

ΜΑΡΙΑ Γ. ΚΩΤΣΟΥ

***ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ
ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΩΝ
ΣΤΗΝ ΕΠΙΣΧΕΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ
ΕΔΑΦΟΥΣ***

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

υποβληθείσα στο Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας Διατροφής του

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2002

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Ελαίας Οπωροκηπευτικών του ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε. και στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, υπό την επίβλεψη του αείμνηστου Καθηγητή Κ. Μπαλή για τον οποίο τα γεωργικά απόβλητα υπήρξαν ένα σημαντικό κομμάτι της ερευνητικής του δραστηριότητας. Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Κ. Μπαλή για την ανάθεση ενός τόσο ενδιαφέροντος θέματος και για τις γνώσεις και την εμπειρία που απέκτησα δουλεύοντας κοντά του όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Ευχαριστώ θερμά τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Τον Καθηγητή Ανδρικόπουλο Ν. ο οποίος ανέλαβε το δύσκολο ρόλο του επιβλέποντα μετά την τραγική απώλεια του καθηγητή Κ. Μπαλή. Τον ευχαριστώ επίσης και για την επιστημονική και ηθική του υποστήριξη όλο αυτό το διάστημα της παραμονής μου στο Χαροκόπειο.

Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γιαννακοπούλου Τ. για την επιστημονική και ηθική υποστήριξη καθώς και για τις συμβουλές της στη διαμόρφωση του τελικού κειμένου.

Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Καραγκούνη Α. για την επιστημονική και ηθική υποστήριξη και για τις πολύτιμες συμβουλές της οι οποίες υπήρξαν ιδιαίτερα καθοριστικές στη διαμόρφωση του κειμένου. Επίσης την ευχαριστώ για την υποστήριξη και τις ευκολίες που μου παρείχε κατά τη διάρκεια εκπόνησης του πειραματικού σταδίου.

Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: Τον Καθηγητή Βουδριά Ε. τον Καθηγητή Παναγιωτακόπουλο Δ. και τη Λέκτορα Λαζαρίδη Α. για το χρόνο που αφιέρωσαν συμμετέχοντας στη Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή και τις πολύτιμες συμβουλές τους επί του τελικού κειμένου. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τη Λέκτορα Κυριακού Α. τόσο για την καθοδήγηση και τις συμβουλές της στα στάδια της εκπόνησης και συγγραφής της μελέτης όσο και για την αμέριστη συμπαράσταση, την ηθική υποστήριξη και την κατανόηση που επέδειξε σε όλο το χρονικό διάστημα της συνεργασίας μας. Η βοήθειά της ήταν πραγματικά καθοριστική για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια και διευθύντρια του Εργαστηρίου Αντωνοπούλου Σ. για την εργαστηριακή υποστήριξη και τις

ευκολίες που μου παρείχε καθώς και όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιολογίας, Βιοχημείας και Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών για την αμέριστη υποστήριξή τους.

Ευχαριστώ θερμά τη φίλη και συνάδελφο Μάρη Ι. για τη βοήθεια, τη συμπαράσταση και την ηθική της υποστήριξη σε όλα τα στάδια εκπόνησης της εργασίας αυτής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους φίλους και συνάδελφους στο Ινστιτούτο Ελαίας και Οπωροκηπευτικών Καλαμάτας και στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για τις πολύτιμες συμβουλές τους, τη φιλική ατμόσφαιρα και τη συμπαράσταση που μου παρείχαν. Επίσης ευχαριστώ τον Δρ. Κατσίφα Ε. του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών για τη βοήθειά του στην εκπόνηση μέρους του πειραματικού σταδίου.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου και ιδιαίτερα τις μητέρες Μώρου Ε. και Κώτσου Ε. για την ηθική και υλική τους υποστήριξη καθώς και για την ανεξάντλητη υπομονή τους, χωρίς την οποία δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Η εργασία αυτή αφιερώνεται στα ανίψια μου
Βασιλική, Ελένη και Αντώνη.

Περίληψη	1
Summary	4
Στόχοι διατριβής	7
Πρόλογος	10
 A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	 14
 1. <i>ΤΟ ΕΔΑΦΙΚΟ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑ ΩΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ</i>	 14
1.1. Φυσικές ιδιότητες του εδάφους	14
1.1.1. Υφή του εδάφους	14
1.1.2. Δομή του εδάφους	16
1.1.3. Εδαφικοί πόροι	16
1.2. Χημικές ιδιότητες του εδάφους	18
1.2.1. Το pH του εδάφους	18
1.2.2. Η αλατότητα του εδάφους	19
1.2.3. Η Ικανότητα Ανταλλαγής Κατιόντων	19
1.3. Η οργανική ουσία του εδάφους	20
1.4. Οι μικροβιακοί πληθυσμοί	25
1.4.1. Δομή των μικροβιακών πληθυσμών	25
1.4.2. Προσαρμοστικότητα και διαδοχή των μικροοργανισμών κατά τον αποικισμό οργανικών υποστρωμάτων	27
 2. <i>ΟΙ ΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΤΑ ΦΥΤΑ ΚΑΙ ΤΟ ΕΔΑΦΟΣ ΩΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ</i>	 33
2.1. Οι φυτοπαθογόνοι μύκητες	33
2.1.1. Διαχείριση της τροφής και της ενέργειας από τους παθογόνους μύκητες	34
2.1.2. Βιολογικός έλεγχος των εδαφογενών παθογόνων μυκήτων	36
2.2. Ο ξενιστής	38
2.2.1. Η επίδραση της θρέψης	39
2.2.2. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών στη ριζόσφαιρα	40
2.3. Το έδαφος	45
2.3.1. Η μυκόσταση του εδάφους	45
2.3.2. Επισχετικά εδάφη	46
 3. <i>ΤΑ ΥΓΡΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΩΝ (Υ.Α.Ε.)</i>	 49
3.1 Η καλλιέργεια της ελιάς	49
3.2 Κύρια χαρακτηριστικά των Υ.Α.Ε.	51
3.2.1. Ρυπαντικό φορτίο	51
3.2.2. Φυσικοχημικές ιδιότητες	52
3.3. Μέθοδοι επεξεργασίας των Υ.Α.Ε.	57
3.3.1. Αερόβια βιολογική επεξεργασία	57
3.3.1.1. Αερόβια επεξεργασία για παραγωγή μικροβιακής βιομάζας και μικροβιακών μεταβολιτών	60
3.3.2. Βιολινασματοποίηση των Υ.Α.Ε. με τη μέθοδο Μπαλή	61
3.3.3. Συγκομποστοποίηση των Υ.Α.Ε. με διάφορα οργανικά υποστρώματα	64
3.3.4. Αναερόβια βιολογική επεξεργασία	66
3.4. Εφαρμογή των Υ.Α.Ε. στο έδαφος	69

3.4.1. Επίδραση των Υ.Α.Ε. στις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους	69
3.4.2. Επίδραση των Υ.Α.Ε. στους μικροοργανισμούς του εδάφους	71
3.4.3. Επίδραση των Υ.Α.Ε. στα φυτά	73
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	75
4. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΦΥΣΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ	75
4.1. Δείγματα εδάφους	75
4.1.1. Προέλευση εδαφικών δειγμάτων	75
4.1.2. Εδαφολογική ανάλυση	75
4.1.3. Μέθοδοι εδαφικών αναλύσεων	76
4.1.3.1. Υγρασία	76
4.1.3.2. Υδατοϊκανότητα	76
4.1.3.3. pH	77
4.1.3.4. Αγωγιμότητα	77
4.1.3.5. Φυτοτοξικότητα	77
4.2. Δείγματα υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων (Υ.Α.Ε.)	78
4.3. Δείγματα επεξεργασμένων αποβλήτων ελαιοτριβείων (Ε.Υ.Α.Ε.)	79
5. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	80
5.1. Αναπνευστική δραστηριότητα	80
5.2. Αζωτοδέσμευση	82
5.3. Προδιορισμός του μεγέθους των βακτηριακών πληθυσμών	82
5.4. Ρυθμός ανάπτυξης του μύκητα <i>R. solani</i>	84
5.4.1. Ρυθμός ανάπτυξης σε εκχυλίσματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις Υ.Α.Ε.	84
5.4.2. Ρυθμός ανάπτυξης σε εδαφικά εκχυλίσματα των χειρισμών με νερό Υ.Α.Ε. και Ε.Υ.Α.Ε.	85
5.4.3. Αντιμυκητιακή δράση των βακτηριακών απομονώσεων	85
5.5. Παρασκευή εμβολίου του μύκητα <i>R. solani</i> για μόλυνση του εδάφους	86
5.6. Μικροοργανισμοί	86
5.7. Φυτά	87
6. ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΕΛΑΦΟΣ	88
6.1. Ενσωμάτωση του <i>R. solani</i> στο έδαφος μετά το τέλος των διαβρέξεων με τα απόβλητα	88
6.2. Ενσωμάτωση του <i>R. solani</i> στο έδαφος κατά τη διάρκεια των διαβρέξεων με τα απόβλητα	89
6.2.1. Χειρισμός με Υ.Α.Ε.	89
6.2.2. Χειρισμός με Ε.Υ.Α.Ε.	89
6.3. Περιληπτική παρουσίαση των χειρισμών και των μετρήσεων κατά την εφαρμογή των Υ.Α.Ε. και Ε.Υ.Α.Ε. στο έδαφος	91
6.4. Στατιστικοί έλεγχοι	94
7. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	95
7.1. Απομόνωση ανταγωνιστικών βακτηρίων	95
7.2. Ταυτοποίηση στρεπτομυκήτων	95
7.3. Ταυτοποίηση άλλων βακτηρίων	102
8. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ	105

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	109
9. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΩΝ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΩΝ	109
10. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ Ε.Υ.Α.Ε. ΚΑΙ Υ.Α.Ε. ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ	112
10.1. Μελέτη της επίδρασης των προσθηκών Ε.Υ.Α.Ε. και Υ.Α.Ε. στις χημικές ιδιότητες του εδάφους	112
10.2. Μελέτη της επίδρασης των προσθηκών Ε.Υ.Α.Ε. και Υ.Α.Ε. στη φυτοτοξικότητα του εδάφους	117
10.3. Μελέτη της επίδρασης των προσθηκών Ε.Υ.Α.Ε. και Υ.Α.Ε. στην αζωτοδεσμευτική ικανότητα του εδάφους	123
10.4. Μελέτη της επίδρασης των προσθηκών Ε.Υ.Α.Ε. και Υ.Α.Ε. στην αναπνευστική δραστηριότητα του εδάφους	124
10.5. Μελέτη της επίδρασης των προσθηκών Ε.Υ.Α.Ε. και Υ.Α.Ε. στους βακτηριακούς πληθυσμούς	130
10.6. Μελέτη της επίδρασης των προσθηκών Ε.Υ.Α.Ε. και Υ.Α.Ε. στην επισχετικότητα του εδάφους έναντι του <i>R. solani</i>	136
11. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ Υ.Α.Ε. ΚΑΙ Ζ.Υ.Α.Ε. ΣΤΟ ΡΥΘΜΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ <i>R. SOLANI</i>	145
12. ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	148
12.1. Ταυτοποιήσεις βακτηρίων	148
12.1.1. Ακτινοβακτήρια	148
12.1.2. Άλλα βακτήρια	150
12.2. Μελέτη της αντιμυκητιακής δράσης των βακτηριακών απομονώσεων	156
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	163
13.1. Επίδραση των Υ.Α.Ε. και Ε.Υ.Α.Ε. στις χημικές ιδιότητες του εδάφους	163
13.2. Επίδραση των Υ.Α.Ε. και Ε.Υ.Α.Ε. στις βιολογικές ιδιότητες του εδάφους	164
13.3. Επίδραση των Υ.Α.Ε. και Ε.Υ.Α.Ε. στην επισχετικότητα του εδάφους	169
13.3. Γενικά συμπεράσματα	175
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	176
Συντομογραφίες	197

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων αποτελούν ένα σημαντικό περιβαλλοντικό πρόβλημα ιδιαίτερα για τις Μεσογειακές χώρες οι οποίες είναι υπεύθυνες για το μεγαλύτερο μέρος της παγκόσμιας παραγωγής ελαιολάδου. Ωστόσο, από πολύ νωρίς διαπιστώθηκε η λιπαντική αξία των αποβλήτων αυτών, αφού οι εφαρμογές τους στο έδαφος οδηγούν τόσο στην αύξηση της οργανικής ουσίας όσο και στην αύξηση της συγκέντρωσης ανόργανων στοιχείων τα οποία είναι απαραίτητα στη θρέψη των φυτών. Περιορισμό για την εφαρμογή των αποβλήτων σε καλλιέργειες αποτελεί η έντονα φυτοτοξική τους δράση. Τα ανεπεξέργαστα απόβλητα μπορούν να εφαρμοστούν σε ακαλλιέργητα εδάφη τα οποία θα χρησιμοποιηθούν μόνο μετά την πάροδο κάποιου χρονικού διαστήματος κατά τη διάρκεια του οποίου θα αποικοδομηθούν οι φυτοτοξικές ενώσεις. Μπορούν επίσης να εφαρμοστούν απ' ευθείας σε καλλιέργειες κατόπιν αερόβιας βιολογικής επεξεργασίας και μια τέτοια προσέγγιση αποτελεί η μεθοδολογία της αερόβιας επεξεργασίας με το αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *Azotobacter vinelandii*.

Η χρήση οργανικών προσθηκών στο έδαφος έχει αναφερθεί ως πρακτική για το βιολογικό έλεγχο εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων. Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής μελετήθηκε η επίδραση που έχουν οι προσθήκες ανεπεξέργαστων και επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων στην επισχετικότητα του εδάφους έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani*. Η επισχετικότητα που εκδηλώθηκε έναντι του μύκητα στο έδαφος που δέχθηκε τα απόβλητα, ερμηνεύτηκε με τη μεταβολή διαφόρων βιολογικών παραμέτρων.

Παρατηρήθηκε ότι όταν έδαφος το οποίο είχε δεχθεί ανεπεξέργαστα απόβλητα ελαιοτριβείων μολύνονταν με το παθογόνο μετά την πάροδο κάποιου χρονικού διαστήματος από την τελευταία διάβρεξη, η προσβολή των φυτών μαρουλιού ήταν περιορισμένη σε σχέση με τον μάρτυρα (έδαφος το οποίο δέχονταν νερό). Όταν χρησιμοποιήθηκαν μεγαλύτερες ποσότητες αποβλήτων, η επισχετικότητα του εδάφους έναντι του *Rhizoctonia solani* ήταν εντονότερη. Όταν το παθογόνο εισήχθηκε στο έδαφος κατά τη διάρκεια των διαβρέξεων του εδάφους με τα απόβλητα, εκδηλώθηκε κάποια επισχετικότητα αλλά σε μικρότερο βαθμό. Η χρήση του επεξεργασμένου αποβλήτου ελαιοτριβείων δεν οδήγησε στην εκδήλωση σημαντικής επισχετικότητας, σε καμία από τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν (εισαγωγή του παθογόνου μετά την πάροδο κάποιου

χρονικού διαστήματος από την τελευταία διάβρεξη, χρήση μεγαλύτερης ποσότητας αποβλήτων, εισαγωγή του παθογόνου κατά τη διάρκεια των διαβρέξεων με το απόβλητο).

Μελετήθηκε επίσης το κατά πόσο τα ίδια τα απόβλητα παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του παθογόνου και διαπιστώθηκε ότι δεν έχουν παρεμποδιστική δράση και ότι η όποια επίδρασή τους είναι ελαφρώς ευνοϊκή. Άλλωστε ο *Rhizoctonia solani* είναι σαπροφυτικός μύκητας και μπορεί να αυξάνεται εκμεταλλευόμενος τα υπολείμματα οργανικής ουσίας και επιπλέον διαθέτει ενζυμικό σύστημα (λακάσες) το οποίο σχετίζεται με την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων και της λιγνίνης. Η μεταβολή στις τιμές κάποιων άλλων αβιοτικών παραμέτρων όπως του pH και της αγωγιμότητας λόγω της προσθήκης των αποβλήτων στο έδαφος, δεν συσχετίστηκε με την εκδήλωση επισχετικότητας.

Για την ερμηνεία της επισχετικότητας που εκδηλώθηκε στο έδαφος που δέχθηκε τα ανεπεξέργαστα απόβλητα εξετάστηκε η μεταβολή συγκεκριμένων βιολογικών παραμέτρων. Από τις παραμέτρους αυτές, η αύξηση του πληθυσμού των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, τα οποία εισήχθησαν στο έδαφος που δέχθηκε τα επεξεργασμένα απόβλητα ή επιλέχθηκαν φυσικά στο έδαφος που δέχθηκε τα ανεπεξέργαστα απόβλητα, δεν συσχετίστηκε με την εκδήλωση επισχετικότητας. Η αύξηση της μικροβιακής δραστηριότητας, η αύξηση του ολικού πληθυσμού των βακτηρίων, η αύξηση του πληθυσμού των μικροοργανισμών οι οποίοι χρησιμοποιούν την γ-στρατηγική στον αποικισμό της οργανικής ουσίας καθώς και η αύξηση του πληθυσμού των βακτηρίων τα οποία παράγουν αντιμυκητιακές ενώσεις θεωρήθηκε ότι συμβάλλουν σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό στην εκδήλωση της επισχετικότητας. Την κυριότερη επίδραση φαίνεται να την έχει η αύξηση του πληθυσμού των βακτηρίων που χρησιμοποιούν την γ-στρατηγική στον αποικισμό της οργανικής ουσίας. Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι ενδεχομένως αποτελεσματικότεροι στον αποικισμό των φυτικών ριζών παρέχοντάς τους μεγαλύτερη προστασία από τα παθογόνα. Τα ανεπεξέργαστα απόβλητα διατήρησαν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε υψηλά ποσοστά τους μικροοργανισμούς αυτούς επειδή περιέχουν σημαντικές ποσότητες εύκολα αφομοιώσιμων οργανικών ουσιών.

Η προσθήκη των επεξεργασμένων αποβλήτων οδήγησε επίσης σε αύξηση των παραπάνω βιολογικών παραμέτρων αλλά σε μικρότερο βαθμό επειδή η περιεκτικότητά τους σε οργανική ουσία είναι μικρότερη, αλλά και η σύσταση της οργανικής ουσίας διαφορετική: έχει κυρίως τη μορφή μικροβιακών κυττάρων, ενώ όλες οι εύκολα

αφομοιώσιμες οργανικές ενώσεις έχουν εξαντληθεί στο στάδιο της αερόβιας βιολογικής επεξεργασίας.

Τέλος, απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν βακτήρια από τους διάφορους χειρισμούς τα οποία παρουσίαζαν αντιμυκητιακή δράση. Τα βακτήρια αυτά ταυτοποιήθηκαν και μελετήθηκε η δημιουργία ζώνης δράσης σε τρυβλία έναντι διαφόρων μυκήτων. Η αύξηση της οργανικής ουσίας στο χειρισμό με τα απόβλητα ελαιοτριβείων οδήγησε σε αύξηση του πληθυσμού των ανταγωνιστικών βακτηρίων. Επίσης στο χειρισμό με τα απόβλητα είναι πιθανό οι μικροοργανισμοί αυτοί να είναι ενεργοί, σε αντίθεση με το χειρισμό με νερό όπου λόγω έλλειψης υποστρώματος ενδεχομένως να βρίσκονται σε αδρανείς μορφές (σπόρια, ενδοσπόρια).

SUMMARY

Olive mill wastewaters (OMW) constitute a major environmental problem especially for the Mediterranean countries, which are responsible for the largest part of the olive oil produced worldwide. On the other hand, many researchers have established the high fertilizing value of these wastes when they are applied to the soil: OMW are known to increase the soil organic matter content and the concentration of inorganic elements essential for plant growth.

Nevertheless, OMW are also known to be highly phytotoxic, which has proven to be a strong limitation to their application to cultivated soils. Untreated wastewater can be applied to fallow soils or to soils that will only be cultivated after a period of time during which the phytotoxic substances will have been degraded. A solution to the problem of the direct application of the wastewater to the cultivated land is its biological treatment / bioremediation. Such an approach is the aerobic bioremediation of the olive mill wastewater with the nitrogen-fixing bacterium *Azotobacter vinelandii*.

The use of organic amendments as a method for the biological control of soilborne plant pathogenic fungi has been reported by many researchers. In the context of this thesis, the effect of the addition to the soil of untreated olive mill wastewater and bioremediated olive mill wastewater on the suppressiveness against the plant pathogen *Rhizoctonia solani* was investigated. Several biological parameters have been investigated for the interpretation of the suppressive effects that have been observed.

When the soil treated with OMW was infected with *Rhizoctonia solani* after a certain period of time from the last OMW application, the infection of lettuce seedlings was limited compared to the control (soil treated with water). Suppressiveness was also observed when the soil was infected with the pathogen during the period of the wastewater additions, but to a lesser degree. The effect of a low and a high dose of OMW addition was also examined and a higher suppressiveness was observed in soil treated with the high dose of the wastewater. The use of bioremediated OMW did not reveal any significant suppressive effect against *R. solani*, neither when the soil was infected with the pathogen during the waste addition nor after a period of time from the last addition of the wastewater nor when a high dose of wastewater was used.

The effect of the OMW to the pathogen growth was investigated. It was observed that the wastewater did not prevent the fungus growth; on the contrary it slightly promoted

it. It is known that *R. solani* is a saprophytic fungus able to grow on organic residues. The fungus is also equipped with a specific enzymatic system (lacasses) that is related to the oxidation of phenolic compounds and lignin. Other abiotic factors, such as the increase in soil pH and conductivity, as a result of the wastewater addition, did not correlate with the suppressiveness observed.

For the explanation of the suppressiveness that was revealed to the soil receiving the untreated OMW, the variation of an array of biological parameters was examined. From the biological parameters investigated, the increase of the population of nitrogen-fixing bacteria did not seem to have a direct effect on soil suppressiveness, neither when these bacteria were introduced to the soil receiving the bioremediated OMW nor when they were naturally selected in the soil receiving untreated O.M.W. All the other biological parameters investigated, such as the increase of total bacterial population, the increased microbial activity, the increase of r-strategists population and the increased population of bacteria exhibiting antifungal activity, were considered to be the cause, to a lesser or greater extend, for the suppressiveness that was observed in the soil receiving the untreated wastewater. The main responsibility for the increased suppressiveness was attributed to the increased population of the r-strategists. These microorganisms are probably more effective to the colonization of the plant roots so they provide the plant with a better protection from the pathogens. It seems that untreated wastewater can sustain a high population of r-strategists because of its high content of readily assimilated substances.

Increased values of the above-mentioned biological parameters were also observed in the soil that received the bioremediated wastewater but to a lesser degree. That was attributed to the lower quantity of available organic matter and its different composition. The organic matter in the bioremediated wastewater was mainly in the form of microbial cells and all the readily available compounds were consumed at the stage of the biological treatment.

An attempt has also been made to isolate bacterial strains that exhibit antimicrobial activity against *R. solani* from the treatments with O.M.W., bioremediated O.M.W. and Water. These strains were identified and it was examined the inhibition zone against several fungi, in petri dishes. Increased population counts for these bacterial strains have been observed in the soil treated with OMW compared to the soil treated with water. In addition, it is likely that these strains are metabolically active in the soil treated with

OMW while they might exist in the form of inactivated spores or endospores in the soil treated with water due to a substrate shortage.

ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Τα ελαιοτριβεία, αποτελούν μια από τις σημαντικότερες βιομηχανίες επεξεργασίας τροφίμων στις χώρες της Μεσογείου και η διάθεση των αποβλήτων που παράγονται κατά τη διαδικασία παραλαβής του ελαιολάδου, συνιστά ένα από τα σοβαρότερα περιβαλλοντικά προβλήματα στις χώρες αυτές. Η μέχρι σήμερα διάθεσή τους σε υδάτινους αποδέκτες ή σε φυσικές λιμνοδεξαμενές οδηγεί σε υποβάθμιση του περιβάλλοντος και εγκυμονεί σοβαρούς κινδύνους για την υγεία. Οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις που προκύπτουν από τη διοχέτευση των αποβλήτων στους αποδέκτες αυτούς, συνδέονται κυρίως με το υψηλό οργανικό φορτίο, τις αντιμικροβιακές και φυτοτοξικές ιδιότητες των αποβλήτων. Οι συνθήκες ασφυξίας που δημιουργούνται από τη διάθεση των αποβλήτων σε υδάτινους αποδέκτες χωρίς καμία προεπεξεργασία, είναι καταστροφικές για την υδάτινη πανίδα και χλωρίδα.

Λόγω της υψηλής περιεκτικότητας των αποβλήτων αυτών σε ανόργανα στοιχεία απαραίτητα για τη θρέψη των φυτών έχει προταθεί από διάφορους ερευνητές η εφαρμογή τους στο έδαφος. Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων (Υ.Α.Ε.) διαθέτουν υψηλό οργανικό φορτίο ιδιαίτερης σύστασης και η εφαρμογή τους στο έδαφος μεταβάλλει τη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά. Τα επεξεργασμένα απόβλητα ελαιοτριβείων με τη χρήση του αζωτοδεσμευτικού βακτηρίου *Azotobacter vinelandii* (Ε.Υ.Α.Ε.) είναι επιπλέον εμπλουτισμένα με βιολογικά δεσμευμένο άζωτο. Επίσης δεν εμφανίζουν φυτοτοξικότητα οπότε είναι δυνατή η εφαρμογή τους απ' ευθείας σε καλλιέργειες. Τα απόβλητα αυτά θεωρούνται ότι συνιστούν μικροβιακό εμβόλιο το οποίο μπορεί να προάγει την ανάπτυξη των φυτών και να τα προστατεύει από προσβολές από εδαφογενή παθογόνα.

Πρώτος στόχος της παρούσας διατριβής ήταν ο έλεγχος εδάφους που δέχθηκε ανεπεξέργαστα και επεξεργασμένα απόβλητα ελαιοτριβείων για την εκδήλωση επισχετικότητας έναντι του μύκητα *Rhizoctonia solani*.

Η προσθήκη οργανικών υποστρωμάτων στο έδαφος, οδηγεί σε αύξηση των μικροβιακών πληθυσμών αλλά ενδεχομένως και σε αύξηση του πληθυσμού εδαφογενών παθογόνων μικροοργανισμών. Ο *R. solani* μπορεί να επιβιώνει σαπροφυτικά στο έδαφος εκμεταλλευόμενος υπολείμματα οργανικής ουσίας και να αυξάνει τον πληθυσμό του. Επιπλέον σχηματίζει ανθεκτικές ληθαργικές μορφές (μικροσκληρώτια, σκληρώτια) οι οποίες του επιτρέπουν να επιβιώνει σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες για μεγάλο

χρονικό διάστημα. Παρ' όλα αυτά, φάνηκε ότι το έδαφος το οποίο δέχθηκε τα ανεπεξέργαστα απόβλητα εμφάνισε επισχετική δράση έναντι του παθογόνου ενώ στα επεξεργασμένα απόβλητα δεν εκδηλώθηκε έντονη επισχετικότητα.

Το επόμενο στάδιο ήταν η διευκρίνιση του μηχανισμού μέσω του οποίου εκδηλώνεται η επισχετικότητα έναντι του *R. solani* στο έδαφος που δέχεται τα απόβλητα. Μελετήθηκαν αβιοτικοί παράγοντες όπως οι μεταβολές στο pH και την αγωγιμότητα του εδάφους μετά τις προσθήκες των αποβλήτων και το ενδεχόμενο της τοξικής επίδρασης των ίδιων των αποβλήτων στο παθογόνο. Επίσης μελετήθηκαν βιολογικοί παράγοντες δεδομένου ότι η επισχετικότητα των εδαφών σχετίζεται σε ορισμένες περιπτώσεις με την ανάπτυξη μιας ιδιόμορφης μικροβιακής κοινότητας (εξειδικευμένη επισχετικότητα) ενώ σε άλλες με ενίσχυση του συνολικού μικροβιακού πληθυσμού και την αύξηση της μικροβιακής δραστηριότητας (γενικευμένη επισχετικότητα). Οι βιολογικοί παράγοντες που μελετήθηκαν αφορούσαν ποσοτικές μεταβολές στα εδάφη με τους διάφορους χειρισμούς (ολικοί βακτηριακοί πληθυσμοί, μικροβιακή δραστηριότητα) αλλά και ποιοτικές (πληθυσμοί οι οποίοι χρησιμοποιούν την K- ή την r-στρατηγική στον αποικισμό της οργανικής ουσίας, αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, και βακτήρια τα οποία παράγουν αντιμικροβιακές ενώσεις έναντι του *R. solani*).

Από τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, η επίδραση των προσθηκών των ανεπεξέργαστων αποβλήτων σε χημικές ιδιότητες του εδάφους όπως το pH και η αγωγιμότητα έχει μελετηθεί και από άλλους ερευνητές. Επίσης η επίδραση των προσθηκών ανεπεξέργαστων αποβλήτων σε βιολογικές ιδιότητες του εδάφους όπως η αζωτοδέσμευση, η αναπνευστική δραστηριότητα, οι ολικοί βακτηριακοί πληθυσμοί και η φυτοτοξικότητα έχει επίσης μελετηθεί και από άλλους ερευνητές. Αντιπροσωπευτικοί ερευνητές για τις παραπάνω μελέτες αναφέρονται οι: Χατζηπαυλίδης 1999, Bonari et al. 1993, Paredes et al. 1986. Η πορεία της αερόβιας βιολογικής επεξεργασίας των Υ.Α.Ε. με τη χρήση του αζωτοδεσμευτικού βακτηριακού στελέχους *Azotobacter vinelandii* αποτελεί τμήμα διδακτορικής διατριβής (Χατζηπαυλίδης 1999) και για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας περιγράφεται περιληπτικά η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του βιολογικά επεξεργασμένου αποβλήτου στο οποίο μελετήθηκε η επισχετικότητα.

Τα παραπάνω (μεταβολές σε φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες εδάφους) μελετήθηκαν για πρώτη φορά σε έδαφος που δέχθηκε επεξεργασμένο απόβλητο ελαιοτριβείων. Η επανάληψη των μετρήσεων και για τα ανεπεξέργαστα απόβλητα κρίθηκε σκόπιμη διότι τα απόβλητα αυτά παρουσιάζουν μεγάλη διαφοροποίηση στη

σύσταση και στην ποσότητα της οργανικής ουσίας που περιέχουν, παράγοντες οι οποίοι επιδρούν άμεσα στη σύσταση και το μέγεθος των μικροβιακών πληθυσμών του εδάφους. Επίσης οι χειρισμοί, ο τύπος εδάφους και οι χρησιμοποιούμενες ποσότητες αποβλήτων ήταν διαφορετικές σε κάθε περίπτωση. Αυτό έχει ως συνέπεια την διαφορετική ανταπόκριση των μικροοργανισμών του εδάφους στα απόβλητα. Η επίδραση των ανεπεξέργαστων και των επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων στην επισχετικότητα εδάφους έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* δεν έχει μελετηθεί. Τέλος, ο μηχανισμός για την εκδήλωση επισχετικότητας έναντι εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων σε έδαφος που δέχθηκε Υ.Α.Ε. και Ε.Υ.Α.Ε δεν έχει διερευνηθεί.

A sustainable agriculture – sustains the
people and preserves the land

T. Franzen - farmer

Οι περιβαλλοντικές συνέπειες από την εφαρμογή του συστήματος «υψηλών εισροών» στη γεωργία έχουν ευαισθητοποιήσει τα τελευταία χρόνια τόσο την επιστημονική κοινότητα, όσο και μια σημαντική μερίδα του κοινωνικού συνόλου. Εμφανίστηκε λοιπόν η ανάγκη να αναπτυχθεί μια άλλη προσέγγιση στη διαχείριση της γεωργικής γης, η οποία θα λαμβάνει υπ' όψιν πολιτιστικές, κοινωνικές και οικολογικές αξίες. Στις αναζητήσεις αυτές, το σύστημα της αειφόρου ή βιώσιμης γεωργίας (sustainable agriculture) εδραιώνεται όλο και περισσότερο ως κινητήρια δύναμη αλλαγής, ιδιαίτερα μεταξύ εκείνων που γνωρίζουν τι μπορεί να προσφέρει η σύγχρονη βιολογία και ειδικότερα η γεωργική βιοτεχνολογία (Μπαλής 1996).

Η έννοια της βιωσιμότητας στη σύγχρονη γεωργία αναφέρεται στην υιοθέτηση γεωργικών συστημάτων οικονομικά και κοινωνικά αποδεκτών, τα οποία θα συντηρούν τα παραγωγικά τους επίπεδα, διατηρώντας ταυτόχρονα την ποιότητα του εδάφους και του νερού, και τα οποία δεν θα επιβαρύνουν το περιβάλλον (Bouma 2002). Για να αντιμετωπίσει τις ανάγκες του συνεχώς αυξανόμενου πληθυσμού, η σύγχρονη γεωργία εξελίχθηκε σε βιομηχανία υψηλής τεχνολογίας και εισροών. Το βιομηχανοποιημένο αυτό σύστημα γεωργίας οδηγεί στη μείωση των οικονομικών απολαβών των γεωργών, υποβαθμίζει την ποιότητα των εδαφών, εξαντλεί τους φυσικούς μη-ανανεώσιμους πόρους και αυξάνει τα περιβαλλοντικά προβλήματα. Η βασική αρχή της νέας αντίληψης είναι η διατήρηση των αγροοικοσυστημάτων σε παραγωγικά επίπεδα, τα οποία θα ανταποκρίνονται στις υπάρχουσες ανάγκες, χωρίς όμως να θυσιάζονται οι ανάγκες των μελλοντικών γενεών, λόγω της εξάντλησης ή της υποβάθμισης των φυσικών πόρων. Η επιβεβαίωση ή και η αύξηση της αποτελεσματικότητας των γεωργικών πρακτικών που αφορούν την ανακύκλωση των γεωργικών υπολειμμάτων, την αύξηση της οργανικής ουσίας και τη διατήρηση της δομής του εδάφους, καθώς και το βιολογικό έλεγχο εχθρών των καλλιεργειών, θα βοηθήσει στην προσέγγιση συστημάτων που θα είναι επικερδή και ταυτόχρονα φιλικά προς το περιβάλλον. Η πρόκληση αφορά τη μέγιστη δυνατή αξιοποίηση της ποικιλότητας και της ρυθμιστικής ικανότητας που διαθέτουν οι βιοκοινότητες του εδάφους, ώστε να διατηρείται ένα ποιοτικό οικοσύστημα, το οποίο θα

προάγει την προστασία και τη διατήρηση των λειτουργιών του εδάφους και συνεπώς, την αειφόρο ανάπτυξη της γεωργίας.

Η ανάγκη για τη διατήρηση των λειτουργιών του εδάφους (οι οποίες περιλαμβάνουν τις διαδικασίες για την υποστήριξη των έμβιων οργανισμών καθώς και διαδικασίες ρυθμιστικές για το περιβάλλον) οδήγησε στην αναζήτηση δεικτών, οι οποίοι να σχετίζονται με την ποιότητα και την υγεία των εδαφικών συστημάτων. Στους δείκτες αυτούς, οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση των χημικών, φυσικών και βιολογικών ιδιοτήτων του εδάφους, περιλαμβάνεται πάντα η ποσότητα και συχνά η ποιότητα της οργανικής ουσίας του εδάφους. Η ενσωμάτωση οργανικών υπολειμμάτων στα γεωργικά εδάφη αποτελεί μια από τις αρχαιότερες πρακτικές που εφαρμόζονται για τη βελτίωση των εδαφικών ιδιοτήτων. Με την πρακτική αυτή, οι κοινωνίες απαλλάσσονται από τα απόβλητα, τα οποία καθώς συσσωρεύονται οδηγούν στην υποβάθμιση της ποιότητας ζωής και στη δημιουργία περιβαλλοντικών προβλημάτων. Επιπλέον, η ενσωμάτωση οργανικών υπολειμμάτων στο έδαφος, εκτός από την αύξηση της παραγωγικότητας λόγω βελτίωσης των φυσικοχημικών του χαρακτηριστικών, μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στο βιολογικό έλεγχο εδαφογενών παθογόνων. Ειδικότερα, ο βιολογικός έλεγχος των ασθενειών είναι μεταξύ των κυριότερων και σημαντικότερων μεθόδων που επιδέχονται ακόμα βελτίωση και μπορούν να οδηγήσουν στην αύξηση της παραγωγής με τρόπο οικονομικό και κυρίως φιλικό προς το περιβάλλον.

Τα φυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιούν πολύ πιο αποτελεσματικά τα θρεπτικά συστατικά του εδάφους, εάν δεν υπήρχε το πρόβλημα της κακής υγείας της ρίζας που προκαλείται από εδαφογενείς παθογόνους μικροοργανισμούς και το οποίο πολύ συχνά αντιμετωπίζεται από τους καλλιεργητές με περισσή λίπανση. Ο βιολογικός έλεγχος των παθογόνων, είτε με καταστολή του παθογόνου είτε με προστασία του φυτού από τη μόλυνση, αποτελεί ένα ισχυρό όπλο για την αύξηση της απόδοσης. Επιπλέον η χρήση ωφέλιμων μικροοργανισμών (P.G.P.R.: plant-growth promoting rhizobacteria) οι οποίοι βελτιώνουν την ανάπτυξη των φυτών είτε προστατεύοντάς τα από παθογόνους μικροοργανισμούς είτε εκκρίνοντας ουσίες οι οποίες λειτουργούν ως ορμόνες, αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη μέθοδο για την αύξηση της παραγωγής (Brown 1974, Bowen & Rovira 1976, Schroth & Handcock 1982, Schippers et al. 1987, Kloepper et al. 1980 a και b, Safiyazov et al. 1995).

Η εκτενής χρήση φυτοφαρμάκων έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικών παθογόνων στελεχών και οι χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται για την

καταπολέμησή τους συχνά πρέπει να χρησιμοποιούνται σε συνδυασμούς ή να εναλλάσσονται. Τα νέα προϊόντα, σε αντίθεση με τα παλαιότερα τα οποία είχαν ανεπιθύμητες επιδράσεις και σε ωφέλιμους μικροοργανισμούς, έχουν πιο εξειδικευμένη δράση, η οποία σχετίζεται με τις ιδιαίτερες μεταβολικές διαδικασίες του παθογόνου. Όμως, όσο πιο εξειδικευμένη είναι η επίδραση ενός φυσικού, χημικού ή βιολογικού παράγοντα σε ένα είδος, τόσο πιο μεγάλη είναι η πιθανότητα γενετικής μετακίνησης του πληθυσμού και συνεπώς τόσο αυξάνει η πιθανότητα μείωσης της επίδρασης αυτής στο συγκεκριμένο είδος. Εκεί οφείλεται άλλωστε και η γνωστή ανθεκτικότητα που αναπτύσσουν οι μικροοργανισμοί στα αντιβιοτικά. Όταν όμως αντιβιοτικά παράγονται *in situ* από τους μικροοργανισμούς μπορεί να είναι αποτελεσματικά στην καταστολή των φυτοπαθογόνων με διάφορους τρόπους (Shen 1997). Για παράδειγμα, ένας μικροοργανισμός-ανταγωνιστής μπορεί να παράγει περισσότερους από έναν τύπους αντιβιοτικών ουσιών ή να εκδηλώνει ταυτόχρονα περισσότερες από μια στρατηγικές για την καταστολή των παθογόνων (Howell & Stipanovic 1979, Kloepper & Schroth 1981, Ryder et al. 1999, Schoeman et al. 1999). Τα περισσότερα μυκητοκτόνα έχουν έντονη, άλλα παροδική δράση και απαιτούν επαναλαμβανόμενες επεμβάσεις. Αντίθετα, ο βιολογικός έλεγχος δρα πιο ήπια, για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και η ευεργετική του επίδραση στα φυτά υπερβαίνει την απλή θανάτωση των παθογόνων. Στην πραγματικότητα, μεταβάλλει τη σύσταση της μικροχλωρίδας προς μια μορφή σταθερότερη, με μεγαλύτερη ρυθμιστική ικανότητα και συνεπώς λιγότερο επιρρεπή στα παθογόνα (Cook & Baker 1983).

Οι δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες (ακραίες θερμοκρασίες και υγρασία, υψηλή αλατότητα ή παρουσία άλλων παραγόντων όπως μολύνσεις από ιούς ή νηματώδεις, μειωμένη φωτοσύνθεση, κακή θρέψη κ.λπ.) έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση της αντίστασης του φυτού, την αύξηση των ριζικών εκκρίσεων που προσελκύουν παθογόνους μικροοργανισμούς και τη δημιουργία πληγών που διευκολύνουν την είσοδο των παθογόνων στους φυτικούς ιστούς. Σε τέτοιες συνθήκες ακόμα και «ασθενή» παράσιτα μπορεί να γίνουν ισχυρά παθογόνα (Lockwood 1986). Οι καλλιεργητικές μέθοδοι (οργανικές προσθήκες, άρδευση, αμειψισπορά κ.ά.) αποτελούσαν για πάρα πολλά χρόνια την κυριότερη μέθοδο στο βιολογικό έλεγχο, δημιουργώντας ένα περιβάλλον που ενθαρρύνει την ανάπτυξη των ανταγωνιστικών μικροοργανισμών, περιορίζει τα παθογόνα και βελτιώνει την κατάσταση του φυτού ώστε να αμύνεται σθεναρά στις προσβολές (Cook & Baker 1983). Οι νεότερες επιστημονικές έρευνες, μελετώντας τις

αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται μεταξύ μικροοργανισμών - φυτού - περιβάλλοντος, ενδέχεται να βελτιώσουν ή να τροποποιήσουν τις υπάρχουσες τεχνικές.

Η αντιμετώπιση της πρόκλησης για παραγωγική και ταυτόχρονα «βιώσιμη» γεωργία, θα απαιτήσει τη χρήση όλων των διαθέσιμων στρατηγικών παραγωγής που θα είναι περιβαλλοντικά ασφαλείς, οικονομικές και αποτελεσματικές. Οι καλλιεργητές θα πρέπει να χρησιμοποιούν περισσότερες από μία τεχνικές για τον επιτυχή έλεγχο των παθογόνων, όπως ακριβώς κάνει και ένας μικροοργανισμός για να επιτύχει σε κάποια απαραίτητη φυσιολογική λειτουργία (Cook & Baker 1983).

1. ΤΟ ΕΛΑΦΙΚΟ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑ ΩΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Society has its roots in the soil.

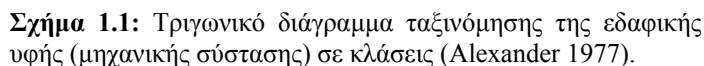
C. Kellogg

1.1. Φυσικές ιδιότητες του εδάφους

Το έδαφος συνίσταται κυρίως από ανόργανα υλικά, νερό, αέρα, νεκρά οργανικά υλικά και ζωντανούς οργανισμούς που συγκροτούν ένα περίπλοκο και ετερογενές περιβάλλον. Οι αναλογίες των συστατικών αυτών δεν είναι σταθερές στα διάφορα εδάφη, ενώ ακόμα και στον ίδιο τύπο εδάφους, μεταβάλλονται ανάλογα με τους χειρισμούς που δέχεται. Η γένεση του εδάφους συντελείται σε μια μακρόχρονη εξελικτική διαδικασία στην πορεία της οποίας το μητρικό πέτρωμα υπό την επίδραση κλιματικών και βιολογικών παραγόντων μεταπίπτει προοδευτικά στον κοινό αλλά ιδιότυπο αυτό σχηματισμό. Στους κλιματικούς παράγοντες περιλαμβάνονται οι βροχοπτώσεις, ο άνεμος, η θερμοκρασία και το φως. Στους βιολογικούς παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζονται από τους κλιματικούς παράγοντες, περιλαμβάνονται τα είδη της χλωρίδας και πανίδας που επικρατούν και η δράση των μικροβιακών πληθυσμών.

1.1.1. Υφή του εδάφους

Το ανόργανο κλάσμα του εδάφους καταλαμβάνει συνήθως το 50% περίπου του όγκου του και προέρχεται άμεσα ή έμμεσα από τα μητρικά πετρώματα. Τα δομικά μέρη του ανόργανου κλάσματος του εδάφους συνίστανται από τεμαχίδια, οι διαστάσεις των οποίων ακολουθούν κανονική κατανομή. Ανάλογα με το μέγεθός τους τα σωματίδια του ανόργανου κλάσματος ταξινομούνται σύμφωνα με το Αμερικάνικο σύστημα σε: άμμο (σωματίδια διαμέτρου 2-0,05 mm), ιλύ (σωματίδια διαμέτρου 0,05-0,002 mm) και άργιλο (σωματίδια διαμέτρου <0,002 mm). Τα εδαφικά αυτά κλάσματα προσδιορίζουν την υφή του εδάφους, η οποία μπορεί να παρασταθεί ως σημείο σ' ένα τριγωνικό διάγραμμα αναφοράς (Σχήμα 1.1) στο οποίο η κάθε μια από τις πλευρές του εκφράζει αντίστοιχα σε ποσοστιαία κλίμακα την περιεκτικότητα του εδάφους σε άμμο, άργιλο και ιλύ.



Πίνακας 1.1: Διαστάσεις, αριθμός και ανάπτυγμα της επιφάνειας των εδαφικών τεμαχιδίων. Οι υπολογισμοί βασίζονται στη μέγιστη διάμετρο των τεμαχιδίων κάθε κατηγορίας και για λόγους απλούστευσης τα τεμαχίδια θεωρούνται σφαιρικά (Alexander 1977).

Οι άργιλοι περιέχουν πυρίτιο, αργίλιο, μαγνήσιο και / ή σίδηρο τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με άτομα οξυγόνου και υδροξυλομάδες. Παρουσιάζουν

μικροκρυσταλλική δομή σε φυλλίδια, η διάταξη των οποίων είναι χαρακτηριστική των διαφόρων τύπων αργίλων (καολίνη, μοντοριλλονίτη, βερμικουλίτη, ιλλίτη κ.λπ). Επίσης στα αργιλικά τεμαχίδια ανήκουν και τα ενυδατωμένα οξείδια του σιδήρου και του αργιλίου τα οποία μπορεί να διαθέτουν κρυσταλλική δομή ή να είναι άμορφα. Τα τεμαχίδια των αργίλων μαζί με το χούμο, αποτελούν τα εδαφικά κολλοειδή τα οποία είναι συνήθως αρνητικά φορτισμένα, και τα οποία προσελκύουν ιόντα αντίθετου φορτίου (κατιόντα όπως H^+ , Al^{+3} , Mg^{+2} κ.λπ.) (Brady & Weil 1996).

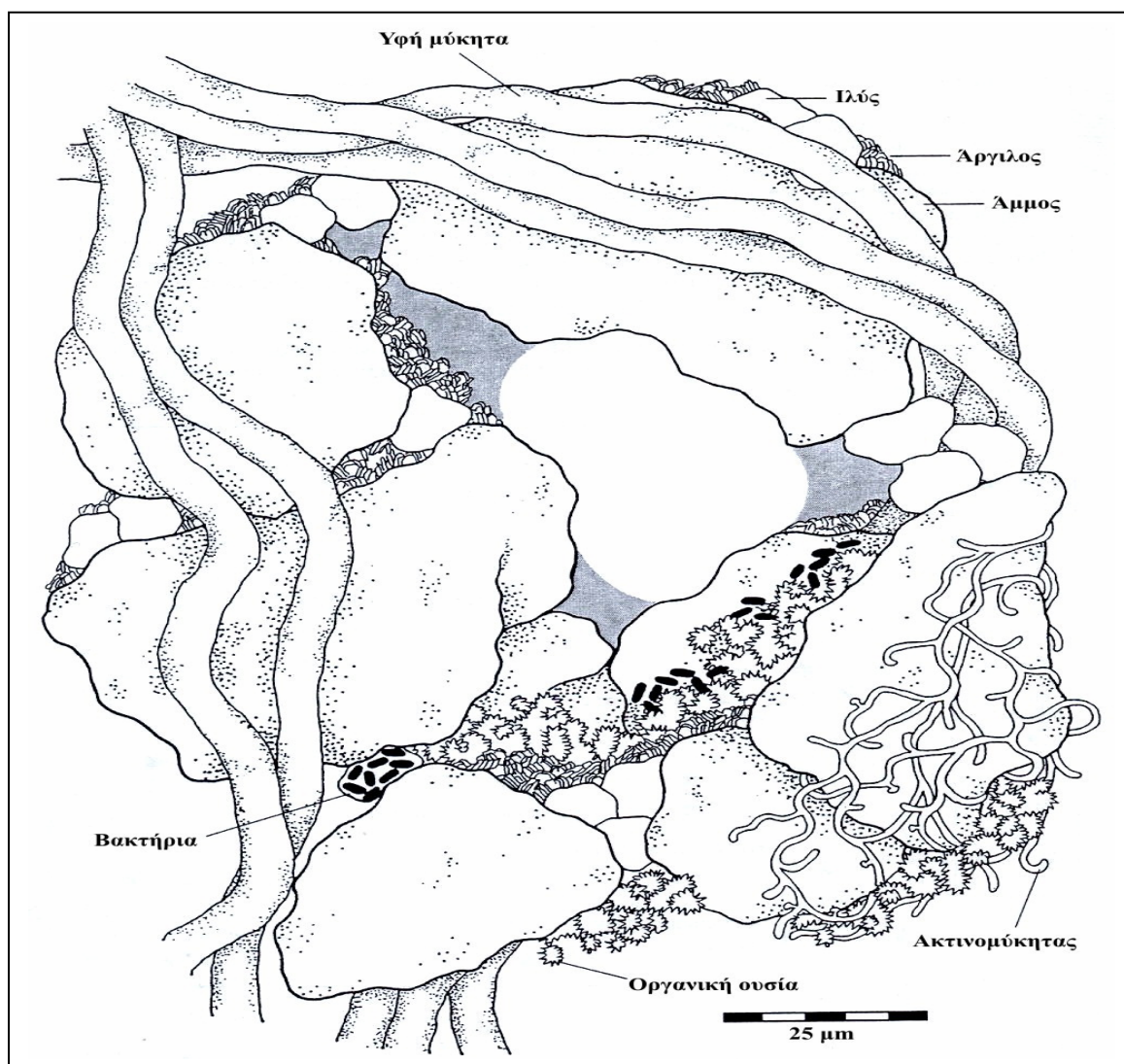
1.1.2. Δομή του εδάφους

Ο σχηματισμός των εδαφικών συσσωματωμάτων είναι μια διαδικασία κατά την οποία τα εδαφικά τεμαχίδια (άμμος, ιλύς και άργιλος) συνενώνονται μέσω φυσικοχημικών δυνάμεων και μέσω ενώσεων οι οποίες προέρχονται από τις ριζικές εκκρίσεις και τη μικροβιακή δραστηριότητα (Díaz-Zorita et al. 2002). Ο συνδυασμός των συστατικών του εδάφους σε συσσωματώματα καθορίζει τη δομή του εδάφους η οποία έχει άμεση επίδραση στην ικανότητα συγκράτησης του νερού, τον αερισμό, τη θερμοκρασία και τη μηχανική αντοχή (Connolly 1998). Στο σχηματισμό των εδαφικών συσσωματωμάτων εκτός από αβιοτικούς παράγοντες όπως το μητρικό υλικό, οι κλιματολογικές συνθήκες, οι καλλιεργητικές πρακτικές και το είδος των προσροφημένων κατιόντων (π.χ. τα ιόντα Na^+ τείνουν να διασπούν τα εδαφικά συσσωματώματα ενώ τα ιόντα Ca^{++} συμβάλλουν στο σχηματισμό των συσσωματωμάτων) κυρίαρχο ρόλο παίζουν οι βιολογικοί παράγοντες. Οι ρίζες των φυτών διαπερνούν το έδαφος και διασπούν τα συσσωματώματα. Η οργανική ουσία του εδάφους συμβάλλει στο σχηματισμό των συσσωματωμάτων, μέσω του σχηματισμού συμπλόκων μαζί με τα ανόργανα τεμαχίδια, τα ανόργανα στοιχεία και τους μικροοργανισμούς του εδάφους. Οι μικροοργανισμοί, μέσω της παραγωγής εξωκυτταρικών πολυσακχαριδίων και υφών τα οποία συνδυάζονται με τα ανόργανα και οργανικά υλικά αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες για το σχηματισμό των εδαφικών συσσωματωμάτων (Σχήμα 1.2).

1.1.3. Εδαφικοί πόροι

Οι πόροι του εδάφους παίζουν σπουδαίο ρόλο στην κίνηση του νερού και την ανταλλαγή των αερίων. Τα αμμώδη εδάφη έχουν μικρότερο ποσοστό σε πόρους (35-50%)

από τα λεπτόκοκκα αργιλώδη εδάφη (40-60%). Εκτός από το ποσοστό των πόρων στο έδαφος, ιδιαίτερη σημασία έχει η κατανομή του μεγέθους τους. Διακρίνονται κυρίως δύο κατηγορίες: οι μακροπόροι, με διάμετρο 30-100 μm οι οποίοι επιτρέπουν την ταχεία ανταλλαγή των εδαφικών αερίων και διακίνηση του νερού και αυτοί χαρακτηρίζουν τα αμμώδη εδάφη και οι μικροπόροι με διάμετρο μικρότερη των 30 μm οι οποίοι περιορίζουν την κίνηση του νερού και χαρακτηρίζουν τα αργιλώδη εδάφη. Η κατανομή του μεγέθους των πόρων επιδρά στον αερισμό, στη διαθεσιμότητα του νερού και στην υδατοϊκανότητα του εδάφους και συνεπώς στην κατανομή των διαφόρων ομάδων μικροοργανισμών στο έδαφος. Οι μικροοργανισμοί οι οποίοι εντοπίζονται σε πόρους μεγάλης διαμέτρου υφίστανται εντονότερα τις επιδράσεις της ξήρανσης σε σχέση με τους μικροοργανισμούς που ζουν σε πόρους μικρότερης διαμέτρου (Van Gestel et al. 1996).



Σχήμα 1.2: Σχηματική αναπαράσταση τυπικού εδαφικού συσσωματώματος (Sylvia et al. 1998).

