληθυσμούς βακτηρίων (Miller, 1996). Κατά την έναρξη της κομποστοποίησης παρατηρούνται βακτήρια που παράγουν αμμωνία, τα οποία αυξάνονται ραγδαία τις δύο πρώτες εβδομάδες και μετά ο πληθυσμός τους μειώνεται. Τη θέση τους καταλαμβάνουν τα αυτότροφα νιτροποιητικά βακτήρια, που ανιχνεύονται στο σωρό μέχρι το τέλος της διαδικασίας. Τα κυτταρινολυτικά βακτήρια δραστηριοποιούνται κατά τη θερμοφιλή φάση και τη φάση που ακολουθεί αυτής, αλλά ο ρυθμός ανάπτυξής τους είναι μικρός, επειδή στο τελευταίο στάδιο επικρατούν οι κυτταρινολυτικοί μύκητες και ακτινομύκητες (Riffaldi *et al.*, 1986). Παρατηρήθηκε ότι η αρχική συγκέντρωση των βακτηρίων στο σωρό είναι μικρή, πιθανώς λόγω των αντιμικροβιακών παραγόντων των ΥΑΕ. Στο αρχικό στάδιο επικρατούν τα μεσόφιλα βακτήρια (ο πληθυσμός τους είναι μεγαλύτερος από των υπόλοιπων μικροοργανισμών) που είναι οι κύριοι αποικοδομητές του φρέσκου οργανικού υλικού. Τα βακτήρια είναι γνωστό ότι αυξάνονται πολύ γρήγορα όταν υπάρχουν εύκολα αποικοδομήσιμα υποστρώματα (Golueke, 1992, Epstein 1997). Ακολούθως, ο αριθμός τους μειώθηκε, όπως ήταν αναμενόμενο, λόγω της απότομης αύξησης της θερμοκρασίας, οπότε πολλά είδη δεν μπορούν να επιβιώσουν στη θερμοφιλή φάση ή αδρανοποιούνται, ωστόσο η μείωσή τους δεν ήταν ιδιαίτερα σημαντική. Στη θερμοφιλή φάση τα βακτήρια αυξάνονται αποικοδομώντας τις πιο πολύπλοκες ενώσεις ή εκμεταλλευόμενα τις ουσίες που απελευθερώνονται από την αποσύνθεση ενώσεων, οι οποίες έχουν διασπαστεί από εξωκυτταρικά ένζυμα που εκκρίνουν άλλοι οργανισμοί (Epstein, 1997). Μετά την

επακόλουθη πτώση της θερμοκρασίας ο αριθμός τους αυξήθηκε, επειδή ενεργοποιήθηκαν τα μεσόφιλα είδη και συγχρόνως υπήρχε διαθέσιμη σημαντική ποσότητα οργανικών υλικών προς αποικοδόμηση. Το μέγιστο του αριθμού των βακτηρίων (1.91×10^{11} CFU/g ξ.β.) σημειώθηκε μετά το γύρισμα, επειδή η ανάμιξη και η ομογενοποίηση του οργανικού υλικού κατέστησε περισσότερο θρεπτικά διαθέσιμα, ενώ η διατήρηση των αερόβιων συνθηκών επέτρεψε την ανταλλαγή αερίων και απομάκρυνε τυχόν παγιδευμένα αέρια προϊόντα, ενώ παράλληλα αυξήθηκε και η υγρασία του υποστρώματος.

Παρόλο που οι μύκητες είναι οι κυριότεροι αποικοδομητές του οργανικού υλικού σε όλα τα χερσαία οικοσυστήματα, η συμβολή τους στη διαδικασία της κομποστοποίησης θεωρείται μικρή συγκρινόμενη με αυτή των βακτηρίων (Miller, 1996 - Bonito *et al.*, 2010) ή ίσως δεν είναι τόσο καλά μελετημένη (Peters *et al.*, 2000). Οι μύκητες χρησιμοποιούν διάφορες πηγές άνθρακα, κυρίως λιγνινοκυτταρινούχα πολυμερή, αποικοδομούν πολύπλοκα πολυμερή, όπως αρωματικές ενώσεις και μπορούν να επιβιώσουν σε ακραίες συνθήκες (χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης οξυγόνου, ξηρές συνθήκες). Επιπλέον, αυξάνουν τη γονιμότητα του εδάφους, όταν το κόμποστ χρησιμοποιείται ως λίπασμα, συμβάλλουν στην καταστολή των ασθενειών των φυτών και ευνοούν την καρποφορία μανιταριών (Straatsma & Samson, 1994). Παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός τους στην αρχή είναι μεγάλος, επειδή είναι μεσόφιλοι μικροοργανισμοί και μειώθηκε αρκετά κατά τη θερμόφιλη φάση, στην οποία επικρατούν κυρίως οι θερμοανθεκτικοί και θερμόφιλοι μύκητες, ενώ πολλά είδη μπορεί να υπάρχουν σε ανενεργή μορφή (σκληρώτια, σπόρια). Οι μύκητες είναι περισσότερο ευαίσθητοι στη θερμοκρασία από ότι τα βακτήρια, όπως επίσης και στην υγρασία. Γενικά, ο πληθυσμός τους είναι μικρός κατά τη θερμόφιλη φάση, αλλά δραστηριοποιούνται πιο έντονα στις μεσόφιλες και ειδικότερα στη δεύτερη μεσόφιλη και στο τελικό στάδιο της διαδικασίας (στάδιο ωρίμανσης), επειδή αποικοδομούν τα εναπομείναντα δύσκολα αποδομήσιμα υποστρώματα, που είναι κυρίως κυτταρίνη και λιγνίνη (de Bertoldi *et al.*, 1983). Στο στάδιο αυτό, οι συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και pH δεν είναι πλέον απαγορευτικές και ο αριθμός τους αυξάνεται εκ νέου. Μετά το γύρισμα, ο πληθυσμός των μυκήτων έφτασε στη μέγιστη τιμή του (1.9×10^7 CFU/g ξ.β.).

Οι ακτινομύκητες αυξάνονται πολύ πιο αργά συγκριτικά με τα βακτήρια και τους μύκητες και έτσι δεν είναι ανταγωνιστικοί στη διεκδίκηση θρεπτικών που βρίσκονται σε μεγάλη ποσότητα, όπως συμβαίνει στα αρχικά στάδια της αποικοδόμησης (Beffa *et al.*, 1995). Ο πληθυσμός τους μειώθηκε στη θερμόφιλη φάση και αυξήθηκε σημαντικά μετά από γύρισμα, οπότε και έφτασε στη μέγιστη τιμή του (4.5×10^9 CFU/g ξ.β.). Στο στάδιο της ωρίμανσης, ο πληθυσμός τους αυξάνεται, όπως και των μυκήτων, επειδή αποικοδομούν τις δύσκολα αποικοδομήσιμες ενώσεις (κυτταρίνη).

Τα σποριογόνα βακτήρια αυξήθηκαν κατά τις δύο θερμόφιλες φάσεις, καθώς είναι ανθεκτικά στις υψηλές θερμοκρασίες. Η αφθονία τους σχετίζεται με το σχηματισμό ενδοσπορίων και την αντοχή τους σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών που χαρακτηρίζουν τη θερμόφιλη φάση (Peters *et al.*, 2000). Είδη όπως *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B.*

cereus, *B. sphaericus*, *B. coagulans* και *B. stearothermophilus* έχουν βρεθεί σε διάφορα είδη κόμποστ (Strom, 1985, Ryckeboer *et al.*, 2003, Anastazi *et al.*, 2005, Asraf *et al.*, 2007). Θερμόφιλα σποριογόνα είδη, όπως τα είδη του γένους *Bacillus* (στελέχη *B. stearothermophilus* είναι τα μόνα που έχουν ανιχνευτεί σε θερμοκρασίες μέχρι 69°C) (Storm, 1985) και *Clostridium* (τα κυριότερα βακτήρια που διασπούν την κυτταρίνη, Tiquia *et al.*, 2005), είναι οι μικροοργανισμοί που κυριαρχούν σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 60°C.

Κατά τις δύο πρώτες δειγματοληψίες δεν εντοπίστηκαν στο σωρό κυτταρινολυτικά βακτήρια, αλλά εμφανίστηκαν κατά τη δεύτερη μεσόφιλη και τη δεύτερη θερμόφιλη φάση. Το γεγονός αυτό ήταν αναμενόμενο, γιατί, όπως προαναφέρθηκε, στην αρχή της κομποστοποίησης υπάρχουν εύκολα αφομοιώσιμες οργανικές ενώσεις, ενώ προς το τέλος της διαδικασίας, που οι ουσίες αυτές έχουν αποικοδομηθεί, δραστηριοποιούνται οι κυτταρινολυτικοί μικροοργανισμοί που διασπούν τις πιο δύσκολα αποδομήσιμες ενώσεις που έχουν παραμείνει στο σωρό, όπως η κυτταρίνη και η λιγνίνη.

Η μελέτη της αζωτοδέσμευσης καθώς και η εκτίμηση των αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών, έδειξε ότι ο πληθυσμός των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων ήταν υψηλός σε όλες τις φάσεις της κομποστοποίησης. Έχει αναφερθεί στο παρελθόν η ανάπτυξη αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων σε ΥΑΕ και έχει υπογραμμιστεί η σημασία της ύπαρξης τους επειδή, αν τα ΥΑΕ προστεθούν στο έδαφος, η δράση τους θα το εμπλουτίσει με πολυσακχαρίτες, που συμβάλουν στη σταθερότητα της δομής του, θα καταστείλει την ανάπτυξη ορισμένων φυτοπαθογόνων μυκήτων και θα αυξήσει τη γονιμότητα (Balis *et al.*, 1987, Tomati *et al.*, 1990, Balis *et al.*, 1996). Ενδιαφέρον ήταν το γεγονός ότι εντοπίστηκε δραστηριότητα κατά τη δεύτερη θερμόφιλη φάση, αποτέλεσμα της ύπαρξης θερμοανθεκτικής μικροχλωρίδας, η οποία παρέμεινε ενεργή μέχρι τότε. Δεν ήταν δυνατή, παρόλα αυτά, η απομόνωση βακτηρίων από τη θερμόφιλη φάση σε καθαρή καλλιέργεια. Δυστυχώς, η μελέτη της αζωτοδεσμευτικής δραστηριότητας απευθείας σε δείγματα κόμποστ δεν έδωσε θετικά αποτελέσματα στη δοκιμή του ακετυλενίου. Θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική η ύπαρξη ενδογενών αζωτοδεσμευτικών πληθυσμών βακτηρίων και η συμβολή τους στον εμπλουτισμό του τελικού προϊόντος με άζωτο, αφού η εφαρμογή του στο έδαφος θα αποτρέψει τη χρήση χημικών αζωτούχων λιπασμάτων, που επιβαρύνουν το περιβάλλον.