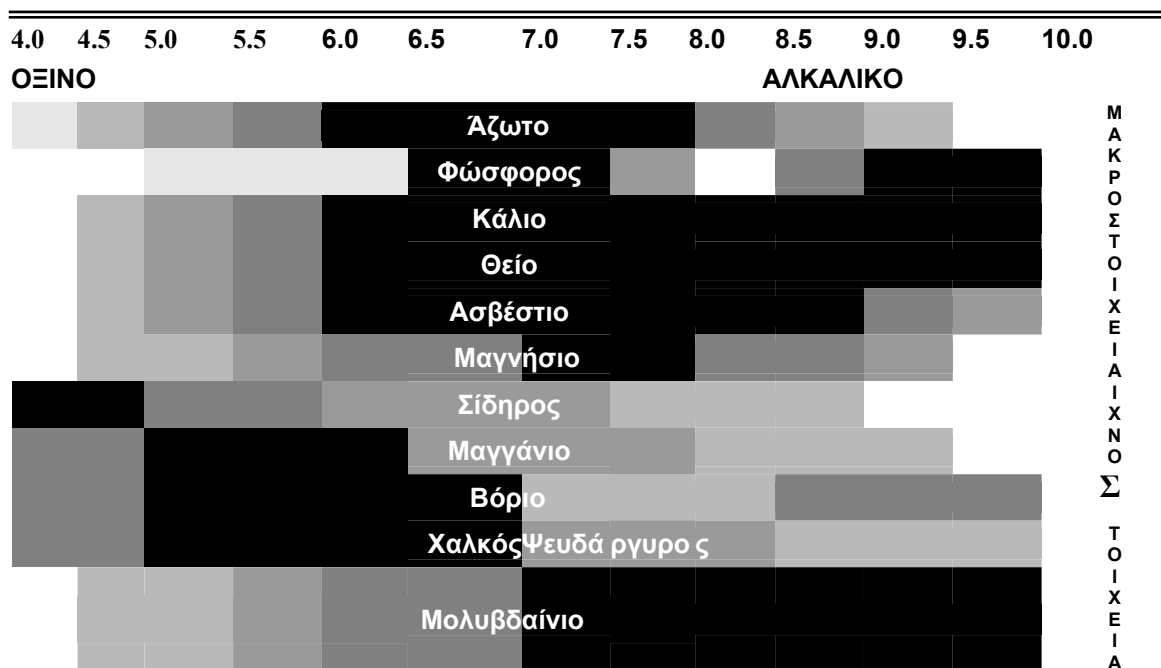
Η παρουσία πόρων μικρής διαμέτρου μειώνει επίσης τη δυνατότητα πρόσβασης των μικροοργανισμών στην οργανική ουσία που βρίσκεται σε αυτούς. Ιδιαίτερη σημασία για τη βιοαποικοδόμηση ουσιών που εισάγονται στο έδαφος, έχει το ποσοστό των εδαφικών νανοπόρων (διάμετρο της τάξης των nm). Έχουν αναφερθεί περιπτώσεις εμμονής βιοαποικοδομήσιμων ουσιών στο έδαφος λόγω της διάχυσής τους στους νανοπόρους οι οποίοι είναι τόσο μικροί ώστε η μικροβιακή ή ενζυμική δράση να είναι απαγορευτική σε αυτούς (Sylvia et al. 1998).

1.2. Χημικές ιδιότητες του εδάφους

1.2.1 Το pH του εδάφους

Το εδαφικό pH αποτελεί μια παράμετρο η οποία μας δίνει τις σημαντικότερες πληροφορίες για τις χημικές ιδιότητες του εδάφους. Ελέγχεται από τα εδαφικά κolloειδή (άργιλοι και οργανική ουσία) και από τα προσροφημένα σε αυτά ανόργανα κατιόντα. Οι τιμές του στο έδαφος καθορίζουν τη διαθεσιμότητα των ανόργανων στοιχείων προς τους μικροοργανισμούς και τα φυτά. Επίσης οι τιμές του καθορίζουν τα φυτικά είδη που θα επικρατήσουν στο φυσικό τοπίο, τα είδη των καλλιεργειών που θα μπορέσουν να αποδώσουν στη γεωργική γη, καθώς και τα είδη των μικροβιακών κοινοτήτων και τις αντιδράσεις τους. Στον Πίνακα 1.2 δίνονται οι περιοχές του pH στις οποίες τα διάφορα στοιχεία γίνονται διαθέσιμα προς τους μικροοργανισμούς και στα φυτά. Εδάφη με pH μεταξύ 6-7 θεωρείται ότι παρέχουν σε ικανοποιητικό βαθμό τα περισσότερα απαραίτητα στοιχεία για τα φυτά αν και η γενίκευση αυτή δεν ισχύει για όλες τις καλλιέργειες και όλους τους τύπους εδαφών (Brady & Weil 1996). Σε εδάφη όπως αυτά της χώρας μας όπου η βροχόπτωση είναι μικρή, το εδαφικό pH τείνει να έχει αλκαλικές τιμές λόγω του ότι τα ιόντα που συνεισφέρουν στην αλκαλική αντίδραση (Ca^{++} , Mg^{++} , K^{+} και Na^{+}) δεν ξεπλένονται και συσσωρεύονται αντικαθιστώντας τα ιόντα H^{+} και Al^{+++} τα οποία συνεισφέρουν στην όξινη αντίδραση του εδάφους. Σε εδάφη με αντίδραση ελαφρώς ή μέτρια αλκαλική, το μολυβδαίνιο και όλα τα μακροστοιχεία εκτός από τον φώσφορο, είναι άμεσα διαθέσιμα, ενώ μειώνεται η διαθεσιμότητα των Fe, Mn, B, Zn, Cu και Co.

Πίνακας 1.2: Βιοδιαθεσιμότητα των κυριότερων μακροστοιχείων και ιχνοστοιχείων σε σχέση με το pH του εδάφους. Το πιο σκούρο χρώμα υποδηλώνει τις περιοχές pH όπου το στοιχείο είναι περισσότερο διαθέσιμο. (<http://www.micromitsolutions.com/diag-effectph.html>)



1.2.2. Η αλατότητα του εδάφους

Η αλατότητα του εδάφους (η οποία προσδιορίζεται με τη μέτρηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας του εδάφους) έχει άμεση επίδραση στις βιολογικές του ιδιότητες διότι επιδρά άμεσα στο υδατικό δυναμικό το οποίο προσδιορίζει τη διαθεσιμότητα του νερού στους μικροοργανισμούς και τα φυτά. Έτσι, υψηλή συγκέντρωση διαλυμένων αλάτων μπορεί να οδηγήσει σε συνθήκες απαγορευτικές για τη μικροβιακή ή φυτική αύξηση ή σε συνθήκες όπου μπορούν να αναπτυχθούν μόνο αλόφιλοι οργανισμοί. Η αλατότητα ενός εδάφους σε αιώρημα 1:5 με νερό μπορεί να χαρακτηριστεί ως χαμηλή (<0,3 mS/cm), ικανοποιητική (0,3-0,65 mS/cm), υψηλή (0,65-1 mS/cm) και πολύ υψηλή (>1 mS/cm) (ΕΘΙΑΓΕ, ΠΕΓΕΑΛ Ευλοκάστρου 1995).

1.2.3. Η Ικανότητα Ανταλλαγής Κατιόντων (Ι.Α.Κ.)

Τα εδαφικά κολλοειδή (άργιλος και οργανική ουσία) φέρουν συνήθως αρνητικό φορτίο και προσελκύουν τα κατιόντα του εδαφικού διαλύματος ώστε να δημιουργείται μια δυναμική ισορροπία μεταξύ των προσροφημένων κατιόντων και των κατιόντων του εδαφικού διαλύματος. Η συγκράτηση των κατιόντων στα κολλοειδή είναι αντιστρεπτή,

εάν άλλα κατιόντα στο εδαφικό διάλυμα έχουν επαρκή συγκέντρωση ώστε να αντικαταστήσουν τα προσροφημένα κατιόντα. Το ολικό ποσό των ανταλλάξιμων κατιόντων ανά μονάδα βάρους του εδάφους αποτελεί την I.A.K. και σχετίζεται άμεσα με την ικανότητα του εδάφους να συγκρατεί τα κατιόντα και στη συνέχεια να τα διαθέτει στα φυτά και τους μικροοργανισμούς. Έτσι, ιόντα H^+ ανταλλάσσονται από τις ρίζες των φυτών και τους μικροοργανισμούς με απαραίτητα για τη θρέψη τους κατιόντα όπως Ca^{++} , K^+ , Mg^{++} κ.λπ. (Brady & Weil 1996).

1.3. Η οργανική ουσία του εδάφους

Τα φυτικά υπολείμματα τα οποία ενσωματώνονται στο έδαφος αποτελούν το κύριο υπόστρωμα για το σχηματισμό της οργανικής ουσίας του εδάφους. Καθώς αυτά αποικοδομούνται από τους μικροοργανισμούς το μεγαλύτερο μέρος του άνθρακα απελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα ως CO_2 ή ενσωματώνεται στη μικροβιακή βιομάζα. Ένα μικρότερο μέρος του άνθρακα του οποίου η δομή έχει μετασχηματιστεί, παραμένει στο έδαφος ως οργανική ουσία. Ο προσδιορισμός των διαφόρων κλασμάτων της οργανικής ουσίας δίνεται στον Πίνακα 1.3.

Πίνακας 1.3: Προσδιορισμός των διαφόρων κλασμάτων της οργανικής ουσίας του εδάφους (Sylvia et al. 1998).

Οργανική ουσία: Είναι το νεκρό οργανικό κλάσμα του εδάφους και συνίσταται κυρίως από μη αποικοδομημένα φυτικά και ζωικά υπολείμματα. Στο σχηματισμό της συμμετέχουν μη χουμικές και χουμικές ενώσεις.

Μη χουμικές ενώσεις: Αποτελούνται από υπολείμματα φυτικής ζωικής και μικροβιακής προέλευσης τα οποία δεν έχουν υποστεί μετασχηματισμό. Στο κλάσμα αυτό ανήκουν ουσίες όπως αμινοξέα, υδατάνθρακες, λίπη, κηροί, ρητίνες, οργανικά οξέα κλπ. Το κλάσμα αυτό συνιστά το 20% περίπου της οργανικής ουσίας.

Χουμικές ενώσεις: Αποτελούνται από μια ποικιλία ενώσεων χρώματος καφέ έως μαύρου και σχετικά μεγάλου μοριακού βάρους οι οποίες προκύπτουν μετά από δευτερογενείς αντιδράσεις σύνθεσης. Το κλάσμα αυτό συνιστά το 80% περίπου της οργανικής ουσίας και χαρακτηρίζεται από μεγάλη ανθεκτικότητα στη βιοαποικοδόμηση.

Χουμικά οξέα: Οργανικές ενώσεις χρώματος καφέ έως μαύρο που εκχυλίζονται από το έδαφος με διάφορα αντιδραστήρια (π.χ. διαλυμένο άλκαλι όπως $NaOH$ 0.5M) και κατακρημνίζεται με οξίνιση σε pH 1-2.

Φουλβικά οξέα: Ουσίες κίτρινου χρώματος οι οποίες παραμένουν στο διάλυμα μετά την απομάκρυνση των χουμικών οξέων με οξίνιση.

Χουμίνη: Το κλάσμα της οργανικής ουσίας το οποίο δεν μπορεί να εκχυλιστεί με άλκαλι.

Παρ' όλο που η ποσότητα της οργανικής ουσίας του εδάφους δεν υπερβαίνει το 5% του συνολικού όγκου του εδάφους, η επίδρασή της στις βιολογικές και φυσιολογικές ιδιότητες του εδάφους είναι τεράστια (Πίνακας 1.4).

Πίνακας 1.4 : Επίδραση της οργανικής ουσίας στις ιδιότητες του εδάφους (Sylvia et al. 1998).

Βιολογικές ιδιότητες

- Παρέχει με χαμηλούς ρυθμούς τις απαραίτητες πηγές άνθρακα και ενέργειας για την υποστήριξη ενός μεγάλου, ποικίλου και μεταβολικά ενεργού μικροβιακού πληθυσμού.
- Αποτελεί πηγή ουσιών οι οποίες ενδεχομένως προάγουν την αύξηση των φυτών.

Χημικές ιδιότητες

- Αυξάνει την Ικανότητα Ανταλλαγής Κατιόντων του εδάφους (συνήθως το 20-80% της I.A.K. οφείλεται στην οργανική ουσία που περιέχει το έδαφος).
- Εξομαλύνει τις μεταβολές του pH (ρυθμιστικές ιδιότητες)
- Απελευθερώνει με χαμηλούς ρυθμούς απαραίτητα στοιχεία για τη θρέψη των φυτών όπως άζωτο, φώσφορο και θείο σε οργανική μορφή (καθώς αυτή αποσυντίθεται σε ποσοστό 2-5% ανά έτος)
- Συντελεί στο σχηματισμό χηλικών ενώσεων με τα ιχνοστοιχεία του εδάφους, αυξάνοντας έτσι τη βιοδιαθεσιμότητά τους στα φυτά.
- Επιταχύνει τη διαλυτοποίηση ανόργανων στοιχείων απαραίτητων για τη θρέψη των φυτών, τα οποία βρίσκονται στο έδαφος σε αδιάλυτες μορφές.
- Έχει μεγάλη ικανότητα προσρόφησης οργανικών ουσιών και έτσι μειώνει τη βιοδιαθεσιμότητα τοξικών ξενοβιοτικών ουσιών.

Φυσικές ιδιότητες

- Συμβάλλει στη βελτίωση της δομής του εδάφους και στη δημιουργία συσσωματωμάτων.
 - Αυξάνει το ποσοστό των εδαφικών πόρων.
 - Αυξάνει την υδατοϊκανότητα του εδάφους, μπορεί όμως να αυξηθεί και η δύναμη με την οποία συγκρατείται το νερό (ενεργότητα νερού)
 - Αυξάνει την απορρόφηση θερμότητας από το έδαφος, αλλά συχνά κάποια εδάφη επειδή συγκρατούν περισσότερο νερό χρειάζονται και περισσότερη ενέργεια για τη διατήρηση της θερμοκρασίας τους.
-
-

Ανάλογα με το βαθμό που η οργανική ουσία γίνεται διαθέσιμη στους μικροοργανισμούς, μπορούμε να διακρίνουμε τις εξής ομάδες:

(i) Εύκολα αφομοιώσιμες ενώσεις του άνθρακα, οι οποίες προέρχονται από ριζικές εκκρίσεις ή από ενζυμική διάσπαση μακρομορίων (μονοσακχαρίτες, αμινοξέα, νουκλεοτίδια, αρωματικά και αλειφατικά μόρια μικρού μοριακού βάρους)

(ii) Μακρομόρια με εξισορροπημένη στοιχειακή σύσταση δηλαδή με επαρκή συμμετοχή ανόργανων στοιχείων στο οργανικό μόριο (πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, λιπο-

και γλυκο-πρωτεΐνες). Συνήθως τα μόρια αυτά αποικοδομούνται από εξωκυτταρικά ένζυμα και θεωρούνται εύκολα αφομοιώσιμα διότι περιέχουν και κύρια ανόργανα στοιχεία (φώσφορο, κάλιο, ασβέστιο) απαραίτητα για την αύξηση των μικροοργανισμών.

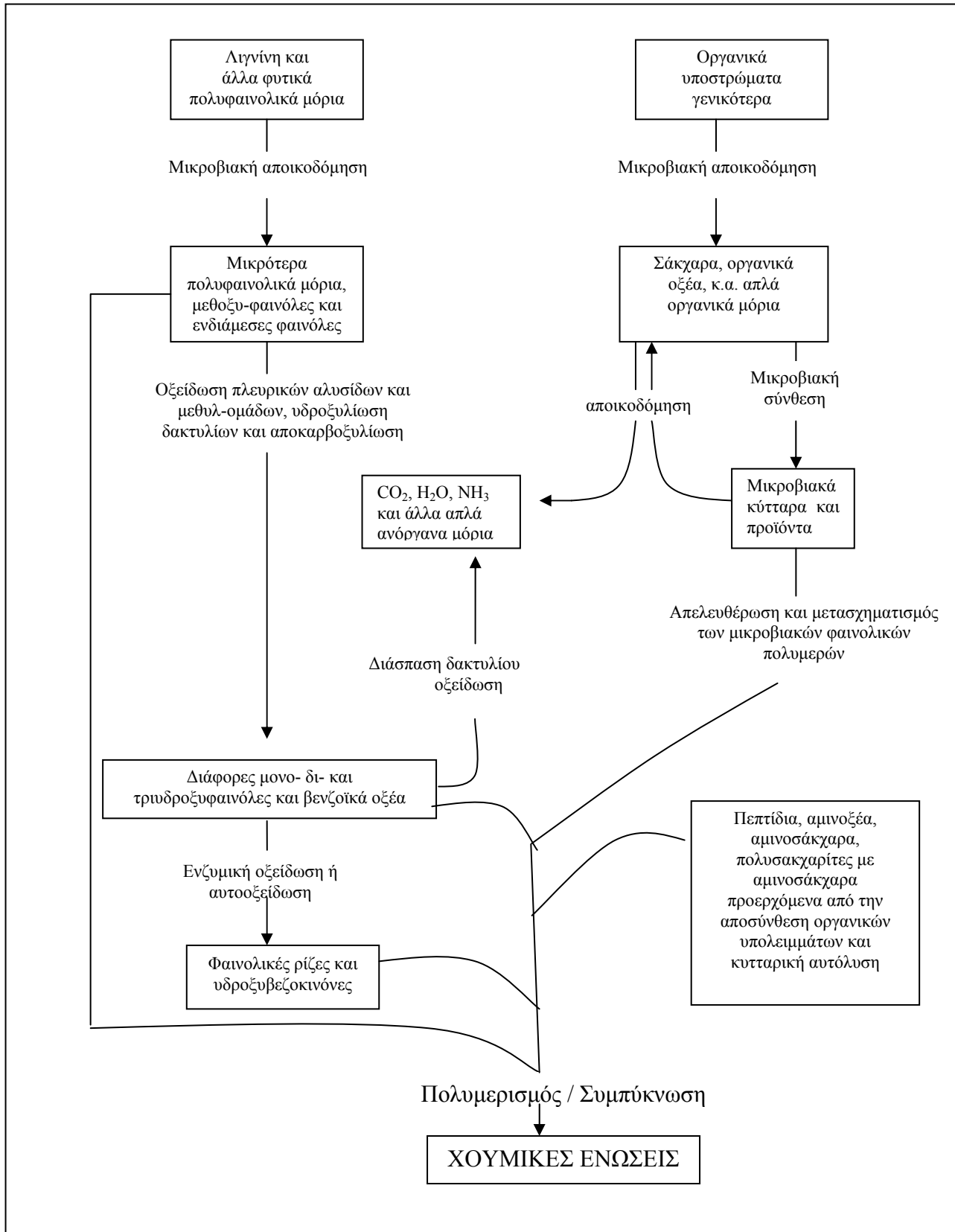
(iii) Δομικά συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών, τα οποία είναι μακρομόρια με μη εξισορροπημένη στοιχειακή σύσταση (μικρή περιεκτικότητα σε τέφρα) όπως είναι οι λιγνινοκυτταρινούχες ενώσεις οι ημικυτταρίνες, οι πηκτίνες κ.ά. Η αποικοδόμηση των μορίων αυτών είναι δυσκολότερη και συχνά απαιτείται η συμμετοχή κοινοτήτων μικροοργανισμών οι οποίοι αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (μικροοργανισμοί οι οποίοι παράγουν υδρολυτικά ένζυμα, σιδηροφόρα, αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, μυκηλαιοκοί μικροοργανισμοί οι οποίοι θα μεταφέρουν τα θρεπτικά στοιχεία τα οποία εκλείπουν από άλλες περιοχές). Αντιπροσωπευτικά γένη μικροοργανισμών που διασπών αυτού του είδους τα οργανικά υποστρώματα δίνονται στον Πίνακα 1.5.

(iv) συντηρημένη οργανική ουσία όπως ο χούμος, η οποία αποτελείται από εκείνα τα τελικά προϊόντα του μικροβιακού μεταβολισμού ή των αβιοτικών φυσικοχημικών αντιδράσεων, τα οποία είναι ανθεκτικά στην αποικοδόμηση ή σε επιπλέον μετασχηματισμό (Panikov 1999).

Πίνακας 1.5: Αντιπροσωπευτικά γένη μικροοργανισμών οι οποίοι αποικοδομούν τα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών (Καραγκούνη 1999).

	Κυτταρίνη και ημικυτταρίνες	Λιγνίνη
Βακτήρια	<i>Cytophaga, Vibrio, Polyanthium, Cellulomonas, Streptomyces, Nocardia, Clostridium</i>	<i>Arthrobacter, Flavobacterium, Micrococcus, Pseudomonas</i>
Μύκητες	<i>Aspergillus, Fusarium, Phoma, Trichoderma</i>	<i>Phanerochaete, Polyporus, Poria, Fomes, Agaricus, Pleurotus, Collybia, Schizophyllum, Fusarium</i>

Ο χούμος αποτελεί το μεγαλύτερο αλλά και το πιο δύσκολα βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα της οργανικής ουσίας. Για το σχηματισμό του, ο οποίος είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με την αποικοδόμηση της οργανικής ουσίας στο έδαφος, έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί (Σχήμα 1.3).

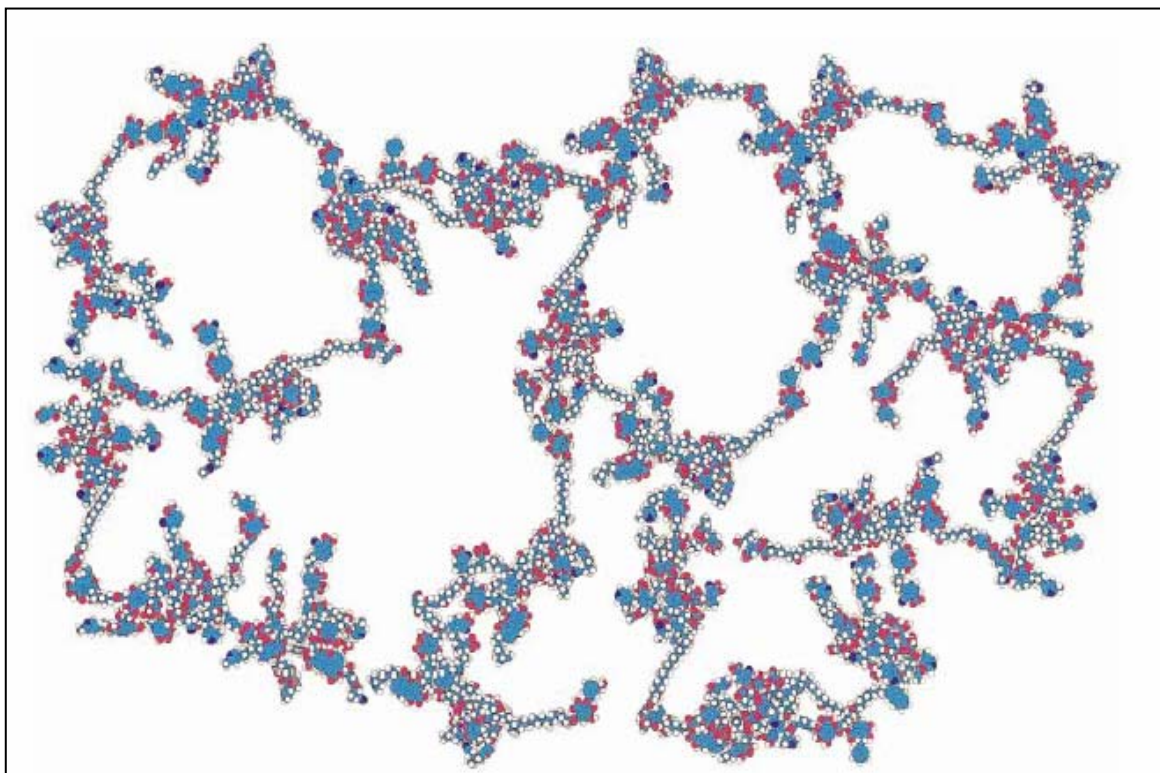


Σχήμα 1.3: Πορεία της αποσύνθεσης οργανικών υποστρωμάτων και σχηματισμός του χούμου (Sylvia et al. 1998)

Με βάση τη θεωρία της μικροβιακής σύνθεσης, κατά την αποικοδόμηση μη λιγνινούχων υποστρωμάτων από μύκητες (π.χ. κυτταρίνη) συντίθενται πολυφαινολικές ενώσεις οι οποίες στη συνέχεια οξειδώνονται ενζυμικά σε κινόνες. Αυτές συμπυκνώνονται με ενώσεις που έχουν αμινομάδες και σχηματίζουν το χούμο. Κατά τη θεωρία του σχηματισμού κινονών από τη λιγνίνη, οι φαινολικές ουσίες που απελευθερώνονται κατά την αποικοδόμηση της λιγνίνης συμπυκνώνονται με ενώσεις που έχουν αμινομάδες και σχηματίζουν το χούμο. Οι παραπάνω θεωρίες είναι πιθανό να ισχύουν η κάθε μια χωριστά ή και οι δύο σε συνδυασμό σε αερόβια εδάφη. Σε εδάφη κατακλυσμένα με κακή αποστράγγιση όπου σχηματίζεται τύρφη, ενδεχομένως η θεωρία του μετασχηματισμού των φυτικών υπολειμμάτων να παίζει το σπουδαιότερο ρόλο στο σχηματισμό του χούμου. Με βάση τη θεωρία αυτή η λιγνίνη αποικοδομείται ατελώς από τους μικροοργανισμούς και γίνεται μέρος του χούμου. Αυτή μετασχηματίζεται με υδροξυλιώσεις και οξειδώσεις των $-OCH_3$ σε $-COOH$ και αντιδρά με ουσίες που έχουν αμινομάδες σχηματίζοντας χουμικές ενώσεις (Sylvia et al. 1998).

Ο κύριος μηχανισμός για το σχηματισμό του χούμου σχετίζεται με την ικανότητα των φαινολικών ουσιών να υπόκεινται σε ενζυμικές ή αυτοοξειδωτικές αντιδράσεις πολυμερισμού. Ορισμένες ορθο-διυδροξυ- και τριυδροξυ- φαινόλες αυτοοξειδώνονται άμεσα σε $pH \geq 6$ και σχηματίζουν πολυμερή. Οι μικροοργανισμοί του εδάφους παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του χούμου παράγοντας φαινολάσες (monophenol monooxygenases) και υπεροξειδάσες οι οποίες σχετίζονται με τον ενζυμικό πολυμερισμό των φαινολικών ουσιών. Το αποτέλεσμα είναι ο άμεσος σχηματισμός προϊόντων συμπύκνωσης από υδροξυφαινόλες, υδροξυβενζοϊκά οξέα και άλλες αρωματικές ενώσεις τα οποία συνδέονται χημικά με μερικώς αποικοδομημένες πρωτεΐνες, αμινοξέα, αμινοσάκχαρα, υδατάνθρακες και άλλες ουσίες οι οποίες προέρχονται από την αποσύνθεση των φυτικών υπολειμμάτων ή αποτελούν προϊόντα μεταβολισμού των μικροοργανισμών.

Επειδή στο σχηματισμό του χούμου εμπλέκονται διάφορες φαινολικές ενώσεις, αμινοξέα πολυσακχαρίτες κ.λπ., οι αντιδράσεις συμπύκνωσης και πολυμερισμού οδηγούν στη δημιουργία ποικιλίας πολυμερών με διαφορετική δομή, αλλά με παρόμοια στοιχειακή σύσταση. Στην Εικόνα 1.1 δίνονται πιθανές μορφές των χουμικών ουσιών του εδάφους.



Εικόνα 1.1: Τρισδιάστατη δομή ενός χουμικού κολλοειδούς κατασκευασμένο από 22 μόρια χουμικών οξέων (στοιχειακή σύσταση $C_{6932}H_{7666}O_{1970}N_{110}$). Η αντιστοιχία των χρωμάτων με τα στοιχεία έχει ως εξής: C-μπλε ανοιχτό, H-λευκό, O-κόκκινο, N-μπλε σκούρο. (Schulten & Leinweber 2000).

Η περιεκτικότητα του χούμου σε άνθρακα είναι περίπου στο 58% ενώ το άζωτο κυμαίνεται από 3-6%. Η αναλογία του σε C/N/P/S είναι περίπου 100/10/1/1. Η οργανική ουσία του εδάφους θεωρείται ότι έχει μορφή τρισδιάστατου δικτύου το οποίο συνδέεται με την άργιλο με ηλεκτροχημικούς δεσμούς. Μια τυπική ανάλυση τέλος δείχνει ότι το 50% του άνθρακα που περιέχεται σ' αυτήν εμφανίζεται με τη μορφή φαινολικών, το 20% ως πολυσακχαρίτες, το 20% ως διάφορες ενώσεις με άζωτο και το 10% με άλλες μορφές.

1.4. Οι μικροβιακοί πληθυσμοί

1.4.1. Δομή των μικροβιακών πληθυσμών

Οι μικροοργανισμοί του εδάφους (βακτήρια, ακτινοβακτήρια, μύκητες και φύκη) συνιστούν την εδαφική μικροχλωρίδα. Από αυτούς τα βακτήρια αποτελούν την πολυπληθέστερη κατηγορία φθάνοντας σε πληθυσμούς της τάξης του 10^9 / g εδάφους (Πίνακας 1.6).

Πίνακας 1.6: Μικροβιακές ομάδες και αντιπροσωπευτικά μεγέθη των πληθυσμών με τους οποίους ανευρίσκονται στο έδαφος (Sylvia et al. 1998).

Μικροβιακή ομάδα	Πληθυσμός /g εδάφους
<i>Ιοί</i>	10^{10} - 10^{11}
<i>Βακτήρια</i>	10^8 - 10^9
<i>Ακτινοβακτήρια</i>	10^7 - 10^8
<i>Μύκητες</i>	10^5 - 10^6
<i>Φύκη</i>	10^3 - 10^6
<i>Πρωτόζωα</i>	10^3 - 10^5
<i>Νηματώδεις</i>	10 - 10^2
<i>Γαιοσκώληκες</i>	

Παρ' όλο που οι μύκητες αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό της μικροβιακής βιομάζας του εδάφους τα βακτήρια θεωρούνται το ενεργότερο κλάσμα λόγω των μικροσκοπικών τους διαστάσεων σε συνδυασμό με τον υψηλό πληθυσμό και την ταχύτητα του πολλαπλασιασμού τους (Πίνακας 1.7). Έτσι, τα βακτήρια και μόνο προσφέρουν σε ένα στρέμμα γόνιμου εδάφους βάθους 15 cm, μια έκταση ζωντανής κυτταρικής επιφάνειας που ισοδυναμεί (κατά προσέγγιση) με 187,5 στρέμματα. Επίσης, λόγω των ιδιαίτερων και σε πολλές περιπτώσεις μοναδικών μεταβολικών τους δραστηριοτήτων συμβάλλουν κατά κύριο λόγο στην ανακύκλωση των στοιχείων του εδάφους (Μπαλής 1986).

Πίνακας 1.7: Συμμετοχή διαφόρων μικροβιακών ομάδων στην αποικοδόμηση της οργανικής ουσίας (όπως υπολογίζεται από τις αναπνευστικές απώλειες σε C) σε καλλιεργούμενο και ακαλλιεργητο έδαφος (Beare et al. 1997).

	Απώλειες σε C (% του συνόλου)	
	Καλλιεργούμενο έδαφος	Ακαλλιεργητο έδαφος
<i>Βακτήρια</i>	72,8	62,8
<i>Μύκητες</i>	19,3	22,3
<i>Πρωτόζωα</i>	3,7	2,5
<i>Νηματώδεις</i>	0,25	0,16
<i>Μικροαρθρόποδα</i>	0,03	0,11
<i>Γαιοσκώληκες</i>	3,5	11,2

Παρά τους φαινομενικά τεράστιους πληθυσμούς τους οι μικροοργανισμοί του εδάφους υπολογίζεται ότι καταλαμβάνουν μόνο το 0,4% του συνολικού όγκου των εδαφικών πόρων. Αυτό οφείλεται τόσο στην πενία των διαθέσιμων υποστρωμάτων όσο

και στην ανομοιομορφία της δομής του εδάφους. Έτσι, τα οργανικά υποστρώματα που βρίσκονται στους νανοπόρους του εδάφους αποικοδομούνται δύσκολα από τους μικροοργανισμούς επειδή η πρόσβαση σε αυτά είναι μειωμένη. Επίσης η βιοδιαθεσιμότητα των υδατοδιαλυτών ουσιών περιορίζεται μόνο στο κλάσμα των πόρων οι οποίοι είναι πλήρεις με νερό. Τα βακτήρια, λόγω της μονοκύτταρης φύσης τους δεν μπορούν να αποικίσουν αποτελεσματικά στερεά οργανικά υποστρώματα (π.χ. φυτικά υπολείμματα) και δεν μπορούν να μετακινηθούν εύκολα μεταξύ απομακρυσμένων πηγών άνθρακα. Όμως λόγω του μικρού τους μεγέθους, μπορούν να αποικίζουν μικροπόρους στους οποίους είναι αδύνατη η εγκατάσταση μικροοργανισμών μεγαλύτερου μεγέθους. Η πρόσβαση σε πηγές άνθρακα οι οποίες είναι απομακρυσμένες μεταξύ τους επιτυγχάνεται με την ανάπτυξη μυκηλιακών μορφών όπως οι μύκητες και τα ακτινοβακτήρια.

1.4.2. Προσαρμοστικότητα και διαδοχή των μικροοργανισμών κατά τον αποικισμό των οργανικών υποστρωμάτων

Η μικροβιακή αύξηση στο έδαφος εξαρτάται από τη βιοδιαθεσιμότητα των οργανικών ουσιών, από τις περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς και από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους. Εξ' αιτίας της ταυτόχρονης αλληλεπίδρασης πολλών παραγόντων, οι μικροθέσεις που διαμορφώνονται στο έδαφος παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία, και οι μικροοργανισμοί υποχρεώνονται στην υιοθέτηση διαφορετικών στρατηγικών, ώστε να αντεπεξέλθουν. Η ποικιλομορφία των διαφορετικών καταστάσεων στις οποίες πρέπει να ανταπεξέλθουν οι μικροοργανισμοί μπορεί να εκφραστεί με μερικά παραδείγματα: Σε συνθήκες ξηρασίας π.χ., εύκολα αποικοδομήσιμες ουσίες (κοπριά, φυτικά υπολείμματα, κ.λπ.) μπορεί να μη διασπώνται, επειδή δεν υπάρχει αρκετό νερό ώστε να υποστηριχθεί η μικροβιακή αύξηση. Αντίθετα, αμέσως μετά τη διαβροχή ξηρών εδαφών παρατηρείται μια απότομη κορύφωση της μικροβιακής δραστηριότητας. Οι περιπτώσεις της έντονης αλλά παροδικής αύξησης των μικροοργανισμών του εδάφους, λόγω της πρόσκαιρης προσφοράς διαθέσιμου υποστρώματος, είναι διαφορετικές από τις περιπτώσεις συνεχούς παροχής θρεπτικών ουσιών, κάτι που συμβαίνει στην περιοχή της ριζόσφαιρας όπου υπάρχει σταθερή παροχή εύκολα αποικοδομήσιμων θρεπτικών ουσιών. Στο εδαφικό απόθεμα της οργανικής ουσίας (χούμος) υπάρχει επίσης σταθερότητα στο ρυθμό με τον οποίο παρέχεται η οργανική ουσία στους μικροοργανισμούς, μπορεί όμως να χρησιμοποιηθεί μόνο από εκείνους οι οποίοι είναι εφοδιασμένοι με το απαραίτητο ενζυμικό σύστημα. Οι

παραπάνω καταστάσεις δίνουν στους μικροοργανισμούς την ευκαιρία να εκφράσουν τις ιδιαίτερες ικανότητες που διαθέτουν για την αύξησή τους και να ανταγωνιστούν τους υπόλοιπους για το διαθέσιμο υπόστρωμα με οποιοδήποτε χαρακτηριστικό είναι εφοδιασμένοι (χρησιμοποίηση ποικίλων υποστρωμάτων, δυναμικό για ταχεία αύξηση, παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών κ.λπ) (Sylvia et al. 1998).

Ανάλογα με τις διατροφικές τους απαιτήσεις και τις ικανότητές τους για αύξηση οι μικροοργανισμοί του εδάφους έχουν κατηγοριοποιηθεί από διάφορους ερευνητές με διάφορους τρόπους. Ο Winogradsky το 1924 αναφέρεται με τον όρο ζυμογενείς (zymogenous) στους μικροοργανισμούς του εδάφους οι οποίοι αυξάνονται γρήγορα όταν διατίθενται σε αυτούς υποστρώματα εύκολα αποικοδομήσιμα. Σε αντίθεση με αυτούς, οι μικροοργανισμοί που αποικίζουν τα κλάσματα του υποστρώματος που εναπομένουν μετά τον πρώτο αποικισμό και αποικοδομούνται δυσκολότερα, χαρακτηρίστηκαν από τον ίδιο ερευνητή ως αυτόχθονες (autochthonous) (Kataoka et al. 1996, Sylvia et al. 1998).

Σε μια άλλη προσπάθεια κατηγοριοποίησης των βακτηρίων του εδάφους απομονώθηκαν βακτήρια τα οποία αυξάνονταν μόνο σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος (χρησιμοποιήθηκε το Nutrient Agar σε αραιώση 1:100) και τα οποία χαρακτήρισαν ως ολιγογότροφα (oligotrophs) (Ohta & Hattori 1983). Αντίθετα, οι μικροοργανισμοί οι οποίοι αυξάνονται σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος και αποτελούν τις τυπικές απομονώσεις εδαφικών βακτηρίων χαρακτηρίστηκαν ως κοπιότροφα (copiotrophs) (χρησιμοποιήθηκε το Nutrient Agar χωρίς αραιώση, ενώ παρόμοιες συγκεντρώσεις σε πηγές C παρέχουν τα περισσότερα τυποποιημένα εργαστηριακά υποστρώματα). Έχουν αναφερθεί βακτήρια ως υποχρεωτικά ολιγότροφα δηλαδή αυτά που δεν μπορούν να αναπτυχθούν καθόλου σε υποστρώματα με υψηλές συγκεντρώσεις άνθρακα σε αντίθεση με άλλα, τα οποία αναπτύσσονται προαιρετικά σε πλούσια ή φτωχά υποστρώματα (Maloney et al. 1997).

Ιδιαίτερη σημασία έχει δοθεί από τους ερευνητές στη διαδοχή διαφορετικών ομάδων μικροοργανισμών κατά την αποικοδόμηση των οργανικών υποστρωμάτων που προστίθενται στο έδαφος. Ο όρος πρωτογενής μικροχλωρίδα αναφέρεται στους πρώτους πληθυσμούς που αναπτύσσονται αμέσως μετά την προσθήκη του οργανικού υποστρώματος. Η αύξηση των πρωτογενών αποικιστών οδηγεί στη μεταβολή του περιβάλλοντος αλλά και του οργανικού υποστρώματος, το οποίο μετατρέπεται σε μεταβολικά προϊόντα και μικροβιακή βιομάζα. Καθώς το στάδιο αποικοδόμησης προχωρά και οι εύκολα αφομοιώσιμες οργανικές ουσίες εξαντλούνται, οι πρωτογενείς αποικιστές

αντικαθίστανται από άλλους, ικανούς να αποικοδομούν υποστρώματα ανθεκτικότερα και με πολυπλοκότερη σύνθεση. Σύντομα λοιπόν αναπτύσσεται η δευτερογενής μικροχλωρίδα η οποία χρησιμοποιεί τα υπολείμματα του αρχικού υποστρώματος, τα νεκρά μικροβιακά κύτταρα και τα μεταβολικά προϊόντα της πρωτογενούς μικροχλωρίδας. Σε αντίθεση με τους πρωτογενείς αποικιστές, οι μικροοργανισμοί που αποικίζουν τα οργανικά υπολείμματα στα τελευταία στάδια της αποσύνθεσής τους, τείνουν να εμφανίζουν μικρότερους ρυθμούς αύξησης και να είναι λιγότερο ανταγωνιστικοί από τους πρωτογενείς αποικιστές όταν χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα απλές οργανικές ενώσεις. Επίσης, οι δευτερογενείς αποικιστές παράγουν συνήθως ανθεκτικότερες ληθαργικές μορφές αλλά σε μικρότερη ποσότητα από τους πρωτογενείς (Sylvia et al. 1998).

Μελετήθηκε επίσης η δυνατότητα ομαδοποίησης των μικροοργανισμών του εδάφους με βάση τη θεωρία της στρατηγικής r- ή K- στον αποικισμό και τη διαδοχή (Sylvia et al. 1998). Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, ένα είδος χρειάζεται να υιοθετήσει διαφορετική στρατηγική για να αποικίσει ένα περιβάλλον στο οποίο ο αρχικός του πληθυσμός είναι μικρός (r-στρατηγική) από αυτή που θα υιοθετήσει για να διατηρήσει το μέγεθός του, όταν ο πληθυσμός έχει πλησιάσει τη «χωρητικότητα» του περιβάλλοντος (K-στρατηγική).

Τα είδη των μικροοργανισμών που υιοθετούν την r-στρατηγική καταναλώνουν μεγάλο μέρος της διαθέσιμης ενέργειας στον πολλαπλασιασμό τους και προσπαθούν να καταλάβουν την «οικολογική θέση» όσο το δυνατό συντομότερα. Είδη με τέτοια συμπεριφορά θεωρείται ότι δεν είναι καλά προσαρμοσμένα στο να ανταπεξέρχονται σε περιβαλλοντικά stress και σε συνθήκες έλλειψης υποστρώματος. Για το λόγο αυτό οι πληθυσμοί τους υφίστανται έντονες διακυμάνσεις στην πορεία του χρόνου. Πολλά από τα βακτήρια του εδάφους, ιδιαίτερα αυτά που ανήκουν στα κοπιότροφα ή στα ζυμογενή ή στους πρωτογενείς αποικιστές της οργανικής ουσίας θεωρείται ότι υιοθετούν την r-στρατηγική, ενώ συχνά οι παραπάνω ομάδες θεωρούνται συνώνυμες.

Οι μικροοργανισμοί που υιοθετούν την K-στρατηγική, έχουν μικρότερους ρυθμούς αύξησης και πολλαπλασιασμού οι οποίοι ελέγχονται από τα περιορισμένα διαθέσιμα υποστρώματα, καθώς και μικρές απαιτήσεις σε ενέργεια για τη συντήρησή τους. Από την άλλη πλευρά, είναι περισσότερο προσαρμοσμένοι στο να ανταπεξέρχονται σε συνθήκες πενίας και σε περιβαλλοντικές αντιξοότητες και γι' αυτό απαντώνται σε περιβάλλοντα τα οποία βρίσκονται σε κατάσταση ισορροπίας (climax) και όπου εκεί ο ανταγωνισμός μεταξύ των μικροοργανισμών είναι έντονος. Πολλοί μύκητες και ακτινοβακτήρια

θεωρούνται ότι υιοθετούν την K-στρατηγική διότι διαθέτουν μικρότερους σχετικά ρυθμούς αύξησης, παράγουν σπόρια και άλλες μορφές επιβίωσης ανθεκτικές στο χρόνο και μεταβολίζουν σύνθετα οργανικά υποστρώματα όπως λιγνίνη, χούμο κ.λπ. Σε κάποιο έδαφος στο οποίο δεν έχει γίνει πρόσφατα προσθήκη οργανικής ουσίας και το οποίο βρίσκεται σε κατάσταση ισορροπίας, το κλάσμα των μικροοργανισμών που υιοθετούν την r – στρατηγική είναι σχετικά μικρό (5-20% του συνολικού μικροβιακού πληθυσμού), αλλά μπορεί να προσεγγίσει το 100% σε εδάφη όπου το διαθέσιμο υπόστρωμα είναι άφθονο. Ο παράγοντας δηλαδή που καθορίζει τις αναλογίες των πληθυσμών των δύο αυτών ομάδων, είναι η διαθεσιμότητα του υποστρώματος και για το λόγο αυτό εκδηλώνεται μια αντιστρεπτή μεταβολή $r \Leftrightarrow K$ μεταξύ των δύο ομάδων (Stenström et al. 2001).

Η κατάταξη των βακτηριακών πληθυσμών σε είδη που χρησιμοποιούν την r- ή την K- στρατηγική έχει προσεγγιστεί με διάφορους τρόπους από τους ερευνητές. Οι περισσότερες μελέτες αφορούν:

(i) Τον διαχωρισμό τους σε κοπιότροφα ή ολιγότροφα ανάλογα με το αν αυξάνουν σε υποστρώματα με υψηλή συγκέντρωση C τα οποία επωάζονται για μικρό χρονικό διάστημα ή σε υποστρώματα με χαμηλή συγκέντρωση C τα οποία επωάζονται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Τα υποστρώματα που έχουν χρησιμοποιηθεί ποικίλλουν μεταξύ των διαφόρων ερευνητών σε χημικώς ορισμένα (Hu & Van Bruggen 1998, Hu et al 1999) ή σύνθετα (Ohta & Hattori 1983, Hu & Van Bruggen 1997, Semenov 1999). Ο χρόνος επώασης για τον προσδιορισμό των κοπιότροφων κυμαίνεται από 2 ημέρες (Maloney et al. 1997) έως 7 ημέρες (Hu & Van Bruggen 1997). Ο χρόνος επώασης για τον προσδιορισμό των ολιγότροφων κυμαίνεται από 7 ημέρες (Hu & Van Bruggen 1998) έως 28 ημέρες (Ohta & Hattori 1983).

(ii) Τη χρήση δεικτών οι οποίοι σχετίζονται με την ταχύτητα εμφάνισης των βακτηριακών πληθυσμών σε κάποιο υπόστρωμα. Τέτοιος είναι ο δείκτης C.D. (Colony

Development Index) ο οποίος προσδιορίζεται από τη σχέση: $CD = \left[\frac{N_1}{1} + \frac{N_2}{2} + \dots + \frac{N_{10}}{10} \right] \times 100$

όπου $N_1, N_2 \dots N_{10}$ οι αναλογίες των βακτηριακών αποικιών που εμφανίζονται στα τρυβλία σε χρόνο 1 ημέρα, 2 ημέρες, 10 ημέρες (Kozdrók & van Elsas 2000, Sarathchandra et al. 1997). Επίσης έχει χρησιμοποιηθεί ο δείκτης E.P. = $-\sum (p_i \times \log_{10} p_i)$ όπου p_i ο πληθυσμός στην ομάδα i / τον ολικό πληθυσμό, (οι ομάδες προσδιορίζονται από τους διαφορετικούς χρόνους εμφάνισης των αποικιών στο υπόστρωμα) (Kozdrók & van Elsas 2000, De Leij et al. 1993, Sarathchandra et al. 1997).

Οποιαδήποτε διαταραχή στο έδαφος (προσθήκη οργανικών υποστρωμάτων, διαδοχική ξήρανση-επανύγρανση), θα έχει άμεση επίδραση στους μικροοργανισμούς και θα οδηγήσει σε διαδοχικές μεταβολές της σύστασης του πληθυσμού τους. Αρχικά, στα πρώτα στάδια του αποικισμού, θα υπάρξει αύξηση της μικροβιακής δραστηριότητας και του πληθυσμού των μικροοργανισμών. Επίσης, αρχικά αναμένεται και μείωση της βιοποικιλότητας, αφού μόνο ένας περιορισμένος αριθμός μικροοργανισμών μπορεί να ανταποκριθεί άμεσα στην παροχή θρεπτικών ουσιών (όπως οι γρήγορα αυξανόμενοι μικροοργανισμοί της r-στρατηγικής). Η μέγιστη βιοποικιλότητα αναμένεται σε σταθερά οικοσυστήματα (climax). Ο βαθμός και η διάρκεια των μεταβολών της σύστασης της μικροβιακής κοινότητας εξαρτώνται από την ένταση και τη διάρκεια της διαταραχής. Έτσι, σε πρόσκαιρες διαταραχές η μικροβιακή κοινότητα ενός υγιούς εδάφους σύντομα θα επανέλθει στην αρχική της μορφή. Αντίθετα, μακροχρόνιες διαταραχές θα οδηγήσουν αντίστοιχα σε μακροχρόνιες καταστάσεις διαδοχής των μικροβιακών πληθυσμών και συνήθως θα αλλάξουν οι παράγοντες που συνθέτουν το οικοσύστημα, οδηγώντας το έτσι σε μια νέα δυναμική ισορροπία. Σημειώνεται ότι ένα υγιές έδαφος δεν σχετίζεται άμεσα με ένα σταθερό οικοσύστημα αφού οι μικροβιακοί πληθυσμοί και η σύσταση των ειδών σπανίως μένουν σταθεροί και συνήθως μεταβάλλονται εξαρτώμενοι από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Van Bruggen & Semenov 2000).

Ο πληθυσμός καθώς και η σύσταση των μικροβιακών κοινοτήτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως δείκτες για το αν το έδαφος διανύει μια κατάσταση διαταραχής. Ως δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί μικροοργανισμοί οι οποίοι κατέχουν θέσεις - κλειδιά στη λειτουργία του εδαφικού οικοσυστήματος όπως τα βακτήρια τα οποία σχετίζονται με τον κύκλο του αζώτου. Αυτά εκτός από την καίρια θέση τους στο οικοσύστημα παρουσιάζουν και ευαισθησία σε ξενοβιοτικές ενώσεις. Ως δείκτες, οι οποίοι σχετίζονται με την ανταπόκριση της μικροβιακής κοινότητας στον παράγοντα της διαταραχής και απεικονίζουν τη μικροβιακή διαδοχή, χρησιμοποιούνται οι αναλογίες: (i) βιώσιμες αναπαραγωγικές μονάδες (c.f.u.) / ολικό αριθμό μικροσκοπικής παρατήρησης, (ii) βιώσιμες αναπαραγωγικές μονάδες κοπιότροφων βακτηρίων / βιώσιμες αναπαραγωγικές μονάδες ολιγότροφων βακτηρίων και (iii) αναπνευστική δραστηριότητα / μικροβιακή βιομάζα (Van Bruggen & Semenov 2000).

Μια διαφορετική στρατηγική που υιοθετούν οι μικροοργανισμοί ώστε να υπερβούν τους περιορισμούς που εκδηλώνονται σε οποιοδήποτε έδαφος (και οι οποίοι αφορούν

περιοριστικούς παράγοντες στη θρέψη καθώς και περιβαλλοντικές αντιξοότητες), είναι η μεταξύ τους δημιουργία διαφόρων σχέσεων και αλληλεπιδράσεων. Οι σχέσεις αυτές καθορίζονται από τους ερευνητές με βάση το αν κάποιος πληθυσμός ή μικροοργανισμός που συμμετέχει σε μια σχέση έχει όφελος και αν υπάρχει εξειδίκευση στη σχέση αυτή. Οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των μικροοργανισμών μπορεί να είναι :

(i) θετικές (κομενσαλισμός, συνεργισμός, συμβίωση): αρκετές αποδείξεις για την απαίτηση της ύπαρξης κομενσαλιστικών και / ή συνεργιστικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μικροοργανισμών, έχουν δοθεί κατά τη μελέτη της αποικοδόμησης σύνθετων ή ξενοβιοτικών ουσιών (αγροχημικά ή σύνθετα οργανικά απόβλητα) οι οποίες διατίθενται στο έδαφος. Έτσι, οι σχέσεις αυτές αποδίδονται συνήθως με τη χρήση του όρου μικροβιακά consortia. Η ανάγκη της ύπαρξης περισσότερων του ενός πληθυσμών για την πραγματοποίηση σύνθετων μετασχηματισμών της οργανικής ουσίας, οφείλεται κυρίως σε δύο λόγους: Στο ότι ένας πληθυσμός μπορεί να εφοδιάζει με απαραίτητους αυξητικούς παράγοντες κάποιον άλλον πληθυσμό ο οποίος μπορεί να μεταβολίσει την ουσία, και στο ότι συχνά ένας πληθυσμός δεν διαθέτει το πλήρες ενζυμικό σύστημα για την πλήρη αποικοδόμηση μιας σύνθετης οργανικής ένωσης. Χρειάζεται λοιπόν κάποιος άλλος πληθυσμός ο οποίος παρ' όλο που δεν μπορεί να επιδράσει στην αρχική μορφή της ένωσης, μπορεί να διαθέτει το μηχανισμό για τη συνέχιση της αποικοδόμησης από το στάδιο του ενδιάμεσου μεταβολίτη.

(ii) αρνητικές (θήρευση / παρασιτισμός και ανταγωνισμός): οι διάφοροι τύποι των αρνητικών αλληλεπιδράσεων είναι ιδιαίτερα σημαντικοί στο βιολογικό έλεγχο των εδαφογενών παθογόνων και αναπτύσσονται εκτενέστερα σε επόμενο κεφάλαιο.

2. ΟΙ ΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ, ΤΑ ΦΥΤΑ ΚΑΙ ΤΟ ΕΔΑΦΟΣ ΩΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

The research worker in his laboratory and the farmer on his field can do nothing to the soil that does not induce some change in the activity and balance of its microbial population. There must therefore be some element of biological control, or of its reverse, in almost all disease control practices.

S. D. Garrett

2.1. Οι φυτοπαθογόνοι μύκητες

Η έννοια της **μολυσματικής ικανότητας** (*inoculum potential*) των εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων έχει απασχολήσει αρκετούς ερευνητές. Η μολυσματική ικανότητα ορίστηκε ως «η ενέργεια που πρέπει να διαθέσει ο παθογόνος μύκητας για να αυξηθεί, ώστε να μπορέσει να προκαλέσει μόλυνση στην επιφάνεια ενός ξενιστή, ανά μονάδα επιφάνειας του ξενιστή». Η διαθέσιμη από το παθογόνο ενέργεια για αύξηση είναι ανάλογη: 1) Με το μέγεθος του πληθυσμού που μπορεί να έχει ο μύκητας σε σχέση με το περιβάλλον του τη στιγμή της μόλυνσης. 2) Με τη δυναμικότητα με την οποία η υφή μπορεί να εισβάλει στον ξενιστή. Αυτή εξαρτάται από το θρεπτικό της καθεστώος το οποίο και ελέγχει την ικανότητα του παθογόνου να εκφράσει το γενετικό του δυναμικό. 3) Με τη συνολική επίδραση των περιβαλλοντικών συνθηκών οι οποίες μπορεί να κυμαίνονται από άριστες έως τελείως παρεμποδιστικές (Garrett 1970).

Η μολυσματική ικανότητα είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα του παθογόνου, ελέγχεται από το γονιδίωμά του και το γονιδίωμα είναι που καθορίζει το πως θα ανταποκριθεί ο πληθυσμός του παθογόνου στους περιβαλλοντικούς παράγοντες στους οποίους εκτίθεται (Mitchel 1979). Οι παραπάνω ορισμοί υποδηλώνουν ότι η μολυσματική ικανότητα δεν είναι στατικό μέγεθος, αλλά μεταβάλλεται δυναμικά ανταποκρινόμενη στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι μεταβολές της μολυσματικής ικανότητας των εδαφογενών παθογόνων μυκήτων εξαρτώνται από: 1) Τα χαρακτηριστικά του παθογόνου όπως η ανταγωνιστική σαπροφυτική ικανότητα, η ποικιλία των ξενιστών που μπορεί να προσβάλλει και η ικανότητα παραγωγής ανθεκτικών μορφών. 2) Την ανταπόκριση των πολλαπλασιαστικών μονάδων σε φυσικούς και χημικούς παράγοντες του εδάφους (όπως η θερμοκρασία, το υδατικό δυναμικό, οι διάφοροι εδαφικοί τύποι και η διαθεσιμότητα του

υποστρώματος). 3) Την ευαισθησία των πολλαπλασιαστικών μονάδων σε βιολογικούς παράγοντες (όπως είναι ο παρασιτισμός, η μυκόσταση κ.ά.).

Η **ανταγωνιστική σαπροφυτική ικανότητα**, καθορίζει το κατά πόσο το παθογόνο μπορεί να διατηρήσει ή να αυξήσει τη βιομάζα του ανταποκρινόμενο άμεσα σε μια διαθέσιμη πηγή ενέργειας. Τα χαρακτηριστικά της ανταγωνιστικής σαπροφυτικής ικανότητας, τα οποία ελέγχονται γενετικά και καθορίζουν τη συμπεριφορά ενός οργανισμού στο εδαφικό περιβάλλον, είναι τα ακόλουθα: 1) γρήγορη βλάστηση των πολλαπλασιαστικών μονάδων και ταχεία αύξηση των νέων υφών μετά από τη διέγερσή τους από θρεπτικά συστατικά που διαχέονται από κάποιο υπόστρωμα 2) εφοδιασμός με τον κατάλληλο ενζυμικό εξοπλισμό για την αποδόμηση των πιο ανθεκτικών μορφών άνθρακα όπως είναι οι κυτταρίνες και η λιγνίνη 3) έκκριση μυκοστατικών και βακτηριοστατικών ουσιών 4) αντοχή στις μυκοστατικές ουσίες που παράγονται από άλλους μικροοργανισμούς. Έτσι, όταν ο ξενιστής πεθάνει, το παθογόνο εάν δε διαθέτει τα χαρακτηριστικά αυτά, για να επιβιώσει θα πρέπει να είναι ικανό να σχηματίσει ληθαργικές μορφές επιβίωσης, οι οποίες είναι μεταβολικά ανενεργές (Garrett 1970).

2.1.1. Διαχείριση της τροφής και της ενέργειας από τους παθογόνους μύκητες

(i) Οι εδαφογενείς παθογόνοι μύκητες, για να αποκλείσουν άλλους μικροοργανισμούς από τα διαθέσιμα υποστρώματα κατά την έναρξη της προσβολής του φυτού, χρησιμοποιούν διάφορες στρατηγικές όπως:

1) Δεν επιτρέπουν τη διάχυση και τη συσσώρευση εύκολα αφομοιώσιμων οργανικών ουσιών στο περιβάλλον, οι οποίες θα μπορούσαν να προσελκύσουν ανταγωνιστές. Έτσι, κατά την έναρξη της προσβολής, οι μεμβράνες των κυττάρων του ξενιστή διαρρέουν χωρίς όμως να καταστρέφονται, επιτρέποντας το συνεχή αλλά ελεγχόμενο εφοδιασμό των παθογόνων με τροφή. Άλλα παθογόνα διαθέτουν εξειδικευμένους μηχανισμούς διείσδυσης, οι οποίοι φέρουν τα απαραίτητα ένζυμα για την αποσύνθεση των τοιχωμάτων του ξενιστή. Με τον τρόπο αυτό, η καταστροφή του τοιχώματος του ξενιστή περιορίζεται μόνο στην περιοχή όπου υπάρχει άμεση επαφή με την υφή του παθογόνου και ο κίνδυνος να διαχυθούν θρεπτικές ουσίες στο περιβάλλον είναι πολύ μικρότερος απ' ό,τι εάν τα ένζυμα διαχέονταν στο περιβάλλον (Cook & Baker 1983).

2) Παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών στην περιοχή αποικισμού, οι οποίες παρεμποδίζουν την εγκατάσταση ανταγωνιστικών πληθυσμών. Οι αντιμικροβιακές ουσίες

μπορεί να παράγονται είτε από το παθογόνο, είτε από το φυτό ξενιστή ως αποτέλεσμα της διέγερσής του από το παθογόνο.

3) Μετατροπή του διαθέσιμου υποστρώματος σε μικροβιακή βιομάζα. Οι παθογόνοι μύκητες που προσβάλλουν νεαρά φυτά ακολουθούν σε γενικές γραμμές την αρχή της «ολοκληρωτικής εισβολής, εκτενούς αποσύνθεσης, αποθήκευσης της περίσσειας τροφής σε ληθαργικές μορφές και εγκατάλειψη των εξαντλημένων υπολειμμάτων στους άλλους μικροοργανισμούς» (Bruehl 1975). Οποιαδήποτε μείωση της παροχής θρεπτικών ουσιών προς το παθογόνο λόγω ανταγωνισμού από δευτερογενείς αποικιστές θα σήμαινε την παραγωγή λιγότερων ή μικρότερων και ασθενέστερων πολλαπλασιαστικών μονάδων γεγονός που το καθιστά λιγότερο αποτελεσματικό στην πρόκληση μόλυνσης.

(ii) Οι στρατηγικές που έχουν αναπτύξει τα παθογόνα για τη συντήρηση και την άμυνά τους απουσία ξενιστή αφορούν:

1) Εκμετάλλευση της τροφής και στη συνέχεια σαπροφυτική επιβίωση στους ιστούς του ξενιστή. Τα περισσότερα παθογόνα καταφέρνουν να επιβιώνουν επειδή μπορούν να ζουν και σαν σαπρόφυτα. Οι μέθοδοι που εφαρμόζει ένα σαπρόφυτο για τη διατήρηση του ελέγχου της τροφής του δεν διαφέρουν από εκείνες που χρησιμοποιεί κατά τον παρασιτισμό, δηλαδή εγκατάσταση στο υπόστρωμα και διαλυτοποίησή του σε ρυθμούς όχι πιο γρήγορους απ' αυτούς με τους οποίους το καταναλώνει, παραγωγή παρεμποδιστικών ουσιών οι οποίες θα αντισταθμίσουν τα μηνύματα προς τους άλλους μικροοργανισμούς από τη διάχυση θρεπτικών και τέλος, προσαρμοστικότητα στις περιβαλλοντικές αλλαγές που επέρχονται.

Πολλά παθογόνα αυξάνουν τη βιομάζα τους μέσω καθαρού σαπροφυτισμού (Coley-Smith 1979). Γενικά οι παρασιτικοί μύκητες, δεν διαθέτουν τις σαπροφυτικές ικανότητες των γνήσιων σαπρόφυτων. Κάποιοι όμως, όπως οι μύκητες *Rhizoctonia solani* και *Pythium ultimum* μπορούν να ζουν και να αυξάνονται μέσω καθαρού σαπροφυτισμού σε τέτοιο βαθμό που ο παρασιτισμός θεωρείται από πολλούς ερευνητές ως δευτερεύων ή συμπτωματικός στο σαπροφυτικό κύκλο ζωής.

2) Επιβίωση με ληθαργικές μορφές. Με τις ληθαργικές μορφές το παθογόνο εξυπηρετεί δύο στόχους: την προστασία της μολυσματικής μονάδας από πιθανούς ανταγωνιστές και τη διασπορά της από το σημείο παραγωγής μέσω ανθρώπινων ή ζωικών δραστηριοτήτων. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται ότι κάποιο τμήμα της βιομάζας του παθογόνου θα βρεθεί στην κατάλληλη θέση την κατάλληλη στιγμή για να ξαναρχίσει τον

παρασιτικό κύκλο. Αυξάνει επίσης την πιθανότητα, ένα μέρος του πληθυσμού του να ξεφύγει από ανταγωνιστές.

Οι ληθαργικές μορφές των παθογόνων μυκήτων διαθέτουν τους κατάλληλους μηχανισμούς ώστε να βλαστήσουν όταν βρίσκονται σε γειτνίαση με το ξενιστή και κάτω από ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες. Στα περισσότερα παθογόνα η βλάστηση των ληθαργικών ή ανθεκτικών μορφών επιβίωσης εξαρτάται από ουσίες που εκκρίνονται από τις ρίζες των φυτών. Οι μηχανισμοί που αποτρέπουν τις μορφές επιβίωσης από την πρόωρη βλάστηση είναι περίπλοκοι και σχετίζονται με παράγοντες ληθάργου, την απαίτηση για εξειδικευμένα θρεπτικά συστατικά και τη μυκόσταση του εδάφους. Οι μηχανισμοί αυτοί ακόμα και όταν ενεργοποιούνται, οδηγούν στην ασύγχρονη βλάστηση των μορφών επιβίωσης. Η ασύγχρονη βλάστηση, εξασφαλίζει στο παθογόνο τη δυνατότητα για συνεχή παροχή μολυσματικών μονάδων προς τον ξενιστή ώστε να αντισταθμιστεί η απώλεια από τις μορφές επιβίωσης που βλάστησαν αλλά απέτυχαν στην εγκατάστασή τους ή την αναπαραγωγή τους.

2.1.2. Βιολογικός έλεγχος των εδαφογενών παθογόνων μυκήτων

Ο βιολογικός έλεγχος των εδαφογενών παθογόνων έχει οριστεί ως «η μείωση της ποσότητας ενός παθογόνου ή παρασίτου ή η εξασθένηση των λειτουργιών οι οποίες σχετίζονται με την προσβολή, σε οποιοδήποτε στάδιο του βιολογικού του κύκλου, από έναν ή περισσότερους οργανισμούς, με τρόπο φυσικό, ή με χειρισμούς στο περιβάλλον, τον ξενιστή ή τον ανταγωνιστή, ή με μαζική εισαγωγή ενός ή περισσότερων ανταγωνιστών» (Baker & Cook 1974).

Οι κύριοι μηχανισμοί για το βιολογικό έλεγχο των εδαφογενών παθογόνων μυκήτων σχετίζονται με:

(i) **Ανταγωνισμός**, όπου η μόνη λειτουργία του παράγοντα του βιολογικού ελέγχου μπορεί να είναι η κατάληψη του «οικολογικού θώκου» του παθογόνου, τον οποίο εξαντλεί από παράγοντες απαραίτητους για την αύξηση του παθογόνου και έτσι παρεμποδίζει την εγκατάστασή του. Ανταγωνιστική σχέση μεταξύ των μικροοργανισμών μπορεί να αναπτυχθεί για θρεπτικά υποστρώματα, αυξητικούς παράγοντες, ανόργανα στοιχεία τα οποία βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στο εδαφικό διάλυμα όπως ο σίδηρος, αλλά και άλλους παράγοντες όπως οξυγόνο, χώρο κ.λπ. Συγκεκριμένα ο ανταγωνισμός για θρεπτικά υποστρώματα μπορεί να επιδράσει στη μολυσματική ικανότητα ενός παθογόνου με διάφορους τρόπους όπως: Με παρεμπόδιση της βλάστησης των ληθαργικών μορφών

του (οι οποίες δεν δέχονται τις ουσίες που απαιτούνται για τη διέγερση της βλάστησης), ή με αποκλεισμό του παθογόνου από τον αποικισμό της ριζόσφαιρας και των νεκρών οργανικών υποστρωμάτων (λόγω της κατάληψης της θέσης από άλλους περισσότερο ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς).

(ii) **Παραγωγή παρεμποδιστικών ουσιών**, η οποία σχετίζεται με την παραγωγή τοξικών μεταβολιτών από τους μικροοργανισμούς, οι οποίοι μειώνουν ή παρεμποδίζουν την αύξηση των πολλαπλασιαστικών μονάδων των μυκήτων, οδηγούν σε λύση ή παρεμποδίζουν την αύξηση μετά τη βλάστηση των ληθαργικών μορφών. Με την παραγωγή παρεμποδιστικών ουσιών, κάποιος μικροοργανισμός ο οποίος έχει αποικίσει ένα υπόστρωμα, παρεμποδίζει τους υπόλοιπους και προφυλάσσει τον απαραίτητο για την επιβίωσή του πόρο. Η παραγωγή αντιβιοτικών ουσιών από κάποιους μικροοργανισμούς του εδάφους έχει ιδιαίτερη σημασία στο βιολογικό έλεγχο, παρ' όλο που το μέγεθος της συμμετοχής τους στην καταστολή των εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων αμφισβητείται. Η αμφισβήτηση αυτή οφείλεται στο ότι οι ουσίες αυτές σπάνια ανιχνεύονται στο έδαφος, διότι γρήγορα αδρανοποιούνται είτε από μικροβιακό μετασχηματισμό είτε με τη δέσμευσή τους στα κolloειδή του εδάφους. Επίσης σε ορισμένες περιπτώσεις είναι δύσκολο να διαχωριστεί το μέγεθος της επίδρασης των αντιβιοτικών ουσιών στους παθογόνους μύκητες, από την επίδραση άλλων παραγόντων όπως είναι ο ανταγωνισμός για θρεπτικά στοιχεία. Από την άλλη πλευρά υπάρχουν πολλές βιβλιογραφικές αναφορές στις οποίες ο ανταγωνισμός μέσω αντιβίωσης είναι αναμφισβήτητος. Αυτές κυρίως αφορούν είτε την παραλαβή του αντιβιοτικού παράγοντα και δοκιμή της αποτελεσματικότητάς του στο έδαφος σε σχέση με την αποτελεσματικότητα του στελέχους που το παράγει (Howell & Stipanovic 1979) είτε σύγκριση στελεχών που παράγουν αντιβιοτικά με μεταλλαγμένα στελέχη τα οποία δεν παράγουν (Klopper & Scroth 1981).

(iii) **Παρασιτισμός και λύση των αναπαραγωγικών μονάδων** του παθογόνου από άλλους οργανισμούς (Papavizas & Lumsden 1980, Schoeman et al. 1999). Εδώ ο παράγοντας του βιολογικού ελέγχου παρασιτεί και καταστρέφει τις αναπαραγωγικές μονάδες του παθογόνου απομυζώντας απ' αυτές θρεπτικά συστατικά. Ως παρασιτικοί μύκητες μπορούν να αναφερθούν ενδεικτικά στελέχη του είδους *Trichoderma harzianum* τα οποία παρασιτούν υφές μυκήτων των ειδών *Sclerotium rolfsii* και *Rhizoctonia solani* (Elad et al. 1983, Rey et al. 2001) και στελέχη του γένους *Coniothirium minitans* τα οποία παρασιτούν υφές και σκληρώτια του φυτοπαθογόνου μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum* (De Vrije et al. 2001). Η λύση των υφών ή των ληθαργικών μορφών, προκύπτει από την

ενζυμική αποδιοργάνωση του κυτταρικού τοιχώματος και την απώλεια πρωτοπλάσματος. Στη διαδικασία αυτή εκτός από τους εξειδικευμένους μικροοργανισμούς-παράσιτα μπορεί να συμμετέχει και η μικροβιακή κοινότητα ως σύνολο. Έτσι, τα βακτήρια του εδάφους που προσελκύονται από τις εκκρίσεις των αναπαραγωγικών μονάδων των μυκήτων, μπορούν να τις αποικίσουν απομυζώντας από αυτές θρεπτικά συστατικά, εξαντλώντας τα ενεργειακά τους αποθέματα. Αναφέρεται ότι στελέχη των *Azospirillum* sp., *Azotobacter chroococcum* και *Pseudomonas fluorescens* μπορούσαν να αποικίσουν αποτελεσματικά τα σκληρώτια του μύκητα *Rhizoctonia solani* σε μη αποστειρωμένο έδαφος. Ο αποικισμός, εξαντλώντας τα ενδογενή αποθέματα σε άνθρακα μείωσε την βλαστικότητα των σκληρωτίων (Gupta et al. 1995).

Γενικά υπάρχουν τρεις κατηγορίες ληθαργικών μορφών: ληθαργικές μυκηλιακές μορφές, ληθαργικές μορφές επιβίωσης για μικρό χρονικό διάστημα όπως κονίδια, σποριάγγεια κ.ά., και ληθαργικές μορφές επιβίωσης για μεγάλα χρονικά διαστήματα όπως σκληρώτια, γλαυδοσπόρια, κ.α. Οι δύο πρώτες ομάδες υφίστανται σε μεγάλο βαθμό λύση στο έδαφος, ενώ η τρίτη ομάδα θεωρείται περισσότερο ανθεκτική. Έχουν αναφερθεί διάφορες επεμβάσεις οι οποίες οδηγούν σε αυξημένη λύση των ληθαργικών μορφών στο έδαφος. Παράδειγμα αποτελεί η ενσωμάτωση οργανικών υποστρωμάτων με υψηλό λόγο C/N στο έδαφος, η οποία οδήγησε σε λύση των υφών του μύκητα *Rhizoctonia solani* ενώ αντίθετα η προσθήκη αζώτου, μείωσε τη λύση των υφών του (Papavizas & Lumsden 1980). Επίσης μείωση των ληθαργικών μορφών κατά τη διάρκεια της βλάστησης επιτυγχάνεται με το μηχανισμό **βλάστησης-λύσης**. Στην περίπτωση αυτή οι ληθαργικές μορφές των εδαφογενών παθογόνων που δεν έχουν εξειδικευμένες θρεπτικές απαιτήσεις, βλαστάνουν με την προσθήκη οργανικών υποστρωμάτων. Απουσία όμως ξενιστή και με ταυτόχρονη ενεργοποίηση και της υπόλοιπης μικροβιακής κοινότητας από την αρχική περίσσεια θρεπτικών ουσιών, οι νεαρές υφές μπορεί να οδηγηθούν σε λύση πριν προλάβουν να σχηματίσουν νέες ανθεκτικές μορφές επιβίωσης.

2.2. Ο ξενιστής

Το φυτό-ξενιστής συμμετέχει άμεσα στο βιολογικό έλεγχο των εδαφογενών παθογόνων, διότι αποτελεί το χώρο όπου πραγματοποιούνται όλες οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών. Η συμμετοχή του ξεκινάει από την ημέρα που ο σπόρος θα βρεθεί στο έδαφος και καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του, και τελειώνει μόνο όταν τα φυτικά υπολείμματα θα έχουν πλήρως αποικοδομηθεί. Στο βιολογικό έλεγχο το φυτό

πρέπει να θεωρείται ως ένα περιβάλλον στο οποίο μεταβάλλεται το pH, το υδατικό δυναμικό, οι μερικές πιέσεις βιολογικά σημαντικών αερίων, η σύσταση και η συγκέντρωση οργανικών και ανόργανων ουσιών. Το φυτό διαθέτει επίσης μηχανισμούς ανταπόκρισης (αναγνώρισης, αποκλεισμού κ.λπ.) στους μικροοργανισμούς και τα προϊόντα τους.

2.2.1. Η επίδραση της θρέψης

Όταν πρόκειται για φυτά καταπονημένα από την έλλειψη ενός ή περισσότερων θρεπτικών στοιχείων, ακόμα και ένα «ασθενές» παράσιτο μπορεί να εξελιχθεί σε ισχυρό παθογόνο. Συχνά είναι δύσκολο να διακριθεί η επίδραση που έχουν τα ανόργανα στοιχεία και οι μορφές τους στην άμυνα του φυτού έναντι των εδαφογενών παθογόνων, από την επίδραση που έχουν στα ίδια τα παθογόνα. Έτσι, παρατηρείται συχνά ότι η έλλειψη σε κάποιο θρεπτικό συστατικό, ακόμα και όταν το φυτό δεν εκδηλώνει συμπτώματα τροφопενίας, μπορεί να ευνοεί την προσβολή από συγκεκριμένα παθογόνα.

Η θρέψη μπορεί να συμμετέχει στην αύξηση ή στη μείωση της προσβολής με διάφορους τρόπους. Έτσι, η περίσσεια αζώτου μπορεί να επιδράσει στη βλαστική περίοδο και να την επιμηκύνει, δίνοντας μεγαλύτερο χρονικό περιθώριο σε παθογόνα που προτιμούν νεαρούς ιστούς για να δράσουν. Έλλειψη σε φώσφορο μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση των ριζικών εκκρίσεων, οι οποίες σε κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες, θα προσελκύσουν παθογόνα της ρίζας (Sylvia et al. 1998). Άλλα στοιχεία όπως το ασβέστιο, σχετίζονται με τη σύσταση των κυτταρικών τοιχωμάτων και την αντίσταση που προβάλλουν αυτά στην είσοδο των παθογόνων. Τέλος, ο επαρκής εφοδιασμός του φυτού με στοιχεία τα οποία συμμετέχουν σε οργανικές ενώσεις που αφορούν την άμυνα του φυτού επηρεάζει άμεσα την ανθεκτικότητα του φυτού στα παθογόνα. Έτσι μπορεί να μειωθεί η συγκέντρωση αμυντικών ενώσεων που στηρίζονται στο άζωτο (όπως τα αλκαλοειδή) σε συνθήκες έλλειψης αζώτου (όπου ο λόγος C/N του φυτού είναι υψηλός) και αντίστοιχα να αυξηθεί η συγκέντρωση αμυντικών ουσιών που βασίζονται περισσότερο στον άνθρακα (όπως οι φαινολικές ενώσεις) (Hoffland et al. 1999).

Ανάλογος είναι και ο ρόλος των ιχνοστοιχείων. Γενικά, φυτά με ισορροπημένη θρέψη, όπου όλα τα θρεπτικά στοιχεία παρέχονται στα κατάλληλα ποσά, είναι πιο ικανά στο να προστατεύουν τον εαυτό τους από μολύνσεις σε σχέση με φυτά που έχουν έλλειψη ή περίσσεια σε ένα ή περισσότερα στοιχεία.

2.2.2. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών στη ριζόσφαιρα

Η περιοχή του εδάφους, η οποία επηρεάζεται από το ριζικό σύστημα των φυτών και αποτελεί ένα ιδιαίτερα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη διαφόρων μικροοργανισμών καλείται ριζόσφαιρα. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτού και μικροοργανισμών στη ριζόσφαιρα, έχουν τεράστια σημασία για τη γεωργική παραγωγή, διότι σ' αυτή την περιοχή πραγματοποιείται η είσοδος των ανόργανων θρεπτικών στοιχείων από το έδαφος προς το φυτό αλλά και η είσοδος των παθογόνων μικροοργανισμών.

Ένα μεγάλο ποσοστό των φωτοσυνθετικών προϊόντων (5-30% σε νεαρά φυτά) εκρέει από τις ρίζες προς το έδαφος. Οι ριζικές εκκρίσεις μπορεί να προέρχονται είτε από παθητική εκροή (συνήθως μικρού μοριακού βάρους οργανικές ενώσεις οι οποίες μετακινούνται λόγω διαφοράς στο ηλεκτροχημικό δυναμικό) είτε από ενεργή έκκριση (μεγαλύτερου βάρους οργανικές ενώσεις οι οποίες μεταφέρονται μέσω των κυτταρικών μεμβρανών). Παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του φυτού αφού σ' αυτές περιλαμβάνονται ουσίες που μειώνουν την τριβή μεταξύ ακρορίζιου (καλύπτρα) και εδάφους, βελτιώνουν την επαφή μεταξύ ρίζας και εδαφικού διαλύματος, αυξάνουν την διαλυτοποίηση ή και την απορρόφηση διαφόρων ανόργανων στοιχείων κ.ά. Ταυτόχρονα μπορούν να προσελκύουν ωφέλιμους μικροοργανισμούς αλλά και παθογόνους.

Στον Πίνακα 2.1 δίνονται οι διάφορες οργανικές ενώσεις οι οποίες εκκρίνονται από τις ρίζες φυτών τα οποία καλλιεργήθηκαν σε ασηπτικές συνθήκες. Λόγω της συνεχούς παροχής εύκολα αφομοιώσιμων οργανικών ουσιών από τις ρίζες, ο πληθυσμός των μικροοργανισμών στη ριζόσφαιρα μπορεί να είναι 10-100 φορές μεγαλύτερος από τον πληθυσμό στο υπόλοιπο έδαφος και ένα ποσοστό 4-10% της επιφάνειας της ρίζας (ριζόπλανο) καλύπτεται από μικροοργανισμούς.

Η έκταση της ριζόσφαιρας εξαρτάται από το ποσό των εκκρίσεων, από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους που επηρεάζουν τη διάχυση των ουσιών, καθώς και από τη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας. Έτσι, ένα φυτό που παράγει μεγάλες ποσότητες ριζικών εκκρίσεων, σε καθαρή άμμο, παρουσία λίγων μικροοργανισμών, μπορεί να έχει ριζόσφαιρα που εκτείνεται σε απόσταση αρκετών εκατοστών και αντιθέτως, ένα φυτό σε έδαφος πλούσιο σε οργανική ουσία και έντονη μικροβιακή δραστηριότητα, θα έχει ριζόσφαιρα που σχεδόν ταυτίζεται με το ριζόπλανο (Campbell 1983).

Πίνακας 2.1: Ενώσεις οι οποίες εκκρίνονται από φυτά τα οποία καλλιεργήθηκαν κάτω από ασηπτικές συνθήκες (Alexander 1977).

Ενώσεις	Παραδείγματα
Αμινοξέα:	Σχεδόν όλα τα αμινοξέα τα οποία απαντώνται στην φύση
Οργανικά οξέα:	Οξικό, βουτυρικό, κινικό, φουμαρικό, γλυκολικό, γαλακτικό, μηλικό, οξαλικό, Προπιονικό, σουκινικό, τατραρικό, βαλερικό.
Υδατάνθρακες:	Αραβινόζη, δεσοξυριβόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη, γλυκόζη, μαλτόζη, μανόζη, ολιγοσακχαρίτες, ραφφινόζη, ραμνόζη, ριβόζη, σουκρόζη, ξυλόζη.
Αυξητικοί παράγοντες:	p-αμινοβενζοϊκό οξύ, βιοτίνη, χολίνη, ινοσιτόλη, νικοτινικό οξύ, παντοθενικό οξύ, πυριδοξίνη, θειαμίνη.
Ένζυμα:	Αμυλάση, ινβεράση, φωσφατάση, πρωτεάση.
Άλλες ενώσεις:	Αυξίνες, γλουταμίνη, γλυκοζίδια, HCN, p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, πεπτίδια, σαπωνίνες.

Στη διαφοροποίηση του περιβάλλοντος της ριζόσφαιρας εκτός από τη σύσταση και την ποσότητα των ριζικών εκκρίσεων, συμμετέχουν και αβιοτικοί παράγοντες. Η συγκέντρωση του O_2 στην περιοχή αυτή είναι μειωμένη λόγω της αναπνοής των ριζών και των μικροοργανισμών. Το pH επίσης μπορεί να διαφέρει έως και 2 μονάδες από αυτό του υπόλοιπου εδάφους και οφείλεται στην αυξημένη συγκέντρωση CO_2 το οποίο σχηματίζει ανθρακικό οξύ στο εδαφικό διάλυμα. Η δημιουργία ανθρακικού οξέος βοηθά στη διαλυτοποίηση αδιάλυτων ανόργανων στοιχείων όπως ασβέστιο, φώσφορο, κάλιο κ.ά. Η απορρόφηση αμμωνιακού αζώτου από τις ρίζες, οδηγεί επίσης σε πτώση του pH λόγω της απελευθέρωσης ιόντων υδρογόνου από αυτές, αντίθετα η χρήση νιτρικών μορφών αζώτου οδηγεί σε αύξηση του pH (Sylvia et al. 1998).

Λόγω του μεγάλου μεγέθους του πληθυσμού των μικροοργανισμών που αποικίζουν τη ριζόσφαιρα, ο ανταγωνισμός για θρεπτικά στοιχεία στην περιοχή αυτή είναι έντονος και αποτελεί ένα βασικό τμήμα του μηχανισμού του βιολογικού ελέγχου των εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων. Συνήθης πρακτική αποτελεί ο ριζοεμβολιασμός των φυτών με βακτήρια τα οποία προάγουν την αύξηση (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) και μπορούν να αποικίζουν ανταγωνιστικά τις ρίζες εκδιώκοντας άλλους μικροοργανισμούς, μεταξύ αυτών και τους παθογόνους μικροοργανισμούς.

Στην περιοχή της ριζόσφαιρας παρουσιάζεται εξειδίκευση ως προς το είδος των μικροοργανισμών που θα την αποικίσουν και η εξειδίκευση αυτή εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος του φυτού και την ηλικία του, παράγοντες οι οποίοι προσδιορίζουν την ποσότητα και την ποιότητα των εκκρίσεων. Στελέχη του γένους *Pseudomonas* ανευρίσκονται πολύ συχνά μεταξύ των ριζοβακτηρίων, λόγω της μεταβολικής ποικιλότητας που διαθέτουν. Τα φυτο-σιδηροφόρα και τα αμινοξέα που εκκρίνονται

επηρεάζουν το μεταβολισμό των ριζοβακτηρίων. Ο χημειοτακτισμός και η ικανότητα για προσκόλληση είναι επίσης σημαντικοί παράγοντες για την επιλογή των μικροοργανισμών που θα αποικίσουν τη ριζόσφαιρα και η επιλογή αυτή παρουσιάζει εξειδίκευση σε επίπεδο στελεχών. Επίσης έχουν αναφερθεί βακτήρια της ενδοριζόσφαιρας τα οποία παράγουν οργανικές ενώσεις (rhizoripines) οι οποίες μπορεί να λειτουργήσουν ως εκλεκτικό υπόστρωμα για ελεύθερα διαβιούντα στελέχη του δικού τους είδους (Nehl et al. 1996).

Όπως το φυτό επηρεάζει τη μικροβιακή κοινότητα με την ποσότητα και τη σύσταση των εκκρίσεών του, έτσι και η μικροβιακή κοινότητα επηρεάζει τις εκκρίσεις του φυτού. Τα ριζοβακτήρια μπορεί να διεγείρουν την έκκριση οργανικών ουσιών από τις ρίζες και η διέγερση αυτή μπορεί να εμφανίζει εξειδίκευση σε επίπεδο είδους. Αναφέρεται ως παράδειγμα ότι μεταβολίτες στελεχών του *Pseudomonas aeruginosa* δωδεκαπλασίασαν την ποσότητα των ριζικών εκκρίσεων, ενώ αντίθετα μεταβολίτες στελεχών του γένους *Arhtrobacter* δε είχαν καμία επίδραση (Nehl et al. 1996).

Για να εισέλθει ένας παθογόνος μύκητας στην περιοχή της ρίζας, θα πρέπει να διασχίσει πρώτα το «φράγμα» της ριζόσφαιρας κάτι που γίνεται ιδιαίτερα δύσκολο ή και ακατόρθωτο όταν η περιοχή αυτή είναι αποικισμένη από ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς. Ευκαιρία στο παθογόνο για δράση μπορεί να δοθεί από τις ριζικές εκκρίσεις οι οποίες προέρχονται από τα προπορευόμενα ριζικά άκρα (καλύπτρα), όπου εκεί η μικροβιακή κοινότητα βρίσκεται σε ληθαργική κατάσταση. Στην περιοχή αυτή οι μικροοργανισμοί που δέχονται τις θρεπτικές ουσίες περνούν αρχικά από μια φάση υστέρησης, κατά την οποία η παροχή των θρεπτικών υπερβαίνει παροδικά τους ρυθμούς κατανάλωσης, με αποτέλεσμα αυτά να διαχέονται σε κάποια απόσταση από τη ρίζα. Η εκθετική φάση αύξησης μπορεί να μην έχει επέλθει ως και το σχηματισμό των ριζικών τριχιδίων. Η στατική φάση αύξησης και διαδοχής στον αποικισμό αναμένεται με την ωρίμανση της ρίζας. Οι ρίζες λοιπόν που αυξάνονται στο έδαφος αποτελούν μια «κινούμενη είσοδο» για τα παθογόνα αφού τους παρέχεται τροφή από τα άκρα όπου οι εκκρίσεις είναι περισσότερες και ο ανταγωνισμός μικρότερος. Το μέγεθος της «εισόδου» μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με την ταχύτητα με την οποία ανταποκρίνεται η μικροβιακή κοινότητα στην εμφάνιση οργανικού υποστρώματος σε σχέση με την ταχύτητα με την οποία ανταποκρίνεται το παθογόνο. Η μικροχλωρίδα η οποία κυριαρχείται από μικροοργανισμούς γ-στρατηγικής, κάτι που συμβαίνει σε εδάφη μετά από πρόσφατη οργανική προσθήκη, θα ανταποκριθεί γρηγορότερα στις εκκρίσεις της καλύπτρας, μειώνοντας τις πιθανότητες εκμετάλλευσής τους από παθογόνους μύκητες.

Σε εδάφη τα οποία έχουν δεχθεί πρόσφατα οργανικές προσθήκες και το κλάσμα των ληθαργικών μικροοργανισμών ή των μικροοργανισμών K-στρατηγικής είναι μικρό, η ποσότητα της οργανικής ουσίας που θα απαιτηθεί για τη μετατροπή $K \rightarrow r$ θα είναι μικρότερη από αυτή που θα απαιτούνταν σε εδάφη τα οποία βρίσκονται σε σταθερή (climax) κατάσταση όπου το κλάσμα των μικροοργανισμών που βρίσκονται σε λήθαργο ή στην κατάσταση K, είναι μεγάλο (Stenström et al. 2001). Μελετήθηκε επίσης η ανταπόκριση της μικροβιακής κοινότητας στην προσθήκη γλυκόζης σε τέσσερις εδαφικούς τύπους: ακαλλιέργητο, καλλιεργούμενο, καλλιεργούμενο με αζωτούχο λίπανση και καλλιεργούμενο με αζωτούχο λίπανση και συγχρόνως ενσωμάτωση των υπολειμμάτων της καλλιέργειας. Οι τύποι αυτοί είχαν διαφορές κυρίως ως προς την ποσότητα της οργανικής ουσίας και τη μικροβιακή (αναπνευστική) δραστηριότητα, οι οποίες ήταν μειωμένες στο πρώτο έδαφος και αυξάνονταν σταδιακά προς το τελευταίο. Η προσθήκη γλυκόζης οδήγησε στην εκθετική αύξηση της αναπνευστικής δραστηριότητας, ενδεικτική της εκθετικής φάσης της μικροβιακής αύξησης. Σημαντικές διαφορές μεταξύ των παραπάνω εδαφών παρατηρήθηκαν στο χρόνο που μεσολαβούσε μετά την προσθήκη της γλυκόζης, για να φθάσει η αναπνευστική δραστηριότητα στο μέγιστο σημείο. Ο χρόνος αυτός ήταν μικρότερος στο οργανικό έδαφος και αυξανόταν όσο μειώνονταν η οργανική ουσία του εδάφους. Επίσης σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν και στην αναπνευστική δραστηριότητα που επάγεται από το υπόστρωμα 2-4 ώρες μετά την προσθήκη (substrate induced respiration) η οποία μειώνονταν όσο μειώνονταν και η οργανική ουσία του εδάφους. Το οργανικό έδαφος δηλαδή ανταποκρίθηκε γρηγορότερα στην προσθήκη γλυκόζης και η ανταπόκριση μειώνονταν όσο μειώνονταν η οργανική ουσία του εδάφους (Witter & Kanai 1998).

Μελετήθηκε επίσης η ριζόσφαιρα σε δύο εδάφη, ένα φτωχό και ένα πλούσιο σε οργανική ουσία και παρατηρήθηκε ότι η επίδραση της ριζόσφαιρας ήταν εντονότερη στο φτωχό σε οργανική ουσία έδαφος. Παρατηρήθηκε επίσης ότι οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών κατά μήκος της ρίζας, παρουσίαζαν διακυμάνσεις συναρτήσεως του χρόνου. Οι διακυμάνσεις αυτές ήταν εντονότερες σε έδαφος φτωχό σε οργανική ουσία απ' ό,τι σε οργανικό έδαφος. Επίσης οι διακυμάνσεις ήταν εντονότερες για τους πληθυσμούς των κοπιότροφων βακτηρίων σε σχέση με τις διακυμάνσεις των ολιγότροφων. Αυτό αποδόθηκε στους συνεχείς κύκλους αύξησης και θανάτου των μικροοργανισμών, οι οποίοι αρχικά αυξάνονται με μεγάλους ρυθμούς ανταποκρινόμενοι στις εκκρίσεις της καλύπτρας, στη συνέχεια πεθαίνουν όταν ο πληθυσμός τους υπερβεί ένα μέγιστο (και καθώς η καλύπτρα της οποίας οι εκκρίσεις θεωρούνται περισσότερες προχωρά σε

βαθύτερα σημεία) απελευθερώνοντας θρεπτικά συστατικά τα οποία θα δώσουν ένα νέο κύκλο αύξησης κ.ο.κ. (Semenov et al. 1999).

Η μικροβιακή κοινότητα που διαμορφώνεται στη ριζόσφαιρα, έχει καθοριστική σημασία για την ανάπτυξη του φυτού. Τα βακτήρια που έχουν αναφερθεί ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου ανήκουν σε διάφορα γένη: *Actinoplanes*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Amorphosporangium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Hafnia*, *Micromonospora*, *Pseudomonas*, *Pasteuria*, *Rhizobium* και *Bradyrhizobium*, *Serratia*, *Streptomyces*, και *Xanthomonas* (Weller 1988). Τα ριζοβακτήρια που προάγουν την αύξηση των φυτών (P.G.P.R.) μπορούν να ευνοούν άμεσα την ανάπτυξη του φυτού με διάφορους τρόπους: με έκκριση φυτοορμονών (Bloemberg & Lugtenberg 2001, Lebuhnet et al. 1997), δεσμεύοντας άζωτο στη ριζόσφαιρα (Graham & Vance 2000), διαλυτοποιώντας ανόργανες ουσίες που βρίσκονται σε αδιάλυτη μορφή όπως ο φώσφορος (Rodriguez & Fraga 1999), προάγοντας τις μυκορριζικές σχέσεις (Azcón-Aguilar & Barea 1997) και ρυθμίζοντας την παραγωγή αιθυλενίου στις ρίζες (Mayak et al. 1999). Επίσης τα P.G.P.R. μπορούν να ευνοούν έμμεσα την ανάπτυξη των φυτών παρέχοντάς τους προστασία από τα παθογόνα. Οι κύριοι μηχανισμοί που σχετίζονται με την προστασία από τους παθογόνους μικροοργανισμούς αφορούν ανταγωνισμό για τις πηγές άνθρακα, χρησιμοποίηση του σιδήρου με σιδηροφόρα που δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν από το παθογόνο (Tomashow 1996), απελευθέρωση αντιβιοτικών ουσιών (Tomashow 1996), αύξηση της διαθεσιμότητας του μαγγανίου (Nehl et al. 1996), λύση και παρασιτισμό των κυττάρων των παθογόνων μικροοργανισμών (De Vrije et al. 2001, Rey et al. 2001), και επαγωγή συστηματικής ανθεκτικότητας (Nandakumar R. 2001, Ramamoorthy et al. 2001, Benhamou & Nicole 1999).

Στα ριζοσφαιρικά βακτήρια ανήκουν και εκείνα τα οποία μπορεί να οδηγήσουν σε μείωση της ανάπτυξης του φυτού (D.R.B.: Deleterious Rhizobacteria). Η μείωση αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους μηχανισμούς όπως: παραγωγή φυτοτοξικών ουσιών, παραγωγή φυτοορμονών που επιβραδύνουν την αύξηση, ανταγωνισμός με το φυτό για θρεπτικά (π.χ. χρησιμοποίηση των φυτοσιδηροφόρων), παρεμπόδιση των μυκορριζικών σχέσεων, κ.λπ. (Schippers et al. 1987, Nehl et al. 1996, Sturz et al. 1997). Ιδιαίτερη σημασία έχει το γεγονός ότι κάποια βακτήρια τα οποία προάγουν τη φυτική ανάπτυξη (P.G.P.R.) σε διαφορετικό περιβάλλον μπορεί να λειτουργήσουν ως δηλητηριώδη για τα φυτά (D.R.B.) (Nehl et al. 1996). Η γνώση της βιολογίας και της οικολογίας του βακτηρίου που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για ριζοεμβολιασμό, των

περιβαλλοντικών παραμέτρων, καθώς και του χρόνου και τόπου της πραγματοποίησης του εμβολιασμού, είναι σημαντικοί παράγοντες για την επιτυχή έκβαση αυτής της πρακτικής.

2.3. Το έδαφος

Η μελέτη του εδάφους ως δυναμικό οικοσύστημα, με οικολογικές «θέσεις» που μεταβάλλονται ταχύτατα και τη μικροβιακή βιομάζα να παρουσιάζει διακυμάνσεις ανταποκρινόμενη στις αλλαγές αυτές, μπορεί να παρέχει σημαντικά στοιχεία για το πως μπορούν να επιδράσουν οι χρησιμοποιούμενες καλλιεργητικές πρακτικές στο βιολογικό έλεγχο. Ένα κατάλληλο εδαφικό περιβάλλον μπορεί να διαδραματίσει πολύ σημαντικό ρόλο στην καλή ανάπτυξη του φυτού και στην υγεία της ρίζας, καθώς και στην εγκατάσταση μιας ισορροπημένης και ανταγωνιστικής μικροβιακής χλωρίδας.

Η αναγνώριση και η μελέτη των επισχετικών σε εδαφογενή παθογόνα εδαφών, έδωσε σημαντικά στοιχεία για το πως μπορεί να τροποποιηθεί ένα εδαφικό οικοσύστημα για να επιτευχθεί βιολογικός έλεγχος.

2.3.1. Η μυκόσταση του εδάφους

Ο όρος μυκόσταση χρησιμοποιείται για τη γενικότερη περιγραφή του φαινομένου της μη βλάστησης των ληθαργικών μορφών των μυκήτων στο έδαφος. Οφείλεται κυρίως σε δύο παράγοντες: στην έλλειψη ουσιών που διεγείρουν τη βλάστηση και στην παρουσία παρεμποδιστικών ουσιών.

Η βλάστηση των ληθαργικών μορφών μόνο μετά τη διέγερσή τους από συγκεκριμένες ουσίες είναι πολύ σημαντική για την επιβίωση παθογόνων, αφού έτσι εξασφαλίζεται η έναρξη της βλάστησης μόνο παρουσία ξενιστή ή όταν είναι διαθέσιμο κάποιο άλλο υπόστρωμα σε επαρκή ποσότητα. Μέθοδοι για τη ρύθμιση της μυκόστασης του εδάφους, είναι πολύ χρήσιμες στο βιολογικό έλεγχο. Η πρακτική χρήση της μυκόστασης έγκειται στη σωστή διαχείριση του καθεστώτος του διαθέσιμου άνθρακα έτσι ώστε αυτός να υποστηρίζει τα σαπρόφυτα αλλά όχι τα παθογόνα, ή σε χειρισμούς που οδηγούν σε βλάστηση των ανθεκτικών μορφών επιβίωσης και στη συνέχεια σε λύση και όχι σε αύξηση. Η προσθήκη οργανικής ουσίας στο έδαφος μπορεί παροδικά να άρει τη μυκόσταση του εδάφους λόγω απελευθέρωσης οργανικών ουσιών, όμως η ταυτόχρονη διέγερση και της υπόλοιπης μικροβιακής χλωρίδας, θα οδηγήσει μετά την πάροδο

κάποιου χρόνου σε αύξηση της μυκόστασης, πιθανόν σε υψηλότερα επίπεδα από την αρχική. Σε άλλες περιπτώσεις όμως όπου ο άνθρακας προστίθεται σε ποσότητες που υπερβαίνουν τις ανάγκες των σαπροφυτικών ανταγωνιστών μπορεί να οδηγήσει σε άρση της μυκόστασης, με επακόλουθη βλάστηση και πολλαπλασιασμό των ληθαργικών μονάδων των παθογόνων μυκήτων.

Μια ιδιαίτερη κατηγορία ουσιών που επιδρούν στη μυκόσταση του εδάφους είναι οι πτητικές ενώσεις, οι οποίες απελευθερώνονται κατά την αποικοδόμηση της οργανικής ουσίας και οι οποίες παρεμποδίζουν ή επιφέρουν τη βλάστηση ληθαργικών μορφών. Τέτοιες πτητικές ουσίες έχουν προσδιοριστεί στο έδαφος σε συγκεντρώσεις ικανές να προκαλέσουν επίσχεση στη βλάστηση των ληθαργικών μορφών των μυκήτων. Το αιθυλένιο στην εδαφική ατμόσφαιρα έχει αναφερθεί ως ο υπεύθυνος παράγοντας για την εκδήλωση της μυκόστασης αν και ο ρόλος του έχει αμφισβητηθεί. Εκτός από το αιθυλένιο, άλλοι υδρογονάνθρακες όπως το μεθάνιο και το ακετυλένιο, αναφέρονται ως υπεύθυνες για την εκδήλωση μυκόστασης στο έδαφος (Φλουρή 1984). Τέλος και άλλες ουσίες με ακόρεστο διπλό δεσμό όπως το ακρυλικό οξύ, η ακρολεΐνη ή η αλλυλική αλκοόλη είναι κάποιοι πιθανοί μυκοστατικοί παράγοντες (Μπαλής 1986).

Επίσης έχει αναφερθεί η βλάστηση των μικροσκληρωτίων του *Verticillium dahliae* ανταποκρινόμενα σε οργανικά πτητικά που απελευθερώνονται από οργανικές ουσίες που αποσυντίθενται. Τα πτητικά αυτά περιλαμβάνουν ακεταλδεϋδη, βουτυραλδεϋδη, μεθανόλη, αιθανόλη κ. α. ουσίες (Griffin & Roth 1979).

Το πλεονέκτημα της χρήσης πτητικών είναι η γρήγορη διάχυσή τους στο έδαφος και η γρήγορη απορρόφησή τους από τις ληθαργικές μονάδες. Σημαντικό επίσης είναι το γεγονός ότι η παρουσία ουσιών που διεγείρουν τη βλάστηση των ληθαργικών μορφών χωρίς την επακόλουθη υποστήριξή τους από πηγές άνθρακα μπορεί να οδηγήσει σε βλάστηση και στη συνέχεια σε λύση των ληθαργικών μονάδων.

2.3.2. Επισχετικά εδάφη

Ως επισχετικό ορίζεται το έδαφος εκείνο στο οποίο το παθογόνο είτε δεν μπορεί να εγκατασταθεί, είτε εγκαθίσταται προκαλώντας αμελητέα έως καθόλου προσβολή, ή εγκαθίσταται προκαλώντας ασθένεια για κάποιο χρονικό διάστημα, η ένταση της οποίας μειώνεται σημαντικά με την πάροδο του χρόνου παρ' όλο που το παθογόνο μπορεί να υπάρχει στο έδαφος (Cook & Baker 1983).

Μπορούν να διακριθούν διάφορα είδη επισχετικότητας:

(i) Η «φυσική» επισχετικότητα (natural suppressiveness) είναι περισσότερο συνδεδεμένη με συγκεκριμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους τα οποία επηρεάζουν τη διαμόρφωση της μικροβιακής κοινότητας: είτε του παθογόνου είτε των ανταγωνιστών (Scroth & Hancock 1982, Peng et al. 1999). Παράδειγμα αποτελεί η μετατροπή ενός εδάφους που επάγει την αύξηση του *Fusarium oxysporum* σε επισχετικό στον παθογόνο μύκητα με την προσθήκη ορυκτών της αργίλλου και ασβεστίου. Στη μετατροπή αυτή ήταν σημαντικός ο ρόλος του pH αφού σε υψηλότερα pH το φαινόμενο της επισχετικότητας ήταν εντονότερο (Höper et al. 1995).

(ii) Η «επαγόμενη» επισχετικότητα (induced suppression) σχετίζεται κυρίως με τις χρησιμοποιούμενες καλλιεργητικές πρακτικές όπως η μονοκαλλιέργεια, η προσθήκη οργανικών υπολειμμάτων κ.λπ. (Scroth & Hancock 1982). Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η μείωση της προσβολής δημητριακών από το μύκητα *Gaeumannomyces graminis*. Η ασθένεια είναι έντονη και αυξάνει για τα τρία έως πέντε χρόνια μονοκαλλιέργειας αφού ο μύκητας επιβιώνει στα υπολείμματα της καλλιέργειας της προηγούμενης χρονιάς, τα οποία του προσφέρονται ως υπόστρωμα για την προσβολή της επόμενης καλλιέργειας. Στη συνέχεια όμως η προσβολή μειώνεται σε τέτοιο βαθμό ώστε να είναι οικονομικά αποδεκτή. Το φαινόμενο αποδίδεται στην αύξηση του πληθυσμού των ανταγωνιστών του μύκητα όπως είναι οι φθορίζουσες ψευδομονάδες (Haas et al. 2000).

(iii) Η «γενικευμένη» επισχετικότητα (general suppression) έναντι των εδαφογενών παθογόνων μυκήτων είναι άμεσα συνδεδεμένη με το συνολικό ποσό της μικροβιακής δραστηριότητας σε κάποιο χρονικό διάστημα κρίσιμο για το παθογόνο (π.χ. κατά τη βλάστηση των ληθαργικών μονάδων ή κατά την αύξησή τους στην ριζόσφαιρα πριν από τη διείσδυση στον ξενιστή). Στην περίπτωση αυτή, ο ρόλος των διαφορετικών ειδών των ενεργών μικροοργανισμών είναι λιγότερο σημαντικός από την ποσότητα της συνολικής ενεργής βιομάζας η οποία ανταγωνίζεται το παθογόνο για τις πηγές άνθρακα και ενέργειας ή και αζώτου σε κάποιες περιπτώσεις. Κατά μία έννοια η γενικευμένη επισχετικότητα του εδάφους είναι περισσότερο συνδεδεμένη με τον υψηλό βαθμό μυκόστασης. Κανένα είδος ή εξειδικευμένη ομάδα μικροοργανισμών δεν είναι υπεύθυνη από μόνη της για την εκδήλωση του φαινομένου (Baker 1987). Η επισχετικότητα που εκδηλώνεται μετά την προσθήκη κομποστοποιημένων οργανικών υπολειμμάτων σε πολλαπλασιαστικές μονάδες μυκήτων των γενών *Pythium* και *Phytophthora* συνήθως οφείλεται στην παρουσία μεγάλου αριθμού μικροοργανισμών οι οποίοι μπορούν να δράσουν ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου (Hoitink et al. 1997).

(iv) Η «εξειδικευμένη» επισχετικότητα (specific suppression) είναι περισσότερο ποιοτική και οφείλεται στις ειδικές επιδράσεις ενός είδους ή μιας συγκεκριμένης ομάδας μικροοργανισμών που ανταγωνίζονται το παθογόνο σε κάποιο στάδιο του βιολογικού του κύκλου. Η επισχετικότητα αυτή μπορεί να εισαχθεί σε ένα έδαφος που επάγει κάποια ασθένεια (conducive soil) και να το μετατρέψει σε επισχετικό. Η μετατροπή αυτή μπορεί να γίνει είτε με μεταφορά επισχετικού εδάφους είτε με μεταφορά των μικροοργανισμών που είναι υπεύθυνοι για το φαινόμενο (εάν αυτοί έχουν ήδη απομονωθεί), ή σε κάποιες περιπτώσεις και με τη μεταφορά των προϊόντων μεταβολισμού τους (Baker 1987). Παράδειγμα εξειδικευμένης επισχετικότητας η οποία εισάγεται στο έδαφος είναι η χρήση ωφέλιμων ριζοβακτηρίων (P.G.P.R.) τα οποία μπορούν να καταστείλουν την προσβολή από παθογόνα (Backman et al. 1994, Mew et al. 1994). Άλλο παράδειγμα είναι η ύπαρξη συγκεκριμένων μικροοργανισμών η οποία μπορεί να συσχετιστεί με τη μείωση της προσβολής π.χ. η μείωση του πληθυσμού του μύκητα *Rhizoctonia solani* η οποία συσχετίστηκε με τον πληθυσμό του μύκητα *Trichoderma harzianum* (Kuter 1983).

3. ΤΑ ΥΓΡΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΩΝ

Everything is everywhere and the milieu selects.

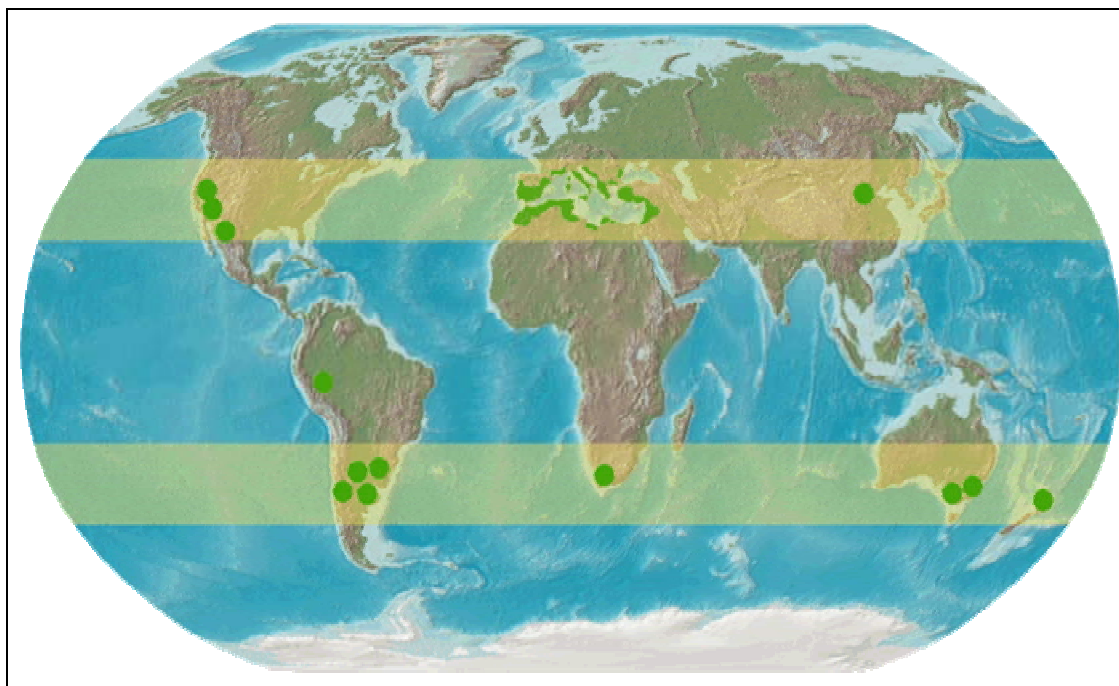
M.Beijerinck

3.1. Η καλλιέργεια της ελιάς

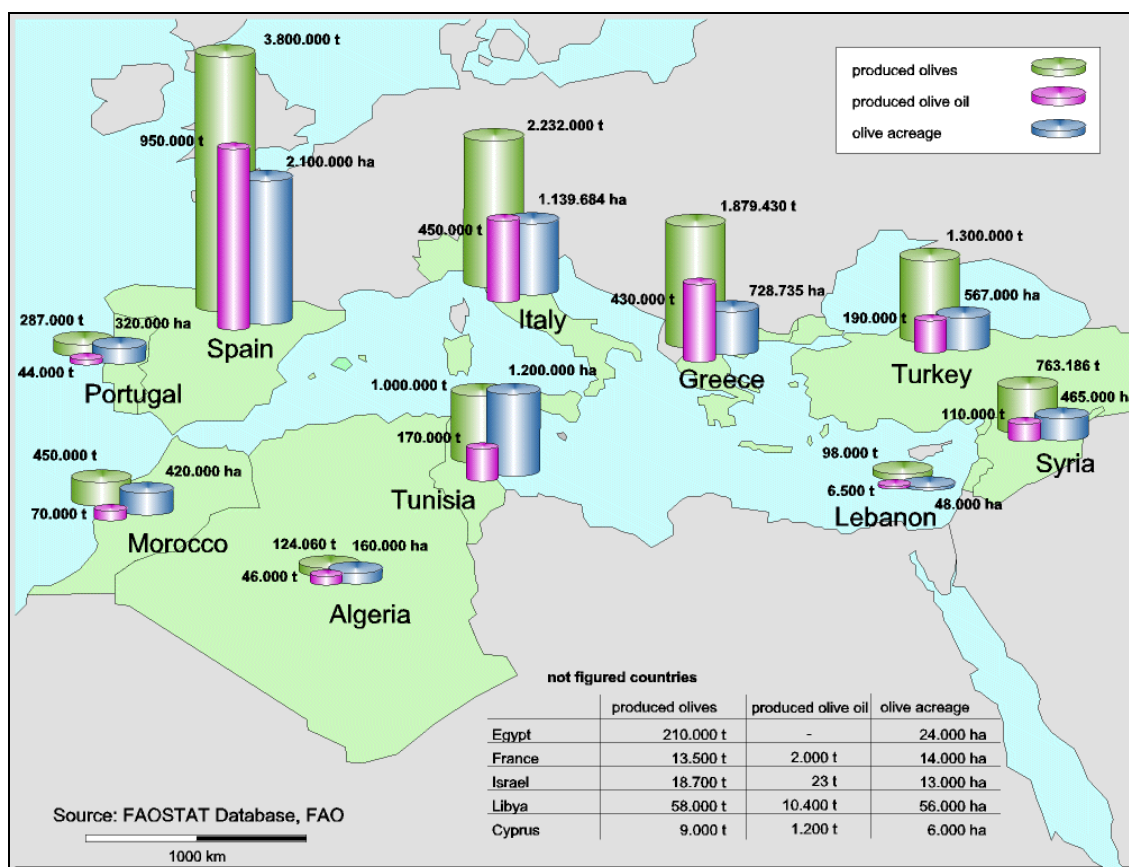
Η προέλευση του ελαιόδεντρου χάνεται στα βάθη του χρόνου. Οι πρώτες καλλιέργειες της ελιάς τοποθετούνται στο 6000 π.Χ στην περιοχή της Συρίας. Στη συνέχεια μέσω του εμπορίου, το ελαιόδεντρο και η τεχνική της καλλιέργειάς του εξαπλώθηκαν στην Κύπρο, την Ελλάδα και τη νότιο Αφρική. Ήδη από το 1500 π.Χ. το ελαιόλαδο αποτελούσε κύριο εμπορικό προϊόν των Κρητών.