Στην παρούσα εργασία απομονώθηκαν σε καθαρή καλλιέργεια 27 στελέχη μυκήτων, τα οποία μελετήθηκαν ως προς τα ταξινομικά χαρακτηριστικά τους (μελέτη μακροσκοπικών και μικροσκοπικών χαρακτήρων) και έγινε προσπάθεια ταυτοποίησης τριών στελεχών μυκήτων που απομονώθηκαν από τρία διαφορετικά στάδια της διαδικασίας της κομποστοποίησης με τη χρήση μοριακών τεχνικών. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης και χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές που στόχευαν στο γονίδιο 18S rDNA και την ITS περιοχή του ριβοσώματος. Το γονίδιο 18S rDNA κωδικοποιεί για το 18S rRNA της μικρής υπομονάδας (Small SubUnit-coding sequence) του ευκαρυωτικού ριβοσώματος και η ITS (Internal Transcribed Spacer), που είναι μια εξαιρετικά μεταβαλλόμενη μη-

κωδική περιοχή που περιβάλλει την 5.8S κωδική περιοχή και παρεμβάλλεται μεταξύ των ακολουθιών που κωδικοποιούν για τη μικρή (SSU) και τη μεγάλη (LSU) υπομονάδα του ριβοσώματος και βρίσκονται σε σειρά και συγκροτούν μια γονιδιακή συστοιχία (gene cluster). Οι ITS περιοχές του ριβοσωμικού DNA των μυκήτων έχουν μεγάλη σημασία για τη διάκριση των ειδών με την PCR και είναι αυτές που χρησιμοποιούνται περισσότερο στην ταξινόμηση και φυλογένεση.

Οι αλληλουχίες των τριών στελεχών (K1As1, K3As4, K4As8) συγκρίθηκαν με αλληλουχίες ήδη ταυτοποιημένων ειδών που έχουν καταχωρηθεί σε διεθνείς βάσεις δεδομένων. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης ήταν ο εντοπισμός γονιδίων που κωδικοποιούν για το 18S rRNA και την ITS περιοχή του ριβοσώματος και παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με αντίστοιχα γονίδια οργανισμών που έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί και έχουν καταχωρηθεί στις βάσεις δεδομένων. Τα τρία στελέχη βρέθηκε ότι έχουν υψηλή ομολογία με τα είδη του γένους *Aspergillus* που ανήκουν σε τρεις διαφορετικές ομάδες (sections): *Aspergillus* section *fumigati*, *A.* section *flavi* και *A.* section *nigri*, αντίστοιχα. Το στέλεχος K1As1 έχει υψηλή ομολογία με το είδος *Aspergillus fumigatus*. Το στέλεχος K3As4 έχει υψηλή ομολογία με το είδος *Aspergillus flavus* και το στέλεχος K4As8 έχει υψηλή ομολογία με το είδος *Aspergillus niger* και *Aspergillus tubingensis*.

Το γένος *Aspergillus* είναι το πιο κοινό γένος μυκήτων που έχει βρεθεί σε διάφορα είδη κόμποστ (Strom, 1985, Ryckeboer *et al.*, 2003, Anastazi *et al.*, 2005, Asraf *et al.*, 2007). Η κυριαρχία του οφείλεται στην ευρεία εξάπλωσή του, ως σαπροτροφικός οργανισμός. Τα σπόρια του βρίσκονται παντού διασκορπισμένα, και σχετίζονται με τα οργανικά υλικά και το έδαφος. Το γένος *Aspergillus* περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1729 και είναι ένα από τα σημαντικότερα από οικονομικής απόψεως γένη, αφού πολλές βιομηχανικές διεργασίες βασίζονται σε είδη του, τα οποία χρησιμοποιούνται για τη βιομηχανική παραγωγή οινοπνευματωδών, τροφίμων, φαρμάκων και ενζύμων. Από την άλλη πλευρά, τα είδη του γένους μπορεί να μολύνουν τα τρόφιμα ή να προκαλέσουν ποικίλες ασθένειες σε φυτά και ζώα. Επίσης είναι ικανά να παράγουν μυκοτοξίνες, με κυριότερη την αφλατοξίνη, που έχει ισχυρά καρκινογόνες ιδιότητες.

Τα είδη του γένους *Aspergillus* section *Nigri* ή των μαύρων *Aspergillus* έχουν ευρεία εξάπλωση και μεγάλη ικανότητα ανάπτυξης σε ποικίλα υποστρώματα. Τα στελέχη που ανήκουν στην ομάδα αυτή χαρακτηρίζονται από το σχηματισμό κονιδίων χρώματος σκούρου καφέ προς μαύρου, με σφαιρικές κύστες που φέρουν μία ή δύο σειρές φιαλιδίων και υαλώδεις ή ελαφρά χρωματισμένες στο τοίχωμα υφές (Klich, 2002). Η ομάδα αυτή παρουσιάζει μεγάλα ταξινομικά προβλήματα, επειδή τα είδη εμφανίζουν πολύ μικρές διαφορές μεταξύ τους (Silva *et al.*, 2011). Πολλά είδη μπορούν να διαχωριστούν μεταξύ τους με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, ενώ άλλα, όπως τα είδη που μοιάζουν με τον *A. niger*, δεν μπορούν. Η χρήση μοριακών τεχνικών αποκάλυψε πολλά κρυπτικά είδη που μέχρι τότε θεωρούνταν ότι ανήκαν σε ήδη χαρακτηρισμένα είδη. Η σύγκριση της ITS περιοχής του ριβοσώματος μπορεί να διακρίνει μόνο τα είδη με μία ή δύο σειρές φιαλιδίων στην κεφαλή του κονιδιοφόρου.

Συγκρίνοντας τις αλληλουχίες των γονιδίων που κωδικοποιούν για τη β-τουμπουλίνη διαχωρίζονται όλα πλην ενός (*A. lacticoffeatus*) (Samson *et al.*, 2004), ενώ με σύγκριση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την καλμοδουλίνη επιτυγχάνεται πλήρης διαχωρισμός των ειδών της ομάδας αυτής (Samson *et al.*, 2007). Ο *Aspergillus tubingensis* ανήκει στην ομάδα αυτή και για τον πλήρη χαρακτηρισμό του απαιτείται ανάπτυξη του στελέχους σε διαφορετικά υποστρώματα, μικροσκοπική παρατήρηση, βιοχημικές αναλύσεις των δευτερογενών μεταβολιτών του και μοριακή ανάλυση. Η χρήση της πολυφασικής ταξινόμησης συμβάλλει στην επίλυση των ταξινομικών προβλημάτων. Το είδος *A. tubingensis* παρουσιάζει μεγάλη μορφολογική ομοιότητα με το *A. niger*. Το *A. tubingensis* παράγει σκληρώτια, τα οποία παρατηρούνται στο *A. niger* σε σπάνιες περιπτώσεις (Samson *et al.*, 2004). Οι διαφορές μεταξύ τους αποσαφηνίζονται αν γίνει η αλληλούχιση του γονιδίου της β - τουμπουλίνης (Valero *et al.*, 2007).

Το είδος *A. fumigatus* αναπτύσσεται, σχηματίζοντας αποικία με βελούδινη υφή, και παράγει σπόρια πολύ γρήγορα, ενώ χαρακτηρίζεται από παχείς κονιδιοφόρους, ακανόνιστους, μεγάλες, διογκωμένες, ροπαλοειδείς κύστες. Απαντάται κυρίως στο έδαφος και στον άνθρωπο (παθογόνο). Είναι υπεύθυνο για την παραγωγή των φουμιτοξινών και άλλων δευτερογενών μεταβολιτών (Samson *et al.*, 2007). Ο *Aspergillus fumigatus* είναι υπεύθυνος για τις περισσότερες περιπτώσεις ασπεργίλλωσης παγκοσμίως. Είναι από τα πλέον θερμόφιλα είδη που αναπτύσσονται στην αποικοδομούμενη νεκρή οργανική ύλη και απαντάται πολύ συχνά σε διάφορα είδη κόμποστ. Έχει παρατηρηθεί, σε μονάδες κομποστοποίησης, ιδιαίτερα μεγάλη συγκέντρωση σπορίων *Aspergillus fumigatus* σε δείγματα αέρα που έφτανε τα 10^4 - 10^5 CFU/m³ (Fischer *et al.*, 1998, Fischer *et al.* 1999, Browne *et al.*, 2001, Epstein *et al.*, 2001), χωρίς όμως να εντοπιστούν ισχυρές μυκοτοξίνες. Αυτές, φαίνεται, ότι δεν παράγονται φυσικά στο κόμποστ (Fischer *et al.*, 1999), αλλά έχουν εντοπιστεί αρκετοί άλλοι δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι μπορεί να σχετίζονται με καταστάσεις αλλεργικής αντίδρασης.

Ο *Aspergillus flavus* είναι από τα πλέον άφθονα και ευρέως διαδεδομένα είδη μυκήτων του εδάφους. Είναι σαπροτροφικό είδος, ικανό να αναπτυχθεί σε ετερογενή οργανικά υποστρώματα όπως φυτικά υπολείμματα, φύλλα δένδρων, σητόμενο ξύλο, βαμβάκι, σωρούς κόμποστ, νεκρά έντομα και ζώα, κ.α. (Klich, 1998). Σε φυσιολογικές συνθήκες απαντάται υπό τη μορφή μυκηλίου που σχηματίζει αγενή σπόρια. Αν όμως υπάρξει κάποια περιβαλλοντική καταπόνηση, μπορεί και σχηματίζει ανθεκτικές δομές, τα σκληρώτια. Είναι το δεύτερο κατά σειρά υπεύθυνο είδος για τα κρούσματα ασπεργίλλωσης, μετά τον *Aspergillus fumigatus* (Denning *et al.*, 1991, Denning, 1998).

Η ταυτοποίηση των ειδών του γένους *Aspergillus* παραδοσιακά βασιζόταν στα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά της αποικίας που έχει καλλιεργηθεί σε ένα θρεπτικό υπόστρωμα, καθώς και στη μελέτη των χαρακτηριστικών στο μικροσκόπιο. Η αναγνώριση, όμως, των πιο κοινών και σημαντικών ειδών είναι συχνά προβληματική, εξαιτίας της μεγάλης διακύμανσης των μορφολογικών χαρακτήρων. Ως εκ τούτου, η ύπαρξη γρήγορων μεθόδων που βασίζονται στην αλληλούχιση του DNA είναι πολύτιμη

για την αναγνώριση των ειδών του γένους (Hinrikson *et al.*, 2005). Ο ρόλος της γονιδιωματικής προς αυτή την κατεύθυνση είναι πολύ σημαντικός. Η διαθεσιμότητα αλληλουχιών από διάφορα είδη του γένους επιτρέπει την ανάλυση των ειδών σε επίπεδο ολόκληρου γονιδιώματος και τις συγκρίσεις σε δια- και ενδο- ειδικό επίπεδο για την αποκάλυψη της ποικιλομορφίας των ειδών και έχουν αναπτυχθεί νέες μέθοδοι για την ταξινόμηση και ταυτοποίηση. Παρόλα αυτά οι πληροφορίες που μας δίνουν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά παραμένουν χρήσιμες και ο συνδυασμός τους με τις σύγχρονες μοριακές και αναλυτικές μεθόδους έχουν εισάγει την έννοια της πολυφασικής ταξινόμησης, η οποία συνδυάζει τους μορφολογικούς χαρακτήρες και την αλληλούχιση του DNA και βασίζεται στην αρχή ότι τα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά της καλλιέργειας και οι παραγόμενοι μεταβολίτες είναι εξίσου σημαντικά με τα μοριακά δεδομένα (Samson *et al.*, 2006).