Οι αρχαίοι Έλληνες θεωρούσαν την ελιά ως σύμβολο ευφορίας, εξαγνισμού, τιμής, νίκης και ειρήνης. Ο συμβολικός χαρακτήρας της ελιάς και του ελαιολάδου πέρασε και στη χριστιανική θρησκεία και παράδοση, η οποία διατηρήθηκε ως τις μέρες μας. Από την αρχαιότητα είχε αναγνωριστεί στο ελαιόλαδο η ιδιαίτερη συνεισφορά του σε θέματα υγείας και ο Ιπποκράτης είχε αναφερθεί σε αυτό ως «το μέγα φάρμακο». Σήμερα οι περισσότερες εμπειριστατωμένες έρευνες και μελέτες έχουν αναδείξει το ελαιόλαδο ως ένα από τα σημαντικότερα προϊόντα υγιεινής διατροφής. Θεωρείται ότι συμβάλλει στην μείωση των καρδιακών νοσημάτων και της χοληστερόλης και παρεμποδίζει την εμφάνιση καρκίνου, ενώ οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου οι οποίες αποτελούν φυσικά αντιοξειδωτικά επιδρούν ευεργετικά στην πρόληψη ή και θεραπεία πολλών άλλων νοσημάτων (Visioli & Galli 1998, Owen et al. 2000). Πρόσφατα, και άλλα συστατικά του ελαιολάδου αποδείχθηκε ότι έχουν προστατευτική δράση έναντι της *in vitro* οξείδωσης της LDL χοληστερόλης (Andrikopoulos et al. 2002).

Η βιομηχανία παραγωγής ελαιολάδου αποτελεί μια από τις σημαντικότερες βιομηχανίες τροφίμων στη χώρα μας. Υπάρχουν πάνω από 686.000 καλλιεργητές της ελιάς (οι οποίοι αντιπροσωπεύουν το 6,5% του συνολικού πληθυσμού) και οι οποίοι φροντίζουν 137 εκατομμύρια ελαιόδεντρα. Οι καλλιεργούμενες με ελιά εκτάσεις στη χώρα μας αποτελούν το 18,5% της συνολικής γεωργικής γης και οι οποίες δίνουν μια παραγωγή 1.879.430 τόνοι ελιάς. Στην Εικόνα 1.8 δίνεται ο παγκόσμιος χάρτης της καλλιέργειας της ελιάς και στην Εικόνα 1.9 δίνονται η παραγωγή ελιάς και ελαιολάδου καθώς και οι καλλιεργούμενες εκτάσεις στη Μεσόγειο.



Εικόνα 3.1: Παγκόσμιος χάρτης για την καλλιέργεια της ελιάς
(<http://www.internationaloliveoil.org/eng/index.html>)



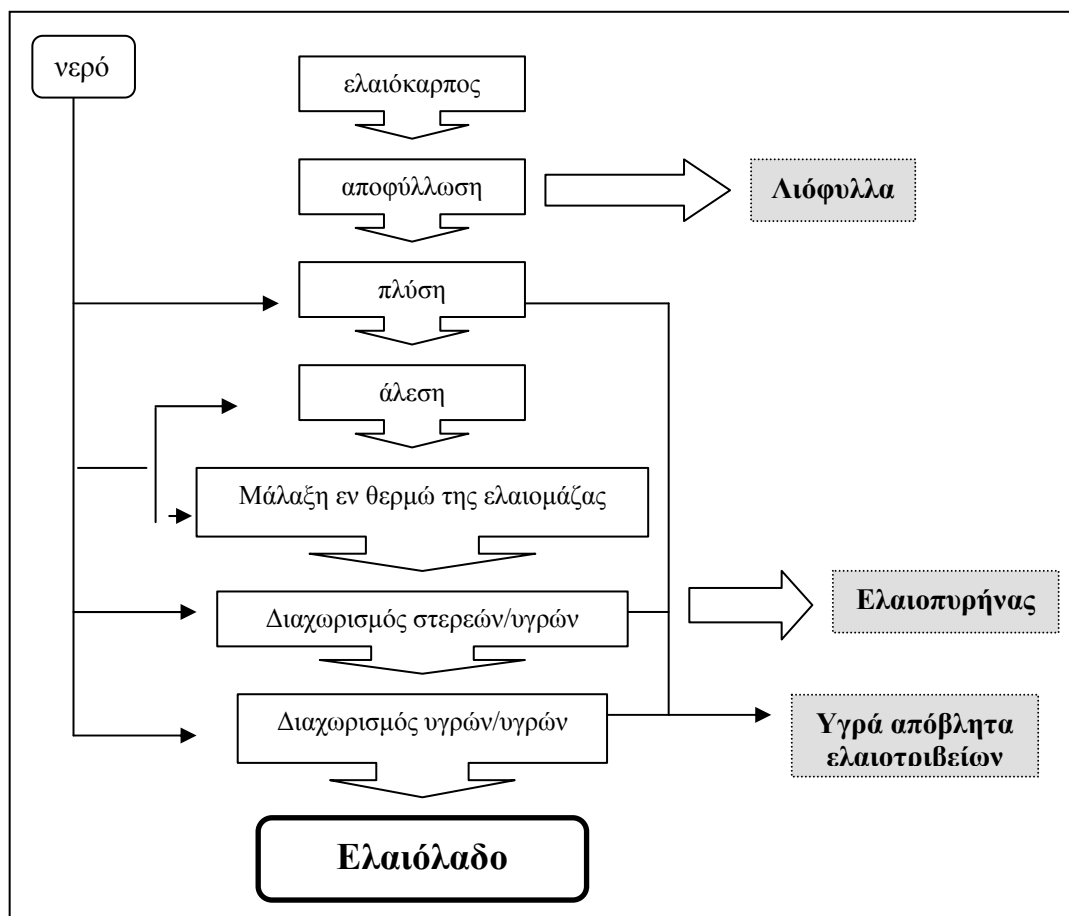
Εικόνα 3.2: Παραγωγή ελιάς, ελαιολάδου και καλλιεργούμενες εκτάσεις στη Μεσόγειο (1998).
(<http://www.fiw.rwth.aachen.de/improlive/englisch/intro/englisch.html>)

3.2. Κύρια χαρακτηριστικά των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων (Υ.Α.Ε.)

3.2.1. Ρυπαντικό φορτίο

Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα περιβαλλοντικά προβλήματα κυρίως για τις χώρες της Μεσόγειου, οι οποίες είναι υπεύθυνες για το 95% της παγκόσμιας παραγωγής ελαιολάδου. Στις χώρες αυτές παράγονται περίπου 11 εκατομμύρια τόνοι ελιάς ετησίως από τις οποίες εξάγονται 1,7 εκατομμύρια τόνοι ελαιολάδου. Εάν θεωρήσουμε ότι από 1 τόνο ελιάς παράγονται 0,8 τόνοι υγρού αποβλήτου του οποίου το οργανικό φορτίο εκτιμάται κατά προσέγγιση σε 80 g/l COD, τότε το εποχιακό ρυπαντικό φορτίο της διαδικασίας παραγωγής του ελαιολάδου αντιστοιχεί (ως προς το COD) σε ισοδύναμο ρυπαντικό φορτίο 22 εκατομμυρίων ατόμων για 1 έτος (Aktas et al. 2001).

Στο Σχήμα 3.1 δίνονται συνοπτικά η διαδικασία παραλαβής του ελαιολάδου καθώς και τα διάφορα υποπροϊόντα που παράγονται στα επί μέρους στάδια:



Σχήμα 3.1: Διάγραμμα επεξεργασίας της ελιάς για την παραγωγή ελαιολάδου

Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων υπήρχαν ως πηγή ρύπανσης εδώ και χιλιάδες χρόνια, όμως η επίδρασή τους στο περιβάλλον έχει γίνει ιδιαίτερα έντονη τα τελευταία χρόνια. Αυτό οφείλεται τόσο στην αύξηση της ελαιοπαραγωγής όσο και στη συσσώρευση των ελαιοτριβείων μεγάλης δυναμικότητας σε συγκεκριμένες περιοχές (τα οποία παλιότερα ήταν μικρότερης δυναμικότητας και διασκορπισμένα). Η πιο συνηθισμένη πρακτική που ακολουθείται σήμερα για τα απόβλητα αυτά είναι η ανεξέλεγκτη απόρριψή τους σε ρεματιές και στο έδαφος και σε μικρότερο βαθμό σε αποχετεύσεις, ποτάμια, θάλασσα κ.λπ. Οι τρόποι αυτοί διάθεσης εκτός από τα προφανή έντονα περιβαλλοντικά προβλήματα, δημιουργούν και προβλήματα στη διαβίωση των κατοίκων των γύρω περιοχών. Οι δυσάρεστες οσμές που αναδίδονται λόγω των αναερόβιων ζυμώσεων στις υπαίθριες δεξαμενές προσωρινής αποθήκευσης καθώς και τα έντομα που συσσωρεύονται εκεί οδηγούν στην υποβάθμιση της ποιότητας ζωής των κατοίκων.

3.2.2. Φυσικοχημικές ιδιότητες

Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων (Υ.Α.Ε.) περιέχουν συστατικά παρόμοια με αυτά του καρπού της ελιάς τα οποία εκχυλίζονται με το νερό. Έτσι λοιπόν η σύστασή τους δεν είναι σταθερή αλλά ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία της ελιάς, το στάδιο ωρίμανσης, την προσβολή του καρπού από έντομα, τις περιβαλλοντικές και τις καλλιεργητικές συνθήκες. Επίσης η μεγάλη διαφοροποίηση στη σύσταση του παραγόμενου αποβλήτου οφείλεται σε σημαντικό βαθμό στον τύπο του ελαιοτριβείου (κλασικό ή φυγοκεντρικό) με τα κλασικά ελαιοτριβεία να δίνουν πυκνότερο απόβλητο αλλά μικρότερους όγκους.

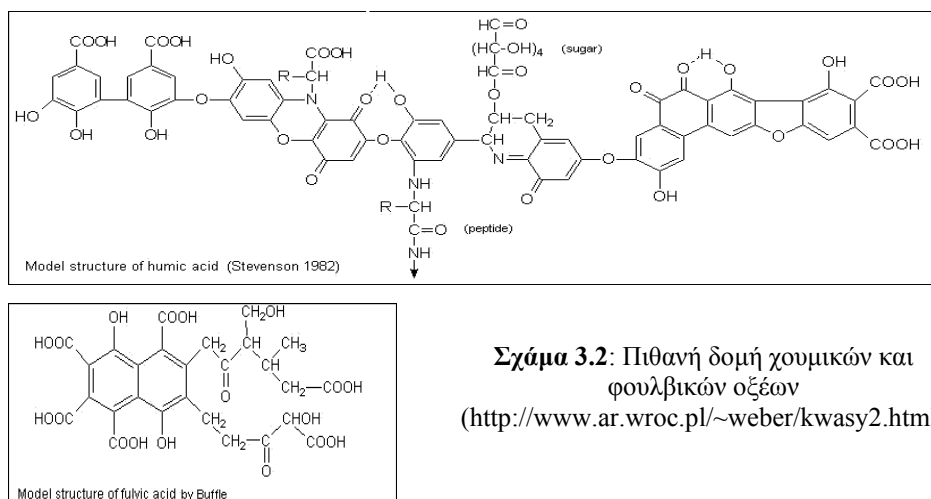
Το μεγαλύτερο μέρος των στερεών που περιέχονται στα Υ.Α.Ε. αποτελείται από οργανική ουσία και το μικρότερο από ανόργανα άλατα. Η χημική σύσταση ενός αποβλήτου στο οποίο η οργανική ουσία αποτελεί το 14,8% και τα ανόργανα άλατα το 1,8% δίνεται στον Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1: Σύσταση οργανικού και ανόργανου κλάσματος των Υ.Α.Ε. (Fiestas Ros de Ursinos & Borja-Padilla 1996).

ΟΡΓΑΝΙΚΑ		ΑΝΟΡΓΑΝΑ	
Σάκχαρα:	2-8%	Άλατα του καλίου:	47%
Πρωτεΐνες:	1,2-2,4%	Ανθρακικά άλατα:	21%
Πολυαλκοόλες:	1-1,5%	Φωσφορικά άλατα:	14%
Οργανικά:οξέα	0,5-1,5%	Άλατα του νατρίου:	7%
Πηκτίνες-τανίνες-κόμμεα:	0,5-1,5%	κ.α.	
Λίπη:	0,02-1%		
Πολυφαινόλες:	0,5-1%		

Τα σάκχαρα είναι το κυριότερο κλάσμα της οργανικής ουσίας των Υ.Α.Ε. και αποτελούνται κυρίως από τα εύκολα αφομοιώσιμα σάκχαρα γλυκόζη και φρουκτόζη. Επίσης σε μικρότερες ποσότητες ανευρίσκονται ενώσεις όπως η μαννόζη, η σουκρόζη και η ραφινόζη καθώς και ένα σακχαριδικό σύμπλοκο η υδρόλυση του οποίου δίνει γαλακτόζη, γλυκόζη, αραβινόζη, ξυλόζη, ραμνόζη και γαλακτουρονικό οξύ. Εκτός από τα παραπάνω σάκχαρα ανευρίσκεται σε σημαντικές ποσότητες μία κατεχοϊμελανινική χρωστική η υδρόλυση της οποίας δίνει γλυκόζη, ραμνόζη, γαλακτόζη και αραβινόζη. Τα κυριότερα οργανικά οξέα που ανευρίσκονται στα Υ.Α.Ε είναι τα: οξικό, φουμαρικό, γλυκερικό, γαλακτικό, μαλικό, μαλονικό, ταρταρικό, οξαλικό και τρικαρβαλλυλικό οξύ (Ranalli 1991a, b & c).

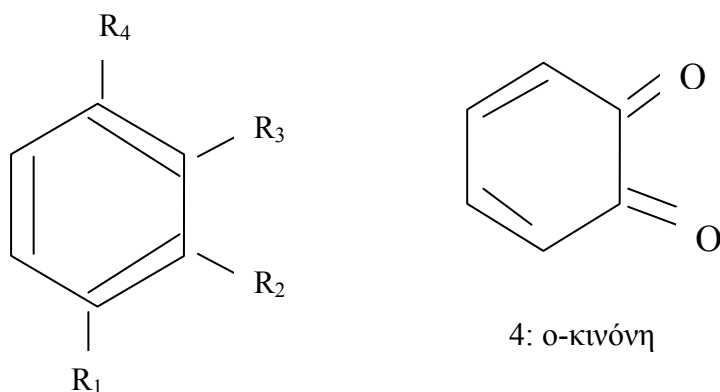
Οι ελεύθερες φαινόλες που απαντώνται στα Υ.Α.Ε., σχηματίζονται με ενζυμική υδρόλυση των διαφόρων γλυκοζιδίων και εστέρων της ελαιόπαστας κατά τη διάρκεια της εκχύλισης για την παραλαβή του ελαιολάδου. Θεωρείται ότι οι ελεύθερες φαινόλες είναι αυτές που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη τοξικότητα στους μικροοργανισμούς ταυτόχρονα όμως αποικοδομούνται ευκολότερα σε σύγκριση με τις πολυφαινολικές ενώσεις. Αντίθετα οι πολυφαινολικές ενώσεις οι οποίες είναι υπεύθυνες για το σκούρο χρώμα του αποβλήτου, είναι λιγότερο τοξικές και πιο δύσκολα αποικοδομήσιμες. Έτσι, παρατηρήθηκε ότι το χρώμα των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων σκούραινε κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους. Η αλλαγή αυτή στο χρώμα μπορεί να οφείλεται στην οξείδωση και στη συνέχεια στον πολυμερισμό των ταννινών που οδηγεί στο σχηματισμό σκουρόχρωμων πολυφαινολικών ουσιών (Assas et al. 2000). Οι πολυφαινολικές ενώσεις των Υ.Α.Ε. και οι ιδιότητές τους, παρομοιάζονται από αρκετούς ερευνητές με τις χουμικές ενώσεις (Σχήμα 3.2) και για την αποικοδόμησή τους έχουν χρησιμοποιηθεί μικροοργανισμοί οι οποίοι σχετίζονται με την αποικοδόμηση της λιγνίνης (Robles et al. 2000 a & b, Sayadi et al. 2000, Sayadi & Ellouz 1992).



Σχήμα 3.2: Πιθανή δομή χουμικών και φουλβικών οξέων
(<http://www.ar.wroc.pl/~weber/kwasy2.html>)

Στον Πίνακα 3.2 δίνονται οι κύριες φαινολικές ενώσεις (αλκοόλες και εστέρες) που απαντώνται στα Υ.Α.Ε.

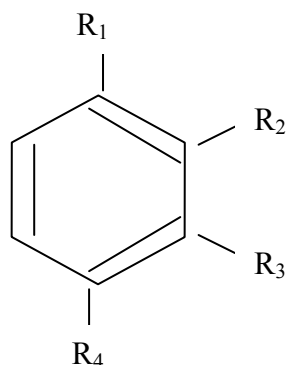
Πίνακας 1.7: Δομή των κυριότερων φαινολικών ουσιών (αλκοόλες και εστέρες) που υπάρχουν στα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων (Capasso et al. 1995).



	R_1	R_2	R_3	R_4	ονομασία
1	OH	OH	H	H	Κατεχόλη
2	OH	OCH ₃	H	H	Γουεκόλη
3	OCH ₃	OCH ₃	H	H	Βερατρόλη
5	OAc	OAc	H	H	
6	OH	OH	H	CH ₃	4-μεθυλ-κατεχόλη
7	OAc	OAc	H	CH ₃	
8	OH	OH	H	CH ₂ CH ₂ OH	Υδροξυτυροσόλη
9	OAc	OAc	H	CH ₂ CH ₂ OH	Διακετυλ-1,2-υδροξυτυροσόλη
10	OAc	OAc	H	CH ₂ CH ₂ OAc	
11	OH	H	H	CH ₂ CH ₂ OH	1,4-τυροσόλη
12	OH	CH ₂ CH ₂ OH	H	H	1,2-τυροσόλη
13	OH	H	CH ₂ CH ₂ OH	H	1,3-τυροσόλη
14	OAc	H	H	CH ₂ CH ₂ OH	Μονοακετυλ-1,4-τυροσόλη
15	OAc	H	H	CH ₂ CH ₂ OAc	
16	OAc	CH ₂ CH ₂ OAc	H	H	Διακέτυλ-1,2-τυροσόλη
17	OAc	OH	CH ₂ CH ₂ OAc	H	Διακέτυλ-1,3-τυροσόλη

Η δομή των κυριότερων φαινολικών οξέων που απαντώνται στα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων δίνεται στον Πίνακα 3.3:

Πίνακας 3.3: Δομή των κυριότερων φαινολικών οξέων που υπάρχουν στα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων (Capasso et al. 1995).



	R_1	R_2	R_3	R_4	ονομασία
1	COOH	H	OH	H	4-υδροξυβενζοϊκό οξύ
2	CH=CHCOOH	H	OH	H	4-υδροξυκινναμικό οξύ (p-κουμαρικό οξύ)
3	CH ₂ COOH	H	OH	H	4-υδροξυ-φαινυλοξικό οξύ
4	COOH	OH	OH	H	3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ (πρωτο-κατεχοϊκό οξύ)
5	COOH	OCH ₃	OH	H	4-υδροξυ-3-μεθοξυβενζοϊκό οξύ (βανιλλικό οξύ)
6	COOH	OCH ₃	OCH ₃	H	3,4-διμεθοξυβενζοϊκό οξύ (βερατρικό οξύ)
7	CH=CHCOOH	OH	OH	H	3,4-διυδροξυκινναμικό οξύ (καφεϊκό οξύ)
8	COOH	OH	OH	OH	3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ (γαλλικό οξύ)
9	COOH	OCH ₃	OH	OCH ₃	3,5-διμεθοξυ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (συρινγικό οξύ)

Εκτός από το οργανικό κλάσμα, τα Υ.Α.Ε. περιέχουν ανόργανα άλατα τα οποία αποτελούν σύμφωνα με πολλούς ερευνητές λιπαντικά στοιχεία που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν αντικαθιστώντας εξ' ολοκλήρου ή σε μεγάλο βαθμό τη χημική λίπανση σε συνδυασμό με τον εμπλουτισμό του εδάφους σε οργανική ουσία. Έτσι τα απόβλητα αυτά είναι ιδιαίτερα πλούσια σε κάλιο και φώσφορο ενώ περιέχουν σε μικρότερες ποσότητες και άλλα στοιχεία όπως ασβέστιο, μαγνήσιο, νάτριο. Ένα από τα μειονεκτήματα της χημικής σύστασής τους είναι η μικρή αναλογία σε C/N η οποία πιθανά να οδηγήσει σε παροδική ακινητοποίηση του εδαφικού αζώτου.

Στον Πίνακα 3.4 δίνεται η ανάλυση των αποβλήτων από 10 ελαιοτριβεία διαφόρων περιοχών της νοτίου Ισπανίας (μέση τιμή, εύρος μετρήσεων και ο συντελεστής μεταβλητότητας).

Πίνακας 3.4: Ανάλυση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων (Paredes et al. 1999).

	<i>Μέσος όρος</i>	<i>Εύρος</i>	<i>C.V.</i>
Ξηρό βάρος (% υγρού)	7,19	4,12-16,38	3,87
pH	5,17	4,8-5,5	4,83
Αγωγιμότητα (dS/m)	5,5	4-13,98	41,73
Οργανική ουσία (% ξ.β.)	64,6	58,45-70,63	6,33
Ολικός οργανικός C (%)	47,5	43,61-53,45	6,46
Ολικό N (%)	0,88	0,58-1,13	25,18
P (%)	0,19	0,06-0,32	51,73
K (%)	5,24	3,3-6,94	23,18
Na (%)	0,15	0,04-0,48	114,97
Ca (%)	0,42	0,32-0,53	18,66
Mg (%)	0,18	0,06-0,22	26,1
Fe (mg/kg)	951	652-1482	31,83
Cu (mg/kg)	21	14-44	40,63
Mn (mg/kg)	15	1-53	110,07
Zn (mg/kg)	57	31-82	31,55
Πυκνότητα (g/cm ³)	1,02	1,01-1,06	1,3
Λίπη (% ξ.β.)	4,27	0,55-11,37	84,41
Πολυφαινόλες (% ξ.β.)	2,21	1,32-3,99	35,8
Υδατάνθρακες (% ξ.β.)	12,22	3,37-32,91	76,79

Στην ίδια μελέτη διαπιστώθηκε ότι υπάρχει γραμμική συσχέτιση της περιεκτικότητας ενός αποβλήτου σε ξηρή ουσία με τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά του (αγωγιμότητα, οργανική ουσία, ολικός οργανικός C, κύρια μακρο- και ιχνο-στοιχεία, και πολυφαινόλες) (Paredes et al. 1999).

3.3. Μέθοδοι επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων

3.3.1 Αερόβια βιολογική επεξεργασία

Κατά την αερόβια βιολογική επεξεργασία των Υ.Α.Ε. η απομάκρυνση του οργανικού φορτίου γίνεται μέσω οξειδωτικών μικροβιακών διεργασιών για τις οποίες απαιτείται οξυγόνο. Η βιολογική αυτή απαίτηση σε οξυγόνο (BOD) είναι ανάλογη με το οργανικό φορτίο του αποβλήτου το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τους μικροοργανισμούς. Η χημική απαίτηση σε οξυγόνο (COD), η οποία είναι ιδιαίτερα υψηλή στα Υ.Α.Ε., είναι ανάλογη της συνολικής οργανικής ουσίας των αποβλήτων και σ' αυτήν περιλαμβάνεται και το κλάσμα της οργανικής ουσίας η οποία είναι μη αποικοδομήσιμη από τους μικροοργανισμούς. Κατά τη μελέτη της αποτελεσματικότητας των διαφόρων μικροοργανισμών που έχουν εξεταστεί, η μείωση του COD και της συγκέντρωσης των φαινολικών σε πολύ χαμηλά επίπεδα είναι ο στόχος, για να μπορέσει το τελικό προϊόν να οδηγηθεί σε βιολογικούς καθαρισμούς αστικών ή βιομηχανικών λυμάτων ή σε υδάτινους αποδέκτες. Επίσης το χρονικό διάστημα στο οποίο επιτυγχάνεται η μείωση των παραπάνω παραμέτρων και η οποία είναι ανάλογη με το χρόνο παραμονής του αποβλήτου στο βιοαντιδραστήρα, θα πρέπει να είναι μικρή για την πρακτική εφαρμογή της μεθόδου, αφού τα απόβλητα αυτά παράγονται σε τεράστιους όγκους σε μικρό χρονικό διάστημα. Για την αερόβια επεξεργασία έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα μικροβιακά στελέχη σε διαφορετικούς τύπους βιοαντιδραστήρων.

Είδη του γένους *Aspergillus* έχουν χρησιμοποιηθεί για την αερόβια επεξεργασία των Υ.Α.Ε. με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Στελέχη των ειδών *Aspergillus niger* και *Aspergillus terreus* μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να μειώνουν το COD του αποβλήτου και τη συγκέντρωση των φαινολικών. Σε χρονικό διάστημα 4-5 ημερών το στέλεχος του *Aspergillus niger* μείωσε κατά 73% το COD και κατά 76% τις ολικές φαινόλες ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για το στέλεχος του *Aspergillus terreus* ήταν 64% μείωση του COD και 64% των ολικών φαινολών στο ίδιο χρονικό διάστημα (García García et al. 2000). Επιπλέον εξετάστηκε η επίδραση του μεγέθους του εμβολίου και της προσθήκης ανόργανων αλάτων ως προς τη βελτιστοποίηση της αερόβιας επεξεργασίας των αποβλήτων με στέλεχος του *Aspergillus niger*. Φάνηκε ότι η πηγή αζώτου, τα θειικά ιόντα και το μέγεθος του εμβολίου επηρέαζαν άμεσα την ανάπτυξη του μυκηλίου και κατά συνέπεια τη μείωση του COD. Η υψηλότερη παραγωγή βιομάζας και η μεγαλύτερη

απομάκρυνση του COD επιτεύχθηκαν με αναλογία COD:N:SO₄⁻² της τάξης του 100:3:1,5 και η άριστη συγκέντρωση εμβολίου κυμάνθηκε μεταξύ 10⁶ και 10⁷ σπόρια ανά g COD. Η προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης, μαγνησίου, νάτριου, καλίου ή ασβεστίου δεν επηρέασαν την ανάπτυξη του μύκητα (Hamdi et al. 1991). Επίσης ο μύκητας *Aspergillus niger* χρησιμοποιήθηκε και για τη βελτίωση της διηθητικότητας των Υ.Α.Ε (η οποία σχετίζεται με τη μείωση των στερεών του αποβλήτου). Σε χρονικό διάστημα τριών ημερών επιτεύχθηκε μείωση του COD και των ολικών στερεών κατά 50%. Τα θετικά αποτελέσματα αποδόθηκαν στην αποικοδόμηση της οργανικής ουσίας και στο ότι ένα μέρος των στερεών παγιδεύονται στις υφές του μύκητα και έτσι μπορούν να απομακρυνθούν εύκολα (Hamdi & Ellouz 1992).

Ο λιγνινολυτικός μύκητας *Phanerochaete chrysosporium* όταν καλλιεργήθηκε σε Υ.Α.Ε. με αρχικό COD 83 g/l απέδωσε 75% μείωση του COD και 92% μείωση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ουσιών σε 6 ημέρες (Garcia Garcia et al. 2000). Επίσης έγινε προσπάθεια καλλιέργειας του μύκητα σε αραιωμένα απόβλητα στα οποία προστέθηκε ένα βασικό συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα (η αραιώση ήταν τέτοια ώστε να αντιστοιχούν 53 g COD/l και το βασικό υπόστρωμα αποτελούνταν από ανόργανα άλατα). Παρατηρήθηκε 74% μείωση του χρώματος και 80% απομάκρυνση του COD σε χρονικό διάστημα εννέα ημερών όταν στις καλλιέργειες προστέθηκε veratryl alcohol (η οποία αυξάνει τη δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της λιγνίνης-LiP) και όταν ο αερισμός γίνονταν με καθαρό O₂ (διεγείρει την αποικοδόμηση της λιγνίνης και την παραγωγή LiP). Φάνηκε ότι το λιγνινολυτικό σύστημα του μύκητα είναι αυτό που εμπλέκεται στον αποχρωματισμό του αποβλήτου το οποίο σχετίζεται άμεσα με τη διάσπαση των μεγάλου μοριακού βάρους πολυφαινολικών και τη βιοαποικοδόμηση των μικρού μοριακού βάρους αρωματικών ουσιών. Το λιγνινολυτικό σύστημα και ιδιαίτερα η LiP σχετίζονται με τη βιοαποικοδόμηση ουσιών όπως τα χουμικά οξέα και οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (Sayadi & Ellouz 1992). Το ενζυμικό σύστημα και η κινητική της αύξησης του *Phanerochaete chrysosporium* μελετήθηκε και σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα στο οποίο είχαν προστεθεί χημικά καθαρές φαινόλες, χλωροφαινόλες και χρωστικές (Mamimekalai & Swaminathan 2000).

Ένας άλλος λιγνινολυτικός μύκητας ο *Pleurotus ostreatus* (εδώδιμο μανιτάρι) καλλιεργήθηκε σε αραιωμένο απόβλητο 1:10. Παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης των φαινολικών κατά 90% καθώς και της τοξικότητάς του σε ευαίσθητους μικροοργανισμούς (*Bacillus cereus*) κατά επτά φορές σε σχέση με το ανεπεξέργαστο

απόβλητο σε χρονικό διάστημα 100 ωρών. Μετά από 15 ημέρες καλλιέργειας η μείωση του χρώματος έφτασε στο 71% ενώ η μεγαλύτερη δραστικότητα του ενζύμου οξειδάσης της φαινόλης παρατηρήθηκε τη 13^η ημέρα (Martinari et al. 1996).

Ο *Geotrichum candidum*, είναι ένας ακόμα μύκητας γνωστός για την ικανότητά του να αποικοδομεί μεγάλο εύρος απλών αρωματικών ενώσεων. Όταν καλλιεργήθηκε σε Υ.Α.Ε., σε χρονικό διάστημα 25 ωρών επέφερε μείωση του COD κατά 44% ενώ δεν επέδρασε καθόλου στη συγκέντρωση των φαινολικών. Η παράταση της καλλιέργειάς του για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ή η χρήση αποβλήτου σε αραιώση 1: 3 δεν άλλαξαν την εικόνα αυτή (Garcia Garcia et al 2000). Επίσης μελετήθηκε η επίδραση της αραιώσης του αποβλήτου, του αερισμού καθώς και της προσθήκης θεικού αμμωνίου, στη μείωση του χρώματος και στην απομάκρυνση του COD από τον ίδιο μύκητα. Διαπιστώθηκε ότι η αναλογία COD: N: S της τάξης του 100:5:2 είναι η αποτελεσματικότερη για τη μείωση του χρώματος (55,5%) και ότι ο ρόλος του αερισμού είναι σημαντικός στο σχηματισμό μυκηλιακής βιομάζας (σε σχέση με το σχηματισμό σπορίων) η οποία οδηγεί σε μεγαλύτερη μείωση του χρώματος. Η αραιώση του αποβλήτου είχε θετικότερα αποτελέσματα στη μείωση του χρώματος παρά στη μείωση του COD (Assas et al. 2000).

Τα είδη του γένους *Penicillium* αποικοδομούν και αυτά διάφορες αρωματικές ενώσεις οι οποίες σχετίζονται με τη λιγνίνη καθώς και άλλες φαινολικές ενώσεις και θεωρήθηκαν ως υποψήφιοι αποικοδομητές των Υ.Α.Ε. Έτσι εξετάστηκαν επτά στελέχη του γένους αυτού τα οποία απομονώθηκαν από φυσικές δεξαμενές διάθεσης των αποβλήτων. Το στέλεχος που έδωσε τα καλύτερα συνολικά αποτελέσματα μείωσε το COD κατά 40%, τις ολικές φαινόλες κατά 45% και το χρώμα κατά 20% σε χρονικό διάστημα είκοσι ημερών ενώ η βιοτοξικότητα του αποβλήτου εξαφανίστηκε στις δώδεκα ημέρες καλλιέργειας (Robles et al. 2000).

Η ζύμη *Yarrowia lipolytica* η οποία επιλέχθηκε μεταξύ διαφόρων άλλων ζυμών για την ικανότητά της να αυξάνει καλύτερα στα Υ.Α.Ε., καλλιεργήθηκε σε απόβλητο χωρίς αραιώση, στο οποίο είχαν προστεθεί 0,6% θεικού αμμωνίου και 0,1% εκχύλισμα ζύμης. Παρατηρήθηκε μείωση του COD κατά 80% σε 24 ώρες, ενώ παραλήφθηκαν 22,45 g/l χρήσιμης βιομάζας καθώς και ενζυμική λιπάση (Scioli et al. 1997).

Μελετήθηκε επίσης η αποικοδόμηση μονοκυκλικών αρωματικών ουσιών οι οποίες απαντώνται στα υγρά απόβλητα, από τα βακτηριακά στελέχη *Ralstonia* sp. LD35 και *Pseudomonas putida* DSM1868. Οι δοκιμές έγιναν σε συνθετικά μέσα καλλιέργειας, καθώς και σε κλάσματα τα οποία παρελήφθησαν είτε από το απόβλητο είτε από

αναερόβιο βιοαντιδραστήρα (τα οποία ήταν πλούσια σε μονοκυκλικές αρωματικές ενώσεις). Η συγκαλλιέργεια των δύο βακτηριακών στελεχών έδωσε καλύτερα αποτελέσματα λόγω της συμπληρωματικότητας που εμφάνισαν, και αποικοδομήθηκαν οι 7 από τις 9 ενώσεις που δοκιμάστηκαν στο συνθετικό υπόστρωμα. Επίσης στα κλάσματα του αποβλήτου που εξετάστηκαν, παρατηρήθηκε επιτυχής αύξηση και των δύο στελεχών και αποικοδόμηση των αρωματικών ουσιών (Di Gioia et al. 2001a & b).

Μελετήθηκε επίσης και η κινητική της αποικοδόμησης υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων σε διάφορες αραιώσεις από μικτή μικροβιακή χλωρίδα η οποία προήρθε μετά από προσαρμογή ενεργής λάσπης βιολογικού καθαρισμού αστικών αποβλήτων. Προστέθηκαν άλατα στο υπόστρωμα ώστε να διατηρείται η αναλογία COD: N: P στο 100:5:1 και η επώαση διήρκεσε 7 ημέρες. Η μείωση του COD που παρατηρήθηκε κυμαίνονταν από 58-84% και ήταν αντιστρόφως ανάλογη προς την αραιώση ενώ τα φαινολικά μειώθηκαν σε ποσοστά μεγαλύτερα του 90% σε όλα τα πειράματα (Benitez et al. 1997b).

3.3.1.2. Αερόβια επεξεργασία του αποβλήτου ελαιοτριβείων για παραγωγή μικροβιακής βιομάζας και μικροβιακών μεταβολιτών

Το υγρό απόβλητο ελαιοτριβείων έχει δοκιμαστεί ως υπόστρωμα για την καλλιέργεια διαφόρων μικροοργανισμών οι οποίοι χρησιμοποιούνται είτε για την παραγωγή χρήσιμης βιομάζας είτε για τα μεταβολικά τους προϊόντα.

Αραιωμένο Υ.Α.Ε. χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή βιομάζας (μυκηλίου) από τους εδώδιμους μύκητες *Pleurotus eryngii* και *Pleurotus pulmonarius* καθώς και για την παραγωγή μανιταριών από τους ίδιους μύκητες,. Ως στερεό υπόστρωμα στην περίπτωση της παραγωγής μανιταριών χρησιμοποιήθηκε ελαιοπυρήνας ή ελαιοπυρήνας ο οποίος είχε διαβρεχτεί με υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων (Zervakis et al. 1996).

Επίσης αραιωμένο Υ.Α.Ε. χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή βιομάζας από τα μικροφύκη *Chlorella pyrenoidosa* και *Scenedesmus obliquus* (Sanchez Villasclaras et al. 1996).

Μια άλλη εφαρμογή του αραιωμένου Υ.Α.Ε. μπορεί να αποτελέσει η χρήση του ως υπόστρωμα χαμηλού κόστους για την παραγωγή ξανθάνης από στέλεχος του γένους *Xanthomonas campestris*. Η ξανθάνη είναι ένας εξωκυτταρικός πολυσακχαρίτης ο οποίος λόγω των ρεολογικών του ιδιοτήτων χρησιμοποιείται ευρέως σε βιομηχανίες τροφίμων,

καλλυντικών, φαρμακευτικών προϊόντων, κ.ά. Τα Υ.Α.Ε. μπορούν να βελτιωθούν ως υπόστρωμα με την προσθήκη αζώτου και αλάτων (Lopez et al. 1996).

Χρησιμοποιήθηκαν επίσης τα Υ.Α.Ε. ως συμπλήρωμα σε συνθετικά θρεπτικά υποστρώματα για την καλλιέργεια στελέχους του είδους *Azotobacter chroococcum* και την παραγωγή PHAs (polyhydroxyalkanoates). Τα PHAs και συγκεκριμένα το PHB (poly-β-hydroxybutyrate) το οποίο παράγεται από το στέλεχος που μελετήθηκε και είναι από τα πιο συνήθη, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά λόγω του ότι εμφανίζουν δομή παρόμοια με του πολυπροπυλενίου (Gonzalez-Lopez et al. 1996).

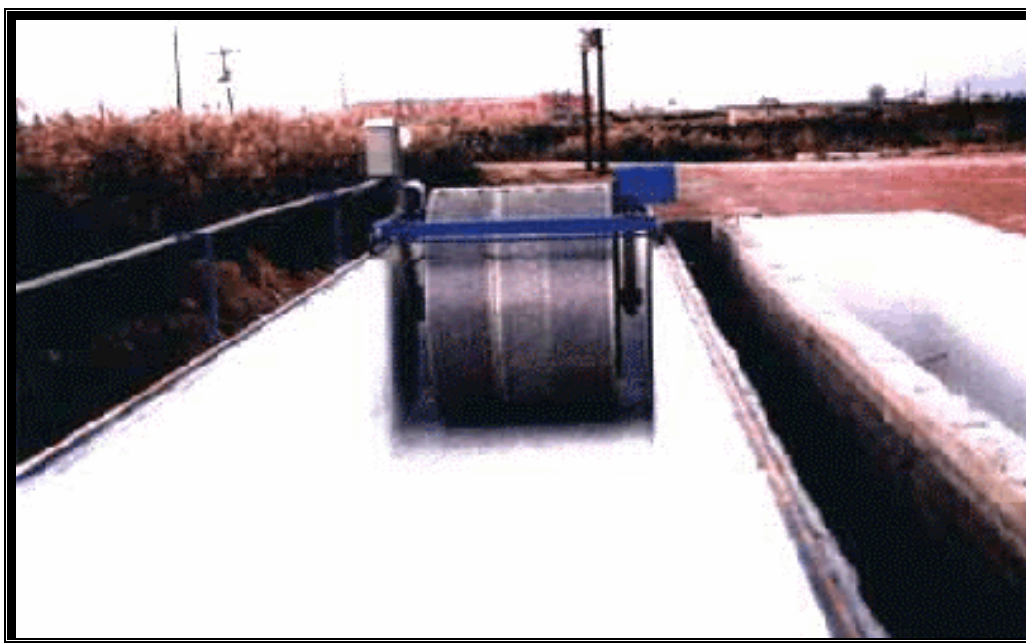
Στέλεχος του γένους *Pseudomonas* καλλιεργήθηκε σε Υ.Α.Ε. για την παραγωγή βιο-τασενεργών ουσιών (biosurfactant). Οι ουσίες αυτές παρουσιάζουν ενδιαφέρον διότι είναι βιοαποικοδομήσιμες και αποτελεσματικές σε ακραίες συνθήκες pH, θερμοκρασίας και αλατότητας. Έτσι, μελετήθηκε η ικανότητα παραγωγής ραμνολιπιδίων από το στέλεχος αυτό και παρελήφθησαν 0,058 g ραμνολιπιδίων/ g υποστρώματος (όπως υπολογίζεται από το αρχικό COD) (Mercadé et al. 1993).

Η χρήση γεωργικών αποβλήτων ως υπόστρωμα για την παραγωγή μικροβιακών βιοπολυμερών μπορεί σε πολλές περιπτώσεις να έχει υψηλότερο κόστος σε σχέση με την ήδη υπάρχουσα τεχνολογία χρησιμοποίησης συνθετικών υποστρωμάτων. Ένα μέρος του επιπλέον κεφαλαίου που μπορεί να απαιτείται, θα πρέπει να καλυφθεί από τη διάθεση του ανεπιθύμητου αποβλήτου. Δυσκολίες επίσης μπορεί να εμφανίζονται σε άλλους τομείς, όπως στην ποιότητα και στις ιδιότητες των προϊόντων που παραλαμβάνονται. Η έρευνα όμως που πλέον κατευθύνεται προς τη χρήση τεχνολογιών φιλικών προς το περιβάλλον σίγουρα θα βοηθήσει στην ανεύρεση λύσεων με δυνατότητες εφαρμογής (Sutherland 1996).

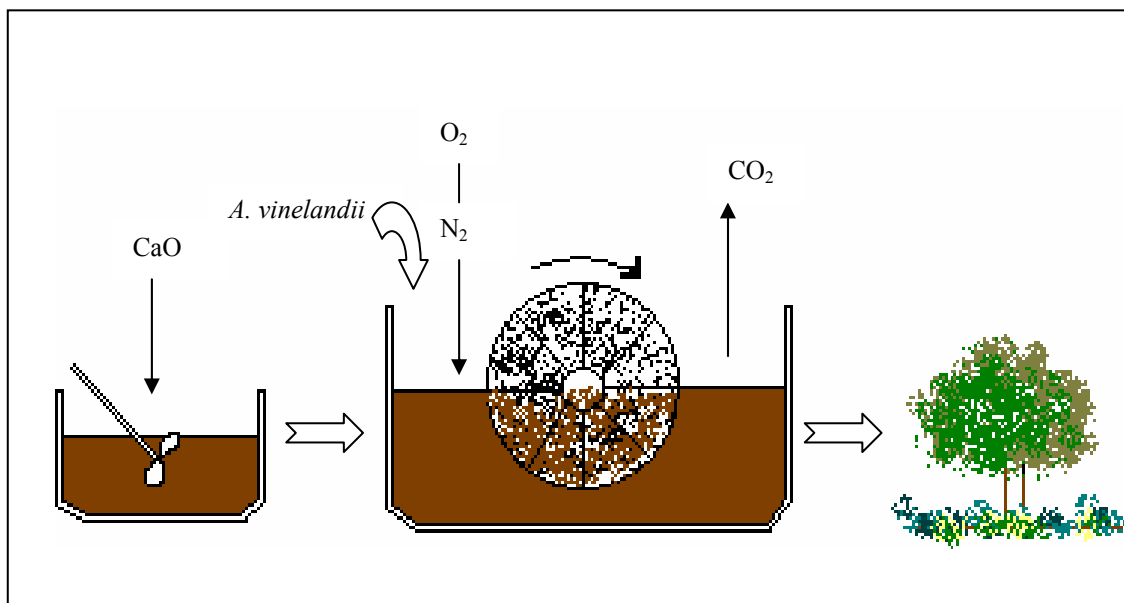
3.3.2. Βιολιπασματοποίηση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη μέθοδο Μπαλή

Η μέθοδος βιολιπασματοποίησης των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων αναπτύχθηκε στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γ.Π.Α. από τον Καθηγητή Κωνσταντίνο Μπαλή και τους συνεργάτες του (πατέντα 930100266 Ο.Β.Ι., Χατζηπανλίδης Ι. 1999, Διδακτορική διατριβή). Έχει λειτουργήσει ήδη σε τρία πιλοτικά προγράμματα: στο Ρωμανό Πυλίας σε βιοαντιδραστήρα όγκου 5,5 m³, στο Πέτα Άρτας σε μεσαίου μεγέθους βιοαντίδραστήρα όγκου 25 m³ και στη Καλαμάτα σε βιοαντιδραστήρα όγκου 100 m³ (Εικόνα 3.3).

Η μέθοδος στηρίζεται στην αερόβια επεξεργασία των αποβλήτων με το βακτηριακό στέλεχος *Azotobacter vinelandii* (στέλεχος Α) και έχει στόχο την αξιοποίηση των αποβλήτων ως οργανική προσθήκη στο έδαφος (Εικόνα 3.4). Το βακτηριακό στέλεχος καλλιεργείται σε ειδικό βιοαντιδραστήρα με αεριστή τύπου περιστρεφόμενου τυμπάνου και τροφοδοτείται ημι-συνεχώς (fed batch culture) με υγρά απόβλητα. Ο χρόνος παραμονής του αποβλήτου στο βιοαντιδραστήρα είναι περίπου τρεις ημέρες. Κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου ο πληθυσμός του *A. vinelandii* αυξάνει και δεσμεύει μοριακό άζωτο εμπλουτίζοντας έτσι το απόβλητο, ενώ η φυτοτοξικότητα μειώνεται σε επίπεδα μικρότερα του 10%. Ένας από τους λόγους της μείωσης της φυτοτοξικότητας είναι η απομάκρυνση των φαινολικών ουσιών οι οποίες χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα από το *A. vinelandii* αλλά και από την υπόλοιπη μικροχλωρίδα που αναπτύσσεται στο απόβλητο κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του (Ehaliotis C. et al. 1999, Zaborina et al. 1995). Σε μια αναλυτική μελέτη του συστήματος βιομετατροπής των Υ.Α.Ε. μέσω αερόβιας βιολογικής επεξεργασίας με τη μέθοδο αυτή αναφέρονται αποδόσεις απομάκρυνσης διαφόρων ουσιών (φαινολικές ενώσεις, σάκχαρα, αμινοξέα, οργανικά οξέα) της τάξης του 90-96% σε 3-7 ημέρες τα οποία μετατρέπονται σε μικροβιακή βιομάζα (Piperidou et al. 2000).



Εικόνα 3.3: Βιοαντιδραστήρας επεξεργασίας υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη μέθοδο Μπαλή. Φωτογραφία από το πιλοτικό πρόγραμμα στην Καλαμάτα το οποίο ολοκληρώθηκε στα πλαίσια του προγράμματος EU LIFE του δήμου Καλαμάτας (LIFE 95/GR/1092).



Εικόνα 3.4: Σχηματική πορεία της βιολογικής επεξεργασίας των αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη μέθοδο Μπαλή.

Το προϊόν που παράγεται με τη μέθοδο αυτή μπορεί να εφαρμοστεί απ' ευθείας σε διάφορα καλλιεργούμενα φυτά ως υγρό βιολογικό λίπασμα, στα πλαίσια της αειφόρου ή βιώσιμης γεωργίας, λόγω μιας πληθώρας χαρακτηριστικών που διαθέτει και τα οποία συνοψίζονται στα εξής:

(i) Περιλαμβάνει σχεδόν όλα τα μακροστοιχεία και ιχνοστοιχεία που περιέχονται στον ελαιόκαρπο και συνεπώς μπορεί να ανταγωνιστεί με επιτυχία την συμβατική λίπανση. Επί πλέον, λόγω της οργανικής του φύσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως προσθετικό-βελτιωτικό εδάφους, δεδομένου ότι τα εδάφη της χώρας μας είναι φτωχά σε οργανική ουσία (η οποία μειώνεται ακόμα περισσότερο λόγω της εντατικής καλλιέργειας). Στην παρουσίαση του πιλοτικού προγράμματος στο Ρωμανό Πυλίας αναφέρεται ότι η χρήση του επεξεργασμένου αποβλήτου ελαιοτριβείων έδωσε τις ίδιες αποδόσεις με τη χημική λίπανση όταν χρησιμοποιήθηκε σε ελαιόδεντρα, σε αμπέλια και πατάτες (Chatjipavlidis et al. 1996).

(ii) Είναι βιολογικά εμπλουτισμένο με οργανικές μορφές αζώτου μέσω του μηχανισμού της αζωτοδέσμευσης του στελέχους *A. vinelandii*, το οποίο αυξάνεται χρησιμοποιώντας τις διάφορες πηγές άνθρακα (σάκχαρα, οργανικά οξέα, φαινολικές ενώσεις κ.α.) που εμπεριέχονται στο απόβλητο (Balis et al. 1996). Μελετήθηκε επίσης η αζωτοδεσμευτική ικανότητα του *A. vinelandii* όταν αυτό καλλιεργούνταν σε εδαφικό

εκχύλισμα στο οποίο προστίθονταν διάφορες φαινολικές ενώσεις. Παρατηρήθηκε ότι η δραστηριότητα της νιτρογενάσης είναι ανάλογη της ποσότητας του διαθέσιμου π-υδροξυβενζοϊκού οξέος (Moreno et al. 1990).

(iii) Οι μικροβιακής προέλευσης πολυσακχαρίτες που παράγονται τόσο από το *A. vinelandii* όσο και από την υπόλοιπη μικροχλωρίδα που αναπτύσσεται, ευνοούν το σχηματισμό σταθερών εδαφικών συσσωματωμάτων και συμβάλλουν στην βελτίωση της δομής του εδάφους (Rehm & Valla 1997). Μελετήθηκε η δυνατότητα παραλαβής των ενδο- και εξωπολυσακχαριδίων τα οποία παρήγαγε το *A. vinelandii* όταν καλλιεργήθηκε σε Υ.Α.Ε. (Passeti et al. 1996). Επιπλέον παράγονται μικροβιακοί μεταβολίτες οι οποίοι επάγουν την αύξηση των φυτών. Έτσι το *A. vinelandii* παράγει ινδολοξικό οξύ (συστατικό που δρα ως φυτο-ορμόνη) όταν αυξάνεται σε Υ.Α.Ε. (Fiorelli et al. 1996). Από το σύνολο της μικροχλωρίδας παράγονται και διάφορα άλλα προϊόντα μικροβιακής προέλευσης όπως χουμικά και φουλβικά οξέα, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, αντιβιοτικά, σιδηροφόρα, και άλλες ουσίες οι οποίες κατά κανόνα έχουν ευεργετική επίδραση στις εδαφικές ιδιότητες.

(iv) Συνιστά «μικροβιακό εμβόλιο» για το έδαφος διότι προάγει την εγκατάσταση μικροοργανισμών που δρουν ευνοϊκά στην ανάπτυξη των φυτών και αυξάνουν την επισχετικότητα του εδάφους (Φλουρή και άλλοι 1994).

3.3.3. Συγκομποστοποίηση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με διάφορα οργανικά υποστρώματα

Κομποστοποίηση (composting) είναι η ελεγχόμενη αερόβια βιολογική αποικοδόμηση ετερογενών στερεών οργανικών υποστρωμάτων μέσω ενός θερμόφιλου σταδίου, κατά το οποίο εκλύεται θερμότητα (μέσω των εξώθερμων αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα). Στο προϊόν που προκύπτει η οργανική ουσία βρίσκεται σε σταθεροποιημένη μορφή και περιέχονται σ' αυτή χουμικές ενώσεις. Στη διαδικασία της κομποστοποίησης συμμετέχει ένας μεγάλος αριθμός αερόβιων και προαιρετικά αναερόβιων μικροοργανισμών καθώς και κάποιοι ανώτεροι οργανισμοί.

Τα Υ.Α.Ε μπορούν να συμμετάσχουν στην κομποστοποίηση διαφόρων στερεών οργανικών υπολειμμάτων χρησιμοποιούμενα ως υγρό ρύθμισης της υγρασίας (αντί του νερού).

Μελετήθηκε η δυνατότητα κομποστοποίησης της λάσπης των Υ.Α.Ε. (η οποία προέρχονταν από δεξαμενές εξάτμισης) χρησιμοποιώντας ως στερεό υπόστρωμα στελέχη καλαμποκιού και υπολείμματα βάμβακος. Φάνηκε ότι και τα δύο υποστρώματα ήταν κατάλληλα για συγκομποστοποίηση με τη λάσπη των αποβλήτων ενώ η φυτοτοξικότητα είχε πλήρως εξαλειφθεί σε χρονικό διάστημα 84 ημερών. Η χρήση υπολειμμάτων βάμβακος πιθανά να δίνει λίγο καλύτερα αποτελέσματα από τα στελέχη καλαμποκιού λόγω μεγαλύτερου βαθμού χουμοποίησης της οργανικής ουσίας προς το τέλος της διαδικασίας (Paredes et al. 1996).