Τα δεδομένα από τη ταξινομική μελέτη των τριών στελεχών με βάση τα χαρακτηριστικά της μορφολογίας τους συνεκτιμήθηκαν για την ανάλυση των δεδομένων που προέκυψαν από την αλληλούχιση του DNA και την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για την ταξινόμηση των ειδών. Βασιζόμενοι στα μορφολογικά χαρακτηριστικά το στέλεχος K4As8 θεωρήθηκε ότι είναι το είδος *A.tubingensis*. Το είδος αυτό, όμως, όπως προαναφέρθηκε, παρουσιάζει μεγάλη μορφολογική ομοιότητα με το *A. niger*. Βασιζόμενοι στην αλληλούχιση του DNA ως προς το γονίδιο 18SrRNA το είδος έχει υψηλή ομοιότητα με το *A. niger*. Οι διαφορές μεταξύ τους αποσαφηνίζονται αν γίνει η αλληλούχιση του γονιδίου της β - τουμπουλίνης (Valero *et al.*, 2007). Επιπλέον, πρέπει να συνεκτιμηθεί το γεγονός ότι το γονίδιο για το 18S είναι χρήσιμο για την ταξινόμηση και φυλογένεση σε επίπεδο τάξεων ή υψηλότερο από αυτό.

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των τριών στελεχών για κάθε γονίδιο, ευθυγραμμίστηκαν χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο ClustalW και του προγράμματος Mega 5.0, με αντίστοιχα γονίδια συγγενικών ειδών, των οποίων οι αλληλουχίες είναι διαθέσιμες στο διαδίκτυο και προέκυψαν με τη χρήση του BLAST. Βάσει των αποτελεσμάτων των μοριακών τεχνικών που εφαρμόστηκαν για την παρούσα μελέτη και της επεξεργασίας τους στο NCBI και της φυλογενετικής ανάλυσης με το πρόγραμμα Mega 5.0 αποδεικνύεται ότι τα στελέχη, όσον αφορά στην περιοχή ITS1, απέχουν μεταξύ τους φυλογενετικά, απόσταση της τάξεως του 90% περίπου για τα K1AS1 (*A. fumigatus*) και K3AS4 (*A. flavus* ή *A. oryzae*) και ότι υπάρχει επίσης 90% ομοιότητα μεταξύ των K3AS4 και K4As8 (*A. niger*, *A. tubingensis*).

Όσον αφορά στο γονίδιο 18S rRNA παρατηρούμε ότι στην ευθυγράμμιση εμφανίζονται με υψηλή ομοιότητα (99.2-99.6%), γεγονός που ήταν αναμενόμενο αν λάβουμε υπόψη ότι πρόκειται για μια πολύ συντηρημένη νουκλεοτιδική περιοχή μεταξύ των μυκήτων. Άλλωστε για το λόγο αυτό η ταυτοποίηση των στελεχών βασίζεται περισσότερο στην ανάλυση της περιοχής ITS1 σε συνδυασμό πάντα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης του 18S rRNA γονιδίου. Στην περίπτωση μας τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δύο γονιδίων που μελετήθηκαν συνάδουν. Για περαιτέρω ανάλυση και ενίσχυση των αποτελεσμάτων θα πρέπει να αναλυθούν

περισσότερα γονίδια και στα τρία στελέχη, ώστε να επιβεβαιωθούν οι ενδείξεις για την ταυτότητά τους.

Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι οι μικροοργανισμοί στο κόμποστ ποικίλουν. Διάφορες μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση της μικροβιακής ποικιλότητας και της μικροβιακής διαδοχής στο κόμποστ. Αυτές περιλαμβάνουν τις παραδοσιακές τεχνικές καλλιέργειας (culture based), βιοχημικές αναλύσεις (π.χ. ανάλυση λιπιδίων PLFA, προφίλ κινονών) και τις μοριακές τεχνικές (culture independent). Οι συμβατικές τεχνικές για τη μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας συμπληρώνονται από τις μοριακές. Ο συνδυασμός και των δύο είναι προτιμότερος, καθώς η μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας που βασίζεται μόνο σε τεχνικές καλλιέργειας, αποτυγχάνει να ανιχνεύσει και να ταυτοποιήσει πλήρως όλη τη μικροχλωρίδα (Parmisano *et al.*, 1993), γεγονός που έχει αποδειχτεί και σε δείγματα κόμποστ, ενώ από την άλλη πλευρά τα αποτελέσματα από την ανάλυση της rDNA ακολουθίας, δείγματος βακτηρίων που έχει καλλιεργηθεί και των κλωνοποιημένων ακολουθιών δείγματος DNA που έχει απομονωθεί από δείγμα κόμποστ, δείχνουν ότι δεν υπάρχουν επικαλύψεις μεταξύ τους (Dees & Ghiorse, 2001, Schloss *et al.*, 2002).

Και στην περίπτωση των μυκήτων, οι συμβατικές τεχνικές εξακολουθούν να είναι απαραίτητες για την πλήρη μελέτη και ταυτοποίηση των ειδών που υπάρχουν στο δείγμα (Anastazi *et al.*, 2005). Οι κλασσικές μικροβιολογικές τεχνικές επιτρέπουν την απομόνωση στελεχών σε καθαρές καλλιέργειες, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη διεξαγωγή ταξινομικής μελέτης με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, τη φυσιολογία τους, την ικανότητα να παράγουν μεταβολίτες κ.ά. Οι πληροφορίες αυτές είναι απαραίτητες για το χαρακτηρισμό των απομονωμένων στελεχών. Από την άλλη πλευρά, η μοριακή ανάλυση συμβάλλει και επιβεβαιώνει ή ανατρέπει τις πληροφορίες για τη συστηματική των στελεχών, ενώ προσφέρει μια λειτουργική ανάλυση. Τα δεδομένα αυτά είναι απαραίτητα για τον πλήρη καθορισμό της μικροβιακής ποικιλότητας, η οποία διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο σε όλη τη διαδικασία της κομποστοποίησης. Κατά συνέπεια, είναι δυνατή η εκτίμηση της αφθονίας, της ποικιλότητας και της διαδοχής των ειδών. Καθώς η σύνθεση της μικροχλωρίδας σχετίζεται με τους φυσικο-χημικούς παράγοντες και την ωρίμανση του κόμποστ, η καλύτερη κατανόηση της, συμβάλλει στην καλύτερη διαχείριση της διαδικασίας. Επιπλέον, με τις τεχνικές αυτές επισημαίνονται οι δυνατότητες των ειδών που απομονώνονται, δίνοντας την προοπτική νέων βιοτεχνολογικών εφαρμογών.

Δεδομένου ότι οι περιβαλλοντικές συνθήκες κατά την κομποστοποίηση παρουσιάζουν ριζικές διαφορές με αυτές που επικρατούν στα περισσότερα φυσικά περιβάλλοντα, είναι πιθανό μικροοργανισμοί από τον κόμποστ να μη βρεθούν σε άλλα οικοσυστήματα. Επομένως, οι έρευνες σχετικά με τη μικροβιακή ποικιλότητα του κόμποστ μπορεί να έχουν ευεργετικά αποτελέσματα, όχι μόνο για τη βιομηχανική κομποστοποίηση, αλλά και για τις χρήσεις του τελικού προϊόντος (Asraf *et al.*, 2007), αλλά και με την προοπτική άλλων βιοτεχνολογικών εφαρμογών, όπως η δημιουργία μικροοργανισμών που θα καταστέλνουν τις ασθένειες των φυτών ή βακτηρίων που θα προωθούν την ανάπτυξή τους και επιβεβαιώνει την απομάκρυνση των παθογόνων

κατά την πορεία της κομποστοποίησης (Boehm *et al.*, 1993). Η μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών που υπάρχει στο κόμποστ, παραμένει ανεκμετάλλευτη και χρειάζεται περαιτέρω έρευνα. Πολλά είδη μυκήτων, βακτηρίων και ακτινομυκήτων που έχουν βρεθεί σε δείγματα κόμποστ ερευνώνται για να εκτιμηθεί η ικανότητά τους να αποικοδομούν πετρελαϊκούς υδρογονάνθρακες, αλλά και για τον αποχρωματισμό πολλών συνθετικών χρωστικών, προκειμένου να αποσαφηνιστεί η πιθανή δυνατότητα εφαρμογή τους για βιοεξυγίανση (Anastazi *et al.*, 2005).

Συμπερασματικά, στην παρούσα εργασία η πορεία της κομποστοποίησης προχώρησε σε ικανοποιητικά επίπεδα μέχρι την 68η ημέρα που πραγματοποιήθηκε η τελευταία δειγματοληψία. Η συγκομποστοποίηση των δύο αγροτοβιομηχανικών προϊόντων που χρησιμοποιήθηκαν, τα οποία αποτελούν δύο βασικά γεωργικά υποπροϊόντα για την Ελλάδα, είναι μια ορθή πρακτική για τη διαχείριση του μεγάλου όγκου των αποβλήτων αυτών και την ανακύκλωση των οργανικών τους υλικών. Η ανίχνευση κάποιων μικροοργανισμών στο κόμποστ αντανακλά την ποιότητά του (Strom, 1985). Η μελέτη των φυσικο-χημικών παραγόντων και της μικροβιακής ποικιλότητας κατά την πορεία της κομποστοποίησης είναι αναγκαία για την καλύτερη διαχείριση της διαδικασίας και την εξασφάλιση ενός τελικού προϊόντος, σταθερού, χωρίς παθογόνους παράγοντες, κατάλληλο για αποθήκευση και εφαρμογή στο έδαφος χωρίς δυσάρεστες περιβαλλοντικές επιπτώσεις και για χρήση σε ποικίλες γεωργικές εφαρμογές με ευεργετικά αποτελέσματα. Η βελτιστοποίηση των παραγόντων που σχετίζονται με την κομποστοποίηση θα συμβάλλει στην ανάπτυξη καλύτερων βιομηχανικών πρακτικών. Κρίνεται αναγκαία λοιπόν, η περαιτέρω μελέτη της διαδικασίας της συγκομποστοποίησης και των φυσικο-χημικών και μικροβιολογικών παραγόντων που σχετίζονται με αυτή, καθώς επίσης και η διερεύνηση των ποσοτήτων των Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργείας που είναι δυνατόν να απορροφηθούν κατά τη συγκομποστοποίησή τους με άλλα στερεά αγροτοβιομηχανικά υποπροϊόντα, πέρα από τα Υπολείμματα Εκκοκκιστηρίου Βάμβακος.

5. Βιβλιογραφία

- Aktas E.S, Imre S., Ersoy L., 2001. Characterization and lime treatment of olive mill wastewater. *Water research*. 35 (9): 2336-2340.
- Alburquerque, J.A., Gonzalvez, J., Garcia, D., Cegarra, J., 2006. Composting of a solid olive-mill by product (“alperujo”) and the potential of the resulting compost for cultivating pepper under commercial conditions, *Waste Management*, 26: 620-626.
- Allcroft, Ruth, Carnaghan R.B.A, Sargeant K., O’Kelly J. 1961. A toxic factor in Brazilian groundnut meal. *Vet. Rec.* 73: 428.
- Altieri R., Esposito A. 2010. Evaluation of the fertilizing effect of olive mill waste compost in short-term crops. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 64 (2): 124-128.
- Amaike S., Keller N. P. 2011. *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*. 49 (1): 107-133.
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual microbial cells without Cultivation, *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*. p. 143-169.
- Anastasi A., Varese G. C., Marchisio V. F., 2005. Isolation and identification of fungi in compost and vermicompost. *Mycologia*. 97 (1): 33-44.
- Anastasiou, C.C., Christou, P., et al, 2011. Approaches to Olive Mill Wastewater Treatment and Disposal in Cyprus, *Environmental Research Journal*, 5 (2):49-58.
- Anderson, I.C., Campbell, C.D., Prosser, J.I., 2003. Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil, *Environmental Microbiology*, 5 (1): 36-47.
- Argeiti G., Ehaliotis C., Katsaris P., Zervakis G. & Papadopoulou K., 2001. Effect of olive mill wastes on soil-borne phytopathogenic fungi. *Phytopathologia Mediterranea* 40: 201.
- Ashraf, Rabia, Shahid, Faiza, Tasneem, Adam Ali, 2007. Association of fungi, bacteria and actinomycetes with different composts, *Pak. J. Bot.*, 39 (6): 2141-2151.
- Azbar N., Sengul F., Ozer A., Bayram A., Filibelli A., Muezzinoglou A. 2004. A review of waste management options in olive oil production. *Reviews in Environmental Science and Technology*. 34 (3): 209-247.
- Baker S. E. et al. 2008. Fungal genome sequencing and bioenergy. *Fungal biology reviews*. 22 (1): 1-5.
- Balis, C., Flouri, F., Servis, D. and Tjerakis, C. 1987. Study and remediation measures coping with the environmental pollution of olive mills waste waters. Progress Report to

the Greek Ministry of Agriculture.