Η κομποστοποίηση των ίδιων υπολειμμάτων (βαμβακιού ή καλαμποκιού) ως στερεό υπόστρωμα μελετήθηκε επίσης σε συνδυασμούς με λάσπη από αστικό βιολογικό καθαρισμό ή κοπριά πτηνοτροφείων και Υ.Α.Ε. ως υγρό διαβροχής. Παρατηρήθηκε ότι η βιοτοξικότητα εμφανίστηκε μόνο στα αρχικά στάδια της κομποστοποίησης ενώ δεν υπήρξαν διαφορές μεταξύ των σωρών στους αριθμούς ολικών αερόβιων βακτηρίων, αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων και κυτταρινολυτικών βακτηρίων (Monteoliva-Sánchez et al. 1996).

Τα Υ.Α.Ε. χρησιμοποιήθηκαν για συγκομποστοποίηση οργανικών αποβλήτων πλούσιων σε άζωτο (κοπριά ορνιθοτροφείων, λάσπη αστικών βιολογικών καθαρισμών και στερεά υπολείμματα από βιομηχανία παραγωγής χυμών φρούτων) χρησιμοποιώντας ως στερεά υποστρώματα υπολείμματα βαμβακιού και στελέχη καλαμποκιού. Τα κομπόστ που προήλθαν από Υ.Α.Ε. με υπολείμματα βάμβακος ως στερεό υπόστρωμα και κοπριά πτηνοτροφείων ή λάσπη αστικού βιολογικού καθαρισμού ως υλικό πλούσιο σε άζωτο έδειξαν ικανοποιητικό βαθμό ωρίμανσης (συγκεντρώσεις υδατοδιαλυτού οργανικού C (C_W) και αμμωνιακού αζώτου καθώς και αναλογίες $C_W/N_{οργαν}$ και NH_4^+/NO_3^- εντός των καθιερωμένων ορίων τα οποία υποδηλώνουν ικανοποιητικό βαθμό ωρίμανσης). Η αύξηση της I.A.K. (Ικανότητα Ανταλλαγής Κατιόντων), του ποσοστού του άνθρακα υπό μορφή χουμικών ενώσεων καθώς και του βαθμού πολυμερισμού τους και η μείωση της φυτοτοξικότητας, δηλώνουν ότι τα Υ.Α.Ε. χουμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της κομποστοποίησης (Paredes et al. 2000).

Το προϊόν συγκομποστοποίησης υγρού αποβλήτου ελαιοτριβείων με υπολείμματα βάμβακος δοκιμάστηκε σε διάφορα φυτά και οι αποδόσεις συγκρίθηκαν με αυτές της χημικής λίπανσης. Στην καλλιέργεια του κριθαριού οι αποδόσεις της χημικής λίπανσης ήταν υψηλότερες, ενώ αντίθετα στη σίκαλη το κομπόστ έδωσε τις υψηλότερες αποδόσεις. Σε άλλες καλλιέργειες (όπως του μαρουλιού) οι διαφορές μεταξύ των δύο επεμβάσεων

δεν ήταν σημαντικές. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι τέτοια προϊόντα μπορούν να αντικαταστήσουν επιτυχώς τη χημική λίπανση (Cegarra et al. 1996).

Μελετήθηκε επίσης η δυνατότητα συγκομποστοποίησης Υ.Α.Ε. με εκχυλισμένο ελαιοπυρήνα ως στερεό υπόστρωμα. Κατά την πειραματική διαδικασία η διατήρηση της υγρασίας του σωρού στη θερμοφιλή φάση γίνονταν με συνεχή προσθήκη του υγρού αποβλήτου. Με τον τρόπο αυτό η θερμοφιλή φάση παρατείνεται, αφού συνεχώς προστίθεται οργανική ουσία. Με τη μέθοδο αυτή μια σημαντική ποσότητα αποβλήτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή κομπόστ, όπου η οργανική ουσία του αποβλήτου αποτελεί υπόστρωμα για τους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται στην παρατεταμένη θερμοφιλή φάση ενώ το νερό του αποβλήτου γρήγορα εξατμίζεται λόγω των υψηλών θερμοκρασιών (Μάρη 2000).

Η κομποστοποίηση ως μέθοδος διαχείρισης γεωργικών υπολειμμάτων έχει πολλά πλεονεκτήματα, διότι οδηγεί σε ένα προϊόν το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη γεωργία ως βελτιωτικό εδάφους με υψηλή μάλιστα τιμή. Επιπλέον το κόστος εγκατάστασης και λειτουργίας μιας μονάδας κομποστοποίησης είναι χαμηλό, ενώ ταυτόχρονα αποτελεί μια φυσική διαδικασία φιλική προς το περιβάλλον.

3.3. 4. Αναερόβια βιολογική επεξεργασία

Κατά την αναερόβια βιολογική επεξεργασία οργανικών αποβλήτων οι μικροοργανισμοί διασπούν τις οργανικές ενώσεις απουσία του O_2 και παράγουν μεταξύ των τελικών προϊόντων CO_2 και CH_4 (για το λόγο αυτό συχνά η αναερόβια βιολογική επεξεργασία αναφέρεται και ως βιομεθανοποίηση). Η διεργασία αυτή πραγματοποιείται σε διάφορα στάδια με τη συμμετοχή διαφόρων βακτηριακών ομάδων. Σε πρώτη φάση (υδρόλυση), τα βακτήρια, αποικοδομούν υδρολυτικά τις οργανικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους σε μικρότερα μόρια (σάκχαρα, αμινοξέα κ.α.). Οι ενώσεις αυτές στη συνέχεια ζυμώνονται σε προϊόντα όπως γαλακτικό, προπιονικό, οξικό, βουτυρικό, βαλερικό οξύ και αιθανόλη κ.α. (οξεογένεση). Ακολουθεί η παραγωγή οξικού οξέος από τα προϊόντα του προηγούμενου σταδίου, το οποίο μετατρέπεται τελικά σε CH_4 από τα μεθανογόνα βακτήρια.

Θεωρητικά, το 80% των οργανικών ουσιών που περιέχονται στα Υ.Α.Ε. μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αναερόβια βιολογική επεξεργασία αποδίδοντας $37 \text{ m}^3 \text{ CH}_4$ ανά m^3 αποβλήτου, που αντιστοιχεί σε 325 KwH ενέργειας, από την οποία το 30% μπορεί να

αποδοθεί ως ηλεκτρική και το 63% ως θερμική (Fiestas Ros de Ursinos & Borja-Padilla 1996). Για την αναερόβια επεξεργασία των αποβλήτων ελαιοτριβείων έχουν προταθεί διάφορες μέθοδοι με κυριότερες τις ακόλουθες (Rozzi & Malpei 1996, Hamdi 1996):

i) Anaerobic contact process: Στο σύστημα αυτό χρησιμοποιείται αναερόβιος ζυμωτήρας στον οποίο ανακυκλώνεται ενεργή μικροβιακή βιομάζα ώστε να αποφεύγεται η έκπλυση των μικροοργανισμών. Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνονται αποδόσεις 80-85% σε απομάκρυνση του COD, ενώ το οργανικό φορτίο που μπορεί να δεχθεί ένας βιοαντιδραστήρας του τύπου αυτού κυμαίνεται σε 2-4 kg COD m⁻³ημέρα⁻¹ με υδραυλικό χρόνο παραμονής 20-25 ημέρες.

ii) UASB (upflow anaerobic sludge blanket): όπου η είσοδος του αποβλήτου γίνεται από τον πυθμένα, και αφού αυτό διαπεράσει ένα στρώμα βιολογικής λάσπης (της οποίας η συγκέντρωση είναι υψηλή στον πυθμένα και μειώνεται βαθμιαία όσο ανεβαίνουμε προς την επιφάνεια, λόγω καθίζησης των συσσωματωμάτων που σχηματίζει) εξέρχεται από το άνω μέρος. Η ανάδευση δεν γίνεται μηχανικά αλλά μόνο μέσω των αερίων που παράγονται καθώς και από την ανοδική κίνηση του ρεύματος του υγρού. Με αυτό τον τύπο βιοαντιδραστήρα είναι δυνατή η επεξεργασία έως και 15 kg COD m⁻³day⁻¹ με απόδοση 70-75% σε απομάκρυνση COD. Κατά την έναρξη της λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα πρέπει να χρησιμοποιηθεί απόβλητο σε ακόμα μεγαλύτερη αραιώση (5 kg COD m⁻³) του οποίου η συγκέντρωση μπορεί να αυξάνεται στη συνέχεια σταδιακά (με ρυθμό 2,5 kg COD m⁻³).

iii) Anaerobic filters: Ο βιοαντιδραστήρας στην περίπτωση αυτή πληρώνεται με κάποιο υλικό το οποίο θα αποτελέσει μέσο στήριξης της βιομάζας. Τα βακτήρια που εγκαθίστανται στο υλικό πλήρωσης σχηματίζουν με αυτό τον τρόπο ένα βιολογικό στρώμα κυττάρων (film). Με τη χρήση προσαρμοσμένης βιομάζας ο βιοαντιδραστήρας μπορεί να λειτουργήσει με απόδοση 60-65% σε χρόνο μικρότερο της μίας εβδομάδας και να δέχεται φορτίο 9-18 kg COD m⁻³day⁻¹.

Στην Ελλάδα, έχουν γίνει μελέτες για τη δυνατότητα εφαρμογής της αναερόβιας χώνευσης των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων και έχει λειτουργήσει πιλοτική μονάδα στην περιοχή Πεζών Ηρακλείου (Γεωργακάκης 1989) καθώς και σε φυγοκεντρικό ελαιοουργείο στα Καλύβια Αττικής (Νταλής 1989).

Η ανάγκη για μεγάλους χρόνους παραμονής και για αραιώση των αποβλήτων ελαιοτριβείων προκειμένου αυτά να επεξεργαστούν με τη μέθοδο της αναερόβιας ζύμωσης οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην τοξικότητα που παρουσιάζουν τα απόβλητα

αυτά στους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στη διαδικασία. Αναφέρεται ότι τα οξεογόνα βακτήρια παρουσιάζουν ευαισθησία σε συγκεντρώσεις καφεϊκού μεγαλύτερες από 0,25 kg / m³ ενώ τα μεθανογόνα είναι ευαίσθητα σε συγκεντρώσεις καφεϊκού, κουμαρικού και φερουλικού μεγαλύτερες από 0,12 kg / m³ (Fiestas Ros de Ursinos & Borja-Padilla 1996). Για το λόγο αυτό πολλοί ερευνητές ασχολήθηκαν με μεθόδους προεπεξεργασίας του αποβλήτου (κυρίως με αερόβιες βιολογικές μεθόδους) για να μειωθεί το τοξικό κλάσμα των φαινολικών καθώς και το COD ώστε το απόβλητο να γίνει δεκτικότερο στην αναερόβια επεξεργασία.

Για την αερόβια προεπεξεργασία του αποβλήτου προκειμένου αυτό να υποστεί στη συνέχεια αναερόβια επεξεργασία, έχει δοκιμαστεί ο μύκητας *Aspergillus terreus*. Μετά την αερόβια επεξεργασία παρατηρήθηκε 71,2% μείωση της βιοτοξικότητας, 77,9% μείωση των φαινολικών και κατά την αναερόβια επεξεργασία η απόδοση σε CH₄ ήταν κατά 23% υψηλότερη σε σχέση με το μη επεξεργασμένο απόβλητο (Borja et al. 1995).

Η προεπεξεργασία του αποβλήτου πριν την αναερόβια επεξεργασία από μικροοργανισμούς όπως τα *Geotrichum candidum*, *Azotobacter chroococcum* και *Aspergillus terreus* έχει επίσης θετικά αποτελέσματα τα οποία αποδόθηκαν στη μείωση των φαινολικών (Borja et al. 1998).

Τέλος χρησιμοποιήθηκαν και χημικές μέθοδοι για την προεπεξεργασία του αποβλήτου όπως η οζόνωση η οποία μειώνει τη συγκέντρωση των φαινολικών και οδηγεί στην αύξηση της απόδοσης μεθανίου (Benitez et al. 1997b).

Συνοψίζοντας μπορούμε να πούμε ότι τα πλεονεκτήματα της αναερόβιας ζύμωσης σε σχέση με την αερόβια είναι η μικρή ποσότητα λάσπης που προκύπτει και η παραγωγή βιοαερίου (CH₄+CO₂) το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ενέργειας. Επιπλέον, η εποχιακή παραγωγή του αποβλήτου δεν αποτελεί σημαντικό πρόβλημα στην λειτουργία της αναερόβιας μονάδας επεξεργασίας διότι αυτή μπορεί εύκολα να επαναλειτουργήσει μετά από αρκετούς μήνες διακοπής. Στα μειονεκτήματα της μεθόδου μπορούν να αναφερθούν το υψηλό κόστος της εγκατάστασης (ιδιαίτερα αντιοικονομικό για μικρού μεγέθους μονάδες), ο μεγάλος χρόνος παραμονής του αποβλήτου στο βιοαντιδραστήρα, η ανάγκη για αερόβια προεπεξεργασία (ώστε να μειωθεί το κλάσμα των φαινολικών ουσιών τα οποία σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι τοξικά για τα μεθανογόνα βακτήρια) και τέλος η ανάγκη για επιπλέον επεξεργασία του τελικού προϊόντος.

3.4. Εφαρμογή των Υ.Α.Ε. στο έδαφος

Η εναπόθεση αποβλήτων στο έδαφος, αποτελεί μια από τις παλαιότερες μεθόδους διαχείρισης αποβλήτων και βασίζεται στην τεράστια ικανότητα των εδαφών για βιοαποικοδόμηση. Η γη αποτελεί ένα γιγαντιαίο σύστημα βιοαποικοδόμησης το οποίο εξελίσσεται κατά τη διάρκεια εκατομμυρίων ετών και έχει τη δυνατότητα να αποικοδομεί ζωικά και φυτικά υπολείμματα ώστε αυτά να αποτελέσουν τελικά μέρος του εδάφους. Η διάθεση οργανικών αποβλήτων στο έδαφος μπορεί να εξυπηρετήσει δύο στόχους: την απομάκρυνσή τους και την ταυτόχρονη ανακύκλωση των συστατικών τους.

Τα απόβλητα, για να είναι κατάλληλα για εφαρμογή στο έδαφος πρέπει να συνδυάζουν διάφορα χαρακτηριστικά όπως: 1) να είναι βιοαποικοδομήσιμα, 2) όταν αυτά εναποτίθενται με λογικούς και πρακτικά εφαρμόσιμους ρυθμούς στο έδαφος, οι μικροοργανισμοί να επιζούν και να είναι μεταβολικά δραστήριοι, 3) να μη συσσωρεύονται ή να μην προσροφώνται στο έδαφος υπολείμματα που να εμφανίζουν μακροχρόνιες τοξικές δράσεις, 4) δεν θα πρέπει να προκαλούν ρύπανση στα υπόγεια ύδατα ούτε να εισέρχονται τοξικές ουσίες στην τροφική αλυσίδα, (ο τύπος δηλ. της διάθεσης των αποβλήτων θα πρέπει να μείνει περιβαλλοντικά ασφαλής), 5) το κόστος της διαχείρισης των αποβλήτων με εφαρμογή στη γη θα πρέπει να βρίσκεται σε λογικά όρια σε σχέση με τις άλλες εναλλακτικές μεθόδους διαχείρισης και 6) η εφαρμογή των αποβλήτων στη γη θα πρέπει να αφήσει το έδαφος στο ίδιο ή σε καλύτερο παραγωγικό επίπεδο (Cabrera et al. 1996).

3.4.1. Επίδραση των Υ.Α.Ε. στις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους

Η δυνατότητα εφαρμογής και αποικοδόμησης των Υ.Α.Ε. μελετήθηκε σε έδαφος τοποθετημένο σε κιβώτια το οποίο δέχονταν τα απόβλητα για χρονικό διάστημα τριών ετών. Τα εδαφικά δείγματα καθώς και τα υγρά έκπλυσης ελέγχθηκαν ως προς τις μεταβολές διαφόρων δεικτών (pH, αγωγιμότητα, I.A.K., οργανική ουσία, συγκεντρώσεις διαφόρων ιόντων κ.ά.). και φάνηκε ότι το έδαφος είναι πολύ αποτελεσματικό στη μείωση του οργανικού και ανόργανου φορτίου των Υ.Α.Ε. Επιπλέον αυξήθηκε η γονιμότητα του εδάφους σε βάθος 0-50 cm. Επειδή είναι πιθανή κάποια έκπλυση ιόντων Na^+ και NO_3^- σε βάθος μεγαλύτερο του 1 m και συνεπώς ενδέχεται να εισχωρήσουν τα ιόντα αυτά στον υδροφόρο ορίζοντα, θα πρέπει να δοθεί προσοχή στις υδρο-γεωλογικές συνθήκες του εδάφους. Η διάθεση των Υ.Α.Ε. σε εδάφη με μικρή περατότητα είναι μια αρκετά

πρακτική εφαρμογή για τη διάθεση των Υ.Α.Ε., τόσο οικονομικά όσο και τεχνικά (Cabrera et al. 1996).

Μελετήθηκε επίσης η μεταβολή στις φυσικοχημικές ιδιότητες εδάφους το οποίο δέχονταν ανεπεξέργαστα Υ.Α.Ε. Διαπιστώθηκε αύξηση στην αγωγιμότητα από 0,37 mS/cm σε 1,27 mS/cm κατά το χρονικό διάστημα των εφαρμογών του αποβλήτου (και η παράμετρος αυτή συνδέθηκε με τη μείωση της βλαστικότητα των σπόρων). Στη συνέχεια η αγωγιμότητα μειώθηκε στα 0,82 mS/cm και 0,57 mS/cm σε χρονικό διάστημα 16 και 71 ημερών μετά το τέλος της διάθεσης των Υ.Α.Ε. στο έδαφος αντίστοιχα. Επίσης αυξήθηκε σημαντικά η ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων (I.A.K.), καθώς και η περιεκτικότητα σε Na, Mg και ιδιαίτερα σε K, το οποίο έχει ευεργετική επίδραση στη γονιμότητα των εδαφών. Επίσης παρατηρήθηκε αύξηση στον οργανικό άνθρακα και στο συνολικό άζωτο του εδάφους ενώ η αναλογία C/N αυξήθηκε κατά 30-40% (λόγω του υψηλού λόγου C/N του αποβλήτου). Τέλος, το pH έμεινε πρακτικά αμετάβλητο (παρά την όξινη αντίδραση του αποβλήτου) (Paredes et al. 1987). Παρατηρήθηκε επίσης σε έδαφος που δέχονταν συνεχείς προσθήκες Υ.Α.Ε., αύξηση του οργανικού άνθρακα και του ολικού αζώτου, μείωση του νιτρικού και αμμωνιακού αζώτου και αύξηση στο pH και την αγωγιμότητα (Χατζηπαυλίδης 1999).

Ένα μήνα μετά τη διάθεση των Υ.Α.Ε. στο έδαφος, παρατηρήθηκε αύξηση στις ολικές φαινόλες, σάκχαρα και πρωτεΐνες καθώς και μικρή αύξηση του pH. Μετά την πάροδο έξι μηνών από τη διάθεση των Υ.Α.Ε. στο έδαφος, οι τιμές αυτές μειώθηκαν σημαντικά και αυτό υποδηλώνει ενεργή βιοαποικοδόμηση της οργανικής ουσίας από τους μικροοργανισμούς (Tardioli et al. 1997).

Επίσης τα Υ.Α.Ε. επιδρούν και στο πορώδες του εδάφους. Έτσι, όταν εφαρμόστηκαν Υ.Α.Ε. στο έδαφος, λόγω της συνδυασμένης δράσης της οργανικής ουσίας και των αλάτων που περιέχονται στα απόβλητα, μειώθηκε το ποσοστό των πόρων μεγάλης διαμέτρου ($r > 0,1 \mu\text{m}$) και αυξήθηκε το ποσοστό των πόρων μικρής διαμέτρου ($r < 0,1 \mu\text{m}$). Με βάση τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύεται το ενδεχόμενο χρησιμοποίησης των Υ.Α.Ε. στο έδαφος, για μείωση της έκπλυσης ξενοβιοτικών ουσιών (π.χ. αγροχημικά) προς τον υδροφόρο ορίζοντα (Cox et al. 1997).

3.4.2. Επίδραση των Υ.Α.Ε στους μικροοργανισμούς του εδάφους

Η προσθήκη Υ.Α.Ε. στο έδαφος, έχει ως συνέπεια τη μεταβολή τόσο του μεγέθους όσο και της σύστασης του πληθυσμού των μικροοργανισμών. Έτσι, μετά την προσθήκη των αποβλήτων, παρατηρήθηκε αύξηση κατά 20 φορές στον αριθμό των βιώσιμων αναπαραγωγικών μονάδων (c.f.u.) των μικροοργανισμών και μεταβολή στην αναλογία με την οποία εμφανίζονται οι διάφοροι πληθυσμοί στο έδαφος. Συγκεκριμένα, στο έδαφος που δέχονταν τα απόβλητα αυξήθηκε το ποσοστό του πληθυσμού των κορινόμορφων βακτηρίων και μειώθηκε το ποσοστό του πληθυσμού του γένους *Bacillus* το οποίο κυριαρχούσε στο έδαφος-μάρτυρα (το οποίο δεν είχε υποστεί επεξεργασία με απόβλητα). Όταν σταμάτησαν οι εφαρμογές των αποβλήτων οι μικροβιακοί πληθυσμοί έτειναν να επανέλθουν στην αρχική τους κατάσταση. Επιπλέον η αύξηση του αριθμού των εντεροβακτηρίων στο έδαφος που δέχονταν απόβλητο, παρ' όλο που αυτά αποδείχθηκαν ευαίσθητα στα Υ.Α.Ε., αναδεικνύει την πιθανή ύπαρξη και άλλων παραγόντων οι οποίοι σχετίζονται με την «επιλογή» των μικροοργανισμών στο έδαφος (Paredes et al. 1986). Αύξηση του ολικού πληθυσμού των βακτηρίων με ιδιαίτερη ενίσχυση στους πληθυσμούς των φαινολυτικών και αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών παρατηρήθηκε επίσης σε έδαφος που δέχονταν Υ.Α.Ε. (Χατζηπαυλίδης 1999).

Τα βακτήρια που απομονώθηκαν από έδαφος το οποίο δέχονταν Υ.Α.Ε., όταν καλλιεργήθηκαν στο απόβλητο παρουσίασαν διαφορετική ευαισθησία. Τα ανθεκτικότερα βακτήρια ανήκαν στο γένος *Acinetobacter*. Τα εντεροβακτήρια τα κορινόμορφα βακτήρια και τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* εκδήλωσαν μέτρια ευαισθησία, ενώ τα πιο ευαίσθητα στελέχη ανήκαν στο γένος *Bacillus* (Moreno et al. 1990). Επίσης διαπιστώθηκε ότι τα εκχυλίσματα των Υ.Α.Ε. σε διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες (στους οποίους παραλαμβάνονταν διάφορες φαινολικές ενώσεις) είχαν βακτηριοστατικές ιδιότητες έναντι του *Bacillus megaterium* ATCC 33085, παρεμποδίζοντας τη βλάστηση και το σχηματισμό ενδοσπορίων (Rodriguez et al. 1988).

Η επίδραση των Υ.Α.Ε. συνολικά καθώς η επίδραση των διαφόρων φαινολικών ουσιών που περιέχονται στα απόβλητα χωριστά, μελετήθηκε σε δύο φυτοπαθογόνα βακτήρια, τα *Pseudomonas syringae p.v. savastanoi* (Gram -) και στο *Corynebacterium michiganense* (Gram +). Τα Υ.Α.Ε. εμφάνισαν έντονες βακτηριοστατικές ιδιότητες και στα δύο παθογόνα. Από τις κυριότερες φαινόλες του αποβλήτου που μελετήθηκαν χωριστά, η μεθυλ-κατεχόλη ήταν τοξική στο *P. savastanoi* και λιγότερο δραστική στο *C.*

michiganense ενώ οι υπόλοιπες φαινόλες ήταν ακόμα λιγότερο δραστικές ή αδρανείς. Από τα παράγωγα των φαινολικών ουσιών η ο-κινόνη ήταν ιδιαίτερα τοξική και στα δύο είδη, ενώ οι ακετυλ-κατεχόλη και γουαιακόλη ήταν τοξικές μόνο στο *P. savastanoi*. Η μη επιλεκτική τοξικότητα που εμφάνισε το αρχικό απόβλητο στα δύο βακτήρια (ακόμα και σε αραιώση 1: 4 αποδόθηκε στο πολυμερές υδρόφιλο κλάσμα της κατεχολ-μελανίνης ή στην πιθανή ύπαρξη συνεργιστικής δράσης μεταξύ των μονομερών φαινολικών ουσιών και άλλων ανόργανων και οργανικών ουσιών (Capasso et al. 1995).

Μελετήθηκε επίσης η επίδραση που έχει στους πληθυσμούς των μυκήτων η εφαρμογή των Υ.Α.Ε. στο έδαφος. Παρατηρήθηκε ότι πριν την επεξεργασία του εδάφους με Υ.Α.Ε. κυριαρχούσε το γένος *Scopulariopsis* και σε μικρότερους αριθμούς τα γένη *Penicillium* και *Cladosporium*. Μετά την εφαρμογή των αποβλήτων, οι πληθυσμοί των γενών *Scopulariopsis* και *Cladosporium* μειώθηκαν σημαντικά, το γένος *Penicillium* κυριάρχησε ενώ εμφανίστηκαν και άλλα γένη όπως τα *Geotrichum* και *Aspergillus*. Ένα μήνα μετά την επεξεργασία του εδάφους με το απόβλητο παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού όλων των ομάδων των μικροοργανισμών (μύκητες, ζύμες και βακτήρια), ενώ έξι μήνες μετά οι πληθυσμοί των διαφόρων κατηγοριών είχαν επανέλθει στην αρχική κατάσταση (Tardioli et al. 1997). Μείωση στον πληθυσμό φυτοπαθογόνων μυκήτων των γενών *Pythium* και *Phytophthora* παρατηρήθηκε σε έδαφος που δέχθηκε Υ.Α.Ε. Οι μύκητες αυτοί παρεμποδίζονταν από το απόβλητο, αλλά ταυτόχρονα θεωρήθηκαν και άλλοι βιολογικοί παράγοντες υπεύθυνοι για τη μείωση του πληθυσμού τους (Φλουρή και άλλοι 1988).

Μεταξύ των μικροοργανισμών που ευνοούνται από την εφαρμογή των Υ.Α.Ε. στο έδαφος είναι και τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια. Επειδή το απόβλητο χαρακτηρίζεται από πλούσιες πηγές C για τους μικροοργανισμούς ενώ αντίθετα είναι φτωχό σε N, προσφέρει ένα ιδιαίτερα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη των ελεύθερα διαβιούντων αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών. Έτσι, οι επαναλαμβανόμενες προσθήκες αποβλήτου στο έδαφος οδηγούν προοδευτικά στον εμπλουτισμό του με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, κυρίως με μέλη του γένους *Azotobacter* (Balis et al. 1996). Μελετήθηκε η αύξηση και η δραστηριότητα της νιτρογενάσης του *Azotobacter vinelandii* όταν αυτό καλλιεργήθηκε σε εδαφικά εκχυλίσματα στα οποία προστέθηκαν οι φαινολικές ενώσεις p-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ, βανιλικό οξύ, p-κουμαρικό οξύ και φερουλικό οξύ. Παρατηρήθηκε αζωτοδέσμευση μόνο στην περίπτωση του p-υδροξυβενζοϊκού οξέος (στο έδαφος-μάρτυρα, χωρίς την προσθήκη φαινολικών δεν ανιχνεύτηκε δραστηριότητα της

νιτρογενάσης) υποδηλώνοντας ότι η ένωση αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή C από το *A. vinelandii* (Moreno et al. 1990). Κατά τη μελέτη της επίδρασης των Υ.Α.Ε. στην αζωτοδεσμευτική ικανότητα των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων του γένους *Azotobacter chroococcum* διαπιστώθηκε ότι η εφαρμογή αραιωμένων Υ.Α.Ε. σε γεωργικά εδάφη δεν είχε αρνητική επίδραση στους ελεύθερα διαβιούντες αζωτοδεσμευτικούς μικροοργανισμούς. Η δραστηριότητα της νιτρογενάσης δεν επηρεάστηκε και σε ορισμένες περιπτώσεις ενεργοποιήθηκε. Τα βακτήρια του γένους *Azotobacter* μπορούσαν όχι μόνο να αζωτοδεσμεύουν σε εδάφη που έχουν δεχθεί το απόβλητο, αλλά και να μεταβολίζουν φαινολικά οξέα (Garcia-Barrionuevo et al. 1992).

Η διεγερτική επίδραση των Υ.Α.Ε. στη βιολογική δραστηριότητα των βακτηρίων του γένους *Azotobacter* μπορεί να αποδειχθεί ευεργετική στη συνολική οικονομία του αζώτου στο έδαφος αλλά και στην ανάπτυξη των φυτών αφού η αζωτοδέσμευση από τους ελεύθερα διαβιούντες αζωτοδεσμευτικούς μικροοργανισμούς έχει συνδεθεί με θετικές επιδράσεις στην ανάπτυξη των φυτών.

3.4.3. Επίδραση των Υ.Α.Ε. στα φυτά

Όσο αφορά την επίδραση των Υ.Α.Ε. στα φυτά, από πολύ νωρίς παρατηρήθηκαν οι έντονες φυτοτοξικές ιδιότητες που παρουσιάζουν τα απόβλητα, οι οποίες όμως εξαφανίζονται μετά από την πάροδο κάποιου χρονικού διαστήματος από την εφαρμογή. Οι φυτοτοξικές ιδιότητες των ανεπεξέργαστων αποβλήτων όταν αυτά έρχονται απ' ευθείας σε επαφή με τις ρίζες των φυτών είναι τόσο έντονες ώστε να έχει προταθεί από κάποιους ερευνητές η χρήση τους ως «φυσικό ζιζανιοκτόνο», αποτελώντας μία μέθοδο για τον έλεγχο των ζιζανίων (Bonari et al. 1993). Μετά από πειράματα μεγάλης χρονικής διάρκειας φάνηκε ότι το απόβλητο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ορισμένες καλλιέργειες χωρίς καμία φυτοτοξική δράση. Η εμφάνιση και ο βαθμός πιθανής φυτοτοξικότητας από τις επεμβάσεις με Υ.Α.Ε. στο έδαφος, εξαρτώνται από την ποσότητα του αποβλήτου που χρησιμοποιείται και το χρόνο ο οποίος μεσολαβεί μεταξύ της εφαρμογής και της σποράς. Αποδείχθηκε ότι η μεσολάβηση χρονικού διαστήματος 60 ημερών μεταξύ εφαρμογής των Υ.Α.Ε. στο έδαφος και σποράς είναι αρκετό για δόσεις αποβλήτου 40-80 m⁻³ha⁻¹ (Bonari et al. 1993).

Για την άμεση εφαρμογή αποβλήτου σε καλλιέργειες θα πρέπει πρώτα αυτό να υποστεί μικροβιακή επεξεργασία για τη μείωση του ρυπαντικού του φορτίου το οποίο

είναι υπεύθυνο για την εκδήλωση των συμπτωμάτων της φυτοτοξικότητας. Έτσι, χρησιμοποιήθηκε απόβλητο με προσθήκη N και Mg ως υπόστρωμα για την καλλιέργεια στελέχους του *Aspergillus niger*. Στη συνέχεια, το επεξεργασμένο με το μύκητα προϊόν, δοκιμάστηκε σε μυκοριζικά και μη φυτά τριφυλλιού. Παρατηρήθηκε ότι ενώ η προσθήκη ανεπεξέργαστου αποβλήτου έδινε μειωμένες αποδόσεις σε σχέση με τον μάρτυρα, το επεξεργασμένο μικροβιακά απόβλητο αύξησε σημαντικά τις αποδόσεις. (Vassilev et al. 1998).

Με τη λογική της χρησιμοποίησης των Υ.Α.Ε. άμεσα σε καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε στέλεχος του γένους *Azotobacter vinelandii* για την αερόβια προεπεξεργασία και στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση του προϊόντος σε ελαιόδεντρα, αμπέλια και πατάτα. Τα αποτελέσματα της εφαρμογής του επεξεργασμένου αποβλήτου στις καλλιέργειες αυτές ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αφού το προϊόν έδωσε εξίσου καλά αποτελέσματα με τη χημική λίπανση ή και καλύτερα, ενώ ακόμα μεγαλύτερες ήταν οι διαφορές με το έδαφος-μάρτυρα (χωρίς καμίας μορφής λίπανση) (Chatjipavlidis et al. 1996).

4. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΦΥΣΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

4.1. Δείγματα εδάφους

4.1.1. Προέλευση εδαφικών δειγμάτων

Το έδαφος που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα προέρχονταν από την περιοχή Βελίκα του νομού Μεσσηνίας από αγρό ο οποίος βρισκόταν σε αγρανάπωση. Παραλήφθηκε μόνο επιφανειακό έδαφος, το οποίο φυλάχτηκε σε υπαίθριο χώρο καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

4.1.2. Εδαφολογική ανάλυση

4.1.2.1. Μηχανική σύσταση

Το έδαφος που χρησιμοποιήθηκε είχε την εξής σωματιδιακή σύσταση (ανάλυση από το Περιφερειακό Εργαστήριο Γεωργικών Εφαρμογών και Αναλύσεως Λιπασμάτων-ΠΕΓΕΑΛ- Ξυλοκάστρου):

Άμμος 39 %

Ιλύς 49 %

Άργιλος 12%

Με βάση το τριγωνικό διάγραμμα ταξινόμησης της εδαφικής υφής (Σχήμα 1.1) το έδαφος χαρακτηρίζεται ως μέσης σύστασης – πηλώδες. Σε όλους τους χειρισμούς χρησιμοποιήθηκε κλάσμα με διάμετρο κόκκων μικρότερο των 4 mm.

4.1.2.2. Χημική ανάλυση

Στον Πίνακα 4.1 παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης του εδάφους η οποία πραγματοποιήθηκε από το ΠΕΓΕΑΛ Ξυλοκάστρου.

Πίνακας 4.1: Ανάλυση του εδάφους που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες.

ΕΝΕΡΓΟ ΑΝΘΡΑΚΙΚΟ ΑΣΒΕΣΤΙΟ (%)	ΙΧΝΗ	ΑΦΟΜΟΙΩΣΙΜΟΣ ΦΩΣΦΟΡΟΣ (ppm)	>40
pH	7,7	ΝΙΤΡΙΚΑ (NO ₃)	26
ΗΛΕΚΤΡΙΚΗ ΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ (mS/cm/25 ⁰ C)	1,58	<u>ΑΝΤΑΛΛΑΞΙΜΑ ΚΑΤΙΟΝΤΑ (meq/100gr)</u>	
ΥΔΑΤΟΚΟΡΕΣΜΟΣ (S.P.) (%)	46	ΑΝΤΑΛΛΑΞΙΜΟ ΑΣΒΕΣΤΙΟ	15,23
<u>ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΑ ΚΑΤΙΟΝΤΑ (meq/l)</u>		ΑΝΤΑΛΛΑΞΙΜΟ ΜΑΓΝΗΣΙΟ	1,46
ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΟ ΚΑΛΙΟ	3,59	ΑΝΤΑΛΛΑΞΙΜΟ ΚΑΛΙΟ	0,76
ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΟ ΜΑΓΝΗΣΙΟ	2,23	ΑΝΤΑΛΛΑΞΙΜΟ ΝΑΤΡΙΟ	0,6

4.1.3. Μέθοδοι εδαφικών αναλύσεων**4.1.3.1. Υγρασία**

Η υγρασία προσδιορίστηκε με ξήρανση εδαφικού δείγματος στους 105⁰C για 24 ώρες βάσει της απώλειας βάρους των εδαφικών δειγμάτων. Σε κάθε περίπτωση πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις.

4.1.3.2. Υδατοϊκανότητα

Η υδατοϊκανότητα προσδιορίστηκε σύμφωνα με την ακόλουθη μέθοδο (Αλεξιάδης 1976): Προζυγίστηκε πλαστικό δοχείο του οποίου η κάτω επιφάνεια ήταν διάτρητη ενώ στο εσωτερικό του είχε τοποθετηθεί διηθητικό χαρτί κορεσμένο με νερό. Στο δοχείο μεταφέρθηκε συγκεκριμένη ποσότητα εδάφους γνωστής υγρασίας και βυθίστηκε σε λεκάνη με νερό ώστε η επιφάνεια του υγρού να φθάσει στο μέσο του ύψους της εδαφικής επιφάνειας. Το όλο σύστημα αφέθηκε για 24 ώρες σε ηρεμία και ακολούθησε στράγγιση για μία ώρα. Με επαναζύγιση υπολογίστηκε το νερό που απορροφήθηκε από το έδαφος και μαζί με την αρχική υγρασία αποτελεί το 100% της υδατοϊκανότητας. Με αναγωγή υπολογίστηκε η υγρασία του δείγματος που αντιστοιχεί στο 60% της υδατοϊκανότητας. Σε κάθε περίπτωση πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις.

4.1.3.3. pH

Το pH προσδιορίστηκε σε έδαφος που δέχθηκε απιονισμένο νερό έως ότου γίνει πάστα κορεσμού ενώ στα υγρά ο προσδιορισμός του pH έγινε με απ' ευθείας βύθιση του ηλεκτρόδιου του pHμέτρου (Brady & Weil, 1996).

4.1.3.4. Αγωγιμότητα

Για τον προσδιορισμό της αγωγιμότητας, 40g ξηρού βάρους εδάφους διαλύθηκαν σε 200 ml απιονισμένο νερό (1:5 αραίωση) και στη συνέχεια ακολούθησε ανάδευση για 2 ώρες. Η αγωγιμότητα μετρήθηκε στο υπερκείμενο υγρό μετά από φυγοκέντρωση στις 5.000 στρ. / λεπτό για 20 λεπτά. Η αγωγιμότητα στα υγρά μετρήθηκε με απ' ευθείας βύθιση του ηλεκτροδίου του αγωγιμόμετρου (Rowell, 1994).

4.1.3.5. Φυτοτοξικότητα

Για την εκτίμηση της φυτοτοξικότητας του εδάφους χρησιμοποιήθηκαν οι εξής μέθοδοι:

4.1.3.5.1. Σε σπόρους κάρδαμου : (τροποποιημένη μέθοδος Zucconi et al. 1981).

Σε τρυβλία τοποθετήθηκαν 5 φύλλα διηθητικού χαρτιού τα οποία εμποτίστηκαν έως τον κορεσμό με εδαφικό διάλυμα από τον κάθε χειρισμό (χρησιμοποιήθηκαν 5 ml από το διάλυμα που περιγράφεται στην παρ. 4.1.3.4.). Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία των οποίων το διηθητικό χαρτί είχε εμποτιστεί με 5 ml νερό βρύσης. Επάνω στο χαρτί τοποθετούνται 25 σπόροι κάρδαμου (*Lepidium sativum*) και τα τρυβλία επώαστηκαν σε ατμόσφαιρα κορεσμένη με υδρατμούς στους 25⁰C για 48 ώρες (3 επαναλήψεις). Στο τέλος του χρόνου επώασης μετρήθηκαν τα μήκη των ριζιδίων των νεαρών φυταρίων καθώς και ο αριθμός των σπόρων που βλάστησαν. Η φυτοτοξικότητα εκφράστηκε από τον Ολικό Δείκτη Βλαστικότητας (Ο.Δ.Β.) στον οποίο εμπεριέχεται τόσο το μήκος των ριζιδίων όσο και το ποσοστό της βλαστικότητας εκφρασμένα ως ποσοστό επί του μάρτυρα.

Ολικός Δείκτης Βλαστικότητας - Ο.Δ.Β. (%) = μέσος όρος μήκους ριζιδίων
(ως ποσοστό του μάρτυρα) * βλαστικότητα (ως ποσοστό του μάρτυρα) / 100

4.1.3.5.2. Σε σπόρους μαρουλιού.

(i) Σε μικρά δοχεία με 40 g εδάφους από τον κάθε χειρισμό φυτεύτηκαν 15 σπόροι μαρουλιού και μετρήθηκε η βλαστικότητα (3 επαναλήψεις). Τα αποτελέσματα για τους τρεις χειρισμούς εκφράστηκαν ως ποσοστά βλαστικότητας, θεωρώντας ως 100% της βλαστικότητας τον αρχικό αριθμό των σπόρων που χρησιμοποιήθηκαν.

(ii) Σε γλάστρες με 900 g εδάφους από τους τρεις χειρισμούς (5 επαναλήψεις από κάθε χειρισμό), σε τρεις διαφορετικούς χρόνους: 45, 55 και 65 ημέρες μετά την τελευταία διάβρεξη με τα υγρά των χειρισμών μετρήθηκαν τα μήκη των ριζιδίων φυτών μαρουλιού (12 φυτά ανά γλάστρα), μετά από πάροδο χρόνου ανάπτυξης 25 ημερών. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως οι μέσοι όροι του μήκους ριζιδίων για κάθε χειρισμό.

Επίσης για τη διεξαγωγή συμπερασμάτων για τη φυτοτοξικότητα, χρησιμοποιήθηκαν οι μάρτυρες των τριών χειρισμών στους διάφορους χρόνους σποράς.

4. 2. Δείγματα υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων (Υ.Α.Ε.)

Ως Υ.Α.Ε. χρησιμοποιήθηκαν τα απόβλητα από φυγοκεντρικό ελαιοτριβείο της περιοχής Μεσσηνίας, τα οποία φυλάσσονταν σε καταψύκτη στους -20°C έτσι ώστε τα χαρακτηριστικά τους να διατηρούνται σταθερά. Στον Πίνακα 4.2 παρατίθεται ανάλυση των χημικών χαρακτηριστικών των αποβλήτων που χρησιμοποιήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Πίνακας 4.2: Χημική ανάλυση των Υ.Α.Ε. που χρησιμοποιήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων (Ehaliotis et al. 1999).

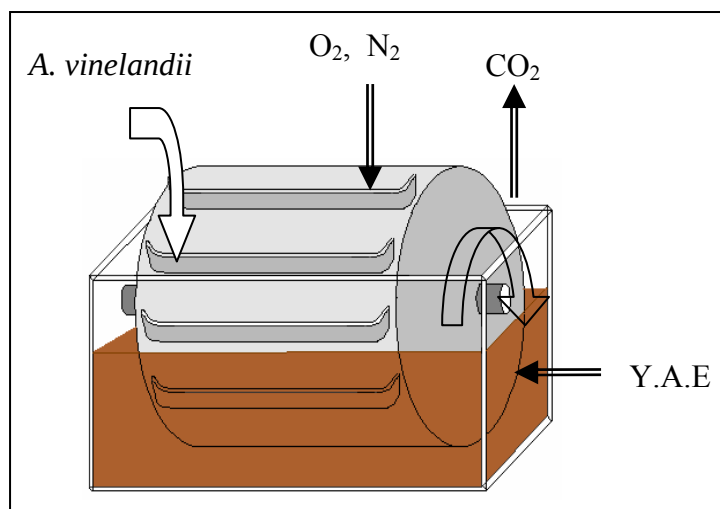
ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΟΥΣΙΑ (%)	6,7	NATPIO (mg/l)	75
C.O.D. (kg/t)	89	ΑΣΒΕΣΤΙΟ (mg/l)	340
pH	4,9	ΜΑΓΝΗΣΙΟ (mg/l)	330
ΗΛΕΚΤΡΙΚΗ ΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ (mS/cm/25 ⁰ C)	15	ΣΙΔΗΡΟΣ(mg/l)	69
ΟΛΙΚΟ ΑΖΩΤΟ (%)	0,11	ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΣ (mg/l)	5,9
ΚΑΛΙΟ (%)	0,85	ΜΑΓΓΑΝΙΟ (mg/l)	4,7
ΦΩΣΦΟΡΟΣ (%)	0,01	ΧΑΛΚΟΣ (mg/l)	1,5

4. 3. Δείγματα επεξεργασμένων αποβλήτων ελαιοτριβείων (Ε.Υ.Α.Ε.)

Ως Ε.Υ.Α.Ε. χρησιμοποιήθηκαν επεξεργασμένα απόβλητα ελαιοτριβείων που ειδικά για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας παράχθηκαν σε βιοαντιδραστήρα εργαστηριακών διαστάσεων με ενεργό όγκο 5,5 l (Σχήμα 4.1). Η διαδικασία της αερόβιας επεξεργασίας - βιομετροπής των Υ.Α.Ε. έχει εκτενώς αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Chatjipavlidis et al. 1996, Χατζηπαυλίδης, 1999, Ehaliotis et al. 1999, Papadeli et al. 1996), ωστόσο παρατίθεται με συντομία η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε:

Το απόβλητο τοποθετείται σε βιοαντιδραστήρα τύπου βιοτροχού και ρυθμίζεται το pH στο 8,0-8,5 με τη χρήση αιωρήματος CaO. Στη συνέχεια εμβολιάζεται με υγρή καλλιέργεια του βακτηρίου *A. vinelandii* ώστε η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων στο απόβλητο να είναι της τάξης του 10^5 κύτταρα /ml.

Ο προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων στο αρχικό εμβόλιο πραγματοποιούνταν με τη μέτρηση της οπτικής του πυκνότητας σε φασματοφωτόμετρο. Η πορεία της αερόβιας επεξεργασίας, η οποία διαρκούσε περίπου 5 ημέρες, ελέγχονταν με δοκιμές φυτοτοξικότητας και μέτρηση της αζωτοδεσμευτικής ικανότητας από το *Azotobacter vinelandii*. Η ποσότητα του υγρού που εξατμίζονταν με την πάροδο των ημερών, συμπληρώνονταν με νερό ώστε το τελικό προϊόν να αντιστοιχεί στον ίδιο όγκο με το αρχικό.



Σχήμα 4.1 Αναπαράσταση του εργαστηριακού βιοαντιδραστήρα

5. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1. Αναπνευστική δραστηριότητα

Για την εκτίμηση της αναπνευστικής δραστηριότητας χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτρολυτική μέθοδος που έχει περιγραφεί από τους Manios and Balis (1983). Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ποσοτική αναπλήρωση του οξυγόνου που καταναλίσκεται από τους ενεργούς μικροοργανισμούς του εδάφους, με οξυγόνο που παράγεται ηλεκτρολυτικά. Η ποσότητα του καταναλισκόμενου οξυγόνου μπορεί να εκτιμηθεί από τον όγκο του υδρογόνου που παράγεται κατά την ηλεκτρόλυση. Η σχηματική παράσταση μίας μονάδας ηλεκτρολυτικού αναπνευσμέτρου φαίνεται στο Σχήμα 5.1.

Οι όγκοι του υδρογόνου στην προχοΐδα επηρεάζονται από τη βαρομετρική πίεση B (mm Hg), τη θερμοκρασία του χώρου θ ($^{\circ}\text{C}$) και το ύψος h (cm) του διαλύματος H_2SO_4 . Κατά συνέπεια για να είναι συγκρίσιμοι, θα πρέπει να διορθωθούν και να αναχθούν σε όγκους κανονικών συνθηκών θερμοκρασίας και πίεσης (0°C και 760 mm Hg).

Οι διορθώσεις αυτές γίνονται εφαρμόζοντας τον τύπο:

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

Όπου: V_0 = ο διορθωμένος όγκος H_2

V = ο όγκος του H_2 (ml) στην προχοΐδα

B = η βαρομετρική πίεση τη στιγμή της ανάγνωσης

δ = η τάση ατμών του διαλύματος 0,2N H_2SO_4 (=17 mm Hg)

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

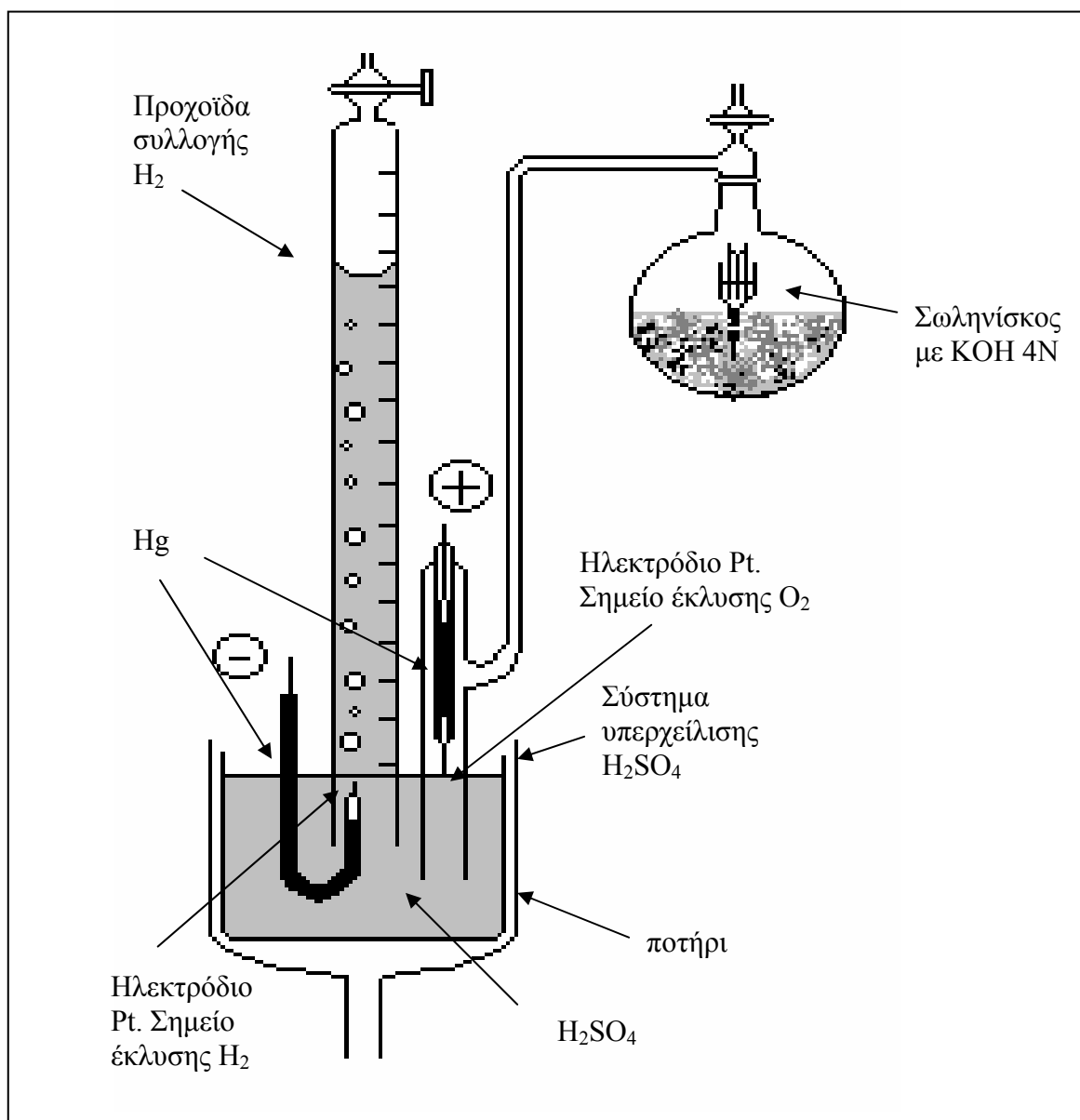
q = η πυκνότητα του διαλύματος 0,2N H_2SO_4 (=1,012 g/cm³)

d = η πυκνότητα Hg

P_0 = η κανονική ατμοσφαιρική πίεση

α = $1/273 = 0,00367$

θ = η θερμοκρασία του χώρου τη στιγμή της ανάγνωσης του V



Σχήμα 5.1: Σχηματική διάταξη ηλεκτρολυτικού αναπνευσμέτρου.

Τα εδαφικά δείγματα αμέσως μετά την κάθε διάβρεξη με το αντίστοιχο υγρό του χειρισμού (τα οποία βρίσκονταν στο 60% της υδατοϊκανότητας του εδάφους) μεταφέρθηκαν στις φιάλες του αναπνευσμέτρου. Η σχέση μεταξύ καταναλισκόμενου O_2 και χρόνου είναι γραμμική (ο συντελεστής συσχέτισης r^2 σε όλες τις περιπτώσεις βρέθηκε ίσος ή μεγαλύτερος του 0,99). Η κλίση της ευθείας, δίνει το ρυθμό της αναπνευστικής δραστηριότητας (σε ml O_2 τα οποία καταναλώνονται από 100 g ξηρού εδάφους / h). Τα αποτελέσματα προέκυψαν από το μέσο όρο τριών επαναλήψεων.

5.2. Αζωτοδέσμευση

Για τον προσδιορισμό της ικανότητας δέσμευσης μοριακού αζώτου από τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αναγωγής του ακετυλενίου (Hardy et al. 1968). Η μέθοδος στηρίζεται στην αναγωγή του ακετυλενίου προς αιθυλένιο, μια αντίδραση η οποία καταλύεται από το ενζυμικό σύστημα της νιτρογενάσης την οποία διαθέτουν τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια. Το παραγόμενο αιθυλένιο ανιχνεύεται με τη χρήση αέριου χρωματογράφου (Fisons 8000, εφοδιασμένο με στήλη GS-Q 30m X 0.53 mm και ανιχνευτή FID)

Για τον προσδιορισμό αζωτοδέσμευσης χρησιμοποιήθηκαν δοκιμαστικοί σωλήνες με 2 ml δείγματος βακτηριακής καλλιέργειας σε Υ.Α.Ε. (ή 2 g μικτού βάρους εδάφους γνωστής υγρασίας, στις περιπτώσεις όπου η μέτρηση γίνονταν σε εδαφικό δείγμα) οι οποίοι έκλειναν αεροστεγώς με ειδικά πώματα. Το 10% της αέριας φάσης που περιέχονταν σε κάθε σωλήνα, αντικαταστάθηκε με C_2H_2 . Οι δοκιμαστικοί σωλήνες επώαστηκαν για 24 h στους 28 °C. Στη συνέχεια στην αέρια φάση των δοκιμαστικών σωλήνων προσδιορίστηκε το παραγόμενο C_2H_4 στον αέριο-χρωματογράφο. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε nmoles αιθυλενίου /ml καλλιέργειας * h (ή / g ξηρού βάρους εδάφους * h στις περιπτώσεις που μετρήθηκε η αζωτοδέσμευση σε έδαφος). Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις.

5.3. Προσδιορισμός του μεγέθους των βακτηριακών πληθυσμών

Για τον προσδιορισμό του συνολικού πληθυσμού των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων και καταμέτρηση των βιώσιμων αναπαραγωγικών μονάδων σε τρυβλία. Για το σκοπό αυτό, 10 g εδάφους γνωστής υγρασίας, αραιώνονται σε 90 ml φυσιολογικού ορού (NaCl 0,85%) και τοποθετούνται στον αναδευτήρα για 30 λεπτά. Στη συνέχεια γίνονται δεκαδικές διαδοχικές αραιώσεις και από αυτές επιστρώνονται τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar. Τα τρυβλία επωάζονται στους 25 °C για δύο ημέρες όπου και μετρώνται οι συνολικοί βακτηριακοί πληθυσμοί.