Balis, C. 1989. The dynamics of the aerobic valorization of olive oil mills wastewaters (katsigaros) (in Greek). In *Management of Olive Mills Wastes*, Proceedings of Scientific Conference. Irakleion, Crete, 31 March 1989. eds Geotechnical Chamber of Greece, Thessaloniki, Greece.

Balis, C., Chatapavilidis, J. and Flouri, F. 1991. Integrated management of olive oil mills wastewaters. In *Management of Olive Mills Wastes* (in Greek). Proceedings of International Seminar, Chania, Crete, 9-10 May 1991, eds Geotechnical Chamber of Greece, Thessaloniki, Greece.

Balis, C., Chatzipavlidis, J., Flouri, F., 1996. Olive Mill Waste as a Substrate for Nitrogen Fixation, *International Biodeterioration & Biodegradation*. p.169-178.

Barnett, H. L., Hunter, B. B., 1998, Illustrated genera of Imperfect fungi. Fourth edition, The American Phytopathological Society.

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

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

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

Beffa, T., 2002. The Composting Biotechnology: A Microbial Aerobic Solid Substrate Fermentation Complex Process, *The composting process and management*, 1-37.

De Bertoldi M., Vallini G., Pera A., 1983. The Biology of Composting: A Review, *Waste Management & Research*. 1: 157-176.

Blanc M., Marilley L., Beffa T., Aragno M., 1999. Thermophilic bacterial communities in hot composts as revealed by most probable number counts and molecular (16S rDNA) methods. *FEMS Microbiology Ecology*. 28: 141-149.

Boehm M.J., Madden L.V., Hoitink H.A.J. 1993. Effect of organic matter decomposition level on bacterial species diversity and composition in relationship to *Pythium* damping-off severity. *Appl. Environ. Microbiol* 59: 4171-4179.

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

- Borneman, J., Hartin j., 2000. PCR Primers that Amplify Fungal rRNA Genes from Environmental Samples, *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. p. 4356-4360.
- Breakspear A., Momany M. 1993. The first fifty microarray studies in filamentous fungi. *Microbiology*. 153: 7-15.
- Browne M.L., Ju C.L., Recer G.M., Kallenbach L.R., Melius J.M., Horn E.G. 2001. A prospective study of health symptoms and *Aspergillus fumigatus* spore counts near a grass and leaf composting facility. *Compost Science & Utilization*. 9: 241-249.
- Bruns, T.D., White, T.J., Taylor, J.W., 1991. Fungal Molecular Systematics, *Annual Review of Ecology and Systematics*. 22: 524-564.
- Cabrera F., Lopez R., Murilo J.M., Brenas M.A. 1990. Olive vegetation water residues composted with other agricultural by-products as organic fertilizer. *Proc. 10th Fertilizer Congress od CIEC* eds. Welte E., Szabolcs Y. Nicosia. p. 475-483.
- Cahyani V.R., Matsuya K., Asakawa S., Kimura M. 2003. Succession and phylogenetic composition of bacterial communities responsible for the composting process of rice straw estimated by PCR-DGGE analysis. *Soil Science and Plant Nutrition*.
- Chander K., Ulrich E., Joergensen R.G., Klein T. 2002. Decomposition of ¹⁴C labeled wheat straw in repeatedly fumigated and non-fumigated soils with different levels of heavy metal contamination. *Biology and Fertility of Soils*. 35 (2): 86-91.
- Chatzipavlidis I., Antonakakou M., Demou D., Flouri F., Balis C. 1996. Bio-fertilization of olive oil mills liquid wastes. The pilot plant in Messini, Greece. *Int. Biodeterior. Biodegrad*. 38: 183-187.
- Cho, K., Lee, S., Math, R., Islam, S., Kambiranda, D., Kim, J., Yun, M., Cho, J., Kim, J., Lee, Y., 2008. Culture-independent analysis of microbial succession during composting of swine slurry and mushroom cultural wastes. *J. Microbiol. Biotech*. 18: 1874–1883
- Dees P., W. Ghiorse, 2001. Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA. . Elsevier applied Science Publishers, New York, p. 207-216.
- Dees P. & Ghiorse W. 2001. Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA. *FEMS Microbial Ecology*. 35: 207 – 216.
- Denning D.W. 1991. Epidemiology and pathogenesis of systemic fungal-infections in the immunocompromised host. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 18: 1-16.
- Denning D.W. 1998. Invasive aspergillosis. *Clinical infectious diseases*. 26: 781-803.
- Denning, D.W., Anderson, M.J., Turner, G., Latge, Jean-Paul, Bennett, J.W. 2002. Sequencing the *Aspergillus fumigatus* genome, *THE LANCET Infectious Diseases*. 2: 251-253.

- Diaz M.J., Madejon E., Lopez F., Lopez R., Cabrera F. 2002. Cocomposting of beet vinasse and grape marc in windrows and static pile systems. *Compost Science & Utilization*. 10: 258-269.
- Dumontet S., Dinel H., Baloda S.B. 1999. Pathogen reduction in sewage sludge by composting and other biological treatments: A review. *Biological Agriculture and Horticulture*. 16: 409-430.
- Dujon, B., *et al*, 2004. Genome evolution in yeasts, *Nature*. 430: 35-44.
- Ehaliotis C., Zervakis G., Anoliefo O., Papadopoulou K., Kardimaki A. 2003. The capacity of agricultural soils to auto-regulate bioremediation of olive-mill wastewaters. *Utilization of Bioremediation to Reduce Soil Contamination: Problems and Solutions*. 19: 353-357.
- Epstein, E., Wu, N., Youngberg, C., Croteau, G., 2001. Dust Bioaerosols At a Biosolids Composting Facility, *Compost Science & Utilization*. 9: 250-255.
- Fiestas ros De Ursinos J.A., Borja Padilla R. 1992. Use and treatment of olive mill wastewater: Current situation and prospect in Spain. *Grasas y Aceites*. 32: 101-106.
- C. Filippi, S. Bedini, R. Levi-Minzi, R. Cardelli and A. Saviozzi, Cocomposting of olive oil mill by-products: chemical and microbiological evaluations. *Compost Sci. Util.* 10: 63-71.
- Fischer, G., Schwalbe, R., Ostrowski, R., Dott, W., 1998. Airborne fungi and their secondary metabolites in working places in a compost facility, *MYCOSES*. 41: 383-388.
- Fischer, G., Muller, T., Ostrowski, R., 1999. Mycotoxins of *Aspergillus fumigatus* in Pure Culture and in native Bioaerosols from Compost Facilities, *Chemosphere*. 38: 1745-1755.
- Fogarty A. M., Tuovinen O. H. 1991. Microbial Dearadation of Pesticides in Yard Waste Composting, *Microbiological Reviews*, June 1991, p. 225-233.
- Galagan, J.E., *et al*, 2005. Sequencing the *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*, *Nature*. 439: 1105-1115.
- Galagan, J.E., Henn, M.R., Ma Li-jun, *et al*, 2011. Genomics of the fungal kingdom: Insights into eukaryotic biology, *GENOME RESEARCH*, p. 1620-1631.
- Galli E., Passeti L., Volterra E., Tomati U. 1994. Lignin degradation and humification during wheat straw olive mill wastewater composting. *7th International Meeting of the Internation Humic Substances Society*. 3-8 July, St. Augustine, Trinidad and Tobago.
- Geiser, D.M., Klich, M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, j., Samson, R.A., 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*, *STUDIES IN MYCOLOGY*. 59: 1-10.
- Georgakakis D., Tsavdaris A., Bakouli J., Simeonidis S. 1995. Composting solid swine

- manure and lignite mixtures with selected plant residues. *Bioresource Technology*. 56: 195-200.
- Golueke C. G. 1992. Bacteriology of composting. *Biocycle*. 33 (1): 55-57.
- Gordon, E., Keisling T.C. , Oliver L.R., Harris C. 2001. Two methods of composting gin trash. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 32 (3&4): 491-507.
- Grasser, J.K.R. 1985. Composting of Agricultural and Other Wastes. *Elsevier Applied Science Publishers*, New York, NY.
- Gray K. R. Sherman K., Biddlestone A.J. 1971. A review of composting. *Process Biochemistry*. 6 (6): 32-36.
- Green, S.J., Michel Jr., F.C., Hadar, Y., Minz, D., 2004. Similarity of bacterial communities in sawdust- and straw-amended cow manure composts, *FEMS Microbiology Letters*. 233: 115-123.
- De Guardia, D., S., Burnet, D., Rogeau and G., Matejka. 2002. Fractionation and characterisation of dissolved organic matter from composting green wastes, *Bioresource Technology*. 83: 181-187.
- Guo Y., Zhu N., Zhu S., Deng C. 2007. Molecular phylogenetic diversity of bacteria and its spatial distribution in composts. *Journal of Applied Microbiology*. 103: 1344-1354.
- Hachicha, S., Sallemi, F., Medhioub, K., Hachicha, R., Ammar, E., 2008. Quality assessment of composts prepared with olive mill wastewater and agricultural wastes, *Waste Management*. 28: 2593-2603.
- Hanninen K. L, J. T. Kovalainen and J. Korvola, 1995. Carbohydrates as chemical constituents of biowaste compost and their humic and fulvic acids. *Compost Science and Utilization*. 3 (4): 51-68.
- Hansgate, A.M., Schloss, P.D., Hay, A.G., Walker, L.P., 2005. Molecular characterization of fungal community dynamics in the initial stages of composting, *FEMS Microbiology Ecology*, 51: 209-214.
- Hardy R. W. F, R. C. Burus and R. D. Holsten, 1973, Application of acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil. Biol. and Biochem.* 5: 47-81
- Harrison, C.J., Langdale, J.A., 2006. A step-by-step guide to phylogeny reconstruction, *The Plant Journal*. 45: 561-572.
- Harwood J.C, Russell N.Y. 1984. *Lipids in Plants and Microbes*. George Allen and Unwin, London.
- Hassen A., Belguith, k., Jedidi, N., Cherif, M., Boubabous, A., 2002. Microbial characterization during composting of municipal solid waste, *Proceedings of International Symposium on Environmental Pollution Control and Waste Management 7-10 January 2002, Tunis*. p. 357-368.

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

Hawksworth D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycol. Res.* 95 (6): 641-655.

Hawksworth D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.* 105 (12): 1422-1432.

Henry, T., Iwen, P.C., Hinrichs, S.H., 2000. Identification of *Aspergillus* Species Using Internal Transcribed Spacer regions 1 and 2, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Apr. 2000: 1510-1515.

Hibbett, D.S., *et al*, 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi, *MYCOLOGICAL RESEARCH*. III: 509-547.

Hinrikson, H.P., Hurst, S.F., De Aguirre, L., Morrison, C.J., 2005. Molecular methods for the identification of *Aspergillus* species, *Medical Mycology Supplement*. 43: 129-137.

Hrabovsky, V., Siegfried, L., 2009. Use of variability of the fungal ITS2 intergenic region for the identification of medically important yeast species, *Biologia*, 64 (4): 671-675.

Hultman, J., Vasara, T., Partanen, P., Kurola, J., Kontro, M.H., Paulin L., Auvinen, P., Romantschuk, M., 2009. Determination of fungal succession during municipal solid waste composting using a cloning-based analysis, *Journal of Applied Microbiology*. 108: 472-487.

Ishii K., Fukui M., Takii S. 2000. Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Journal of Applied Microbiology*. 89: 768-777

Jelinek C.F., Pohland A.E., Wood G.E. 1989. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds: an update. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*. 72: 223-230.

Kane, B.E., Mullins, J.T., 1973. Thermophile Fungi in a Municipal waste Compost System, *Mycologia*. 65 (5): 1087-1100.

Khatib, A., Aqra, F., Yaghi, N., Subuh, Y., Hayeek, B., Musa, M., Basheer, S., Isam, S., 2009. Reducing the Environmental Impact of Olive Mill Wastewater, *American Journal of Environmental Sciences*. 5 (1): 1-6.

Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglou, P., Klironomos, J.N., Lee, H., Trevors, J.T., 2004. Methods of studying soil microbial diversity, *Journal of Microbiological Methods*. 58: 169-188.

Kirk P, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA. 2008. Ainsworth & Bisby's Dictionary of

the Fungi. 10th edn. CAB International, Wallingford, UK.

Klamer, M., Baath, E., 1998. Microbial community dynamics during composting of straw material studied using phospholipid fatty acid analysis, *FEMS Microbiology Ecology*. 27: 9-20.

Klamer, M., Baath, E., 2004. Estimation of conversion factors for fungal biomass determination in compost using ergosterol and PLFA 18:2 ω 6,9, *Soil Biology & Biochemistry*. 36: 57-65.

Klich M.A. 1998. Identification of common *Aspergillus* species. Publisher: Centraalbureau Voor Schimmelcultures. Spi edition (Oct 2002).

Koutsaftakis, A., Kotsifaki, F., & Stefanoudaki, E. 1999. Effect of extraction system, stage of ripeness, and kneading temperature on the sterol composition of virgin olive oils. *JAOCS*. 76 (12): 1477–1481.

Kowalchuk M.A, Naoumenko Z.S., Deriks P.J., Felske A., Stephen J.R., Arkhipchenko I.A. 1999. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class Proteobacteria in compost and composted material. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 396-403.

Lancaster MD, Jenkins FD, Phillips JM. 1961. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature*. 192: 1095-1096.

Liolios K, Mavromatis K, Tavernarakis N, Kyrpides NC. 2008. The genomes on line database (GOLD) in 2007: status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata. *Nucleic Acids Res*. 36: 475-479.

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

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

McNamara, C.J., Anastasiou, C.C., O' Flaherty, V., Mitchell, R., 2008. Bioremediation of olive mill wastewater, *International Biodeterioration & Biodegradation*. 61: 127-134.

Miller F.C. 1996. Composting as a process based on the control of ecologically selective factors. *Soil Microbial Technology*. p. 515-544

Montemurro, F., Charfeddine, M., Maiorana, M., Convertini, G., 2010. Compost Use in Agriculture: The Fate of Heavy Metals in soil and Fodder Crop Plants, *Compost Science & Utilization*. 18: 47-54.

Montemurro F., Maioranna M. 2004. Nitrogen utilization, yield, quality and soil properties in a sugarbeet crop amended with municipal solid waste compost. *Compost Science & Utilization*. 15 (2): 84-92.

- Monteoliva-Sanchez, M., Incerti, C., Ramos-Cormenzan, A., Paredes, C., Roig, A., Cegarra, J., 1996. The study of the aerobic bacterial microbiota and the biotoxicity in various samples of olive mill wastewaters (alpechin) during their composting process. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 38, 211–214.
- Morel, J. L., Colin, F., Germon, J. G., Godin, P. & Juste, C. 1985. Methods for the evaluation of the maturity of municipal refuse compost. *In Composting of Agricultural and Other Wastes*, ed. J. K. R. Gasser. Elsevier Applied Science Publishers, London, p. 56-72.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific Enzymatic Amplification of DNA *In Vitro*: The polymerase Chain Reaction, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, LI: 263-273.
- Mullis K. B. 1990. The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*, April 1990.
- Muyzer G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opinion Microbiol.* 2: 317-322.
- Nagao N., Watanabe K., Osa S., Matsuyama T., Kurosawa N., Toda T. 2008. Bacterial community and decomposition rate in long term fed-batch composting using woodchip and Polyethylene terephthalate (PET) as bulking agent. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24: 1417-1424.
- Narihiro T., Yamanaka Y., Hiraishi A. 2003. High culturability of bacteria in commercially available personal composters for fed-batch treatment of household biowaste. *Microbes and Environment.* 18 (2): 94-99.
- Niaounakis M., Halvadakis C.P. 2006. *Olive Processing Waste Management.* 2nd edition, vol.5.
- Nilsson, R.H., Ryberg, M., Abarenkov, k., Sjokvist, E., Kristiansson, E., 2009. The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies, *FEMS Microbiol let.* 296: 97-101.
- Pace N.R., Stahl D.A., Lane D.L., Olsen G.J. 1986. The analysis of natural microbial populations by RNA sequences. *Adv. Microbiol. Ecol.* 9: 1-55.
- Palmisano A.C., Maruscik D.A., Ritchie C.J., Schwab B.S., Harper S.R., Rapaport R.A. 1993. A novel bioreactor simulating composting of municipal solid waste. *Journal of Microbiological Methods.* 18: 99-112.
- Papadimitriou, E. K., Chathravlidis, i., Balis, c., 1997. Application of Composting to Olive Mill Wastewater Treatment, *Environmental Technology.* 18: 101-107.
- Papafotiou M., Phsyhalou M., Kargas G., Chatzipavlidis I., Chronopoulos J., 2004. Olive-mill wastes compost as growing medium component for the production of poinsettia. *Sci Hortic.* 102 (2): 167-175.

- Paredes, C., Bernal, M.P., Roig, A., Cegarra, J., Sanchez-Monedero, M.A., 1996. Influence of the Bulking Agent on the Degradation of Olive-Mill Wastewater Sludge during Composting, *International Biodeterioration & Biodegradation*. 205-210.
- Paredes, C., Roig, A., Bernal, M.P., Sanchez-Monedero, M.A., Cegarra, J., 2000. Evolution of organic matter and nitrogen during co-composting of olive mill wastewater with solid organic wastes, *Biol Fertil Soils*. 32: 222-227.
- Paredes, C., Bernal, M.P., Roig, A., Cegarra, J., 2001. Effects of olive mill wastewater addition in composting of agroindustrial and urban wastes, *Biodegradation*. 12: 225-234.
- Paredes, C., Bernal, M.P., Cegarra, J., Roig, A., 2002. Bio-degradation of olive mill wastewater sludge by its co-composting with agricultural wastes, *Bioresource Technology*. 85: 1-8.
- Paredes C, Cegarra J, Bernal MP, Roig A 2004. Influence of olive mill wastewater in composting and impact of the compost on a Swiss chard crop and soil properties. *Environment International*. 31: 305–312.
- Paredes, C., Bernal, M.P., Cegarra, J. & Roig, A. 2005. Influence of olive mill wastewater in composting and impact of the compost on a Swiss chard crop and soil properties. *Environment International*. 31: 305-312.
- Payne, G. A. et al. 2006. Whole genome comparison of *Aspergillus flavus* and *A. oryzae*. *Med. Mycol.* 44: 9-11.
- 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.
- Plaza, C., Senesi, N., Brunetti, G., Mondelli, D., 2005. Cocomposting of Sludge from Olive Oil Mill Wastewater Mixed with Tree Cuttings, *Compost Science & Utilization*. 13: 217-226.
- Rennie R., 1980, A single medium for isolation of acetylene-reduction (N₂-fixation) bacteria from soils. *Canad. Journal of Microbiology*. 27: 8-14
- Riffaldi R., Levi-Minzi R., Pera A., de Bertoldi, M. 1986. Evaluation of compost maturity by means of chemical and microbial analyses. *Waste Management and Research*. 4: 387-396.
- Rigane, H., Medhioub, K., 2011. Cocomposting of Olive Mill Wastewater with Manure and agro-industrial Wastes, *Compost Science & Utilization*, 19 (2): 129-134.
- Rynk, R., Kamp, M., Willson, G., Singley, M., Richard, T., Kolega, J. and Gouin, F. 1991 *On-farm Composting Handbook*. Ithaca, NY: North-East Regional Agricultural Engineering Service.

- Roig A., Garcia-Gomez A., Bernal M.P., Cegara J. 2001. Composting of the solid fraction of olive mill waste water. *Bioresource Technology*. 86 (1): 59-64
- Saitou N & Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4: 406-425.
- Samson R.A., Houbraken J.A.M.P., Kuijpers A.F.A., Frank J.M., Frisvad J.C. 2004. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*. 50: 45-61.
- Samson R.A., Noonim P., Meijer M., Houbraken J., Frisvad J.C., Varga J. 2007. Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies in Mycology*. 59: 129-145.
- Samson, R.A., Hong, S., Peterson, J.C., Varga, J., 2007. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*, *STUDIES OF MYCOLOGY*. 59: 147-203.
- Samson, R.A., Varga, J., 2009. What is a species in *Aspergillus*? *Medical Mycology*, p.1-8.
- Saiz-Jimenez, C. & Gomez-Alarcon, G. 1986. Effects of vegetation water on fungal microflora. In *International Symposium on Olive By Products Valorization*, ed. FAO, Madrid, p. 61-76.
- Saviozzi A., R. Levi-Minzi and R. Riffaldi, 1998. Maturity Evaluation of Organic Waste. *BioCycle*. 29 (3): 54-65.
- Sharrock K. R. 1988. Cellulase assay methods: a review. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 17: 81-106.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T *et al*. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microb*. 75: 7537–7541.
- Schmidt, A. R., Dörfelt, H. & Perrichot, V. 2009. Palaeomycology: Do we consider extinct lineages in the evaluation of fossil fungi? *Mycological Research*. 113: 275-276.
- Silva D.M, Batista L.R., Rezende E.F., Fungaro M.H.P., Sartori D., Alves E. 2011. Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *Nigri* using polyphasic taxonomy. *Brazilian Journal of Mycology*, 42: 761-773.
- St. Leger RJ, Screen SE , Shams-Pirzadeh B. 2000. Lack of Host Specialization in *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology* . 66 (1): 320 - 324
- Stajich, J.E., Berbee, M.L., Blackwell, M., Hibbett, D.S., Jamew, T.Y., Spatafora, J.W., Taylor, J.W. 2001. The Fungi, *Current Biology*: 19 (18): 840-R845.
- 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. 224-252.