Σε θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar αραιωμένο 1:100 προσδιορίστηκε ο αριθμός των βακτηρίων Κ-στρατηγικής ως αυτά που αναπτύσσονται στο φτωχό αυτό υπόστρωμα σε χρονικό διάστημα από 2-6 ημέρες (από την καταμέτρηση των έξι ημερών

αφαιρείται η καταμέτρηση των δύο ημερών). Ο αριθμός των βακτηρίων r- στρατηγικής αντιστοιχεί σε αυτά που αναπτύσσονται σε Nutrient Agar σε χρονικό διάστημα 2 ημερών. Οι αριθμοί των πληθυσμών των βακτηρίων εκφράστηκαν ως αριθμός κυττάρων / g ξηρού βάρους εδάφους.

Για τις μετρήσεις των πληθυσμών κατά τη διάρκεια των διαβρέξεων χρησιμοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις και για τις μετρήσεις αμέσως μετά την τελευταία διάβρεξη έως και εβδομήντα ημέρες μετά από αυτή, χρησιμοποιήθηκαν πέντε επαναλήψεις.

Χρησιμοποιήθηκαν επίσης δύο δείκτες για τον προσδιορισμό της διαφορετικής ταχύτητας με την οποία αναπτύσσονται οι βακτηριακοί πληθυσμοί στους τρεις χειρισμούς. Οι δείκτες αυτοί είναι οι :

$$CD = \left[\frac{N_2}{2} + \frac{N_4}{4} + \frac{N_6}{6} \right] \times 100 \quad \text{όπου } N_2, N_4 \text{ και } N_6 \text{ οι αναλογίες των βακτηριακών}$$

αποικιών που εμφανίζονται στα τρυβλία σε χρόνο 0-2 ημέρες, 2-4 ημέρες και 4-6 ημέρες (Ahmed & Wardle 1994, Sarathchandra et al. 1997).

$E.P. = -\sum (p_i \times \log_{10} p_i)$ όπου p_i ο πληθυσμός στην ομάδα i / τον ολικό πληθυσμό, σε κάθε μία από τις τρεις ομάδες i (χρόνοι εμφάνισης αποικιών 0-2 ημέρες, 2-4 ημέρες και 4-6 ημέρες) (De Leij et al. 1993).

Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η μέση τιμή των παραπάνω δεικτών για το χρονικό διάστημα αμέσως μετά την τελευταία διάβρεξη έως και 70 ημέρες μετά, στους τρεις χειρισμούς και στα δύο υποστρώματα (N.A. και N.A.1/100):

$$\overline{C.D.} = (C.D._{0\text{ημέρες}} + C.D._{10\text{ημέρες}} + \dots + C.D._{70\text{ημέρες}}) / 8$$

$$\overline{E.P.} = (E.P._{0\text{ημέρες}} + E.P._{10\text{ημέρες}} + \dots + E.P._{70\text{ημέρες}}) / 8$$

Υψηλές τιμές του δείκτη C.D. υποδηλώνουν μεγαλύτερη αναλογία βακτηρίων τα οποία χαρακτηρίζονται από γρήγορη αύξηση στο υπόστρωμα που μελετάται.

Ο δείκτης E.P. αποτελεί μέτρο της διασποράς των βακτηριακών αναλογιών που αναπτύσσονται στα τρία χρονικά διαστήματα (0-2 ημέρες, 2-4 ημέρες και 4-6 ημέρες): χαμηλές τιμές του δείκτη, υποδηλώνουν ότι κάποια αναλογία κυριαρχεί έναντι των υπολοίπων χωρίς όμως να γίνεται διάκριση στο ποια είναι η αναλογία που κυριαρχεί (π.χ. εάν σε ένα δείγμα το 80% των αποικιών αναπτύσσεται σε χρόνο 0-2 ημέρες και σε ένα

άλλο δείγμα το 80% των αποικιών αναπτύσσεται σε χρόνο 4-6 ημέρες ο δείκτης παίρνει την ίδια τιμή) (Sarathchandra et al. 1997).

5.4. Ρυθμός ανάπτυξης του μύκητα *Rhizoctonia solani*

5.4.1.: Ρυθμός ανάπτυξης σε εκχύλισμα εδάφους με διαφορετικές συγκεντρώσεις Υ.Α.Ε.

Σε 500 g ξηρού βάρους εδάφους προστίθενται 500 ml απιονισμένου νερού και τοποθετούνται στον αναδευτήρα για μία ώρα. Στη συνέχεια το εδαφικό αιώρημα φυγοκεντρείται στις 12.000 στροφές για 10 λεπτά και διηθείται με ηθμό Whatman No 41 έτσι ώστε να απομακρυνθούν όσο το δυνατό περισσότερα στερεά και κύτταρα. Η αποστείρωση του εκχυλίσματος γίνεται μέσω διήθησης με βακτηριολογικούς ηθμούς (διάμετρος πόρων 0,22μm). Τα τρυβλία στα οποία μελετήθηκε ο ρυθμός ανάπτυξης του μύκητα αποτελούνται από 16 ml από το παραπάνω εκχύλισμα και 4 ml αποστειρωμένου, λιωμένου ενυδατωμένου άγαρ και στη συγκεκριμένη περίπτωση προετοιμάζεται ο χειρισμός με συγκέντρωση 0% σε Υ.Α.Ε.

Μειώνοντας την ποσότητα του νερού που χρησιμοποιείται για το εδαφικό εκχύλισμα και προσθέτοντας αντίστοιχο όγκο Υ.Α.Ε., προετοιμάζονται οι χειρισμοί με συγκεντρώσεις 8%, 16%, 24%, 32%, 40%, 48%, 56%, 64% και 72% σε Υ.Α.Ε. Με τη μέθοδο αυτή η μέγιστη δυνατή συγκέντρωση Υ.Α.Ε. στο υπόστρωμα που μπορούμε να επιτύχουμε είναι 72% (εάν συνυπολογίσουμε και το νερό που συμπεριλαμβάνεται στο έδαφος). Τα τρυβλία εμβολιάζονται με δισκίο διαμέτρου 5mm από καλλιέργεια δύο ημερών του μύκητα σε ενυδατωμένο άγαρ έτσι ώστε να αποφευχθεί το ενδεχόμενο αύξησής του από τα θρεπτικά στοιχεία που εμπεριέχονται στο εμβόλιο. Η επώαση γίνεται στους 25 °C ενώ συναρτήσει του χρόνου μετρώνται οι ακτίνες της αναπτυσσόμενης αποικίας. Ο μύκητας μετά τη φάση επώασης αρχίζει να αυξάνει γραμμικά στην επιφάνεια του υποστρώματος, δηλαδή ο ρυθμός μεταβολής της ακτίνας του συναρτήσει του χρόνου επώασης είναι σταθερός. Η κλίση της ευθείας, η οποία συνδέει το μήκος της ακτίνας με το χρόνο, εκφράζει τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του μύκητα στο συγκεκριμένο υπόστρωμα. Για κάθε συγκέντρωση Υ.Α.Ε. που μελετήθηκε, χρησιμοποιήθηκαν επτά επαναλήψεις.

5.4.2.: Ρυθμός ανάπτυξης σε εδαφικά διαλύματα των χειρισμών με Νερό, Υ.Α.Ε. και Ε.Υ.Α.Ε.

Το έδαφος από κάθε χειρισμό το οποίο βρίσκεται στο 60% της υδατοϊκανότητάς του, φυγοκεντρείται στις 12.000 στροφές το λεπτό για 10 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρωση παραλαμβάνεται η ποσότητα του εδαφικού διαλύματος που συγκεντρώνεται στο άνω μέρος του σωλήνα φυγοκέντρωσης και αποστειρώνεται με διήθηση σε στείρο βακτηριολογικό ηθμό μιας χρήσης (διάμετρος πόρων 0,22μm). Σε τρυβλία με υπόστρωμα ενυδατωμένο άγαρ (20ml/τρυβλίο) ανοίγεται μια οπή διαμέτρου 5mm κοντά στην περιφέρεια, όπου τοποθετούνται 60 μl από το παραπάνω υγρό. Τα τρυβλία αφήνονται λίγη ώρα να απορροφήσουν το διάλυμα και στη συνέχεια εμβολιάζονται στο κέντρο με δισκίο διαμέτρου 5mm από καλλιέργεια 2 ημερών του μύκητα *R. solani* σε ενυδατωμένο άγαρ (20 ml/τρυβλίο). Με τη μέθοδο αυτή ελέγχθηκαν εκχύλισμα του εδάφους μάρτυρα (N), του εδάφους που δέχθηκε απόβλητο ελαιοτριβείων (Υ.Α.Ε.) και επεξεργασμένο απόβλητο (Ε.Υ.Α.Ε.) σε διάφορους χρόνους (αμέσως μετά την τελευταία διάβρεξη έως και 70 ημέρες μετά, ανά 10ήμερο). Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 25 °C ενώ συναρτήσεϊ του χρόνου μετρήθηκαν οι ακτίνες του μύκητα προς τη μεριά της οπής που δέχθηκε το εκχύλισμα και ελέγχθησαν για τυχόν δημιουργία ζώνης παρεμπόδισης. Από την κλίση της ευθείας που συνδέει την ακτίνα συναρτήσεϊ του χρόνου υπολογίστηκε ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του μύκητα. Για κάθε μέτρηση χρησιμοποιήθηκαν επτά επαναλήψεις.

5.4.3. : Αντιμυκητιακή δράση των βακτηριακών απομονώσεων.

Τα βακτηριακά στελέχη τα οποία απομονώθηκαν από τους χειρισμούς στο έδαφος εμβολιάστηκαν σε τρυβλία με 15 ml P.D.A (pH 7) σε απόσταση 1 cm από τα τοιχώματα του τρυβλίου. Για τον εμβολιασμό χρησιμοποιήθηκαν 20 μl εμβολίου το οποίο αποτελούνταν από αιώρημα κυττάρων σε διάλυμα Ringer's. Για την καλλιέργεια των ακτινοβακτηρίων του γένους *Streptomyces* χρησιμοποιήθηκαν επίσης τρυβλία P.D.A. στο άκρο των οποίων ανοίχτηκε οπή στο υπόστρωμα, αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό και προστέθηκε Ν.Α. (350 μl) και στο σημείο αυτό εμβολιάστηκαν τα διάφορα στελέχη. Το εμβόλιο στην περίπτωση αυτή, αποτελούνταν από αιώρημα σπορίων σε γλυκερόλη 20% (συγκέντρωση 10⁸ σπόρια /ml). Τα τρυβλία επωάστηκαν για 48 ώρες στους 28 °C και στη συνέχεια εμβολιάστηκαν οι μύκητες στο κέντρο του τρυβλίου. Ως εμβόλιο για τους

μύκητες χρησιμοποιήθηκε δισκίο διαμέτρου 0,5 cm από καλλιέργεια σε τρυβλίο με 15 ml P.D.A. (pH 7). Στην περίπτωση του μύκητα *Aspergillus niger* τα τρυβλία εμβολιάστηκαν με 20 μl από αιώρημα σπορίων σε διάλυμα Ringer's (συγκέντρωση 10^6 σπόρια /ml). Τα τρυβλία επώστηκαν στους 28 °C, και σε διάφορα χρονικά διαστήματα μετρήθηκε η ακτίνα δράσης η οποία εκφράστηκε από την ακτίνα του μύκητα στο τρυβλίο μάρτυρα μείον την ακτίνα του μύκητα στο τρυβλίο με τη βακτηριακή καλλιέργεια. Για κάθε δοκιμή χρησιμοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις.

5.5. Παρασκευή εμβολίου του μύκητα *Rhizoctonia solani* για μόλυνση του εδάφους

Χρησιμοποιήθηκε κλάσμα άμμου με διάμετρο τεμαχιδίων 0,5-2mm. Το κλάσμα αυτό διαβρέχτηκε με απιονισμένο νερό στο 60% της υδατοϊκανότητάς του και αποστειρώθηκε επί 1 ώρα στους 125 °C δύο φορές (σε δύο διαδοχικές μέρες). Στη συνέχεια προστέθηκε 2% κ. β. καλαμποκάλευρο και ακολούθησε αποστείρωση για 20 λεπτά. Το υπόστρωμα αυτό εμβολιάστηκε με δισκία του μύκητα που είχε καλλιεργηθεί σε P.D.A. και επώστηκε για 40 ημέρες στους 25 °C πριν χρησιμοποιηθεί για τη μόλυνση του εδάφους.

5.6. Μικροοργανισμοί

Για τη μελέτη της επίδρασης των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων στην επισχετικότητα εδάφους, χρησιμοποιήθηκε ο μύκητας *Rhizoctonia solani* (Συλλογή Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου). Για τη βιολιπασματοποίηση των υγρών αποβλήτων χρησιμοποιήθηκε το αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *Azotobacter vinelandii* στέλεχος A (Συλλογή Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Γ.Π.Α.). Για τη μελέτη της αντιμυκητιακής δράσης των βακτηριακών στελεχών, χρησιμοποιήθηκαν εκτός από το μύκητα *Rhizoctonia solani* και οι μύκητες *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicalis-cucumerinum* Afu-78(A), *Pythium debaryanum* ATCC 38477 (Συλλογή Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Χ.Π.Α.) και *Aspergillus niger* (Συλλογή Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Γ.Π.Α.). Για τη μελέτη παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών από τα στελέχη στρεπτομυκήτων χρησιμοποιήθηκε εκτός από το μύκητα *Aspergillus niger* και το βακτήριο *Bacillus subtilis* (Συλλογή Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών).

5.7. Φυτά

Ως φυτά-δείκτες της προσβολής από το μύκητα *Rhizoctonia solani* χρησιμοποιήθηκαν σπόροι μαρουλιού (*Lettuce romana*). Για τον προσδιορισμό της φυτοτοξικότητας του εδάφους χρησιμοποιήθηκαν σπόροι καρδάμου (*Lepidium sativum*) και σπόροι μαρουλιού (*Lettuce romana*).

6. ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

6.1. Ενσωμάτωση του *Rhizoctonia solani* στο έδαφος 45 ημέρες μετά το τέλος των διαβρέξεων με τα απόβλητα.

Το έδαφος που επιλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε και στα δύο πειράματα, κοσκινίστηκε με εργαστηριακό κόσκινο διαμέτρου 4mm και μοιράστηκε σε τρεις χειρισμούς ως εξής :

N - Χειρισμός με νερό: αποτελεί τον μάρτυρα του πειράματος. Δοχείο με έδαφος το οποίο διαβρέχεται με νερό.

Y.A.E. - Χειρισμός με υγρό απόβλητο ελαιοτριβείων. Δοχείο με έδαφος το οποίο διαβρέχεται με το ανεπεξέργαστο απόβλητο ελαιοτριβείων.

E.Y.A.E. - Χειρισμός με το βιολογικά επεξεργασμένο απόβλητο ελαιοτριβείων. Δοχείο με έδαφος το οποίο διαβρέχεται με το προϊόν του εργαστηριακού βιοαντιδραστήρα και το οποίο προέρχεται από την αερόβια βιολογική επεξεργασία των Y.A.E. με το αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *Azotobacter vinelandii*.

Κατά τη διάρκεια του σταδίου διαβρέξεων, η προσθήκη υγρών γίνονταν με τέτοιο τρόπο ώστε το έδαφος να διατηρείται στο 60% της υδατοϊκανότητάς του (με ζύγιση προσδιορίζονταν η ποσότητα του υγρού που είχε χαθεί λόγω εξάτμισης).

Στο στάδιο αναμονής το οποίο διήρκεσε 45 ημέρες, οι τρεις εδαφικοί χειρισμοί διαβρέχονταν πλέον μόνο με νερό. Η ύπαρξη του σταδίου αυτού κρίθηκε αναγκαία για την εξάλειψη της φυτοτοξικής δράσης των Y.A.E. (Saviozzi et al. 1993, Franco et al. 1996).

Κατά τη διάρκεια των διαβρέξεων και μέχρι το στάδιο του ελέγχου της επισχετικότητας γίνονταν αναμοχλεύσεις ώστε να διατηρείται το εδαφικό υπόστρωμα όσο το δυνατό πιο ομοιογενές.

Στο στάδιο ελέγχου της επισχετικότητας, τα 3 εδαφικά υποστρώματα ομογενοποιήθηκαν, κοσκινίστηκαν ξανά, μοιράστηκαν σε γλάστρες διαστάσεων 13*19*5 cm (900 g εδάφους / γλάστρα) και κάθε γλάστρα μολύνθηκε με 6 g εμβολίου *Rhizoctonia solani* (παρ. 5.5). Σπόροι μαρουλιού φυτεύτηκαν σε διάφορους χρόνους μετά την εισαγωγή του παθογόνου μύκητα. Μάρτυρες για τους τρεις χειρισμούς οι οποίοι δεν μολύνθηκαν με το μύκητα χρησιμοποιήθηκαν για την αναγωγή της βλαστικότητας στο 100% του μάρτυρα (θεωρείται ως 100% της βλαστικότητας κάθε χειρισμού ο συνολικός αριθμός των σπόρων που φύτρωσε στο χειρισμό αυτό).

Το πείραμα του ελέγχου της επισχετικότητας εδάφους το οποίο έχει δεχθεί Υ.Α.Ε. ή Ε.Υ.Α.Ε. έγινε 2 φορές: στο 1^ο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν μικρότερες ποσότητες αποβλήτων και στο 2^ο μεγαλύτερες. Περιληπτική περιγραφή των χειρισμών και των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν στα πειράματα 1 και 2 δίνονται στην παρ. 6.3

Στα δύο αυτά πειράματα εκτός από τη βιωσιμότητα των φυτών μαρουλιού προσδιορίστηκε και η προφυτρωτική προσβολή από τη σχέση:

$$\text{Προφυτρωτική προσβολή (\%)} = 100 * \left(1 - \frac{\text{B.E.}}{\text{B.M.}}\right)$$

Όπου: B.E.= ο συνολικός αριθμός των σπόρων που βλάστησαν στο χειρισμό ο οποίος μολύνθηκε με το παθογόνο

B.M. = ο συνολικός αριθμός των σπόρων που βλάστησαν στον αντίστοιχο μάρτυρα του χειρισμού

6.2. Ενσωμάτωση του *Rhizoctonia solani* στο έδαφος κατά τη διάρκεια των διαβρέξεων με τα απόβλητα.

6.2.1. Χειρισμός με Υ.Α.Ε.:

Χρησιμοποιήθηκε έδαφος κοσκινισμένο με εργαστηριακό κόσκινο διαμέτρου 4 mm, το οποίο μοιράστηκε σε 24 γλάστρες (900 g εδάφους ανά γλάστρα). Οι 12 από αυτές διαβρέχονταν συνεχώς με Υ.Α.Ε. έως ότου δεχθούν συνολικά 400 ml αποβλήτου / kg εδάφους (η ποσότητα του αποβλήτου που προσθέτονταν αντιστοιχούσε σε αυτό που χάνονταν λόγω εξάτμισης έτσι ώστε οι γλάστρες να διατηρούνται στο 60% της υδατοϊκανότητας). Οι άλλες 12 διαβρέχονταν μόνο με νερό. Όταν οι γλάστρες δέχθηκαν το μισό περίπου της προκαθορισμένης ποσότητας του υγρού διάβρεξης (200 ml/kg εδάφους), ενσωματώθηκε ο μύκητας *Rhizoctonia solani* στις 6 από τις γλάστρες οι οποίες διαβρέχονταν με Υ.Α.Ε. και στις 6 από τις γλάστρες οι οποίες διαβρέχονταν με νερό. Οι υπόλοιπες γλάστρες από τους δύο χειρισμούς οι οποίες δε μολύνθηκαν με το παθογόνο, χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες για τον προσδιορισμό της βλαστικότητας στον κάθε

χειρισμό. Οι διαβρέξεις με Υ.Α.Ε. ή νερό συνεχίστηκαν έως ότου η κάθε γλάστρα δεχθεί όλη την ποσότητα του αποβλήτου. Οι διαβρέξεις για τη διατήρηση της υγρασίας του εδάφους κατά το στάδιο της αναμονής για την εξάλειψη της φυτοτοξικότητας των Υ.Α.Ε., γίνονταν μόνο με νερό και στους δύο χειρισμούς. Στη συνέχεια, μετά την πάροδο του χρονικού διαστήματος που είναι απαραίτητο για την εξάλειψη της φυτοτοξικότητας των Υ.Α.Ε., φυτεύτηκαν 20 σπόροι μαρουλιού / γλάστρα σε όλους τους χειρισμούς (χειρισμός με Υ.Α.Ε.+*R. solani*, χειρισμός με νερό + *R. solani*, μάρτυρες βλαστικότητας εδάφους με Υ.Α.Ε., μάρτυρες βλαστικότητας εδάφους με νερό) όπου μελετήθηκε η βιωσιμότητα των φυτών.

6.2.2. Χειρισμός με Ε.Υ.Α.Ε.:

Χρησιμοποιήθηκε έδαφος κοσκινισμένο με εργαστηριακό κόσκινο διαμέτρου 4 mm, το οποίο μοιράστηκε σε 24 γλάστρες (900 g εδάφους ανά γλάστρα). Οι 12 από αυτές διαβρέχονταν συνεχώς με Ε.Υ.Α.Ε. έως ότου δεχθούν συνολικά 400 ml αποβλήτου / kg εδάφους (η ποσότητα του αποβλήτου που προστίθονταν αντιστοιχούσε στις απώλειες λόγω εξάτμισης έτσι ώστε οι γλάστρες να διατηρούνται στο 60% της υδατοϊκανότητας). Οι άλλες 12 διαβρέχονταν μόνο με νερό. Όταν οι γλάστρες δέχθηκαν το μισό περίπου της προκαθορισμένης ποσότητας του υγρού διάβρεξης, ενσωματώθηκε ο μύκητας *Rhizoctonia solani* στις 6 από τις γλάστρες οι οποίες διαβρέχονταν με Ε.Υ.Α.Ε. και στις 6 από τις γλάστρες οι οποίες διαβρέχονταν με νερό. Οι υπόλοιπες γλάστρες από τους δύο χειρισμούς οι οποίες δε μολύνθηκαν με το παθογόνο, χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες για τον προσδιορισμό της βλαστικότητας στον κάθε χειρισμό.

Οι διαβρέξεις με Ε.Υ.Α.Ε. συνεχίστηκαν έως ότου οι γλάστρες δεχθούν το 85% του προκαθορισμένου όγκου του αποβλήτου, οπότε φυτεύτηκαν 20 σπόροι μαρουλιού / γλάστρα σε όλους τους χειρισμούς (χειρισμός με Ε.Υ.Α.Ε.+*R. solani*, χειρισμός με νερό + *R. solani*, μάρτυρες βλαστικότητας εδάφους με Ε.Υ.Α.Ε., μάρτυρες βλαστικότητας εδάφους με νερό). Στην περίπτωση των διαβρέξεων του εδάφους με Ε.Υ.Α.Ε. δε χρειάζεται να παρεμβληθεί στάδιο αναμονής αφού τα επεξεργασμένα απόβλητα δεν παρουσιάζουν φυτοτοξικότητα. Οι διαβρέξεις με Ε.Υ.Α.Ε. ή νερό συνεχίστηκαν έως ότου κάθε γλάστρα δεχθεί το σύνολο του προκαθορισμένου όγκου του αποβλήτου οπότε πλέον όλες οι γλάστρες διαβρέχονταν μόνο με νερό για τη διατήρηση της υγρασίας του εδάφους.

Μελετήθηκε η βιωσιμότητα των φυτών στο χειρισμό με Ε.Υ.Α.Ε. σε σχέση με τη βιωσιμότητα στο χειρισμό με νερό.

6.3. Περιληπτική παρουσίαση των χειρισμών και των μετρήσεων κατά την εφαρμογή Ε.Υ.Α.Ε. και Υ.Α.Ε. στο έδαφος

Πραγματοποιήθηκαν αρχικά δύο πειράματα, όπου τα στάδια στους χειρισμούς ήταν παρόμοια, με διαφορές κυρίως στις ποσότητες των αποβλήτων που χρησιμοποιήθηκαν και στις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν.

Το 1^ο πείραμα το οποίο ήταν και το προκαταρκτικό, πραγματοποιήθηκε για να διαπιστωθεί εάν το έδαφος που διαβρέχεται με Υ.Α.Ε. ή Ε.Υ.Α.Ε. εμφανίζει επισχετικότητα έναντι του *Rhizoctonia solani* σε σχέση με το έδαφος – μάρτυρα το οποίο διαβρέχονταν μόνο με νερό. Το πείραμα αυτό αποτελείται από τρία στάδια: **το στάδιο των διαβρέξεων**, το οποίο διήρκεσε 50 ημέρες, όπου το έδαφος από τους τρεις χειρισμούς διαβρέχονταν συνεχώς με τα αντίστοιχα υγρά. Στο χρονικό αυτό διάστημα έγιναν 7 διαβρέξεις και το έδαφος δέχθηκε συνολικά 260 ml / kg ξηρού βάρους νερό (Ν.), 252 ml / kg ξηρού βάρους εδάφους ανεπεξέργαστου υγρού αποβλήτου ελαιοτριβείων (Υ.Α.Ε.) και 269 ml / kg ξηρού βάρους εδάφους επεξεργασμένο απόβλητο (Ε.Υ.Α.Ε.) σε αραίωση 1:1 με απιονισμένο νερό. Κατά τη διάρκεια του σταδίου αυτού έγιναν μετρήσεις της μεταβολής του pH και της αγωγιμότητας του εδάφους, μετρήσεις της αζωτοδεσμευτικής ικανότητας του εδάφους, καθώς και μετρήσεις των βακτηριακών πληθυσμών και της αναπνευστικής δραστηριότητας του εδάφους.

Στη συνέχεια ακολουθεί **το στάδιο αναμονής** για την εξάλειψη της φυτοτοξικότητας του οποίου η χρονική διάρκεια ήταν 45 ημέρες. Στο στάδιο αυτό οι διαβρέξεις σε όλους τους χειρισμούς γίνονταν μόνο με νερό και κρίθηκε αναγκαίο διότι είναι γνωστό ότι το έδαφος που διαβρέχεται με Υ.Α.Ε. εμφανίζει έντονα φυτοτοξικές ιδιότητες οι οποίες μειώνονται ή εξαλείφονται με την πάροδο του χρόνου. Η μόνη μέτρηση που έγινε στο στάδιο αυτό είναι η μέτρηση της φυτοτοξικότητας (με μέτρηση του ολικού δείκτη βλαστικότητας) στο τέλος του σταδίου για να διαπιστωθεί εάν το έδαφος ήταν έτοιμο να εισέλθει στο επόμενο στάδιο όπου χρειάζεται να φυτευθούν σπόροι μαρουλιού.

Στο τελευταίο στάδιο, αυτό του **ελέγχου της επισχετικότητας**, το έδαφος από τους τρεις χειρισμούς μοιράζεται σε γλάστρες και μολύνεται με τον παθογόνο μύκητα. Οι

σπόροι μαρουλιού φυτεύονται σε τρεις διαφορετικούς χρόνους: Στην 1^η σπορά, οι σπόροι φυτεύονται ταυτόχρονα με την εισαγωγή του παθογόνου στο έδαφος, στη 2^η σπορά οι σπόροι φυτεύονται 10 ημέρες μετά την εισαγωγή του παθογόνου και στην 3^η σπορά φυτεύονται 20 ημέρες μετά την εισαγωγή του παθογόνου. Οι τρεις διαφορετικοί χρόνοι σποράς χρησιμοποιήθηκαν για να διαπιστωθεί το κατά πόσο ο *Rhizoctonia solani* μπορεί να εγκαθίσταται σε έδαφος που έχει δεχθεί τα απόβλητα. Κάθε σπορά έχει 5 επαναλήψεις για κάθε χειρισμό (5 γλάστρες μολυσμένες με το παθογόνο) ενώ σε κάθε γλάστρα φυτεύτηκαν 12 σπόροι μαρουλιού. Σε κάθε σπορά χρησιμοποιήθηκαν και 5 μάρτυρες (5 γλάστρες με 12 σπόρους / γλάστρα οι οποίες δεν μολύνθηκαν με το παθογόνο). Οι μετρήσεις του σταδίου αυτού αφορούσαν την επισχετικότητα (τη βιωσιμότητα δηλ. των φυτών μαρουλιού συναρτήσει του χρόνου) και τη φυτοτοξικότητα η οποία εκφράστηκε α) από το ποσοστό βλαστικότητας των μαρτύρων συναρτήσει του χρόνου β) από το μέσο όρο του μήκους των ριζιδίων των φυτών που αναπτύχθηκαν στις γλάστρες-μάρτυρες των τριών χειρισμών.

Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του προκαταρκτικού πειράματος, κυρίως αυτών της επισχετικότητας, κρίθηκε αναγκαίο να επαναληφθεί το πείραμα με τις εξής τροποποιήσεις: α) χρήση μεγαλύτερων ποσοτήτων αποβλήτων ώστε να έχουμε πιθανά εντονότερη εκδήλωση του φαινομένου β) αλλαγή στους χρόνους σποράς αφού στην 3^η σπορά του προκαταρκτικού πειράματος δεν παρατηρήθηκε σημαντική προσβολή ούτε στο έδαφος – μάρτυρα και γ) μετρήσεις βακτηριακών πληθυσμών και αναπνευστικής δραστηριότητας κατά τη διάρκεια και των τριών σταδίων.

Έτσι, το **2^ο πείραμα** διαμορφώθηκε ως εξής:

Το **στάδιο των διαβρέξεων** διήρκεσε 52 ημέρες και σε 5 διαβροχές το έδαφος δέχθηκε συνολικά 418 ml / kg ξηρού βάρους νερό, 413 ml / kg ξηρού βάρους εδάφους Υ.Α.Ε και 411 ml / kg ξηρού βάρους εδάφους Ε.Υ.Α.Ε. χωρίς αραίωση. Στο στάδιο αυτό έγιναν μετρήσεις της αναπνευστικής δραστηριότητας και απομονώσεις ανταγωνιστικών βακτηρίων.

Το **στάδιο αναμονής** για την εξάλειψη της φυτοτοξικότητας, όπου οι διαβρέξεις γίνονταν μόνο με νερό, διήρκεσε όπως και στο 1^ο πείραμα, 45 ημέρες. Κατά τη διάρκεια του σταδίου αυτού συνεχίστηκαν οι μετρήσεις βακτηριακών πληθυσμών και αναπνευστικής δραστηριότητας ενώ προστέθηκε και η μέτρηση του ρυθμού της γραμμικής αύξησης του *Rhizoctonia solani* σε εκχυλίσματα του εδάφους από τους τρεις χειρισμούς. Στο τέλος του σταδίου αυτού, έγιναν δοκιμές φυτοτοξικότητας με απ' ευθείας

φύτευση σπόρων μαρουλιού στο έδαφος από τους τρεις χειρισμούς για να διαπιστωθεί το κατά πόσο ήταν έτοιμο να εισέλθει στο επόμενο στάδιο. Επίσης στο στάδιο αυτό έγιναν και απομονώσεις ανταγωνιστικών βακτηρίων.

Στο **στάδιο ελέγχου της επισχετικότητας** οι σπόροι μαρουλιού φυτεύτηκαν σε τέσσερις διαφορετικούς χρόνους μετά την εισαγωγή του παθογόνου στο έδαφος: στην 1^η σπορά η φύτευση των σπόρων και η εισαγωγή του παθογόνου έγινε ταυτόχρονα, στη 2^η σπορά οι σπόροι φυτεύτηκαν 5 ημέρες μετά την εισαγωγή του παθογόνου στο έδαφος, στην 3^η και 4^η σπορά οι σπόροι φυτεύτηκαν 10 και 15 ημέρες μετά την εισαγωγή του παθογόνου αντίστοιχα. Κάθε σπορά έχει 6 επαναλήψεις για κάθε χειρισμό (6 γλάστρες μολυσμένες με το παθογόνο) ενώ φυτεύτηκαν 20 σπόροι σε κάθε γλάστρα. Σε κάθε σπορά χρησιμοποιήθηκαν και 3 μάρτυρες (3 γλάστρες με 20 σπόρους / γλάστρα οι οποίες δεν μολύνθηκαν με το παθογόνο). Οι μετρήσεις του σταδίου αυτού αφορούσαν την επισχετικότητα (τη βιωσιμότητα δηλ. των φυτών μαρουλιού συναρτήσει του χρόνου) και τη φυτοτοξικότητα η οποία προσδιορίστηκε από τη βλαστικότητα των μαρτύρων των επεμβάσεων συναρτήσει του χρόνου. Επιπλέον συνεχίστηκαν οι μετρήσεις βακτηριακών πληθυσμών, αναπνευστικής δραστηριότητας και γραμμικής αύξησης του *Rhizoctonia solani* σε εδαφικά εκχυλίσματα από τους τρεις χειρισμούς. Τέλος από το στάδιο αυτό έγιναν και απομονώσεις ανταγωνιστικών βακτηρίων.

Επίσης, πραγματοποιήθηκε ένα **3^ο πείραμα** (παρ. 6.2.1. και 6.2.2.) κατά το οποίο η εισαγωγή του *Rhizoctonia solani* έγινε κατά το στάδιο των διαβρέξεων του εδάφους με τα απόβλητα, έτσι ώστε να διαπιστωθεί εάν ο μύκητας παρεμποδίζεται ή αυξάνει όταν δέχεται τα απόβλητα στην αρχική τους μορφή. Στο πείραμα αυτό μετρήθηκε μόνο η βιωσιμότητα των φυτών μαρουλιού και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται μαζί με αυτά της μελέτης της επισχετικότητας στα δύο προηγούμενα πειράματα.

Τα αποτελέσματα για το 1^ο και 2^ο πείραμα παρουσιάζονται μαζί, έτσι ώστε να γίνονται ευκολότερα οι συγκρίσεις μεταξύ χρησιμοποίησης μεγάλου ή μικρού όγκου αποβλήτων στο έδαφος (σε όσα σημεία υπάρχουν κοινές μετρήσεις). Τέλος παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ταυτοποίηση των βακτηριακών απομονώσεων και οι δοκιμές σε τρυβλία για τη δημιουργία ζώνης παρεμπόδισης σε διάφορους μύκητες.

6.4 Στατιστικοί έλεγχοι

Οι τρεις χειρισμοί (Νερό, Υ.Α.Ε. και Ζ.Υ.Α.Ε.) ελέγχθηκαν για το αν έχουν μεταξύ τους σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 με τον έλεγχο ANOVA ή το t- test όταν οι συγκρίσεις γίνονταν ανά δύο (νερό – Υ.Α.Ε. ή νερό – Ζ.Υ.Α.Ε.). Στις περιπτώσεις όπου κάποια από τις προϋποθέσεις για τη χρήση των παραπάνω ελέγχων δεν πληρούνταν (ίσες διακυμάνσεις κάθε πληθυσμού, κανονικότητα των καταλοίπων) χρησιμοποιήθηκαν οι μη παραμετρικοί έλεγχοι Kruskal-Wallis (αντί του ANOVA) και Man-Whitney (αντί του t-test). Χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο ανάλυσης MINITAB.

7. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

7.1 Απομόνωση ανταγωνιστικών βακτηρίων

Κατά τη διάρκεια του 2^{ου} πειράματος απομονώθηκαν βακτηριακά στελέχη τα οποία σχημάτιζαν σε τρυβλίο ζώνη δράσης έναντι του μύκητα *R. solani*. Από ένα τρυβλίο παραλαμβάνονταν μεμονωμένες αποικίες οι οποίες εμβολιάζονταν σε νέο τρυβλίο (4 αποικίες / τρυβλίο) και στο κέντρο τοποθετούνταν δισκίο από καλλιέργεια του μύκητα. Όσα στελέχη δημιουργούσαν ζώνη παρεμπόδισης στο μύκητα, παραλαμβάνονταν σε καθαρή καλλιέργεια και φυλάσσονταν στους 4 °C. Τα βακτήρια που απομονώθηκαν ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση της βάσης δεδομένων BIOLOG ενώ η ομάδα των στρεπτομυκήτων με τη χρήση της βάσης δεδομένων MATIDEN.

7.2. Ταυτοποίηση στρεπτομυκήτων

Για τον προσδιορισμό της ομάδας (cluster) στην οποία ανήκει η κάθε απομόνωση χρησιμοποιήθηκε το ειδικό πρόγραμμα ταξινομικής ανάλυσης για ηλεκτρονικό υπολογιστή MATIDEN, το οποίο χρησιμοποιεί μια βάση δεδομένων η οποία στηρίζεται σε μορφολογικά, βιοχημικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε από τους Williams et al. (1983α και 1983β). Η διαδικασία για την μελέτη των διαφόρων χαρακτήρων περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω:

7.2.1.: Προετοιμασία εμβολίου

Το εμβόλιο που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις δοκιμές (εκτός και αν αναφέρεται διαφορετικά) αποτελείται από αιώρημα σπορίων σε γλυκερόλη 20% (συγκέντρωσης 10⁸ σπόρια / ml διαλύματος) το οποίο φυλάσσεται στους -20 °C. Για το σκοπό αυτό σε τρυβλίο με καλλιέργεια του μικροοργανισμού, η οποία έχει πλούσια ανάπτυξη σπορίων, εισάγουμε 10 ml φυσιολογικού ορού και με τη βοήθεια του μικροβιολογικού κρίκου αποσπούμε όσο το δυνατό περισσότερα σπόρια στο διάλυμα. Το υγρό επανασυλλέγεται, αναδεύεται ισχυρά στο Vortex, και φυγοκεντρείται στις 4000 στροφές / λεπτό για τέσσερα λεπτά. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και επαναδιαλύεται το ίζημα σε νέο διάλυμα

φυσιολογικού ορού. Το ξέπλυμα των σπορίων επαναλαμβάνεται τρεις φορές πριν αυτά διαλυθούν τελικά σε γλυκερόλη.

7.2.2. : Μορφολογία της επιφάνειας σπορίων και σχήμα της αλυσίδας σπορίων.

Χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα αμύλου-ανόργανων αλάτων (παράγρ. 8.3). Αφού προετοιμαστούν τα τρυβλία με το θρεπτικό υπόστρωμα και όταν αυτό είναι σε ημίρρευστη κατάσταση (35-40 °C), τοποθετούνται σε κάθε τρυβλίο δύο αποστειρωμένες καλυπτρίδες οι οποίες θα σχηματίζουν γωνία περίπου 45 ° με την επιφάνεια του υποστρώματος. Ο μικροοργανισμός εμβολιάζεται στο σημείο της ένωσης του θρεπτικού υλικού με την καλυπτρίδα και επωάζεται στους 25 °C για 14 ημέρες.

Στο τέλος της επώασης αφαιρούνται προσεκτικά οι καλυπτρίδες. Η μία καλυπτρίδα, εξετάζεται στο μικροσκόπιο για τη μελέτη του σχήματος της αλυσίδας των σπορίων. Οι αλυσίδες των σπορίων ομαδοποιούνται στις εξής κατηγορίες: α) ευθείες (rectiflexibles-RF), β) ευθείες με ελαφρώς κεκλιμένα άκρα (retinaculiapetri- RA), γ) σπειροειδείς (spirales- S) και δ) ακτινωτές (verticillati- V). Στις περιπτώσεις μη σχηματισμού αλυσίδων σπορίων, εξετάζεται η πιθανή ύπαρξη διαμερισμάτων στο μυκήλιο. Στο ταξινομικό πρόγραμμα MATIDEN οι κατηγορίες των σπορίων είναι δύο: αυτή που περιλαμβάνει τα σπόρια με λεία επιφάνεια (smooth-S) και αυτή που περιλαμβάνει σπόρια με κάθε είδους ανωμαλίες στην επιφάνειά τους (ridged-R). Η δεύτερη καλυπτρίδα ξηραίνεται σε ξηραντήρα με silica gel για 48 ώρες. Στη συνέχεια κόβεται ένα τμήμα της στο οποίο παρατηρείται αρκετή ανάπτυξη, τοποθετείται σε ειδική βάση με κολλητική ουσία Electrodag 915 (Acheson Colloide Company, Prince Rock), και καλύπτεται με στρώμα χρυσού-παλλάδιου υπό κενό σε συσκευή E5200 Auto Spytter Coater. Τέλος εξετάστηκε σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης τύπου JSM-T3300A Scanning Microscope (JEOL) για να διαπιστωθεί το σχήμα της επιφάνειας των σπορίων.

7.2.3. Χρώμα σπορίων

Για τον προσδιορισμό του χρώματος των σπορίων οι μικροοργανισμοί καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα αμύλου – ανόργανων αλάτων (παράγρ. 8.3), και επώαστηκαν στους 25 °C για 14 ημέρες. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε από την καλλιέργεια ένα κομμάτι με ικανοποιητική ανάπτυξη σπορίων, τοποθετήθηκε σε

αντικειμενοφόρο πλάκα και αφού αφαιρέθηκε το άγαρ από το δείγμα της καλλιέργειας, εξετάστηκε το χρώμα των σπορίων σε λευκό φως ή στο μικροσκόπιο. Στις περισσότερες περιπτώσεις είναι εφικτό να διακρίνουμε το χρώμα των σπορίων απ' ευθείας στην επιφάνεια της καλλιέργειας στο τρυβλίο. Τα χρώματα των σπορίων ομαδοποιούνται σε γκριζα, κόκκινα, πράσινα ή άλλου χρώματος (λευκό, κίτρινο, μπλε ή βιολετί).

7.2.4. : Χρώμα του μυκηλίου υποστρώματος

Το χρώμα του μυκηλίου υποστρώματος προσδιορίστηκε σε καλλιέργειες που επώαστηκαν στους 25⁰C για 14 ημέρες σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα γλυκερόλης – ασπαραγίνης (παράγρ. 8.4). Από την καλλιέργεια αφαιρείται ένα τμήμα με ικανοποιητική ανάπτυξη και τοποθετείται ανεστραμμένο σε αντικειμενοφόρο. Αφού απομακρυνθεί η περίσσεια υποστρώματος, εξετάζεται οπτικά το χρώμα του μυκηλίου υποστρώματος, το οποίο μπορεί να ανήκει σε μία από τις παρακάτω κατηγορίες: κίτρινο-καφέ (δεν διακρίνεται κάποια ιδιαίτερη χρωστική), κόκκινο – πορτοκαλί ή άλλο χρώμα.

7.2.5. : Παραγωγή μελανίνης

Η παραγωγή μελανίνης εξετάστηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες (3 επαναλήψεις ανά στέλεχος), οι οποίοι περιείχαν 10 ml θρεπτικού υποστρώματος πεπτόνης – εκχύλισμα ζύμης – σιδήρου (παράγρ. 8.5). Κάθε σωλήνας εμβολιάζεται με 40 μl αιωρήματος σπορίων και μετά από επώαση 4 ημερών στους 25 ⁰C τα στελέχη εξετάζονται για την παραγωγή μελανίνης. Η παραγωγή ή μη της μελανίνης διαπιστώνεται συγκρίνοντας το χρώμα του υποστρώματος με το χρώμα αρνητικού μάρτυρα (μη εμβολιασμένος σωλήνας) και το οποίο στους θετικούς σωλήνες είναι σκούρο καφέ έως μαύρο.

7.2.6. : Χρησιμοποίηση διαφόρων πηγών άνθρακα

Στο θρεπτικό υπόστρωμα για τη μελέτη της αύξησης των στρεπτομυκήτων σε διάφορες πηγές άνθρακα (παράγρ. 8.6) χρησιμοποιήθηκαν ως πηγές άνθρακα οι: αντονιτόλη, κελλοβιόζη, D-φρουκτόζη, m-ινοσιτόλη, ινουλίνη, μαννιτόλη, ραφφινόζη, L-ραμνόζη και D-ξυλόζη. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με γλυκόζη, και σαν αρνητικοί μάρτυρες (οι οποίοι στην περίπτωση αυτή είναι και οι πιο σημαντικοί για τις συγκρίσεις), χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία χωρίς πηγή άνθρακα. Κάθε τρυβλίο

εμβολιάστηκε με το πολύ έξι στελέχη (40 μl εμβολίου), ενώ για κάθε στέλεχος έγιναν τρεις επαναλήψεις. Στην περίπτωση αυτή είναι προφανές ότι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για εμβόλιο το αιώρημα σπορίων σε γλυκερόλη αφού η γλυκερόλη αποτελεί πηγή άνθρακα για τους στρεπτομυκήτες. Έτσι παρασκευάζουμε νέο εμβόλιο με την ίδια μεθοδολογία, μόνο που στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιούμε διάλυμα Ringer' s (1/4) για το ξέπλυμα και την επαναδιάλυση των σπορίων. Τέλος τα τρυβλία επωάζονται έως 21 ημέρες στους 25 °C.

7.2.7. : Χρησιμοποίηση διαφόρων πηγών αζώτου

Στο θρεπτικό υπόστρωμα για τη μελέτη της αύξησης των στρεπτομυκήτων σε διάφορες πηγές αζώτου (παράγρ. 8.7.) χρησιμοποιήθηκαν ως πηγές αζώτου οι: DL-α-αμινοβουτυρικό οξύ, L-ιστιδίνη και L-υδροξύπρολίνη. Η χρησιμοποίηση μίας πηγής αζώτου ελέγχεται με τη σύγκριση με ένα θετικό μάρτυρα (L-ασπαραγίνη 1% κ.ό. ως πηγή αζώτου) και με έναν αρνητικό μάρτυρα (χωρίς πηγή αζώτου) με τη δεύτερη σύγκριση να είναι και στην περίπτωση αυτή πιο σημαντική. Κάθε τρυβλίο εμβολιάστηκε με το πολύ έξι στελέχη (40 μl εμβολίου), ενώ για κάθε στέλεχος έγιναν τρεις επαναλήψεις. Τα τρυβλία επωάζονται έως 15 ημέρες στους 25 °C.

7.2.8. : Αποικοδόμηση της αλλαντοΐνης

Η αποικοδόμηση της αλλαντοΐνης μελετήθηκε σε σωλήνες οι οποίοι περιείχαν 5 ml από το αντίστοιχο θρεπτικό υπόστρωμα (παράγρ. 8.8). Οι σωλήνες εμβολιάστηκαν με 40 μl από κάθε στέλεχος και έγιναν 3 επαναλήψεις, ενώ από κάθε στέλεχος έγιναν και 3 επαναλήψεις αρνητικού μάρτυρα (εμβολιασμός σωλήνων χωρίς αλλαντοΐνη). Τα αποτελέσματα ελέγχονται μετά από 28 ημέρες επώασης στους 25 °C. Ως θετική αντίδραση θεωρείται η χρωματική αλλαγή του δείκτη από κίτρινο-πορτοκαλί σε ροδόχρουν, κόκκινο ή μοβ.

7.2.9. : Αποικοδόμηση της αρβουτίνης

Η αποικοδόμηση της αρβουτίνης μελετήθηκε σε σωλήνες οι οποίοι περιείχαν 5 ml από το αντίστοιχο θρεπτικό υπόστρωμα (παράγρ. 8.9). Οι σωλήνες εμβολιάστηκαν με 40 μl από κάθε στέλεχος και έγιναν 3 επαναλήψεις, ενώ από κάθε στέλεχος έγιναν και 3

επαναλήψεις αρνητικού μάρτυρα (εμβολιασμός σωλήνων χωρίς αρβουτίνη) ώστε να αποφευχθεί εσφαλμένη ανάγνωση του αποτελέσματος από στελέχη που παράγουν μελανίνη. Τα αποτελέσματα ελέγχονται μετά από 21 ημέρες επώασης στους 25 °C και σαν θετικοί λαμβάνονται οι σωλήνες στους οποίους παρήχθηκε καφέ-μαύρη χρωστική.

7.2.10 : Αποικοδόμηση της ξανθίνης

Για τη μελέτη της αποικοδόμησης της ξανθίνης χρησιμοποιούνται τρυβλία με το αντίστοιχο θρεπτικό υπόστρωμα (παράγρ. 8.10). Επειδή η ξανθίνη είναι αδιάλυτη στο νερό, η διανομή του θρεπτικού υλικού στα τρυβλία μετά την αποστείρωση έγινε με προσοχή ώστε η κατανομή της ξανθίνης να είναι ομοιόμορφη. Σε κάθε τρυβλίο εμβολιάζονται έως 2 στελέχη (40 μl εμβόλιο), και γίνονται 3 επαναλήψεις. Η επώαση διαρκεί 21 ημέρες στους 25 °C. Η δημιουργία διαφανούς ζώνης γύρω από το μικροοργανισμό αποτελεί ένδειξη αποικοδόμησης της ξανθίνης.

7.2.11. : Αποικοδόμηση της πηκτίνης

Τα τρυβλία με το αντίστοιχο θρεπτικό υπόστρωμα για την αποικοδόμηση της πηκτίνης (παράγρ. 8.11) εμβολιάζονται με 40 μl εμβολίου σ' ένα σημείο (spot inoculation). Σε κάθε τρυβλίο τοποθετούνται το πολύ έξι στελέχη και γίνονται τρεις επαναλήψεις για κάθε στέλεχος. Η επώαση διαρκεί έξι ημέρες στους 25 °C. Μετά το τέλος της επώασης τα τρυβλία πλημμυρίζονται με ζεστό διάλυμα εξαδεσι-τριμεθυλο-αμμωνιακού βρωμίδιου 1% κ.ό. και αφήνονται για μία ώρα. Τέλος το διάλυμα απομακρύνεται και γίνεται παρατήρηση για τυχόν ύπαρξη διαφανών ζωνών (ένδειξη υδρόλυσης της πηκτίνης) γύρω από τις αποικίες.

7.2.12. : Αποικοδόμηση της λεκιθίνης

Τα τρυβλία με το αντίστοιχο θρεπτικό υπόστρωμα για την αποικοδόμηση της λεκιθίνης (παράγρ. 8.12) εμβολιάζονται με 40 μl εμβολίου σ' ένα σημείο (spot inoculation). Σε κάθε τρυβλίο τοποθετούνται το πολύ έξι στελέχη και γίνονται τρεις επαναλήψεις για κάθε στέλεχος. Η επώαση διαρκεί έξι ημέρες στους 25 °C. Το ένζυμο λεκιθινάση προκαλεί την παραγωγή μίας αδιαφανούς κιτρινωπής κρεμώδους ζώνης. Η παρατήρηση των τρυβλίων γίνεται σε δυνατό φως, ώστε να αποφευχθεί να θεωρηθούν

εσφαλμένα ως θετικές οι ζώνες που οφείλονται σε λιπόλυση. Οι ζώνες αυτές είναι περισσότερο διαφανείς και έχουν πιο ακανόνιστο σχήμα γύρω από την αποικία.

7.2.13. : Αναγωγή των νιτρικών

Η αναγωγή των νιτρικών εξετάστηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 5 ml από το αντίστοιχο θρεπτικό υπόστρωμα (παράγρ. 8.13). Οι σωλήνες εμβολιάζονται με 40 μ l εμβολίου και επωάζονται 14 ημέρες στους 25 $^{\circ}$ C. Στο τέλος της επώασης η αναγωγή των νιτρικών ανιχνεύεται με την προσθήκη 0,2 ml από τα αντιδραστήρια Griess-Ilosvay I και II (BDH). Οι σωλήνες ανακινήθηκαν σε μηχανικό αναδευτήρα για 30 λεπτά και στη συνέχεια παρατηρήθηκαν για την εμφάνιση (θετική αντίδραση) ή όχι κόκκινου χρώματος. Στις περιπτώσεις αρνητικής αντίδρασης προστίθεται στους σωλήνες μικρή ποσότητα ψευδαργύρου και ανακινούνται καλά. Αν μετά την προσθήκη το χρώμα αλλάξει σε κόκκινο, το αποτέλεσμα θεωρείται αρνητικό.

7.2.14. : Παραγωγή H_2S

Η μελέτη της παραγωγής H_2S έγινε στους ίδιους σωλήνες που χρησιμοποιήθηκαν για την αναγωγή των νιτρικών εισάγοντας στο στόμιο του σωλήνα μια μικρή αποστειρωμένη λωρίδα διηθητικού χαρτιού, που είχε εμποτιστεί με κορεσμένο διάλυμα οξικού μολύβδου. Θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή ώστε κατά την προετοιμασία και τον εμβολιασμό να μη μολυνθεί το υπόστρωμα με το διάλυμα του οξικού μολύβδου. Για το λόγο αυτό τα πώματα που έφεραν τις λωρίδες χαρτιού με τον οξικό μολύβδο αποστειρώθηκαν χωριστά, και τοποθετήθηκαν στους σωλήνες μετά τον εμβολιασμό. Μετά από επώαση 14 ημερών στους 25 $^{\circ}$ C, το χαρτί εξετάζεται για την παρουσία καφέ ή μαύρου χρώματος που δηλώνει θετική αντίδραση και παραγωγή H_2S από το μικροοργανισμό.

7.2.15. : Αύξηση παρουσία παρεμποδιστών

Οι δοκιμές αυτές πραγματοποιήθηκαν σε τρυβλία με το αντίστοιχο θρεπτικό υπόστρωμα (παράγρ. 8.14) στο οποίο προστέθηκαν οι εξής παρεμποδιστές: νατραζίδιο 0,01 %, χλωριούχο νάτριο 7 % και φαινόλη 0,1 %. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν

τρυβλία χωρίς παρεμποδιστές. Κάθε τρυβλίο εμβολιάστηκε με το πολύ έξι στελέχη (40 μl εμβολίου) και έγιναν τρεις επαναλήψεις. Η επώαση διήρκεσε 14 ημέρες στους 25 °C. Ελάχιστη ή καθόλου αύξηση σε σχέση με τους μάρτυρες εκλαμβάνεται ως αρνητική.

7.2.16. : Αύξηση στους 45 °C

Η αύξηση στους 45 °C μελετήθηκε στο ίδιο βασικό θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για την αύξηση παρουσία παρεμποδιστών και χρησιμοποιήθηκαν κοινοί μάρτυρες. Τα τρυβλία εμβολιάστηκαν με τον ίδιο τρόπο και επώαστηκαν για 14 ημέρες στους 25 °C, τοποθετημένα σε κλειστές σακούλες που περιείχαν διηθητικό χαρτί κορεσμένο με νερό, έτσι ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση. Με το τέλος της επώασης παρατηρείται η παρουσία ή απουσία αύξησης.

7.2.17. : Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά.

Η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά μελετήθηκε στο ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για την αύξηση παρουσία παρεμποδιστών και χρησιμοποιήθηκαν κοινοί μάρτυρες. Δοκιμάστηκαν τα αντιβιοτικά νεομυκίνη και ριφαμπικίνη τα οποία αποστειρώθηκαν με διήθηση και προστέθηκαν στο βασικό θρεπτικό υπόστρωμα μετά την αποστείρωση έτσι ώστε να έχουν τελική συγκέντρωση 50 μg/ml υποστρώματος. Τα τρυβλία επώαστηκαν για 2-7 ημέρες στους 25 °C και συγκρίθηκαν με τους αρνητικούς μάρτυρες (τρυβλία χωρίς προσθήκη αντιβιοτικού).