- Straatsma, G., Samson, R.A., 1993. Taxonomy of *Skytalidium thermophilum*, an important thermophilic fungus in mushroom compost, *Mycol. Res.* 97 (3): 321-328.
- Strom P. F. 1985. Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solid-waste composting. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 899-905.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S., 2007. MEGA4: Molecular Evolution Geneteics Analysis (MEGA) Software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24 (8): 1956-1599.
- Tejada, M., Dobao, M.M., Benitez, C., Gonzalez, J.L., 2001. Study of composting of cotton residues. *Bioresource Technol.* 79: 199-202.
- Tejada, M., Gonzalez, J.L., 2006. Crushed cotton gin compost on soil biological properties and rice yield, *European Journal of Agronomy.* 25: 22-29.
- Tejada, M., Gonzalez, J.L., 2006. Crushed Cotton Gin Compost Effects on Soil Biological Properties, Nutrient Leaching Losses, and Maize Yield, *Agronomy Journal.* 98: 749-759.
- Thomasson, J.A. 1990. A review of cotton gin trash disposal and utilization. *Proc. Beltwide Cotton Prod. Res. Conf.* 1: 689-705.
- Thornton, J. W., DeSalle, R., 2000. Gene Family Evolution and Homology: Genomics meets Phylogenetics, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 01: 41-73.
- Tomati, U., Galli, E., Fiorelli, F., Pasetti, L., 1996. Fertilizers from composting of olive mill waste waters. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 38: 155–162.
- Valero, A., Oliván, S., Marín, S., Sanchis, V. and Ramos, A.J. 2007. Effect of *intra* and interspecific competence in OTA production by *A.* section *Nigri* in grapes during dehydration. *Food Microbiol.* 24: 254–259.
- Varga, J., Kevei, F., Hamari, Z., Tóth, B., Téren, J., Croft, J. H. & Kozakiewicz, Z. (2000). Genotypic and phenotypic variability among black aspergilli. In *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification*. Edited by R. A. Samson & J. I. Pitt. Amsterdam: Harwood Academic. p. 397–411.
- Vivas A., B. Moreno, S. Garcia-Rodriguez and E. Benitez. 2009. Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste. *Bioresour. Technol.* 100: 1319–1326.
- Vlyssides AG and israilides CJ. 1998. Electrochemical oxidation of a textile dye and finishing wastewater using a Pt/Ti electrode. *J. Environ. Sci. Health, Part A: Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.* A33 (5): 847-862.
- Vuorinen A. H., Saharinen M. H. 1997. Evolution of microbiological and chemical parameters during manure and straw co-composting in a drum composting system. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 66: 19-29.

- Watanabe K., Nagao N., Toda T., Kurosawa N. 2010. Bacterial communities in various conditions of the composting reactor revealed by 16S rDNA clone analysis and DGGE. *Sustainable Biotechnology*, O.V. Singh, S.P. Harvey (eds.).
- Wengenack N.L., Binnicker M.J., 2009. Fungal Molecular Diagnostics. *Clin Chest Med*. 30: 391-408.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York. p. 315-322.
- Wortman, J.R., et al, 2006. Whole genome comparison of the *A. fumigatus* family, *Medical Mycology*, 44: 3-7.
- Yamamoto, N., Otawa, K., Nakai, Y., 2010. Diversity and abundance of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea during cattle manure composting. *Microb. Ecol.* 60: 807–815.
- Yu H., Zeng G., Huang H., Xi X., Wang R., Huang D., Huang G., Li J. 2007. Microbial community succession and lignocellulose degradation during agricultural waste composting. *Biodegradation*. 18: 793-802.
- Zhang J. Zeng G, Chen Y., Yu M., Yu Z., Li H., Yu Y., Huan H. 2011. Effects of physico-chemical parameters on the bacterial and fungal communities during agricultural waste composting. *Bioresource Technology*. 102: 2950-2956.
- Γεωργακάκης Δ., Χριστοπούλου, Ν. 2003. Αντιμετώπιση του προβλήματος των αποβλήτων ελαιοτριβείων με φυσική καθίζηση. *Ελιά & Ελαιόλαδο*. 34-35: 26-32.
- Κουτσαυτάκης Α., Στεφανουδάκη Ε., Κοτσιφάκη Φ. 1999. Χαρακτηριστικά υποπροϊόντων και ελαιολάδου προερχόμενα από φυγοκέντριση ελαιοπυρήνας δύο φάσεων σε διφασικό ελαιοουργείο. *Ελιά & Ελαιόλαδο*. 14: 62-65.
- Μπαλατσούρας Γ.Δ., 1997. *Το Ελαιόδενδρο* - Αθήνα, σελ. 409.
- Μπαλής Κ., Φλουρή Φ., Σέρβης Δ., Κλειδωνά Α. 1994. Κομποστοποίηση υπολειμμάτων βάμβακος για την παραγωγή οργανικού λιπάσματος. Ερευνητικό Πρόγραμμα Γ.Γ.Ε.Τ. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Οιχαλιώτης Κ. & Ζερβάκης Γ. 1999. Τα απόβλητα και παραπροϊόντα των ελαιοτριβείων δύο και τριών φάσεων: Μια αξιολόγηση της υφιστάμενης κατάστασης. - *Ελιά & Ελαιόλαδο*. 14: 52-59.

6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

6.1 Παράρτημα Α: Σύνθεση διαλυμάτων - Χρώσεις

Προσδιορισμός του νιτρικού αζώτου (N-NO₃⁻)

Διάλυμα KCl 2M: Σε τελικό όγκο 1l απιονισμένο H₂O διαλύονται 149.1026g χλωριούχου καλίου (KCl).

Πυκνό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου (NH₄Cl): 100g NH₄Cl διαλύονται σε 500ml απιονισμένου νερού και διατηρείται σε γυάλινο ή πλαστικό δοχείο.

Αραιό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου (NH₄Cl): 50g NH₄Cl διαλύονται σε 2l απιονισμένου νερού και διατηρείται σε γυάλινο ή πλαστικό δοχείο.

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

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

Προσδιορισμός του αμμωνιακού αζώτου (N-NH₄⁺)

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

Αντιδραστήριο ρυθμισμένου (buffered) υποχλωριώδους νατρίου: σε ογκομετρική φιάλη των 100ml διαλύονται 1.48g NaOH σε 70 ml απιονισμένου νερού, προστίθενται 4.98g Na₂HPO₄ και 20ml υποχλωριώδους νατρίου. Τελικό pH 11.4 – 12.2. Αραίωση μέχρι τελικό όγκο 100ml.

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

Προσδιορισμός του ολικού αζώτου (μέθοδος Kjeldahl)

Διάλυμα H₂SO₄ & σαλικυλικού: προσθήκη 25g σαλικυλικού σε 1l H₂SO₄.

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

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

Τεχνική χρώσης ενδοσπορίου

1. Μικρή ποσότητα καλλιέργειας μεταφέρεται με το μικροβιολογικό κρίκο σε μία καθαρή αντικειμενοφόρο, όπου απλώνεται καλά (αν χρειάζεται αραιώνεται πρώτα σε μία σταγόνα νερού).
2. Ξήρανση του δείγματος με ελαφρή θέρμανση της αντικειμενοφόρου στη φλόγα ενός λύχνου, ώστε τα βακτηριακά κύτταρα να προσηλωθούν πάνω στην αντικειμενοφόρο.
3. Κάλυψη του δείγματος με μικρό κομμάτι χαρτιού κουζίνας, το οποίο διαποτίζουμε με χρωστική «πράσινο του μαλαχίτη». Άτμισμα του δείγματος πάνω από νερό που βράζει για 5min. Προσθήκη επιπλέον χρωστικής εάν η τελευταία εξατμιστεί.
4. Αφήνεται η αντικειμενοφόρος να κρυώσει, αφαίρεση του χαρτιού και ξέπλυμα με νερό για 30sec.
5. Κάλυψη του παρασκευάσματος με σαφρανίνη για 20sec.
6. Ξέπλυμα με νερό για απομάκρυνση της σαφρανίνης.
7. Στέγνωμα με διηθητικό χαρτί και παρατήρηση του δείγματος με χρήση ελαιοκαταδυτικού φακού.

Μοριακές Τεχνικές:

LB θρεπτικό μέσο: Σε τελικό όγκο 1l απιονισμένο H₂O διαλύονται τόσα 10g Tryptone ή Peptone, 10g NaCl, 5g yeast extract. Για την παρασκευή στερεού μέσου προστίθεται στο τελικό διάλυμα 1,6% άγαρ.

LB θρεπτικό μέσο με αμπικιλίνη: Μετά την αποστείρωση του υλικού, αφήνουμε το θρεπτικό να κρυώσει, και μετά προστίθεται το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (100 mg/ml) σε αναλογία 1:1000.

Διάλυμα αμπικιλίνης (100mg/ml): Ανά 1 ml αποστειρωμένου ddH₂O διαλύονται 100mg αμπικιλίνης. Αποστείρωση του διαλύματος με φιλτράρισμα αυτού μέσα από διηθητικό φίλτρο (0.22μm). Διατήρηση στους -20°C.

Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (10mg/ml): Ανά 1ml αποστειρωμένου ddH₂O διαλύονται 10mg EthBr. Διατήρηση στους 4°C.

IPTG 1M (Μοριακό Βάρος: 238.31): Ανά 1ml αποστειρωμένου ddH₂O διαλύονται 0,23831g IPTG. Αποστείρωση του διαλύματος με φιλτράρισμα αυτού μέσα από διηθητικό φίλτρο (0.22μm). Διατήρηση στους -20°C.

X-Gal (20mg/ml): Ανά 1ml διμεθυλ-φορμαμιδίου διαλύονται 20mg X-Gal. Διατήρηση στους -20°C.

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

Διάλυμα λυσοζύμης: Ανά 1ml αποστειρωμένου ddH₂O διαλύονται 50 mg λυσοζύμης. Διατήρηση στους -20°C.

6.2 Παράρτημα Β: Συγκεντρωτικοί Πίνακες

Φυσικο-χημικές Παράμετροι

Πίνακας 1: Συγκεντρωτική παρουσίαση της εξέλιξης των φυσικο-χημικών παραμέτρων κατά την αρχική (A), 1^η θερμόφιλη (Θ1), μεσόφιλη (M) και 2^η θερμόφιλη (Θ2) φάση της κομποστοποίησης.

Δείγμα	Ημέρες Κομποστοποίησης	Υγρασία (%)	pH	EC (mS/cm)	Ολικό N (%)	NH ₄ ⁺ - N (μg/g)	NO ₃ ⁻ - N (μg/g)	NH ₄ ⁺ /NO ₃ ⁻	cm ³ O ₂ /100g/h
A	0	73.43	6.45	5.10	1.88	270.13	147.53	1.83	51.56
Θ1	6	54.05	7.70	4.19	2.17	46.24	7.47	6.19	29.62 (30°C) 31.38 (50°C)
M	62	48.53	7.60	5.87	2.86	31.17	19.71	1.58	28.74

Θ2	68	73.30	7.80	3.74	3.07	75.40	21.67	3.48	51.13 (30°C) 51.90 (50°C)
-----------	----	-------	------	------	------	-------	-------	------	------------------------------

Μικροβιολογικές Αναλύσεις

Διακύμανση του Αριθμού Βιώσιμων Μονάδων των μικροβιακών ομάδων στις φάσεις της κομποστοποίησης:

Πίνακας 2: Συγκεντρωτική παρουσίαση της διακύμανσης του ABM των μικροβιακών ομάδων ανά g ξηρού δείγματος, κατά την αρχική (A), 1^η θερμοφιλή (Θ1), μεσόφιλη (M) και 2^η θερμοφιλή (Θ2) φάση της κομποστοποίησης.