7.2.18. : Παραγωγή αντιβιοτικών ουσιών

Χρησιμοποιούνται γυάλινα τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα Nutrien Agar και τα οποία εμβολιάζονται με 40 μl εμβολίου σ' ένα σημείο (spot inoculation). Σε κάθε τρυβλίο εμβολιάζονται έως και έξι στελέχη και επωάζονται στους 25 °C για 24-28 ώρες έτσι ώστε να έχουμε ικανοποιητική αύξηση χωρίς να παραχθούν, όσο είναι εφικτό, σπόρια. Στη συνέχεια τα τρυβλία αναστρέφονται, τοποθετείται στο καπάκι τους 1 ml χλωροφόρμιο και αφήνεται να εξατμιστεί στην απαγωγό αερίων για 40 λεπτά ώστε να νεκρωθούν οι αποικίες. Στη συνέχεια τα τρυβλία αφήνονται ανοιχτά σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow) ώστε να απομακρυνθούν εντελώς τα υπολείμματα χλωροφόρμιου. Τέλος

τοποθετείται στα τρυβλία ένα στρώμα μαλακού λιωμένου θρεπτικού άγαρ (Nutrient broth που περιέχει 0,6 % άγαρ) το οποίο βρίσκεται σε θερμοκρασία περίπου 40 °C και έχει προηγουμένως εμβολιαστεί με τον υπό εξέταση μικροοργανισμό. Οι μικροοργανισμοί που δοκιμάστηκαν ήταν οι *Aspergillus niger* και *Bacillus subtilis* (ένας μικροοργανισμός δείκτης ανά τρυβλίο). Μετά από επώαση 1-3 ημέρες τα τρυβλία εξετάζονται ως προς τη δημιουργία ζωνών παρεμπόδισης της αύξησης των υπό εξέταση οργανισμών λόγω παραγωγής παρεμποδιστικών ουσιών από τα στελέχη στρεπτομυκήτων.

7. 3. Ταυτοποίηση άλλων βακτηρίων

Η ταυτοποίηση των βακτηριακών απομονώσεων έγινε με τη χρήση της βάσης δεδομένων BIOLOG. Η μέθοδος αυτή αφορά τον έλεγχο για την ικανότητα των μικροοργανισμών να χρησιμοποιούν ή όχι 95 διαφορετικές πηγές άνθρακα. Η καλλιέργεια των μικροοργανισμών γίνεται σε πλακέτα η οποία φέρει 96 βοθρία σε καθένα από τα οποία εμπεριέχεται το βασικό θρεπτικό υπόστρωμα και οι 95 διαφορετικές πηγές άνθρακα σε αφυδατωμένη μορφή (ένα βοθρίο δεν περιέχει πηγή άνθρακα και χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας). Επιπλέον, σε κάθε βοθρίο εμπεριέχεται η χρωστική ιώδες του τετραζολίου, η οποία αποτελεί δείκτη οξειδοαναγωγής, και η αλλαγή του χρώματός της από διάφανο σε σκούρο ιώδες υποδηλώνει τη χρησιμοποίηση της πηγής άνθρακα από τον υπό μελέτη μικροοργανισμό.

7.3.1. Διαδικασία της μεθόδου

Αρχικά το στέλεχος που θέλουμε να ταυτοποιήσουμε καλλιεργείται σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα BUGM (Biolog Universal Growth Medium) το οποίο είναι κατάλληλο τόσο για Gram + όσο και για Gram- βακτήρια. Στην περίπτωση που το υπό μελέτη στέλεχος σχηματίζει ενδοσπόρια τότε καλλιεργείται σε θρεπτικό υπόστρωμα BUGM εμπλουτισμένο με γλυκόζη 1%. Η επώαση διαρκεί έως 18 ώρες (εμφάνιση ικανοποιητικής αύξησης) στους 30 °C. Στη συνέχεια παραλαμβάνονται τα κύτταρα με τη χρήση αποστειρωμένου βαμβακοφόρου στυλεού και δημιουργείται αιώρημα σε φυσιολογικό ορό του οποίου η περατότητα (η οποία μετρήθηκε στο αντίστοιχο φωτόμετρο Biolog) να βρίσκεται μεταξύ 53%-59% (αντιστοιχεί σε περίπου $3 \cdot 10^8$ κύτταρα/ml). Τέλος, εμβολιάζεται κάθε βοθρίο με 150 μl από το κυτταρικό αιώρημα και η

πλακέτα επωάζεται στους 30 °C. Ανάλογα με την αντίδραση κατά Gram του μικροοργανισμού που εξετάζεται, εμβολιάζονται και οι αντίστοιχες πλακέτες (με διαφορετικές πηγές άνθρακα για τους Gram+ και τους Gram- μικροοργανισμούς και οι οποίες δίνονται στα Σχήματα 7.1 και 7.2).

Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων γίνεται μετά από 4-6 ώρες επώασης και μετά από 24 ώρες επώασης. Ως θετικά λαμβάνονται τα βοθρία που αποκτούν σκούρο ιώδες χρώμα και ως αρνητικά τα διαφανή. Στην περίπτωση που κάποια βοθρία αποκτούν χρώμα ελαφρώς πιο σκούρο από αυτό του αρνητικού μάρτυρα, οι αντιδράσεις εκλαμβάνονται ως αμφίβολες.

Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων εισάγονται στη βάση δεδομένων η οποία τα συγκρίνει με τα αντίστοιχα αποτελέσματα στελεχών αναφοράς. Μαζί με το προτεινόμενο είδος δίνονται οι παρακάτω δείκτες:

Sim (ομοιότητα): Είναι η τιμή η οποία χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της ταυτοποίησης. Όσο περισσότερο πλησιάζει τη μονάδα, τόσο πιο αξιόπιστη είναι η ταυτοποίηση. Ο δείκτης αυτός πλησιάζει τη μονάδα όταν τα δεδομένα που εισάγονται ταιριάζουν με τα δεδομένα του είδους αναφοράς που εμφανίζεται ως προτεινόμενο είδος. Σε αντίθετη περίπτωση, ή όταν τα δεδομένα που εισάγονται είναι εξίσου όμοια με τα δεδομένα περισσότερων του ενός είδους αναφοράς, η τιμή του είναι αρκετά μικρότερη της μονάδας. Τιμές του δείκτη $\geq 0,75$ για αποτελέσματα που λαμβάνονται στις 4 ώρες επώασης και τιμές $\geq 0,5$ για αποτελέσματα που λαμβάνονται στις 24 ώρες επώασης είναι αποδεκτές.

Dist (απόσταση): Ο δείκτης αυτός σχετίζεται με τον αριθμό των αντιδράσεων με τις οποίες το υπό εξέταση στέλεχος «διαφωνεί» με το στέλεχος αναφοράς το οποίο εμφανίζεται ως προτεινόμενο είδος. Κάποιες από τις αντιδράσεις των στελεχών αναφοράς δεν είναι σταθερές για το είδος (δηλαδή, στελέχη του ίδιου είδους δεν δίνουν το ίδιο αποτέλεσμα), ενώ άλλες αντιδράσεις είναι σταθερές για το είδος. Στις περιπτώσεις που τα εισαγόμενα δεδομένα «διαφωνούν» με τα δεδομένα του είδους αναφοράς που προτείνεται σε σταθερές αντιδράσεις, τότε η τιμή της απόστασης ισούται με τον αριθμό των αντιδράσεων αυτών. Στις περιπτώσεις που η «διαφωνία υπάρχει σε μη σταθερές αντιδράσεις, τότε η τιμή της απόστασης προσεγγίζει τον αριθμό των αντιδράσεων αυτών.

B. ΥΑΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

A1 water	A2 α-cyclodextrin	A3 dextrin	A4 glycogen	A5 tween 40	A6 tween 80	A7 N-acetyl-D-galactosamine	A8 N-acetyl-D-glucosamine	A9 adonitol	A10 L-arabinose	A11 D-arabitol	A12 cellobiose
B1 i-erythritol	B2 D-fructose	B3 L-fucose	B4 D-galactose	B5 gentiobiose	B6 α-D-glucose	B7 m-inositol	B8 α-lactose	B9 α-D-lactose lactulose	B10 maltose	B11 D-mannitol	B12 D-mannose
C1 D-melibiose	C2 β-methyl D-glucoside	C3 psicose	C4 D-raffinose	C5 L-rhamnose	C6 D-sorbitol	C7 sucrose	C8 D-trehalose	C9 turannose	C10 xylytol	C11 methyl pyruvate	C12 mono-methyl succinate
D1 acetic acid	D2 cis-aconitic acid	D3 citric acid	D4 formic acid	D5 D-galactonic acid lactone	D6 D-galacturonic acid	D7 D-gluconic acid	D8 D- glucosaminic acid	D9 D-glucuronic acid	D10 α-hydroxy butyric acid	D11 β-hydroxy butyric acid	D12 γ-hydroxy butyric acid
E1 p-hydroxy phenylacetic acid	E2 itaconic acid	E3 α-keto butyric acid	E4 α-keto glutaric acid	E5 α-keto valeric acid	E6 D,L-lactic acid	E7 malonic acid	E8 propionic acid	E9 quinic acid	E10 D-saccharic acid	E11 sebacic acid	E12 succinic acid
F1 bromo succinic acid	F2 succinamic acid	F3 glucuronamide	F4 alaninamide	F5 D-alanine	F6 L-alanine	F7 L-alanyl- glycine	F8 L-asparagine	F9 L-aspartic acid	F10 L-glutamic acid	F11 glycyl- L-aspartic acid	F12 glycyl- L-glutamic acid
G1 L-histidine	G2 hydroxy L-proline	G3 L-leucine	G4 L-ornithine	G5 L-phenyl alanine	G6 L-proline	G7 L-pyro glutamic acid	G8 D-serine	G9 L-serine	G10 L-threonine	G11 D,L-carnitine	G12 γ-amino butyric acid
H1 urocanic acid	H2 inosine	H3 uridine	H4 thymidine	H5 phenyl ethylamine	H6 putrescine	H7 2-amino ethanol	H8 2,3- butanediol	H9 glycerol	H10 D,L-α- glycerol phosphate	H11 glucose-1- phosphate	H12 glucose-6- phosphate

Σχήμα 7.1: Πηγές άνθρακα στα βοηθία της πλακέτας BIOLOG για Gram (-) βακτήρια.

A1 water	A2 α- cyclodextrin	A3 β- cyclodextrin	A4 dextrin	A5 glycogen	A6 inulin	A7 mannan	A8 tween 40	A9 tween 80	A10 N-acetyl glucosamine	A11 N-acetyl mannosamine	A12 amygdalin
B1 L- arabinose	B2 D- arabitol	B3 arbutin	B4 cellobiose	B5 D- fructose	B6 L- fucose	B7 D- galactose	B8 D- galacturonic acid	B9 gentiobiose	B10 D- gluconic acid	B11 α-D- glucose	B12 m- inositol
C1 α-D- lactose	C2 lactulose	C3 maltose	C4 maltotriose	C5 D- mannitol	C6 D- mannose	C7 D- melezitose	C8 D- melibiose	C9 α-methyl D-galactoside	C10 β-methyl D-galactoside	C11 3-methyl glucose	C12 α-methyl D-glucoside
D1 β-methyl D-glucoside	D2 α-methyl D-mannoside	D3 palatinose	D4 D- psicose	D5 D- raffinose	D6 L- rhamnose	D7 D- ribose	D8 salicin	D9 sedoheptulosan	D10 D- sorbitol	D11 stachyose	D12 sucrose
E1 D- tagatose	E2 D- trehalose	E3 turannose	E4 xylytol	E5 D- xylose	E6 acetic acid	E7 α- hydroxybutyric acid	E8 β- hydroxybutyric acid	E9 γ- hydroxybutyric acid	E10 p- hydroxyphenyl acetic acid	E11 α-keto glutaric acid	E12 α-keto valeric acid
F1 lactamide	F2 D- lactic acid methyl ester	F3 L- lactic acid	F4 D- malic acid	F5 L- malic acid	F6 methyl pyruvate	F7 methyl succinate	F8 propionic acid	F9 pyruvic acid	F10 succinamic acid	F11 succinic acid	F12 N-acetyl L-glutamic acid
G1 alaninamide	G2 D- alanine	G3 L- alanine	G4 L- alanyl-glycine	G5 L- asparagine	G6 L- glutamic acid	G7 glycyl- L-glutamic acid	G8 L- pyroglutamic acid	G9 L- serine	G10 putrescine	G11 2, 3- butanediol	G12 glycerol
H1 adenosine	H2 2'- deoxy adenosine	H3 inosine	H4 thymidine	H5 uridine	H6 adenosine-5'- monophosphate	H7 thymidine-5'- monophosphate	H8 uridine-5'- monophosphate	H9 fructose-6- phosphate	H10 glucose-1- phosphate	H11 glucose-6- phosphate	H12 D-L-α- glycerol phosphate

Σχήμα 7.2: Πηγές άνθρακα στα βοηθία της πλακέτας BIOLOG για Gram (+) βακτήρια.

8. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

8.1: Θρεπτικό υπόστρωμα για την καλλιέργεια του *Azotobacter vinelandii*

Διάλυμα 1: K_2HPO_4 0,8 g, KH_2PO_4 0,2 g, NaCl 0,1 g, $Na_2FeEDTA$ 28 mg, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 25 mg, yeast extract 100 mg, μαννιτόλη 5 g, σακχαρόζη 5 g, γαλακτικό νάτριο (60% κ.ο.) 0,5 ml, NH_4Cl 1 g, απιονισμένο νερό 900 ml.

Διάλυμα 2: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g, $CaCl_2$ 0,06 g, σε 100 ml απιονισμένο νερό.

Τα δύο υλικά αποστειρώνονται χωριστά, και αναμιγνύονται αφού ψυχθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Rennie R. 1980).

8.2: Ενυδατωμένο άγαρ

18 g agar/ l απιονισμένου νερού

Τα παρακάτω θρεπτικά υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των ακτινοβακτηρίων του γένους *Streptomyces* και είναι σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται από τους Williams et al. 1983a & b.

8.3: Θρεπτικό υπόστρωμα αμύλου-ανόργανων αλάτων

Διαλυτό άμυλο 10 g, $(NH_4)_2SO_4$ 2 g, $CaCO_3$ 2 g, K_2HPO_4 1 g, NaCl 1 g και άγαρ 20 g. Το pH ρυθμίζεται στο 7. Αρχικά διαλύεται το άμυλο σε μικρή ποσότητα απιονισμένου νερού και στη συνέχεια συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 500 ml. Διαλύονται τα υπόλοιπα συστατικά σε 500 ml απιονισμένου νερού και αναμιγνύονται τα δύο διαλύματα πριν την αποστείρωση.

8.4: Θρεπτικό υπόστρωμα γλυκερόλης – ασπαραγίνης

Γλυκερόλη 10 g, L-ασπαραγίνη 1g, K_2HPO_4 1 g, και άγαρ 20 g σε απιονισμένο νερό έως όγκο 1 l. Το pH ρυθμίζεται στο 7,0 πριν την αποστείρωση.

8.5: Θρεπτικό υπόστρωμα πεπτόνης – εκχύλισμα ζύμης – σιδήρου

Βακτηριολογική πεπτόνη 5 g, πρωτεϊνική πεπτόνη 5 g, κιτρικό σιδηρούχο αμμώνιο 0,5 g, διφωσφορικό κάλιο 1 g, θειώδες νάτριο 0,08 g, εκχύλισμα ζύμης 1 g, και άγαρ 15 g σε απιονισμένο νερό έως όγκο 1 l. Το pH ρυθμίζεται στο 7,4 πριν την αποστείρωση.

8.6: Θρεπτικό υποστρώματα για τη μελέτη της αύξησης των στρεπτομυκήτων σε διάφορες πηγές άνθρακα

i) βασικό διάλυμα (1l): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,64 g, KH_2PO_4 2,8 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5,65 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g, και άγαρ 15g. Το pH ρυθμίζεται στο 7 πριν την αποστείρωση.

ii) διαλύματα πηγών άνθρακα: Παρασκευάζονται διαλύματα από κάθε πηγή άνθρακα έτσι ώστε όταν αυτά προστεθούν στο βασικό διάλυμα να έχουν τελική συγκέντρωση 1% βάρος κατ' όγκο. Όλες οι πηγές άνθρακα αποστειρώνονται με διήθηση σε αποστειρωμένο βακτηριολογικό ηθμό μιας χρήσης και προστίθενται στο βασικό διάλυμα μετά την αποστείρωση.

8.7: Θρεπτικό υπόστρωμα για τη μελέτη της αύξησης των στρεπτομυκήτων σε διάφορες πηγές αζώτου

i) βασικό διάλυμα (1l): γλυκόζη 10 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, NaCl 0,5 g και άγαρ 15 g. Το pH ρυθμίζεται στο 7 πριν την αποστείρωση.

ii) διαλύματα πηγών αζώτου: Παρασκευάζονται διαλύματα από κάθε πηγή αζώτου έτσι ώστε όταν αυτά προστεθούν στο βασικό διάλυμα να έχουν τελική συγκέντρωση 1% βάρος κατ' όγκο. Όλες οι πηγές αζώτου αποστειρώνονται με διήθηση σε αποστειρωμένο βακτηριολογικό ηθμό μιας χρήσης και προστίθενται στο βασικό διάλυμα μετά την αποστείρωση.

8.8: Θρεπτικό υπόστρωμα για την αποικοδόμηση της αλλαντοΐνης

Εκχύλισμα ζύμης 0,1 g, KH_2PO_4 9,1 g, NaHPO_4 9,5 g, αλλαντοΐνη 3,3 g, ερυθρό της φαινόλης 0,01 g, και άγαρ 7,5 g σε απιονισμένο νερό έως όγκο 1 l. Το pH ρυθμίζεται στο 7,5 πριν την αποστείρωση.

8.9: Θρεπτικό υπόστρωμα για την αποικοδόμηση της αρβουτίνης

Εκχύλισμα ζύμης 3 g, αρβουτίνη 1 g, κιτρικό σιδηρούχο αμμώνιο 0,5 g, και άγαρ 7,5 g σε απιονισμένο νερό έως όγκο 1 l. Το pH ρυθμίζεται στο 7,2 πριν την αποστείρωση.

8.10: Θρεπτικό υπόστρωμα για την αποικοδόμηση της ξανθίνης

Εκχύλισμα ζύμης 1 g, Lab-lemco (Oxoid) 0,8 g, γλυκερόλη 10 g, NZ αμίνη A 2 g, ξανθίνη 4 g, και άγαρ 15 g σε απιονισμένο νερό έως όγκο 1 l. Το pH ρυθμίζεται στο 7,2 πριν την αποστείρωση.

8.11: Θρεπτικό υπόστρωμα για την αποικοδόμηση της πηκτίνης

Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από τρία διαλύματα σε απιονισμένο νερό:

Διάλυμα Α: Na_2HPO_4 6 g, KH_2PO_4 4 g σε 200 ml απιονισμένο νερό.

Διάλυμα Β: πηκτίνη 5 g, σε 200 ml (ζεστό) απιονισμένο νερό.

Διάλυμα Γ: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,001 g, εκχύλισμα ζύμης 1 g, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,2 g, και άγαρ 10 g σε 600 ml απιονισμένο νερό.

Τα τρία διαλύματα αποστειρώνονται χωριστά και αναμιγνύονται μετά την αποστείρωση ενώ το τελικό pH του υποστρώματος είναι 7,4.

8.12: Θρεπτικό υπόστρωμα για την αποικοδόμηση της λεκιθίνης

Πεπτόνη 10 g, εκχύλισμα ζύμης 5 g, γλυκόζη 1 g, NaCl 10 g, διάλυμα κρόκου αυγού (egg yolk) 5% κ.ό. και άγαρ 12 g σε απιονισμένο νερό έως όγκο 1 l. Το pH ρυθμίζεται στο 7 πριν την αποστείρωση. Το στείρο διάλυμα του κρόκου αυγού προστίθεται ασηπτικά μετά την αποστείρωση και όταν το υπόστρωμα βρίσκεται σε θερμοκρασία περίπου 45°C.

8.13: Θρεπτικό υπόστρωμα για τη μελέτη της αναγωγής των νιτρικών

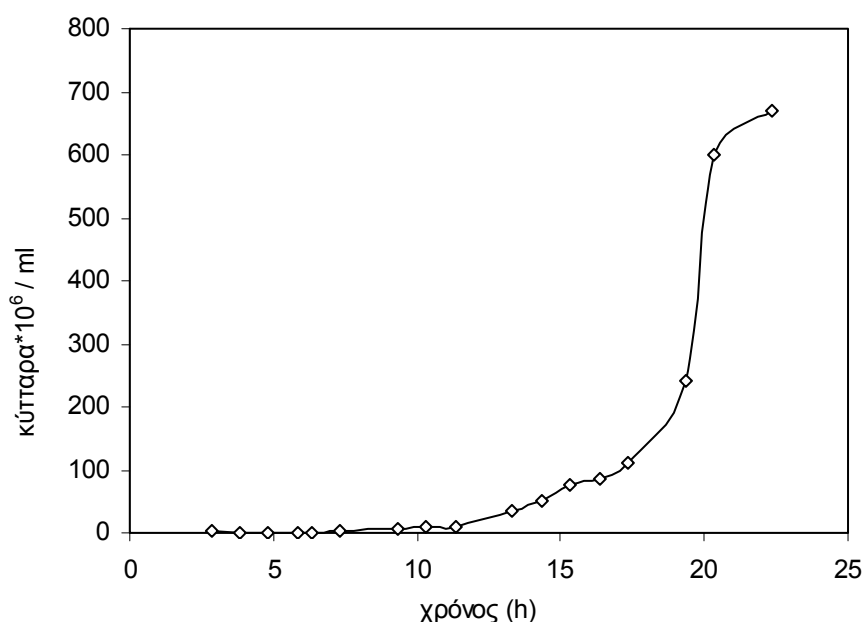
Nutrient broth το οποίο συμπληρώθηκε με KNO_3 2 g, άγαρ 6 g σε απιονισμένο νερό έως όγκο 1 l. Το pH ρυθμίζεται στο 7 πριν την αποστείρωση.

8.14: Θρεπτικό υπόστρωμα για τη μελέτη της αύξησης παρουσία παρεμποδιστών

Εκχύλισμα ζύμης 1g, Lab-lemco (Oxoid) 0,8g, γλυκερόλη 10g, NZ αμίνη A 2 g και άγαρ 15 g σε απιονισμένο νερό έως όγκο 1 l. Το pH ρυθμίζεται στο 7,3 πριν την αποστείρωση. Ο κάθε παρεμποδιστής προστίθεται στο θρεπτικό υλικό στην κατάλληλη συγκέντρωση πριν από την αποστείρωση.

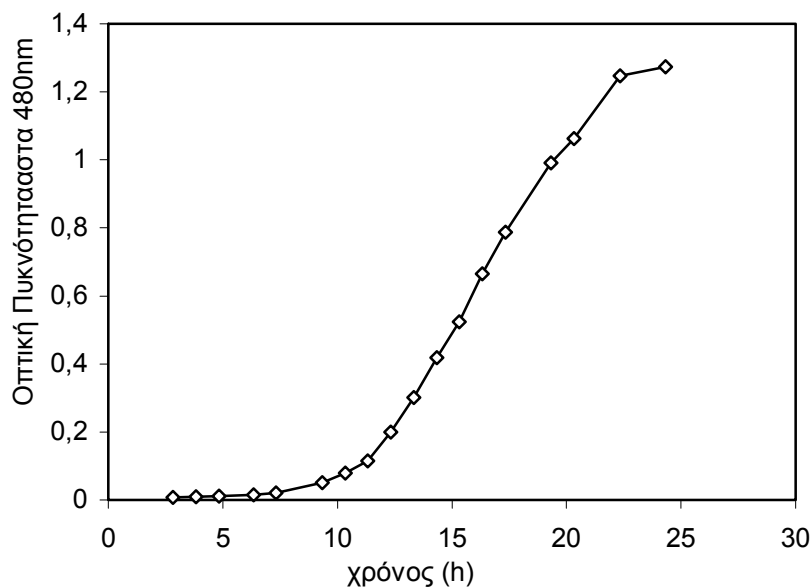
9. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΩΝ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΩΝ (Ζ.Υ.Α.Ε.)

Η αερόβια βιολογική επεξεργασία των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μεθοδολογία που έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο Μικροβιολογίας του Γ.Π.Α. με τη χρήση του αζωτοδεσμευτικού βακτηρίου *Azotobacter vinelandii* στέλεχος Α (παράγρ. 4.3). Στο Σχήμα 9.1 δίνεται η καμπύλη αύξησης του *A. vinelandii* σε θρεπτικό υπόστρωμα Rennie, το οποίο χρησιμοποιούνταν για τον εμβολιασμό των αποβλήτων. Ο ειδικός ρυθμός αύξησης του βακτηρίου (ο οποίος προκύπτει από την κλίση της ευθείας των λογαρίθμων του πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου) ήταν $\mu=0,41\text{h}^{-1}$ και ο χρόνος διπλασιασμού της καλλιέργειας (που υπολογίστηκε από τη σχέση $t_d=\ln 2/\mu$) ήταν $t_d=1,7\text{ h}$.



Σχήμα 9.1: Καμπύλη αύξησης υγρής καλλιέργειας του *Azotobacter vinelandii* στέλεχος Α, το οποίο αυξήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα Rennie στους 30⁰ C και ανάδευση στις 120 στροφές/min.

Στο Σχήμα 9.2 δίνεται η καμπύλη της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας του *A. vinelandii*. Με βάση την καμπύλη αυτή γίνονταν ο υπολογισμός του αριθμού κυττάρων με τον οποίο θα εμβολιαστούν τα Υ.Α.Ε. στο στάδιο της αερόβιας βιολογικής επεξεργασίας.



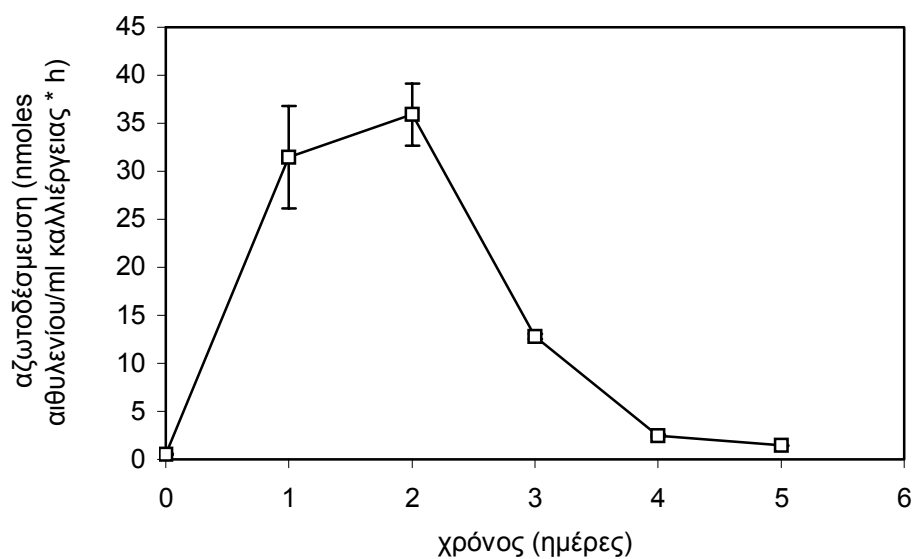
Σχήμα 9.2: Υγρή καλλιέργεια του *Azotobacter vinelandii* στέλεχος A, το οποίο αυξήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα Rennie στους 30°C και ανάδευση στις 120 στροφές/min.

Η πορεία της αερόβιας βιολογικής επεξεργασίας των Υ.Α.Ε. και η αύξηση του *Azotobacter vinelandii* στα απόβλητα, ελέγχονταν με τον προσδιορισμό της αζωτοδεσμευτικής ικανότητας και της μεταβολής της φυτοτοξικότητας των αποβλήτων με την πάροδο του χρόνου.

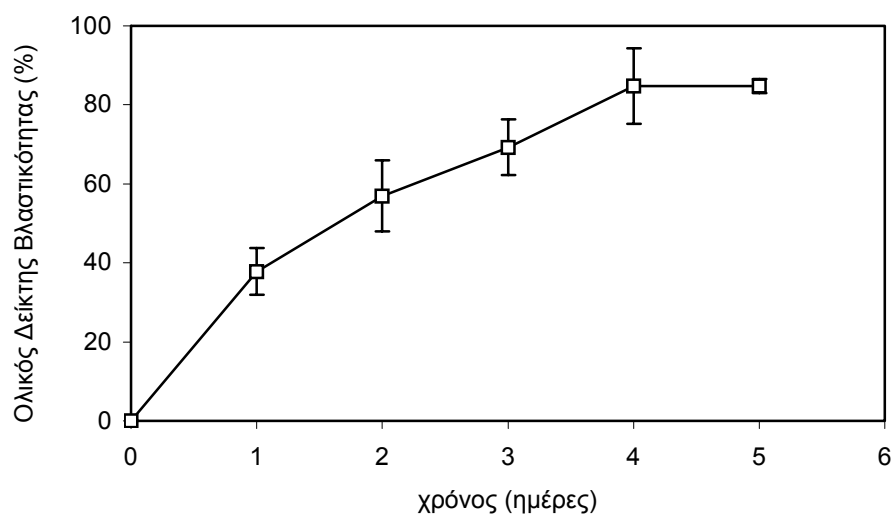
Στο Σχήμα 9.3, δίνεται η μεταβολή της αζωτοδέσμευσης κατά τη διάρκεια ενός τυπικού κύκλου λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα τύπου βιοτροχού, σε κλειστή (batch) καλλιέργεια 5 ημερών και κάτω από μη ασηπτικές συνθήκες (παράγρ. 5.2). Παρατηρείται ότι η αζωτοδέσμευση ξεκινάει από την επόμενη κιόλας ημέρα μετά τον εμβολιασμό, διατηρεί έντονους ρυθμούς μέχρι και τη 2^η ημέρα και στη συνέχεια μειώνεται καθώς εξαντλείται το διαθέσιμο υπόστρωμα για τα βακτήρια αυτά.

Στο Σχήμα 9.4 δίνεται η μεταβολή του Ολικού Δείκτη Βλαστικότητας ο οποίος μετρήθηκε σε αραιώση του αποβλήτου με απιονισμένο νερό 1:1, κατά τη διάρκεια ενός τυπικού κύκλου πέντε ημερών λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα (παράγρ. 4.1.3.5.1). Παρατηρείται ότι με την πάροδο του χρόνου η φυτοτοξικότητα του αποβλήτου (το οποίο αρχικά είναι 100% φυτοτοξικό) μειώνεται και ο Ο.Δ.Β. αυξάνει.

Οι δύο παραπάνω παράγοντες (εκδήλωση έντονης αζωτοδεσμευτικής ικανότητας στα εμβολιασμένα απόβλητα με το *A. vinelandii* και η μείωση της φυτοτοξικότητάς τους) υποδηλώνουν την επιτυχή έκβαση της βιολιπασματοποίησής τους. Με την πάροδο 5 ημερών όπου οι δύο αυτοί παράγοντες σταθεροποιούνταν, παραλαμβάνονταν το προϊόν της αερόβιας επεξεργασίας και χρησιμοποιούνταν ως Ε.Υ.Α.Ε.



Σχήμα 9.3: Αζωτοδεσμευτική ικανότητα του *Azotobacter vinelandii* στέλεχος Α εμβολιασμένου σε υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων. Οι κάθετες μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση.



Σχήμα 9.4: Μεταβολή του Ολικού Δείκτη Βλαστικότητας κατά τη διάρκεια της αερόβιας βιολογικής επεξεργασίας των Υ.Α.Ε. στον εργαστηριακό βιοαντιδραστήρα. Οι κάθετες μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.

10. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ Ε.Υ.Α.Ε. ΚΑΙ Υ.Α.Ε. ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

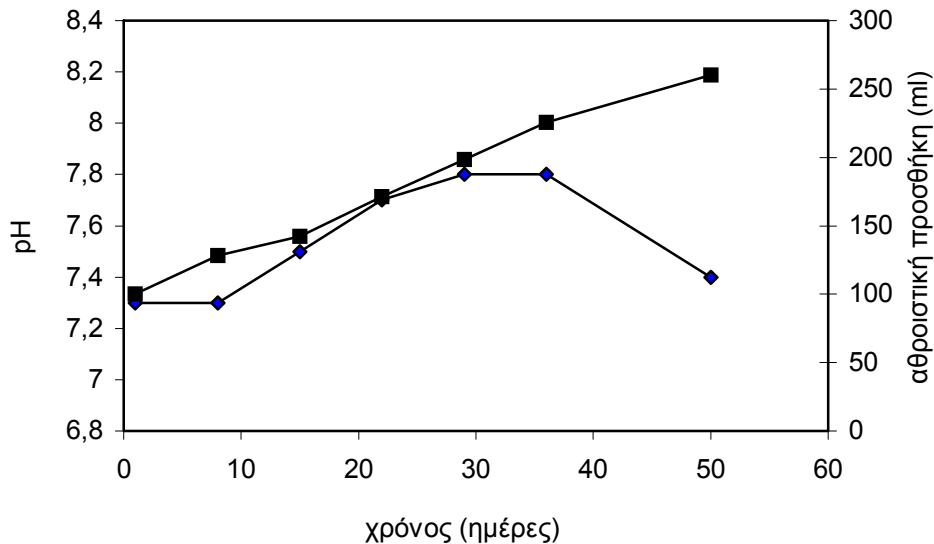
10.1 Μελέτη της επίδρασης των προσθηκών Υ.Α.Ε. και Ε.Υ.Α.Ε. στις χημικές ιδιότητες του εδάφους

Κατά τη διάρκεια του σταδίου των διαβρέξεων του εδάφους με τα υγρά των τριών χειρισμών, προσδιορίστηκε η μεταβολή του pH και της αγωγιμότητας πριν από κάθε διάβρεξη καθώς και μία ημέρα μετά (παράγρ. 4.1.3.3. και 4.1.3.4). Στο στάδιο αυτό οι διαβρέξεις γίνονταν με τέτοιο τρόπο ώστε το έδαφος να διατηρείται στο 60% της υδατοϊκανότητάς του. Στον Πίνακα 10.1 δίνονται οι προσθήκες των υγρών (σε ml / kg ξηρού βάρους εδάφους) καθώς και οι τιμές του pH και της αγωγιμότητας για τους τρεις χειρισμούς στην πορεία του χρόνου. Το αρχικό pH των ανεπεξέργαστου αποβλήτου ελαιοτριβείων (Υ.Α.Ε.) που χρησιμοποιήθηκε για τις διαβρέξεις ήταν 4,9 και η ηλεκτρική αγωγιμότητα 15 mS/cm ενώ το pH του επεξεργασμένου αποβλήτου (Ε.Υ.Α.Ε.) ήταν 8,9 και η ηλεκτρική αγωγιμότητα 18 mS/cm .

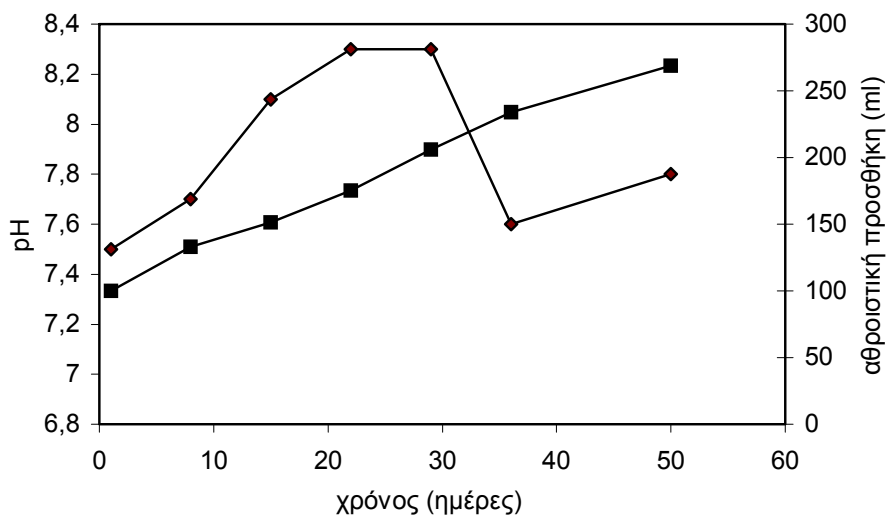
Πίνακας 10.1: Προσθήκες (ml/kg ξηρού βάρους εδάφους) νερού, επεξεργασμένου αποβλήτου και ανεπεξέργαστου υγρού αποβλήτου ελαιοτριβείων στο έδαφος και μεταβολές στο pH και στην αγωγιμότητα κατά τη διάρκεια του 1^{ου} πειράματος.

	N.			Ε.Υ.Α.Ε. (1:1)			Υ.Α.Ε.		
ημέρα	Αθροιστική προσθήκη (ml)	pH	Αγωγιμ. (mS/cm)	Αθροιστική προσθήκη (ml)	pH	Αγωγιμ. (mS/cm)	Αθροιστική προσθήκη (ml)	pH	Αγωγιμ. (mS/cm)
0 ^η (πριν)	100	7,3	0,1	100	7,3	0,1	100	7,3	0,1
1 ^η (μετά)		7,3	0,1		7,5	0,16		7,1	0,14
7 ^η (πριν)	128,2	6,8	0,13	133	7,1	0,3	123,4	7,1	0,2
8 ^η (μετά)		7,3	0,13		7,7	0,34		7	0,29
14 ^η (πριν)	142,2	7,3	0,07	151,5	7,6	0,19	142,2	7,3	0,14
15 ^η (μετά)		7,5	0,08		8,1	0,31		7,6	0,16
21 ^η (πριν)	171,2	7	0,08	175,3	7,4	0,19	168,3	7,2	0,13
22 ^η (μετά)		7,7	0,11		8,3	0,23		7,9	0,16
28 ^η (πριν)	198,4	7,5	0,07	206,1	8,1	0,21	196	7,7	0,13
29 ^η (μετά)		7,8	0,09		8,3	0,22		8	0,13
35 ^η (πριν)	255,8	7,7	0,08	234,1	7,9	0,25	217,6	7,9	0,14
36 ^η (μετά)		7,8	0,08		7,6	0,27		8	0,16
49 ^η (πριν)	260,4	7,5	0,09	268,8	8	0,27	252,2	8	0,15
50 ^η (μετά)		7,4	0,09		7,8	0,28		7,6	0,23

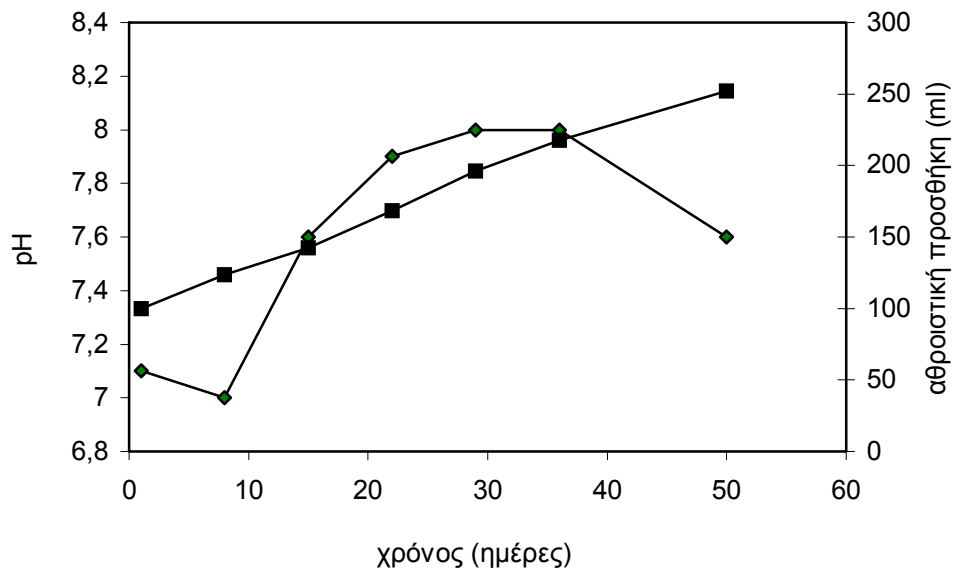
Στα Σχήματα 10.1-10.3 δίνονται οι τιμές του pH οι οποίες προσδιορίστηκαν μία ημέρα μετά από κάθε διάβρεξη του εδάφους με τα υγρά των τριών χειρισμών, σε σχέση με την ποσότητα του αντίστοιχου υγρού που χρησιμοποιήθηκε, κατά τη διάρκεια του 1^{ου} πειράματος.



Σχήμα 10.1: Μεταβολή του pH σε έδαφος που διαβρέχονταν με νερό (◆) μία ημέρα μετά από κάθε προσθήκη, σε σχέση με την ποσότητα του υγρού που χρησιμοποιήθηκε (■), κατά τη διάρκεια του 1^{ου} πειράματος.



Σχήμα 10.2: Μεταβολή του pH σε έδαφος που διαβρέχονταν με επεξεργασμένο απόβλητο ελαιοτριβείων (◆), μία ημέρα από κάθε προσθήκη, σε σχέση με την ποσότητα του υγρού που χρησιμοποιήθηκε (■), κατά τη διάρκεια του 1^{ου} πειράματος.



Σχήμα 10.3: Μεταβολή του pH σε έδαφος που διαβρέχονταν με υγρό απόβλητο ελαιοτριβείων (◆), μία μέρα μετά από κάθε διάβρεξη, σε σχέση με την ποσότητα του υγρού που χρησιμοποιήθηκε (■), κατά τη διάρκεια του 1^{ου} πειράματος.

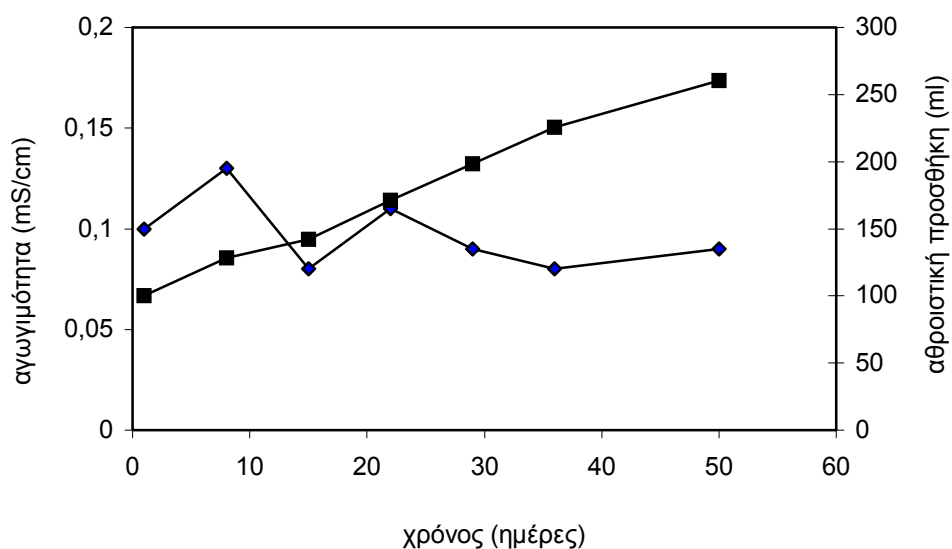
Παρατηρείται ότι το τελικό pH και των τριών χειρισμών αυξήθηκε, με τη μικρότερη αύξηση να εκδηλώνεται στο έδαφος που διαβρέχονταν με νερό και τη μεγαλύτερη αύξηση να εκδηλώνεται στο έδαφος που διαβρέχονταν με Ε.Υ.Α.Ε. Στην περίπτωση των διαβρέξεων με τα Υ.Α.Ε, παρ' όλο που το υλικό που χρησιμοποιείται είναι όξινο, παρατηρείται ότι το pH του εδάφους αυξάνει.

Παρατηρείται επίσης μια ανεξαρτησία των μεταβολών του pH, από την ποσότητα του υγρού που χρησιμοποιήθηκε για τις διαβρέξεις και στους τρεις χειρισμούς. Έτσι, ενώ το συνολικό ποσό του υγρού που χρησιμοποιείται σε κάθε διάβρεξη είναι περίπου σταθερό (η συνολική προσθήκη αυξάνει γραμμικά με το χρόνο), η μεταβολή του pH δεν είναι γραμμική. Οι μεταβολές αυτές είναι εντονότερες στους χειρισμούς με Υ.Α.Ε. και Ε.Υ.Α.Ε. και ηπιότερες στο χειρισμό με νερό. Οι μεταβολές στο pH του εδάφους οφείλονται τόσο στη συσσώρευση αλάτων από τα απόβλητα τα οποία αυξάνουν το εδαφικό pH όσο και στη μικροβιακή δραστηριότητα (εάν π.χ. τα οργανικά συστατικά τα οποία διαμορφώνουν το pH του αποβλήτου έχουν καταναλωθεί από τους μικροοργανισμούς ή όχι και την παραγωγή μικροβιακών μεταβολιτών).

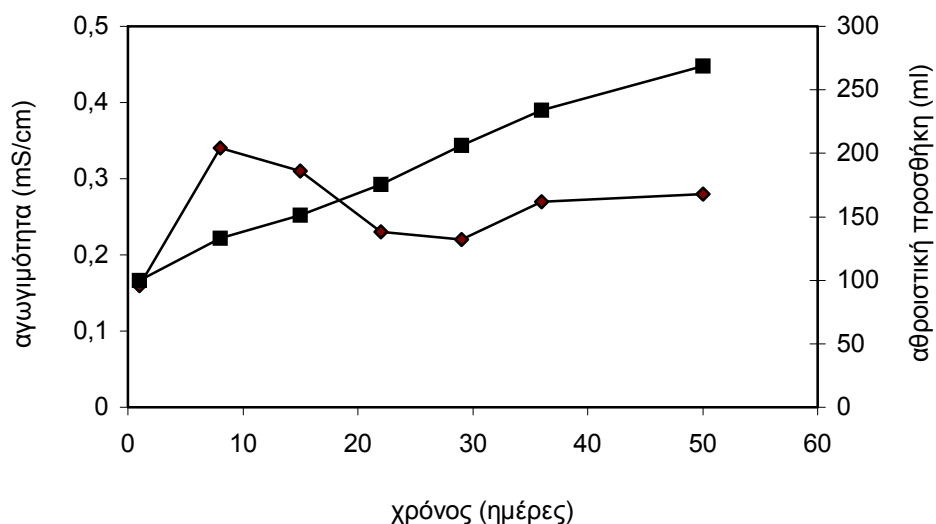
Στο 2^ο πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκαν μεγαλύτερες ποσότητες αποβλήτων στο στάδιο των διαβρέξεων (413 ml/kg ξηρού βάρους εδάφους Υ.Α.Ε. και 411 ml/kg ξηρού

βάρους εδάφους Ε.Υ.Α.Ε.) το τελικό pH μετά το τέλος του σταδίου αυτού διαμορφώθηκε στο 8,1 στο χειρισμό με Υ.Α.Ε. και στο 8,3 στο χειρισμό με Ε.Υ.Α.Ε.

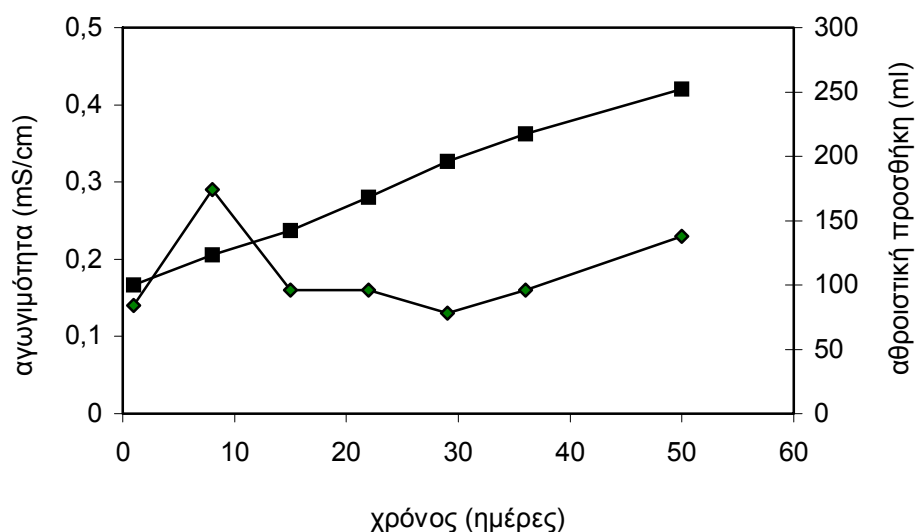
Στα Σχήματα 10.4-10.5 δίνονται οι μεταβολές της αγωγιμότητας στο έδαφος μετά από κάθε διάβρεξη με τα υγρά των τριών χειρισμών σε σχέση με την ποσότητα του υγρού διάβρεξης κατά τη διάρκεια του 1^{ου} πειράματος. Η ηλεκτρική αγωγιμότητα των Υ.Α.Ε. που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 15 mS/cm και των Ε.Υ.Α.Ε. 18 mS/cm.



Σχήμα 10.4: Μεταβολή της αγωγιμότητας του εδάφους που διαβρέχονταν με νερό (♦), μία ημέρα μετά από κάθε διάβρεξη, σε σχέση με την ποσότητα του υγρού που χρησιμοποιήθηκε (■), κατά τη διάρκεια του 1^{ου} πειράματος.



Σχήμα 10.5: Μεταβολή της αγωγιμότητας του εδάφους που διαβρέχονταν με επεξεργασμένο απόβλητο ελαιοτριβείων (♦), μία ημέρα μετά από κάθε διάβρεξη, σε σχέση με την ποσότητα του υγρού που χρησιμοποιήθηκε (■), κατά τη διάρκεια του 1^{ου} πειράματος.



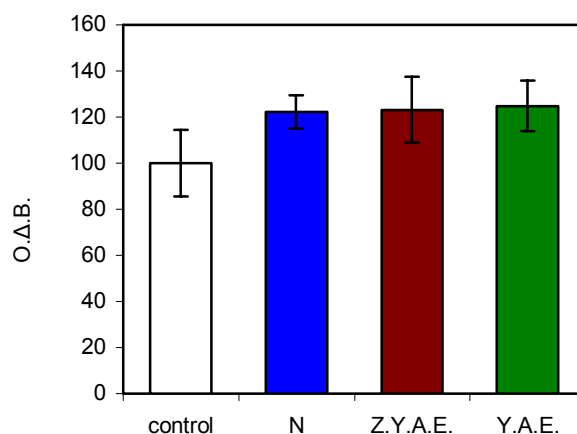
Σχήμα 10.6: Μεταβολή της αγωγιμότητας του εδάφους που διαβρέχονταν με ανεπεξέργαστο υγρό απόβλητο ελαιοτριβείων (◆), μία ημέρα μετά από κάθε διάβρεξη, σε σχέση με την ποσότητα του υγρού που χρησιμοποιήθηκε (■), κατά τη διάρκεια του 1^{ου} πειράματος.

Από τα Σχήματα 10.4-10.6 μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι στο έδαφος που δέχονταν μόνο νερό, οι τιμές της αγωγιμότητας ήταν αρκετά χαμηλές, ενώ οι υψηλότερες τιμές αγωγιμότητας εμφανίστηκαν στο χειρισμό με το επεξεργασμένο απόβλητο (αφού το υγρό αυτό είχε υψηλότερη αγωγιμότητα από το ανεπεξέργαστο απόβλητο λόγω της προσθήκης CaO κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του). Όπως και στην περίπτωση του pH, έτσι και οι τιμές της αγωγιμότητας ήταν ανεξάρτητες από την ποσότητα του υγρού που χρησιμοποιήθηκε.

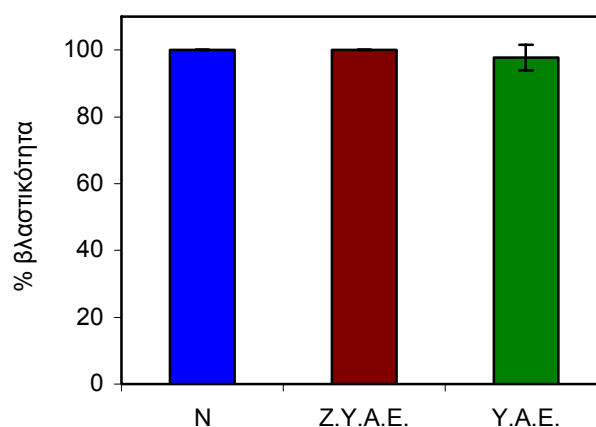
Στο 2^ο πείραμα όπου οι προσθήκες των αποβλήτων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μεγαλύτερες, η αγωγιμότητα αμέσως μετά το τέλος των διαβρέξεων διαμορφώθηκε στα 0,46 mS/cm τόσο στο χειρισμό με Υ.Α.Ε. όσο και στο χειρισμό με Ε.Υ.Α.Ε.

10.2. Μελέτη της επίδρασης των προσθηκών Υ.Α.Ε. και Ε.Υ.Α.Ε. στη φυτοτοξικότητα του εδάφους

Τα Υ.Α.Ε. εμφανίζουν έντονα φυτοτοξικές ιδιότητες και επομένως θεωρήθηκε απαραίτητος ο έλεγχος των εδαφών που δέχθηκαν Υ.Α.Ε. ή Ε.Υ.Α.Ε. ως προς τη φυτοτοξικότητα, πριν το στάδιο της μελέτης της επισχετικότητας (παράγρ. 4.1.3.5). Τα αποτελέσματα των δοκιμών για το 2^ο πείραμα όπου το έδαφος δέχθηκε τις μεγαλύτερες ποσότητες αποβλήτων, δίνονται στα Σχήματα 10.7 και 10.8.



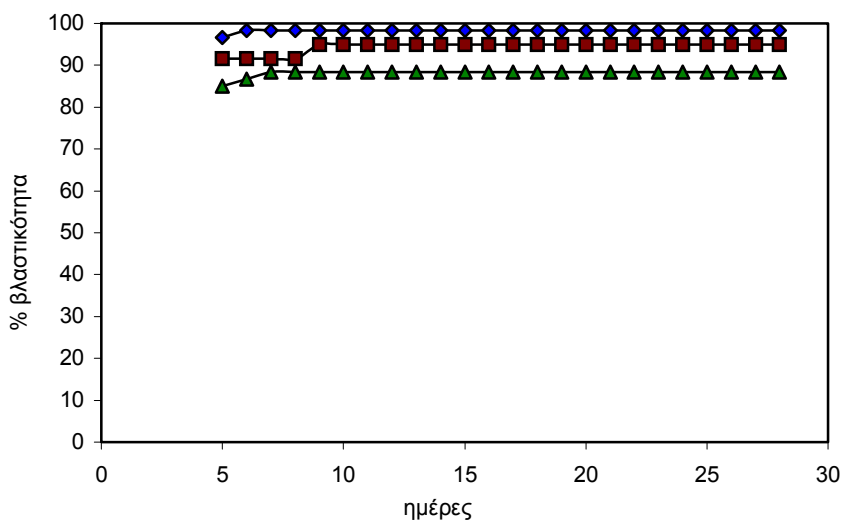
Σχήμα 10.7: Ολικός δείκτης βλαστικότητας σπόρων κάρδαμου σε εκχυλίσματα εδάφους από τους τρεις χειρισμούς κατά τη διάρκεια του 2^{ου} πειράματος. Οι μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.