Δείγμα	Ολικά Βακτήρια	Μύκητες	Ακτινομύκητες	Σποριογόνα Βακτήρια	Κυτταρινολυτικά Βακτήρια	Αζωτοδεσμευτικά Βακτήρια
A	6.21*10 ⁸	2.53*10 ₆	4.47*10 ⁷	1.18*10 ⁸	-	1.43*10 ⁸
Θ1	2.67*10 ⁸	6.93*10 ₅	1.91*10 ⁶	8.39*10 ⁷	-	13.96*10 ³
M	1.91*10 ₁ ¹	1.84*10 ₇	4.53*10 ⁹	1.35*10 ⁹	4.61*10 ⁹	25.71*10 ⁴
Θ2	4.33*10 ⁹	8.82*10 ₆	6.42*10 ⁶	2.62*10 ⁹	1.73*10 ¹⁰	10.20*10 ⁴

Κυτταρινόλυση σε στερεό θρεπτικό υλικό CMC:

Πίνακας 3: Καταγραφή του δείκτη κυτταρινόλυσης της κυτταρίνης του θρεπτικού υλικού από τα κυτταρινολυτικά βακτήρια της 3^{ης} και 4^{ης} δειγματοληψίας.

3η δειγματοληψία (2η μεσόφιλη)				4η δειγματοληψία (2η θερμοφιλή)		
	Διάμετρος Ζώνης (cm)	Διάμετρος αποικίας (cm)	Δείκτης Κυτταρινόλυσης [(δ.ζ./δ.α.)*100]	Διάμετρος Ζώνης (cm)	Διάμετρος αποικίας (cm)	Δείκτης Κυτταρινόλυσης [(δ.ζ./δ.α.)*100]
1	2	0.5	400.00	1.7	0.3	566.67
2	1.9	6.2	30.65	2.6	0.1	2600.00
3	1.2	0.2	600.00	1.2	0.1	1200.00
4	2.2	0.5	440.00	2	0.2	1000.00
5	2	0.3	666.67	3	0.3	1000.00
6	2.6	0.2	1300.00	2	0.1	2000.00
7	3.4	0.4	850.00	2.1	0.1	2100.00

8	3.3	0.6	550.00	2.2	1.2	183.33
9	1.7	0.3	566.67	2.4	0.5	480.00
10	4	0.5	800.00	2.5	0.5	500.00
11	2.1	0.2	1050.00	2.1	0.5	420.00
12	1.7	0.2	850.00	1	0.1	1000.00
13	1.3	0.1	1300.00	1.3	0.1	1300.00
14	2.4	0.5	480.00	1.6	0.4	400.00
15	2.6	0.1	2600.00	2.3	0.3	766.67
16	0.6	0.3	200.00	2.5	1	250.00
17	1.8	0.2	900.00	2.5	0.6	416.67
18	0.8	0.2	400.00	2.2	0.3	733.33
19	1.1	0.2	550.00	3	0.1	3000.00
20	3.1	0.1	3100.00	3	1	300.00
21	2	0.1	2000.00	3.5	0.3	1166.67
22				2.67	0.9	296.67
23				2.87	1	287.00
24				1.6	0.2	800.00
25				2.6	0.8	325.00
26				1.4	0.1	1400.00
27				2.3	0.1	2300.00
28				2.5	0.8	312.50
29				2.5	0.3	833.33
30				1.5	0.2	750.00
31				2.9	0.3	966.67
32				1.8	0.3	600.00
33				1.8	0.2	900.00
34				2.5	0.7	357.14
35				2.5	1	250.00
36				2.6	0.2	1300.00
37				3	1.1	272.73

Μοριακές Τεχνικές

Νουκλεοτιδική ακολουθία 18S rRNA γονιδίου των στελεχών K1As1, K3As4, K4As8:

K1As1

GATTTTAGCATGGAATAATGGAATAGGACGTGCGGTTCTATTTTGTTGGTTTCTAGG
ACCGCCGTAATGATTAATAGGGATAGTTCGGGGGCGTCAGTATTCAGCTGTCAGAG
GTGAAATTCTTGGATTTGCTGAAGACTAACTACTGCGAAAGCATTTCGCCAAGGATGT
TTTCATTAATCAGGGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTA

GTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGGCGGTGTTTCTATGATGACCCG
 CTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGTCGCAA
 GGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACAAGGCGTGGAGCCTGCGGC
 TTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCCAGACAAAATAAGGATTGACA
 GATTGAGAGCTCTTTCTTGATCTTTTGGATGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGT
 GGAGTGATTTGTCTGCTTAATTGCGATAACGAACGAGACCTCGGCCCTAAATAGC
 CCGGTCCGATTTGCGGGCCGCTGGCTTCTTAGGGGACTATCGGCTCAAGCCGA
 TGGAAGTGCGCGGAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCAC
 GCGCGTACACTGACAGGGCCAGCGAGTACATCACCTTGGCCGAGAGGTCTGGGT
 AATCTTGTTAACCTGTGCTGCTGGGGATAGTGCATTGCAT

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
GU201159.1	Uncultured fungus clone 1047RhFu 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1404	1404	99%	0.0	99%
GU201394.1	Uncultured fungus clone 5039RhFu 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1404	1404	99%	0.0	99%
GU201335.1	Uncultured fungus clone 4040RhFu 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1400	1400	100%	0.0	99%
GU201402.1	Uncultured fungus clone 5047RhFu 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1399	1399	99%	0.0	99%
GU201278.1	Uncultured fungus clone 3043RhFu 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1399	1399	99%	0.0	99%
GU201385.1	Uncultured fungus clone 5028RhFu 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1395	1395	100%	0.0	99%
GU201282.1	Uncultured fungus clone 3048RhFu 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1393	1393	99%	0.0	99%
HQ871892.1	Aspergillus fumigatus strain s1813 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1391	1391	99%	0.0	99%
HQ393873.1	Aspergillus sp. PSBORB-4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1391	1391	99%	0.0	99%
HQ393867.1	Aspergillus terreus strain PSFCRG2-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1391	1391	99%	0.0	99%

K3As4

ATTGCAATGCGCTATCCCAGCACGACAGGGTTTAAACAAGATTACCCGGACCTCTC
 GGCCAAGGTGATGTACTCGCTGGCCCTGTCAGTGTAGCGCGCGTGGGCCAGAA
 CATCTAAGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCGCGCACTTCCATCGGCTTGAGCCGA
 TAGTCCCCTAAGAAGCCAGCGGCCCGCAAACGCGGACCGGGCTATTTAAGGGCC
 GAGGTCTCGTTCGTTATCGCAATTAAGCAGACAAATCACTCCACCAACTAAGAACG
 GCCATGCACCACCATCCAAAAGATCAAGAAAGAGCTCTCAATCTGTCAATCCTTATT
 TTGTCTGGACCTGGTGAGTTTCCCCGTGTTGAGTCAAATTAAGCCGCAGGCTCCAC
 GCCTTGTGGTGCCCTTCCGTCAATTTCTTTAAGTTTCAGCCTTGGCACCATACTCCC
 CCCAGAACCCTAAAACCTTTGATTTCTCGTAAGGTGCCGAGCGGGTCACCATAGAAA
 CACCGCCCGATCCCTAGTCGGCATAGTTTATGGTTAAGACTACGACGGTATCTGAT
 CGTCTTCGATCCCCTAACTTTTCGTTCCCTGATTAATGAAAACATCCTTGGCGAATGC
 TTTCGCAGTAGTTAGTCTTCAGCAAATCCAAGAATTTACCTCTGACAGCTGAATAC
 TGACGCCCCCGACTATCCCTATTAATCATTACGGCGGTCTAGAAACCAACAAAATA
 GAACCGCACGTCTTATTCTATTATTCCATGCTAAA

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
GU201272.1	Uncultured fungus clone 3035RhFu 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1404	1404	100%	0.0	99%
GU201347.1	Uncultured fungus clone 4057RhFu 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1404	1404	100%	0.0	99%
HQ393872.1	Aspergillus flavus strain PSFW1RH-4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1402	1402	99%	0.0	99%
HM064501.1	Aspergillus oryzae strain SEMCC-3.248 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1402	1402	99%	0.0	99%
GU953210.1	Aspergillus flavus strain TZ1985 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1402	1402	99%	0.0	99%
EU680477.1	Aspergillus oryzae strain FS4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1402	1402	99%	0.0	99%
EU263602.1	Aspergillus flavus strain TPID12 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1402	1402	99%	0.0	99%

K4As8

GATTTTAGCATGGAATAATGGAATAGGACGTGCGGTTCTATTTTGTTGGTTTCTAGG
ACCGCCGTAATGATTAATAGGGATAGTCGGGGGCGTCAGTATTCAGCTGTCAGAG
GTGAAATTCTTGGATTTGCTGAAGACTAACTACTGCGAAAGCATTCCGCCAAGGATGT
TTTCATTAATCAGGGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTA
GTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGGCGGTGTTTCTATGATGACCCG
CTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCTGGGGGGAGTATGGTCGCAA
GGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACAAGGCGTGGAGCCTGCGGC
TTAATTTGACTCAACACGGGGAACTCACCAGGTCCAGACAAAATAAGGATTGACA
GATTGAGAGCTCTTTCTTGATCTTTTGGATGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGT
GGAGTGATTTGTCTGCTTAATTGCGATAACGAACGAGACCTCGGCCCTTAAATAGC
CCGGTCCGCGTTTGCGGGCCGCTGGCTTCTTAGGGGGACTATCGGCTCAAGCCGA
TGGAAGTGCGCGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCAC
GCGCGTACACTGACAGGGCCAGCGAGTACATCACCTTGCCGAGAGGTCCGGG
TAATCTTGTTAACCTGTCGTGCTGGGGATAGTGCATTGCAA

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
GU201272.1	Uncultured fungus clone 3035RhFu 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1400	1400	100%	0.0	99%
GU201347.1	Uncultured fungus clone 4057RhFu 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1400	1400	100%	0.0	99%
GU201159.1	Uncultured fungus clone 1047RhFu 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1395	1395	100%	0.0	99%
GU201394.1	Uncultured fungus clone 5039RhFu 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1395	1395	100%	0.0	99%
HQ393872.1	Aspergillus flavus strain PSFW1RH-4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1393	1393	99%	0.0	99%
HM064501.1	Aspergillus oryzae strain SEMCC-3.248 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1393	1393	99%	0.0	99%
HQ397705.1	Aspergillus niger 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1360	1360	99%	0.0	99%

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HM347449.1	Aspergillus niger isolate 6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1360	1360	99%	0.0	99%
HM590646.1	Aspergillus niger strain CS 1-1 18S ribosomal RNA gene, partial seq	1360	1360	99%	0.0	99%
GQ338836.1	Aspergillus niger strain IMT 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1360	1360	99%	0.0	99%
AM270052.1	Aspergillus niger contig An03c0110, genomic contig	1360	3473	99%	0.0	99%

Νουκλεοτιδική ακολουθία της ITS περιοχής του ριβοσώματος των στελεχών K1As1, K3As4, K4As8:

K1As1

TTTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGT
CAACCTTAGAAAAATAAAGTTGGGTGTCGGCTGGCGCCGGCCGGGCCTACAGAGC
AGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTC
GGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGGACGGGGGCCCAACACACAAGCCGTGCTTGA
GGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAAT
GTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAT
TTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAAC
TGATTACGATAATCAACTCAGACTGCATACTTTCAGAACAGCGTTCATGTTGGGGTC
TTCGGCGGGCGCGGGCCCGGGGCGCAAGGCCTCCCCGGCGGCCGTCGAAACG
GCGGGCCCGCCGAAGCAACAAGGTACGATAGACACGGGTGGGAGGTTGGACCCA
GAGGGCCCTCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTCACCTACGGAA

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HQ026746.1	Aspergillus fumigatus strain ATCC 1022 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1109	1109	100%	0.0	100%
FM999061.1	Aspergillus fumigatus 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain WM 06.357	1109	1109	100%	0.0	100%
FM999059.1	Aspergillus fumigatus 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain WM 06.577	1109	1109	100%	0.0	100%
FM999057.1	Aspergillus fumigatus 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain WM 06.589	1109	1109	100%	0.0	100%
FM999058.1	Aspergillus fumigatus 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain WM 06.584	1109	1109	100%	0.0	100%
FJ820804.1	Uncultured fungus clone S317 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1109	1109	100%	0.0	100%

K3As4

TTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTC
AACCTGGAAAAAGATTGATTTGCGTTCGGCAAGCGCCGGCCGGGCCTACAGAGCG
GGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTG
GGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGGACGACGACCCAACACACAAGCCGTGCTTGA
TGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGAGAATACCAGGGGGCGCAA
TGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACACTAGTTATCGCA
TTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAA

CTGATTGCGATAACAATCAACTCAGACTTCACTAGATCAGACAGAGTTCGTGGTGTCT
 CCGGCGGGCGCGGGCCCGGGCTGAGAGCCCCGGCGGCCACGAATGGCGGGC
 CCGCCGAAGCAACTAAGGTACAGTAAACACGGGTGGGAGTTGGGCTCGCTAGGA
 ACCCTACACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAA

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
GU120193.1	Aspergillus oryzae isolate A-4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1098	1098	100%	0.0	99%
FJ878656.1	Aspergillus flavus isolate UOA/HCPF 10017 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1096	1096	99%	0.0	99%
FJ878659.1	Aspergillus flavus isolate UOA/HCPF 8934 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence >gb FJ878660.1 Aspergillus flavus isolate UOA/HCPF 8744 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence >gb FJ878661.1 Aspergillus flavus isolate UOA/HCPF 8376 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence >gb FJ878665.1 Aspergillus flavus isolate UOA/HCPF 8708 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence >gb FJ878666.1 Aspergillus flavus isolate UOA/HCPF 8710 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence >gb FJ878671.1 Aspergillus flavus isolate UOA/HCPF 10015 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence >gb FJ878674.1 Aspergillus flavus isolate UOA/HCPF 8749 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1096	1096	99%	0.0	99%
JF951750.1	Aspergillus flavus isolate F4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1092	1092	100%	0.0	99%
HQ340107.1	Aspergillus flavus culture-collection MUM:10.209 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1092	1092	100%	0.0	99%
HQ340106.1	Aspergillus flavus culture-collection MUM:10.206 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1092	1092	100%	0.0	99%
HQ340104.1	Aspergillus flavus culture-collection MUM:10.204 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1092	1092	100%	0.0	99%
HQ285536.1	Aspergillus flavus strain CA-A4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1092	1092	100%	0.0	99%
HQ285552.1	Aspergillus oryzae strain DS-A4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence >gb HQ285572.1 Aspergillus flavus strain SEJ-A3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence >gb HQ285574.1 Aspergillus oryzae strain SEJ-A5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence >gb HQ285582.1 Aspergillus oryzae strain US-A4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence >gb HQ285583.1 Aspergillus oryzae strain US-A5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1092	1092	100%	0.0	99%
GU385811.1	Aspergillus oryzae isolate RP-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1092	1092	100%	0.0	99%
AP007173.1	Aspergillus oryzae RIB40 DNA, rDNA_te13	1092	1092	100%	0.0	99%

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AP007172.1	Aspergillus oryzae RIB40 DNA, SC206	1092	1092	100%	0.0	99%
AF459735.1	Aspergillus oryzae NRRL 506 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1092	1092	100%	0.0	99%
HM145964.1	Aspergillus oryzae strain UPM A22 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1090	1090	99%	0.0	99%
GU183169.1	Aspergillus flavus isolate HF5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1090	1293	99%	0.0	100%
GU183163.1	Aspergillus flavus isolate Type_E_1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1090	1293	99%	0.0	100%

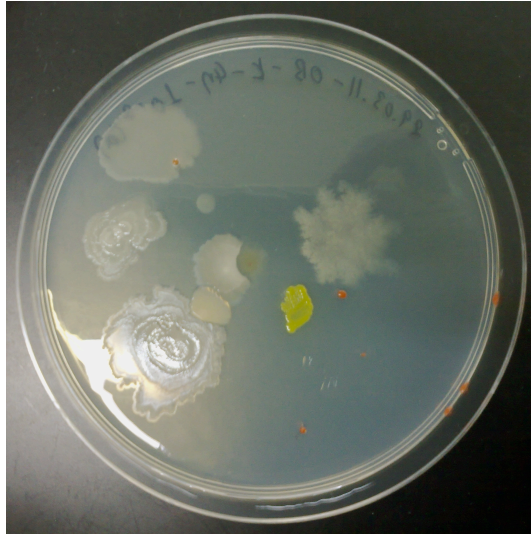
K4As8

TTTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGT
CAACCTGGAAAAAATGGTTGGAAAACGTCGGCAGGCGCCGGCCAATCCTACAGAG
CATGTGACAAAGCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTT
CGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGGACGGCGACCCAACACACAAGCCGGGCTTG
AGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCGA
TGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACCTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCA
TTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAA
CTGATTGCATTCAATCAACTCAGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTGTTGGGGT
CTCCGGCGGGCACGGGCCCGGGGGGCAAAGGCGCCCCCGGCGGCCGACAAG
CGGCGGGCCCGCCGAAGCAACAGGGTATAATAGACACGGATGGGAGGTTGGGCC
CAAAGGACCCGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
JF838357.1	Aspergillus niger strain MUM05.13 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1109	1109	100%	0.0	99%
HQ014696.1	Aspergillus niger strain WM10.74 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1109	1109	100%	0.0	99%
HQ014690.1	Aspergillus niger strain WM10.68 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1109	1109	100%	0.0	99%
HM801881.1	Aspergillus sp. 06 SMR-2010 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1105	1105	99%	0.0	99%
HM101047.1	Fungal sp. FC-5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1105	1105	99%	0.0	99%
AB369898.1	Aspergillus niger genes for small subunit rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and large subunit rRNA, partial and complete sequence, strain: IFM 54309 >gb GQ461899.1 Aspergillus tubingensis isolate UOA/HCPF 8806 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1105	1105	99%	0.0	99%

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FJ040211.1	Aspergillus niger strain EIM-6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1105	1105	99%	0.0	99%
DQ235784.1	Aspergillus awamori 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1105	1105	99%	0.0	99%
HQ014697.1	Aspergillus niger strain WM10.75 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1103	1103	99%	0.0	99%
GQ461899.1	Aspergillus tubingensis isolate UOA/HCPF 8806 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1105	1105	99%	0.0	99%
GQ149492.1	Aspergillus tubingensis strain UAF-15 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1101	1101	99%	0.0	99%
GQ149491.1	Aspergillus tubingensis strain 428-UAF 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1101	1101	99%	0.0	99%
FJ977096.1	Aspergillus tubingensis strain XWSFJJ2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1101	1101	99%	0.0	99%
FJ960824.1	Aspergillus tubingensis strain UAF-250 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1101	1101	99%	0.0	99%

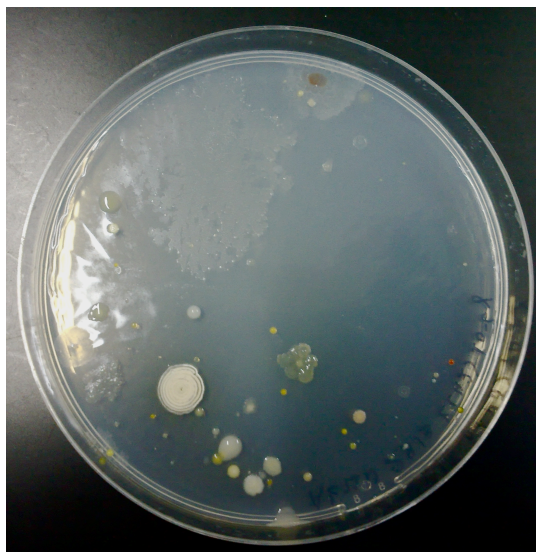
6.3 Παράρτημα Γ: Φωτογραφικό Υλικό



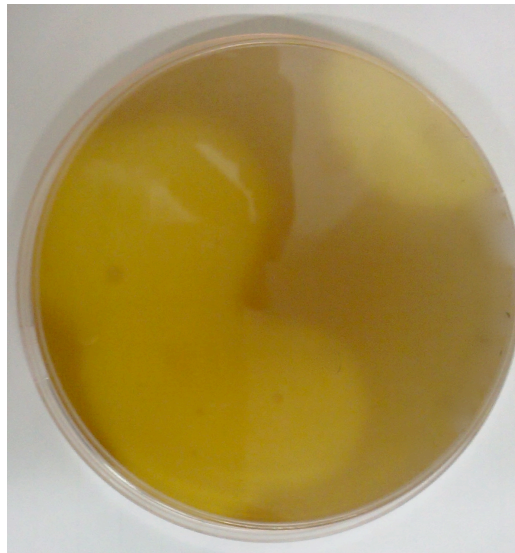
Εικόνα 1: Ολικά Βακτήρια σε NA (4η δειγματοληψία, αραιώση 10^{-7}).



Εικόνα 2: Στελέχη μυκήτων που αναπτύχθηκαν σε PDA (3η δειγματοληψία, αραιώση 10^{-4}).



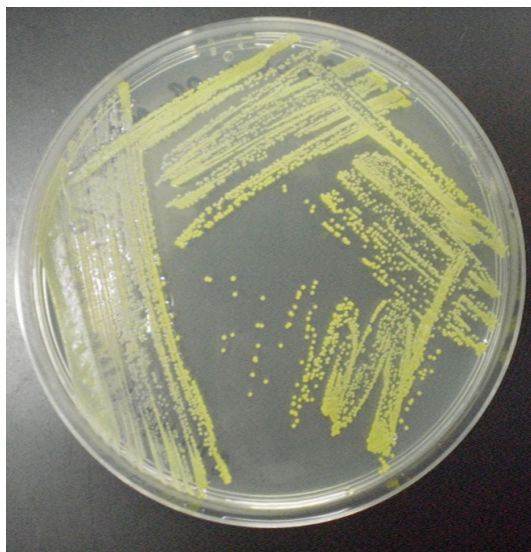
Εικόνα 3: Στελέχη ακτινομυκήτων που αναπτύχθηκαν σε GCA (4η δειγματοληψία, αραιώση 10^{-6}).



Εικόνα 4: Δακτύλιος κυτταρινόλυσης σε CMC άγαρ, μετά από χρώση.



Εικόνα 5: Σωλήνες με θρεπτικό διάλυμα Rennie για την ανάπτυξη των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων.



Εικόνα 6: Απομόνωση βακτηριακού στελέχους σε καθαρή καλλιέργεια (θρεπτικό υλικό NA).