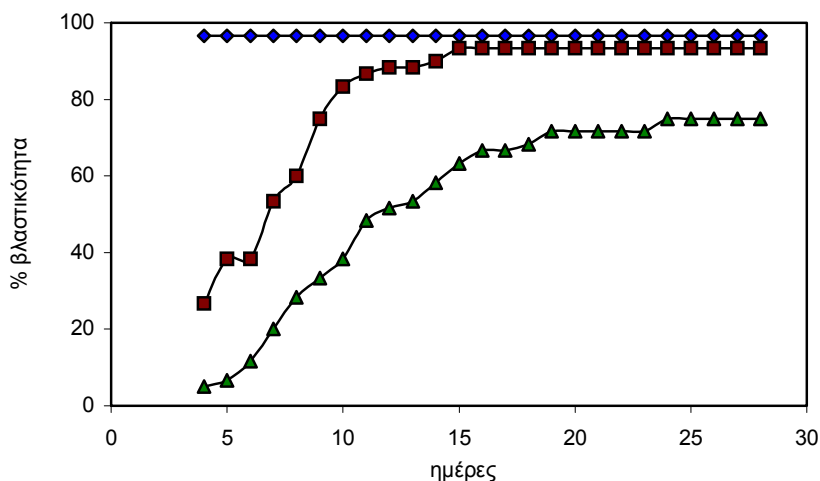
Σχήμα 10.8: Ποσοστά βλαστικότητας σπόρων μαρουλιού οι οποίοι φυτεύτηκαν απ' ευθείας σε έδαφος από τους τρεις χειρισμούς κατά τη διάρκεια του 2^{ου} πειράματος. Οι μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.

Στα Σχήματα 10.7 και 10.8 παρατηρούμε ότι δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών χειρισμών ($p>0,05$) και ότι η φυτοτοξικότητα του υγρού αποβλήτου ελαιοτριβείων έχει εξαλειφθεί σε χρονικό διάστημα 40 ημέρες μετά την τελευταία διάβρεξη. Μετά τη διαπίστωση αυτή θεωρήθηκε ότι το έδαφος ήταν έτοιμο για να μολυνθεί τεχνητά με το μύκητα και να φυτευτεί σε διάφορους χρόνους μετά τη μόλυνση με σπόρους μαρουλιού.

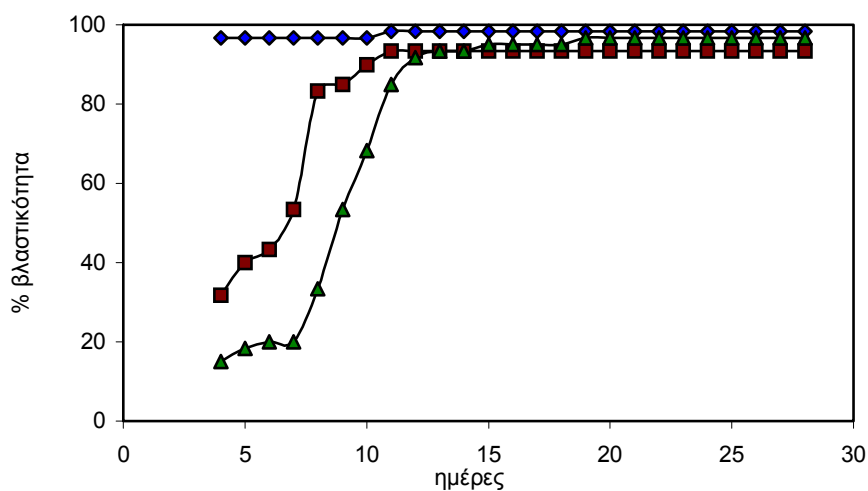
Παρ' όλο που οι προκαταρκτικές δοκιμές δεν έδειξαν την ύπαρξη φυτοτοξικής δράσης, στην πορεία του πειράματος για τη μελέτη της επισχετικότητας, εκδηλώθηκε στη 2^η σπορά έντονη φυτοτοξικότητα, η οποία μειώθηκε στην 3^η σπορά και εξαφανίστηκε στην 4^η σπορά. Για τη μελέτη της φυτοτοξικότητας που εμφανίστηκε, δίνονται στα Σχήματα 10.9-10.12 οι μάρτυρες των τριών χειρισμών από το στάδιο του ελέγχου της επισχετικότητας (οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της βλαστικότητας των σπόρων μαρουλιού στους τρεις χειρισμούς).



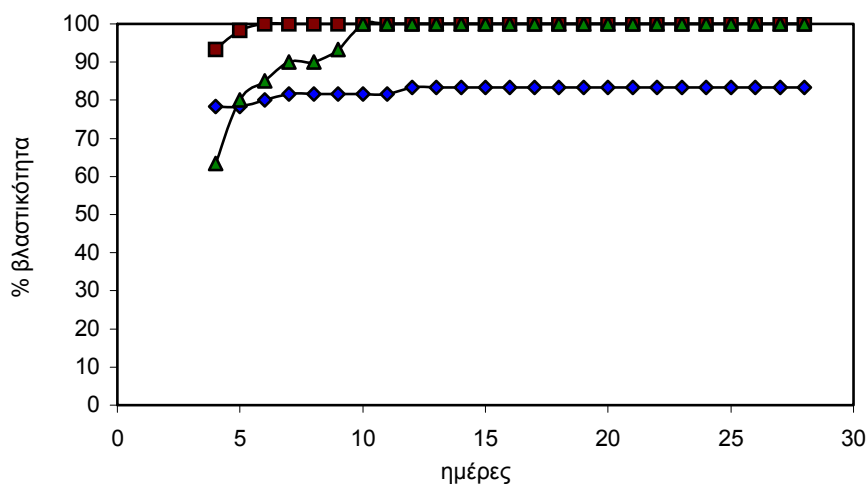
Σχήμα 10.9: Βλαστικότητα μαρτύρων χειρισμού με νερό (♦), E.Y.A.E. (■) και Y.A.E. (▲) κατά τη διάρκεια του 2^{ου} πειράματος στην 1^η σπορά (45 ημέρες μετά την τελευταία διάβρεξη).



Σχήμα 10.10: Βλαστικότητα μαρτύρων χειρισμό με νερό (♦), E.Y.A.E. (■) και Y.A.E. (▲) κατά τη διάρκεια του 2ου πειράματος στη 2η σπορά (50 ημέρες μετά την τελευταία διάβρεξη).



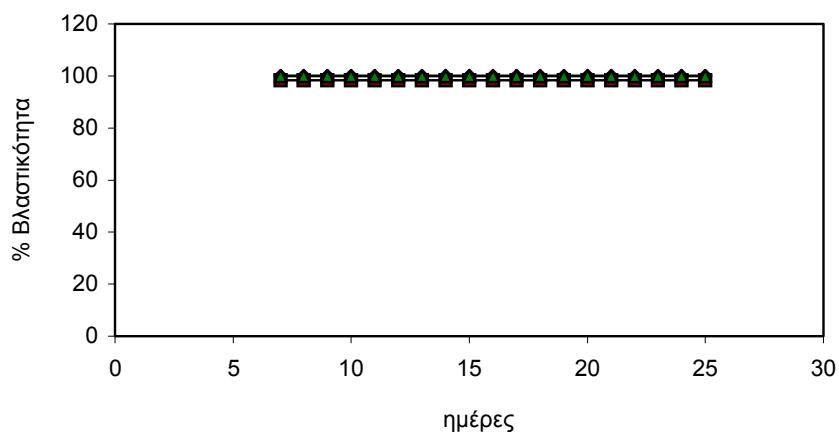
Σχήμα 10.11: Βλαστικότητα μαρτύρων στο χειρισμό με νερό (♦), E.Y.A.E. (■) και Y.A.E. (▲) κατά τη διάρκεια του 2ου πειράματος στην 3η σπορά (55 ημέρες μετά την τελευταία διάβρεξη).



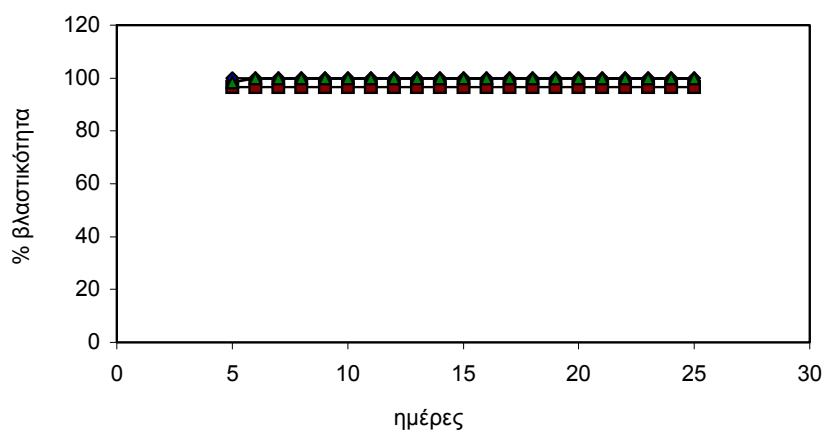
Σχήμα 10.12: Βλαστικότητα μαρτύρων στο χειρισμό με νερό (♦), E.Y.A.E. (■) και Y.A.E. (▲) κατά τη διάρκεια του 2ου πειράματος στην 4η σπορά (60 ημέρες μετά την τελευταία διάβρεξη).

Στα Σχήματα 10.9-10.12 παρατηρείται μια ξαφνική εμφάνιση φυτοτοξικότητας στη 2^η σπορά στο έδαφος που δέχθηκε τα ανεπεξέργαστα απόβλητα, η οποία εκδηλώθηκε ως καθυστέρηση στη βλάστηση και ως μείωση της βλαστικότητας των σπόρων. Παρόμοια φυτοτοξικότητα εκδηλώθηκε και στο έδαφος που δέχθηκε το επεξεργασμένο απόβλητο, αλλά σε μικρότερο βαθμό και μόνο με τη μορφή της καθυστέρησης στη βλάστηση. Είναι χαρακτηριστικό ότι οι καμπύλες των μαρτύρων στο έδαφος που δέχθηκε το επεξεργασμένο απόβλητο ακολουθούν με μεγάλη ομοιότητα τις καμπύλες των μαρτύρων του εδάφους που δέχθηκε το ανεπεξέργαστο απόβλητο αλλά με μικρότερη ένταση. Συγκεκριμένα, στην 1^η σπορά (Σχήμα 10.9) δεν εκδηλώθηκε φυτοτοξικότητα και οι μάρτυρες των χειρισμών δεν είχαν μεταξύ τους σημαντικές διαφορές ($p>0,05$). Στη 2^η σπορά (Σχήμα 10.10) παρατηρήθηκε σημαντική φυτοτοξικότητα στο χειρισμό με Υ.Α.Ε. η οποία εκδηλώθηκε ως καθυστέρηση στη βλάστηση και ως μείωση της βλαστικότητας ($p<0,05$). Στο χειρισμό με Ε.Υ.Α.Ε. εκδηλώθηκε μόνο καθυστέρηση στη βλάστηση για τις 6 πρώτες ημέρες όπου οι διαφορές της βλαστικότητας σε σχέση με το χειρισμό με νερό ήταν σημαντικές ($p<0,05$) ενώ στη συνέχεια δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Στην τρίτη σπορά (Σχήμα 10.11) η φυτοτοξικότητα εκδηλώθηκε μόνο ως καθυστέρηση στη βλάστηση και στους δύο χειρισμούς με τα απόβλητα. Στο χειρισμό με Υ.Α.Ε. η καθυστέρηση σε σχέση με το χειρισμό με νερό διήρκεσε για έξι ημέρες και στο χειρισμό με Ε.Υ.Α.Ε. για τέσσερις ημέρες ($p<0,05$). Στη συνέχεια δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών χειρισμών. Στην 4^η σπορά (Σχήμα 10.12) δεν εκδηλώθηκε καμία φυτοτοξική δράση και δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές στη βλαστικότητα των τριών χειρισμών ($p>0,05$).

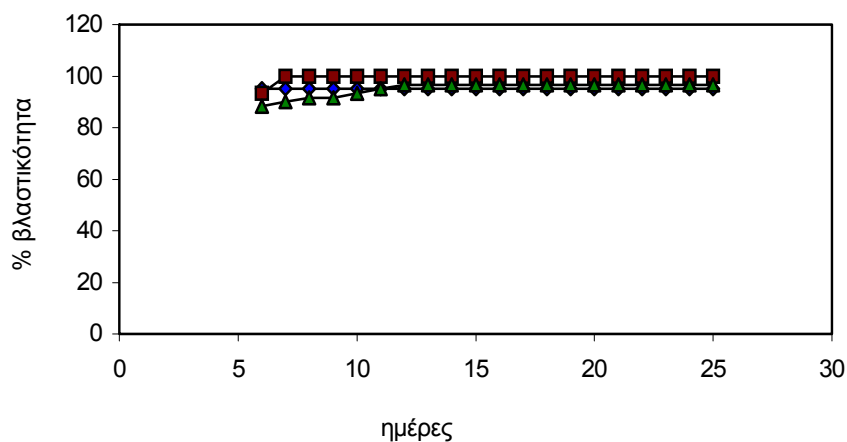
Οι μάρτυρες του 1^{ου} πειράματος όπου χρησιμοποιήθηκαν μικρότερες ποσότητες αποβλήτων, παρουσιάζονται στα Σχήματα 10.13-10.15. Στην περίπτωση αυτή δεν εμφανίστηκε επίσης καμία φυτοτοξικότητα (είτε με τη μορφή της μειωμένης βλαστικότητας είτε με τη μορφή της καθυστέρησης της βλάστησης των σπόρων). Οι διαφορές στη βλαστικότητα των σπόρων στους τρεις χειρισμούς δεν ήταν σημαντικές σε κανένα από τους χρόνους σποράς ($p>0,05$).



Σχήμα 10.13: Βλαστικότητα μαρτύρων (% ως προς τον αριθμό των σπόρων που φυτεύτηκαν) στο χειρισμό με νερό (♦), E.Y.A.E. (■) και Y.A.E. (▲) κατά τη διάρκεια του 1^{ου} πειράματος στην 1^η σπορά (45 ημέρες μετά την τελευταία διάβρεξη).

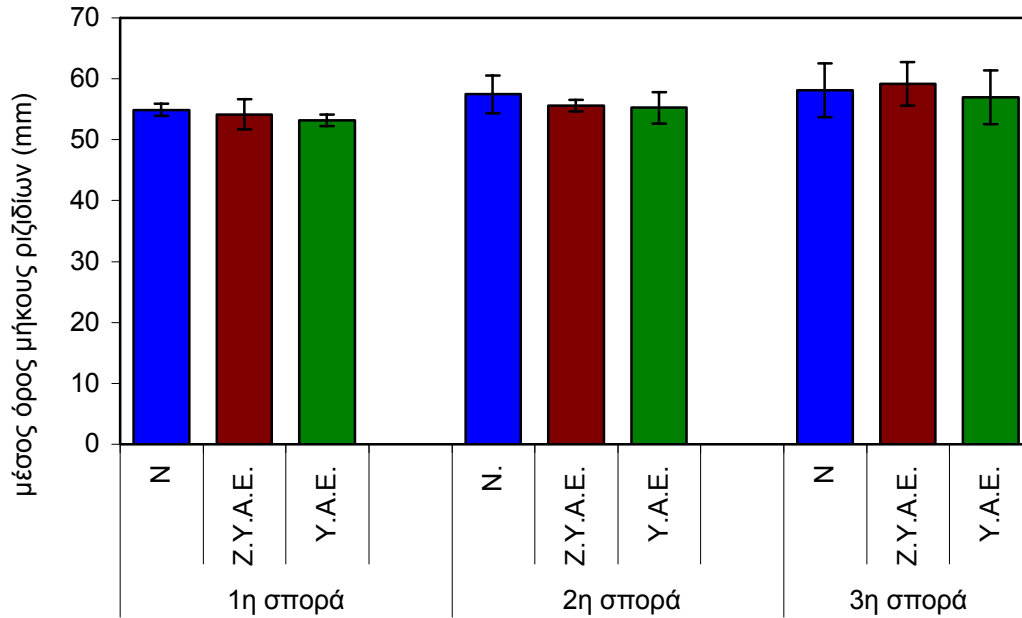


Σχήμα 10.14: Βλαστικότητα μαρτύρων (% ως προς τον αριθμό των σπόρων που φυτεύτηκαν) στο χειρισμό με νερό (♦), E.Y.A.E. (■) και Y.A.E. (▲) κατά τη διάρκεια του 1^{ου} πειράματος στη 2^η σπορά (55 ημέρες μετά την τελευταία διάβρεξη).



Σχήμα 10.15: Βλαστικότητα μαρτύρων (% ως προς τον αριθμό των σπόρων που φυτεύτηκαν) στο χειρισμό με νερό (♦), E.Y.A.E. (■) και Y.A.E. (▲) κατά τη διάρκεια του 1^{ου} πειράματος στην 3^η σπορά (65 ημέρες μετά την τελευταία διάβρεξη).

Επιπλέον, στους μάρτυρες των τριών χειρισμών του 1ου πειράματος στους τρεις χρόνους σποράς, μετρήθηκαν τα μήκη ριζιδίων των φυτών μαρουλιού μετά την πάροδο των 25 ημερών από τη σπορά (Σχήμα 10.16).



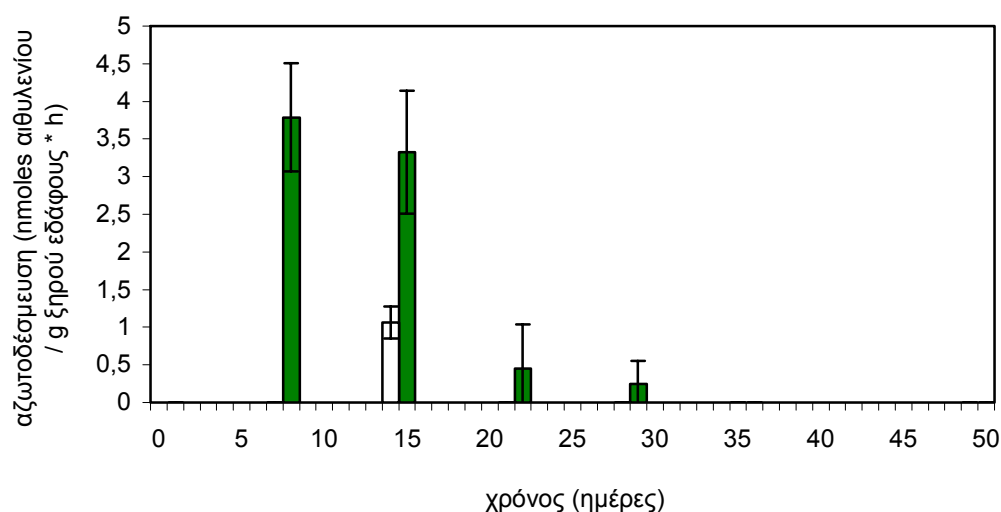
Σχήμα 10.16: Μήκη ριζιδίων φυτών μαρουλιού σε έδαφος που δέχθηκε N., Y.A.E. και E.Y.A.E 45, 55 και 65 ημέρες μετά από την τελευταία διάβρεξη (1^η, 2^η και 3^η σπορά). Οι μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.

Στο Σχήμα 10.16 παρατηρείται ότι οι μέσοι όροι του μήκους των ριζιδίων στους τρεις χειρισμούς και στον ίδιο χρόνο σποράς, δεν παρουσίασαν μεταξύ τους σημαντικές διαφορές ($p>0,05$).

Άρα, κάποια φυτοτοξική επίδραση εκδηλώθηκε στο 2^ο πείραμα στο οποίο χρησιμοποιήθηκαν οι μεγαλύτερες ποσότητες αποβλήτων. Η επίδραση αυτή εκδηλώθηκε μόνο στους δύο από τους τέσσερις χρόνους σποράς ενώ σε όλες τις άλλες περιπτώσεις που μελετήθηκαν δεν εμφανίστηκε φυτοτοξικότητα (είτε με τη μορφή της μειωμένης βλαστικότητας είτε με τη μορφή της καθυστέρησης της βλάστησης των σπόρων). Επίσης στο 1^ο πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκαν μικρότερες ποσότητες αποβλήτων επίσης δεν εκδηλώθηκε φυτοτοξικότητα σε κανένα από τους χρόνους σποράς.

10.3. Μελέτη της επίδρασης των προσθηκών Υ.Α.Ε. και Ε.Υ.Α.Ε. στην αζωτοδεσμευτική ικανότητα του εδάφους

Κατά τη διάρκεια του σταδίου των διαβρέξεων στο 1^ο πείραμα, προσδιορίστηκε η αζωτοδεσμευτική ικανότητα του εδάφους από τους τρεις χειρισμούς, πριν και μετά από κάθε διάβρεξη, έτσι ώστε να διαπιστωθεί εάν οι προσθήκες Υ.Α.Ε. ή Ε.Υ.Α.Ε. στο έδαφος οδηγούσαν σε εκδήλωση αζωτοδεσμευτικής ικανότητας (παράγρ. 5.2). Το έδαφος που διαβρέχονταν με τα Υ.Α.Ε. εμφάνισε αζωτοδεσμευτική ικανότητα, εμπλουτίστηκε δηλ. με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια μετά τη δεύτερη διάβρεξη όπως φαίνεται στο Σχήμα 10.17.

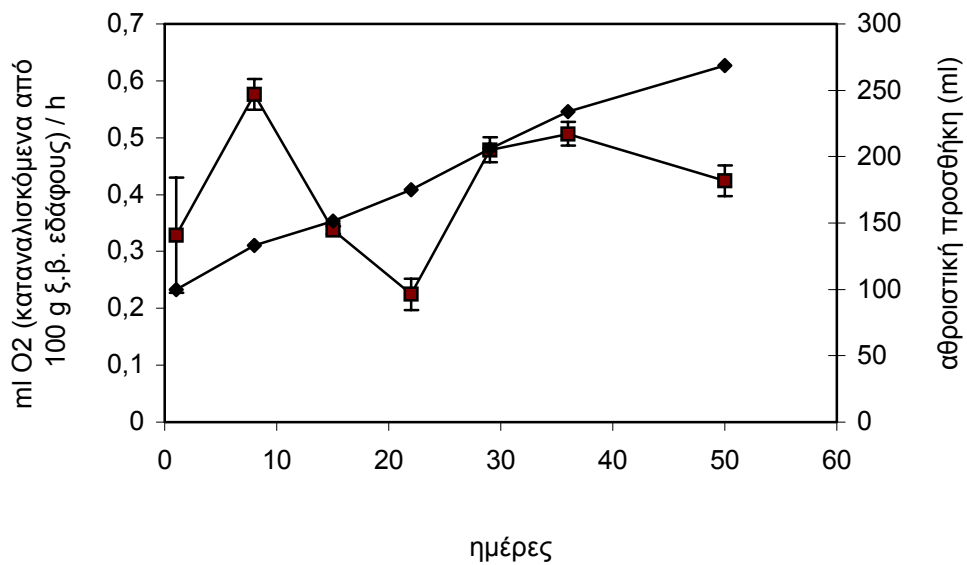


Σχήμα 10.17.: Αζωτοδεσμευτική ικανότητα εδάφους το οποίο δέχθηκε Υ.Α.Ε., στο στάδιο των διαβρέξεων (□N-δέσμευση πριν τη διάβρεξη ■ N-δέσμευση μετά τη διάβρεξη). Οι μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.

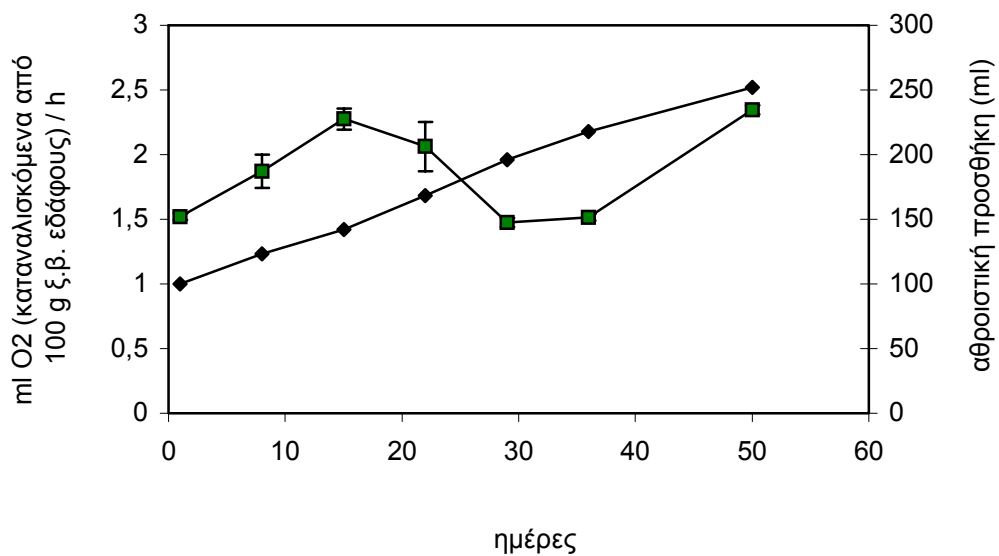
Η μεγαλύτερη τιμή της αζωτοδέσμευσης, παρατηρήθηκε αμέσως μετά τη δεύτερη διάβρεξη με το ανεπεξέργαστο απόβλητο (8^η ημέρα), και η ικανότητα για αζωτοδέσμευση στο έδαφος διήρκεσε για όλο το χρονικό διάστημα μέχρι τη 14^η ημέρα (3^η διάβρεξη). Μετά την τρίτη διάβρεξη (15^η ημέρα) παρατηρήθηκε επίσης αύξηση της αζωτοδέσμευσης αφού το έδαφος εμπλουτίστηκε με φρέσκο απόβλητο, όμως η έντασή της ήταν ελαφρώς μειωμένη σε σχέση με τη 2^η διάβρεξη και δεν διήρκεσε για το ίδιο χρονικό διάστημα. Στις δύο επόμενες διαβρέξεις (4^η και 5^η) η αζωτοδεσμευτική ικανότητα του εδάφους μειώθηκε σημαντικά, για να μηδενιστεί στις δύο τελευταίες διαβρέξεις. Μετά την 5^η διάβρεξη το έδαφος είχε ήδη δεχθεί το 78 % του συνολικού όγκου του αποβλήτου που χρησιμοποιήθηκε. Οι χειρισμοί με νερό και επεξεργασμένο απόβλητο ελαιοτριβείων δεν εμφάνισαν αζωτοδεσμευτική ικανότητα, σε καμία από τις μετρήσεις που έγιναν.

10.4. Μελέτη της επίδρασης των προσθηκών Υ.Α.Ε. και Ε.Υ.Α.Ε. στην αναπνευστική δραστηριότητα του εδάφους.

Η αναπνευστική δραστηριότητα του εδάφους με την οποία εκτιμάται η μικροβιακή δραστηριότητα, προσδιορίστηκε στο στάδιο των διαβρέξεων με Υ.Α.Ε. και Ε.Υ.Α.Ε. κατά τη διάρκεια του 1^{ου} πειράματος με τη συσκευή του ηλεκτρολυτικού αναπνευσσιμέτρου (παράγρ. 5.1). Τα αποτελέσματα δίνονται στα Σχήματα 10.18-10.19.



Σχήμα 10.18: Αναπνευστική δραστηριότητα εδάφους στο στάδιο των διαβρέξεων με Ε.Υ.Α.Ε. (■) σε σχέση με την προσθήκη υγρού διάβρεξης (◆), στο 1^ο πείραμα. Οι μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.

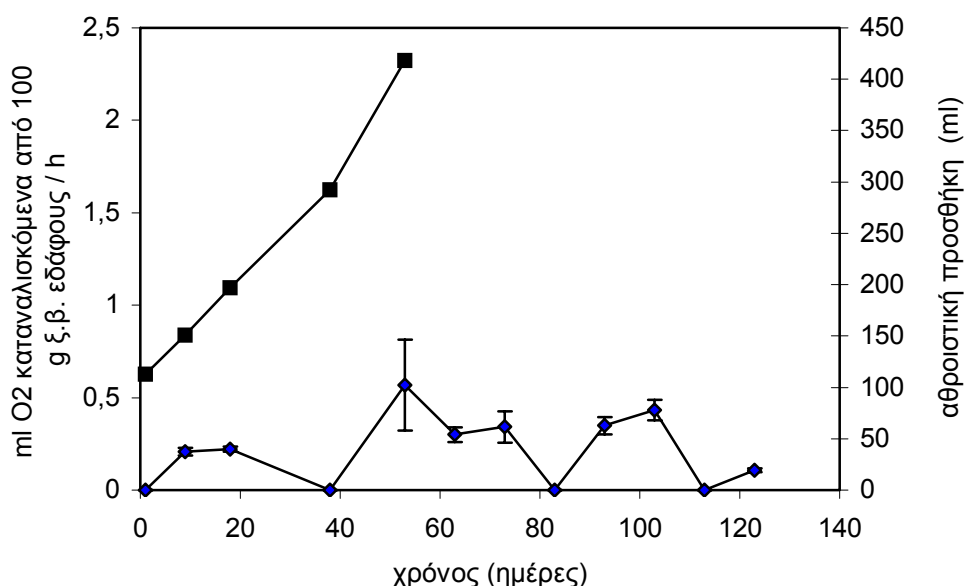


Σχήμα 10.19: Αναπνευστική δραστηριότητα εδάφους στο στάδιο των διαβρέξεων με Υ.Α.Ε. (■) σε σχέση με την προσθήκη υγρού διάβρεξης (◆), στο 1^ο πείραμα. Οι μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.

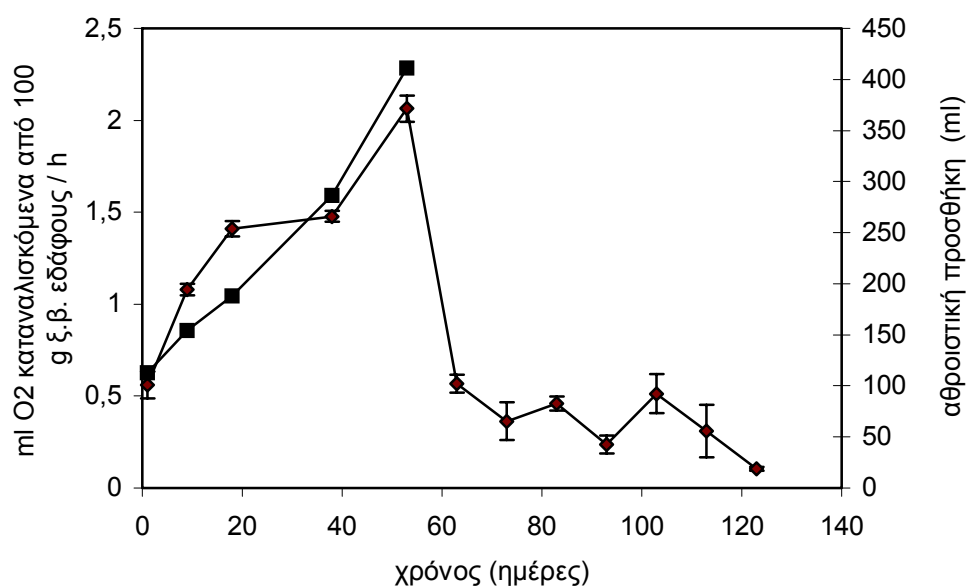
Η αναπνευστική δραστηριότητα του εδάφους που διαβρέχονταν με νερό, ήταν πολύ μικρή και σε ορισμένες περιπτώσεις διέφευγε από τη διακριτική ικανότητα του οργάνου, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται ως μηδενική.

Στα παραπάνω Σχήματα 10.18 και 10.19 παρατηρείται μια σημαντική αύξηση της αναπνευστικής δραστηριότητας στο έδαφος που δέχθηκε τα Υ.Α.Ε. σε σχέση με το έδαφος που δέχθηκε τα Ε.Υ.Α.Ε. ($p < 0,05$) τα οποία προστίθονταν στο έδαφος σε αραίωση 1:1 με νερό. Οι δύο αυτοί χειρισμοί εκδήλωσαν εντονότερη αναπνευστική δραστηριότητα σε σχέση με το χειρισμό με νερό, του οποίου η αναπνευστική δραστηριότητα ήταν σχεδόν μηδενική.

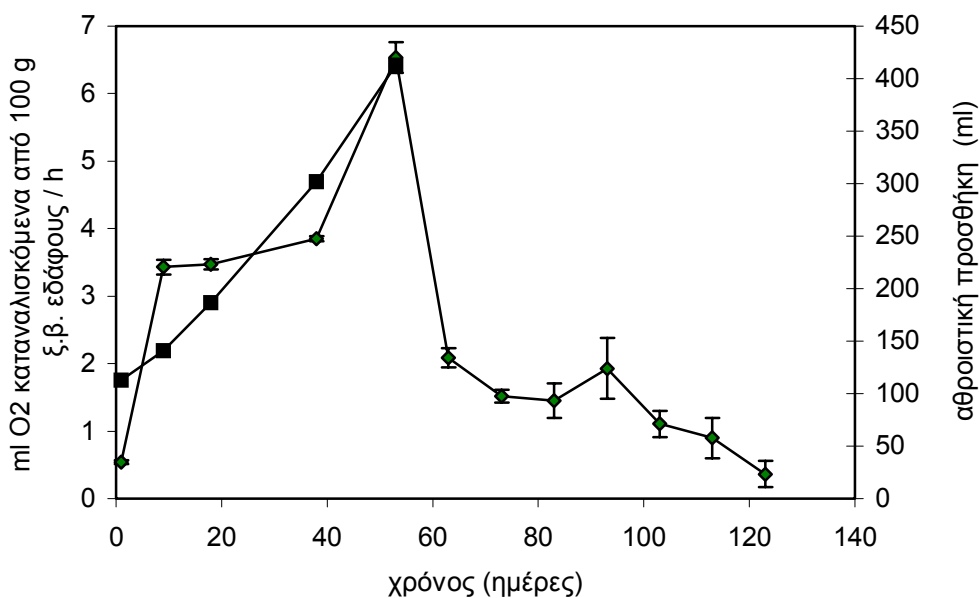
Τα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό της αναπνευστικής δραστηριότητας κατά τη διάρκεια του 2^{ου} πειράματος, στο οποίο οι ποσότητες Υ.Α.Ε. και Ε.Υ.Α.Ε. που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υψηλότερες από αυτές του 1^{ου} πειράματος, δίνονται στα Σχήματα 10.20-10.22. Η αναπνευστική δραστηριότητα προσδιορίστηκε τόσο στο στάδιο των διαβρέξεων, όσο και 70 ημέρες μετά από την τελευταία διάβρεξη (το πρώτο τμήμα της καμπύλης σχετίζεται με τις μετρήσεις κατά τη διάρκεια των διαβρέξεων και το δεύτερο τμήμα με τις μετρήσεις κατά τη διάρκεια των σταδίων της αναμονής για την εξάλειψη της φυτοτοξικότητας και της μελέτης της επισχετικότητας).



Σχήμα 10.20: Αναπνευστική δραστηριότητα εδάφους που διαβρέχονταν με νερό (◆) σε σχέση με την προσθήκη υγρού διάβρεξης (■), στο 2^ο πείραμα. Οι μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.



Σχήμα 10.21: Αναπνευστική δραστηριότητα εδάφους που διαβρέχονταν με E.Y.A.E. (◆) σε σχέση με την προσθήκη υγρού διάβρεξης (■), στο 2^ο πείραμα. Οι μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.



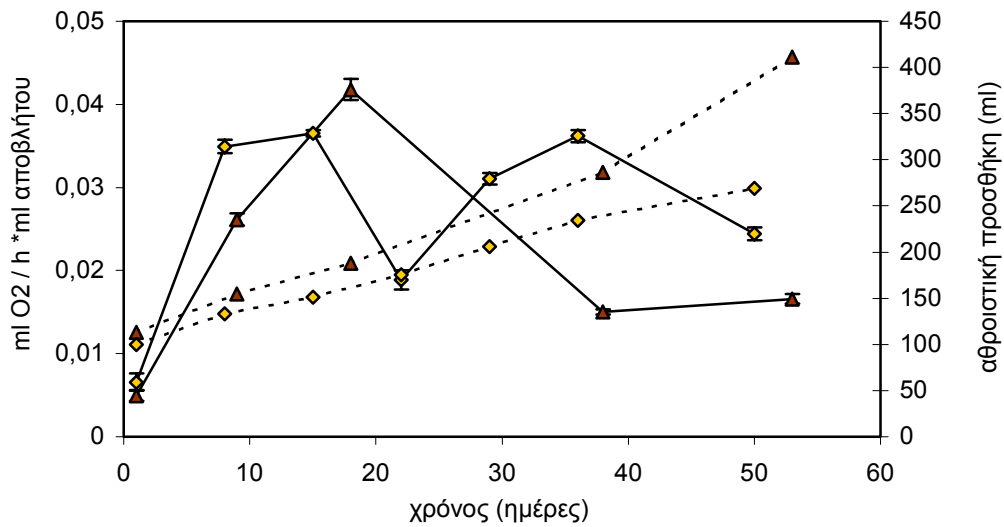
Σχήμα 10.22: Αναπνευστική δραστηριότητα εδάφους που διαβρέχονταν με Y.A.E. (◆) σε σχέση με την προσθήκη υγρού διάβρεξης (■), στο 2^ο πείραμα. Οι μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.

Στα Σχήματα 10.20-10.22 φαίνεται ότι και στο 2^ο πείραμα κατά τη διάρκεια του σταδίου των διαβρέξεων, η αναπνευστική δραστηριότητα του εδάφους που δέχθηκε τα Υ.Α.Ε. ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από την αναπνευστική δραστηριότητα του εδάφους που δέχθηκε τα Ε.Υ.Α.Ε. ($p<0,05$). Η αναπνευστική δραστηριότητα του εδάφους που διαβρέχονταν με νερό ήταν σημαντικά χαμηλότερη από την αναπνευστική δραστηριότητα του εδάφους που δέχθηκε τα δύο οργανικά απόβλητα ($p<0,05$) ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις ήταν μηδενική.

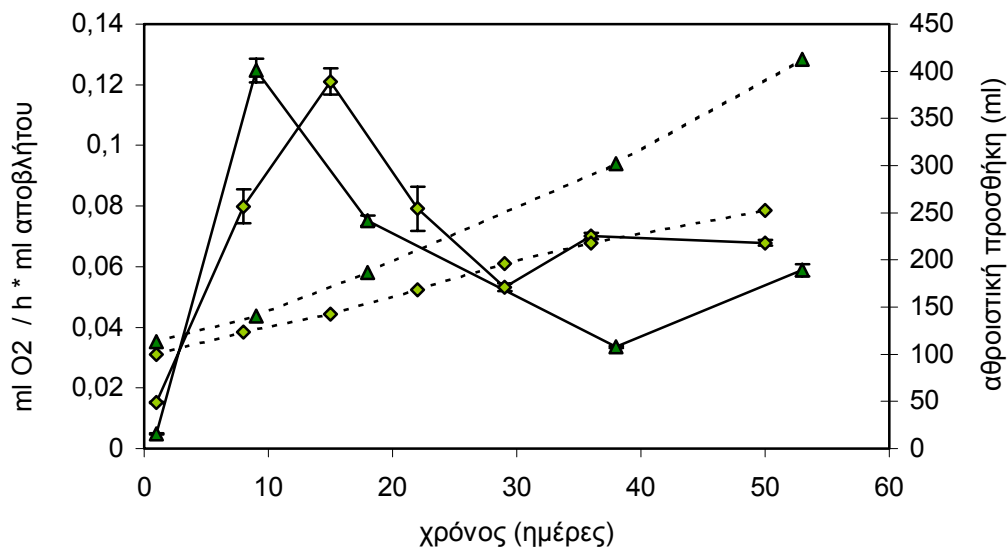
Επίσης παρατηρείται ότι μετά την τελευταία διάβρεξη με τα δύο οργανικά υγρά (Υ.Α.Ε. και Ε.Υ.Α.Ε.) η αναπνευστική δραστηριότητα μειώνονταν συνεχώς αφού εξαντλούνταν σταδιακά το διαθέσιμο υπόστρωμα. Για το χειρισμό με τα Ε.Υ.Α.Ε. η μείωση της αναπνευστικής δραστηριότητας στα επίπεδα της αναπνοής του εδάφους που διαβρέχονταν μόνο με νερό πραγματοποιήθηκε την 20^η ημέρα μετά την τελευταία διάβρεξη ($p>0,05$) ενώ στο έδαφος που δέχθηκε τα Υ.Α.Ε. η αναπνοή ήταν σημαντικά αυξημένη έως και 60 ημέρες μετά από την τελευταία διάβρεξη. Τελικά, μειώθηκε στα επίπεδα της αναπνευστικής δραστηριότητας του εδάφους που διαβρέχονταν με νερό την 70^η ημέρα ($p>0,05$).

Τέλος παρατηρείται ότι κατά τη διάρκεια των διαβρέξεων στο 2^ο πείραμα η αναπνευστική δραστηριότητα στους δύο χειρισμούς με τα οργανικά απόβλητα ήταν μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του 1^{ου} πειράματος αφού στο 2^ο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν μεγαλύτερες ποσότητες αποβλήτων στο ίδιο περίπου χρονικό διάστημα.. Έτσι για τα Υ.Α.Ε. η μέγιστη αναπνευστική δραστηριότητα που παρατηρήθηκε στο 2^ο πείραμα ήταν 2,8 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη τιμή του 1^{ου} πειράματος. Για τα Ε.Υ.Α.Ε. η μέγιστη αναπνευστική δραστηριότητα στο 2^ο πείραμα ήταν 4,1 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη τιμή του 1^{ου} πειράματος (στο 1^ο πείραμα τα Ε.Υ.Α.Ε. χρησιμοποιήθηκαν όχι μόνο σε μικρότερη ποσότητα αλλά και σε αραιώση 1:1).

Στα Σχήματα 10.23 και 10.24 δίνεται η αναπνευστική δραστηριότητα του εδάφους που δέχθηκαν Ε.Υ.Α.Ε. και Υ.Α.Ε. ως προς την ποσότητα από το κάθε υγρό διάβρεξης, στο 1^ο και το 2^ο πείραμα (δηλαδή ο ρυθμός κατανάλωσης O_2 /ml προστιθέμενου αποβλήτου). Εκφράζεται δηλαδή ο ρυθμός αποικοδόμησης της οργανικής ουσίας μέσω της αερόβιας αναπνοής των μικροοργανισμών στα δύο πειράματα.



Σχήμα 10.23: Αναπνευστική δραστηριότητα εδάφους (—) που δέχονταν E.Y.A.E. ανά ml προστιθέμενου αποβλήτου συναρτήσει του χρόνου, στο 1^ο πείραμα (♦) και στο 2^ο πείραμα (▲) σε σχέση με την προσθήκη υγρού διάβρεξης (-----). Οι μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.



Σχήμα 10.24: Αναπνευστική δραστηριότητα εδάφους (—) που δέχονταν Y.A.E. ανά ml προστιθέμενου αποβλήτου συναρτήσει του χρόνου, στο 1^ο πείραμα (♦) και στο 2^ο πείραμα (▲) σε σχέση με την προσθήκη υγρού διάβρεξης (-----). Οι μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.

Στα Σχήματα 10.23 και 10.24 παρατηρείται ότι και στα δύο πειράματα καθώς και στους δύο χειρισμούς, μετά την 1^η διάβρεξη, η αναπνευστική δραστηριότητα ανά ml προστιθέμενου αποβλήτου ήταν αρκετά μικρότερη από αυτή που παρατηρήθηκε στις επόμενες διαβρέξεις. Στη συνέχεια ακολουθεί έντονη αύξηση η οποία υποδηλώνει την

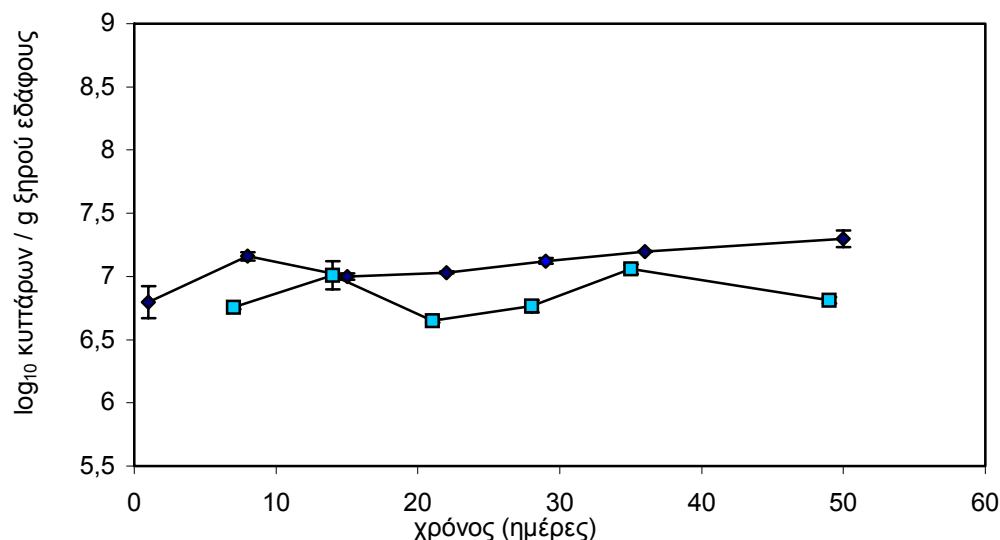
καλύτερη εκμετάλλευση της προστιθέμενης οργανικής ουσίας από τους μικροοργανισμούς οι οποίοι πλέον προσαρμόστηκαν στην οργανική ουσία που προστέθηκε.

Παρατηρείται επίσης ότι ο ρυθμός αναπνοής ανά ml αποβλήτου στο χειρισμό με Υ.Α.Ε. παρουσιάζει την ίδια περίπου εικόνα και στα δύο πειράματα παρ' όλο που στο 2^ο πείραμα οι προσθήκες των αποβλήτων ήταν πιο εντατικές. Η εκμετάλλευση δηλαδή του προστιθέμενου υποστρώματος ήταν περίπου η ίδια και στις δύο περιπτώσεις. Επίσης παρατηρείται ότι ο ρυθμός αναπνοής ανά ml Ε.Υ.Α.Ε. ήταν μικρότερος από το ρυθμό αναπνοής ανά ml Υ.Α.Ε. αφού στην πρώτη περίπτωση η οργανική ουσία που προστέθηκε ήταν λιγότερη (μέρος της έχει απομακρυνθεί στο στάδιο της αερόβιας βιολογικής επεξεργασίας με τη μορφή CO₂).

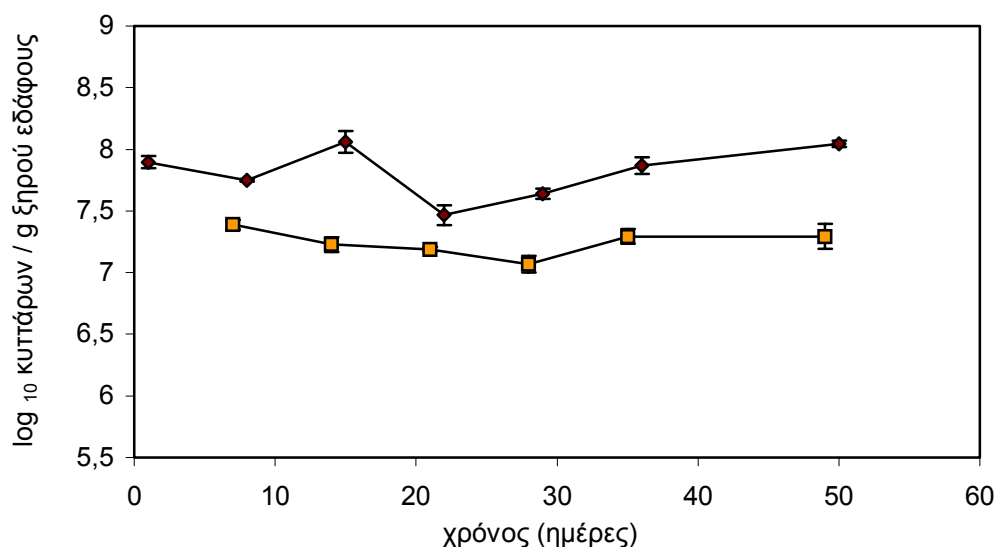
Παρατηρήθηκε τέλος ότι και στους δύο χειρισμούς και στα δύο πειράματα υπήρξε πτώση του ρυθμού κατανάλωσης O₂ ανά ml υποστρώματος σε κάποιο ενδιάμεσο χρονικό διάστημα. Αυτό έγινε στις ημέρες που η προσθήκη των Υ.Α.Ε. ξεπέρασε τα 142 ml αποβλήτου ανά kg ξηρού βάρους εδάφους και στα δύο πειράματα. Στην περίπτωση των Ε.Υ.Α.Ε. η πτώση του ρυθμού κατανάλωσης O₂ ανά ml αποβλήτου έγινε εμφανής μόνο στο 2^ο πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκε το πυκνό απόβλητο και αυτό συνέβη στα 188 ml προσθήκης. Η πτώση αυτή δείχνει ότι η εκμετάλλευση της προστιθέμενης οργανικής ουσίας από τους μικροοργανισμούς μειώνεται όταν οι προσθήκες υπερβαίνουν κάποιον όγκο. Αυτό δεν σημαίνει απαραίτητα ότι το απόβλητο δεν θα αποικοδομηθεί τελικά. Κατά πάσα πιθανότητα το απόβλητο θα αποικοδομείται αλλά με μικρότερους ρυθμούς.

10.5. Μελέτη της επίδρασης των προσθηκών Υ.Α.Ε. και Ε.Υ.Α.Ε. στους βακτηριακούς πληθυσμούς του εδάφους.

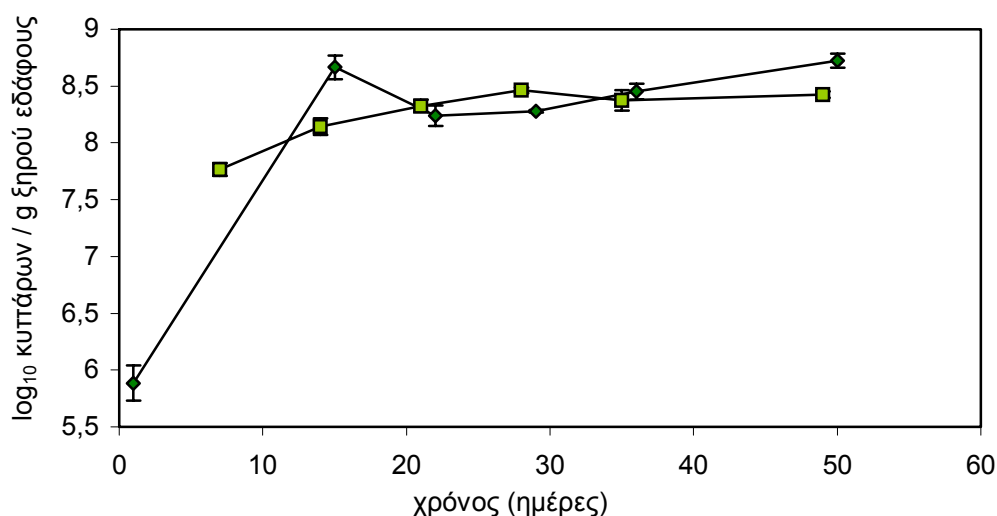
Ο συνολικός πληθυσμός των βακτηρίων προσδιορίστηκε σε έδαφος από τους τρεις χειρισμούς, στο στάδιο των διαβρέξεων του 1^{ου} πειράματος πριν και αμέσως μετά από κάθε διάβρεξη (παράγρ. 5.3). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων δίνονται στα Σχήματα 10.25-10.27.



Σχήμα 10.25: Πληθυσμός βακτηρίων σε έδαφος που δέχονταν νερό, πριν από κάθε διάβρεξη (■) και μετά από κάθε διάβρεξη (◆), στο 1^ο πείραμα. Οι μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.



Σχήμα 10.26: Πληθυσμός βακτηρίων σε έδαφος που δέχονταν Ε.Υ.Α.Ε., πριν από κάθε διάβρεξη (■) και μετά από κάθε διάβρεξη (◆), στο 1^ο πείραμα. Οι μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.

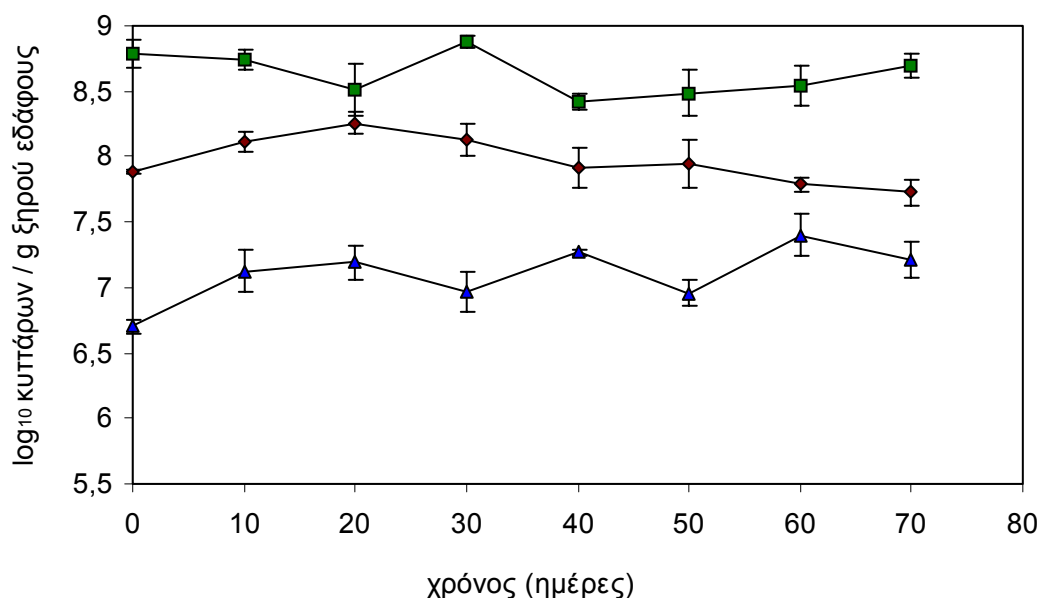


Σχήμα 10.27: Πληθυσμός βακτηρίων σε έδαφος που δέχονταν Υ.Α.Ε πριν από κάθε διάβρεξη (■) και μετά από κάθε διάβρεξη (◆), στο 1^ο πείραμα. Οι μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.

Στα Σχήματα 10.26-10.27 παρατηρείται ότι οι πληθυσμοί των βακτηρίων στο έδαφος που διαβρέχονταν είτε με Ε.Υ.Α.Ε. είτε με Υ.Α.Ε. είναι υψηλότεροι από τους πληθυσμούς στο χειρισμό με νερό τόσο πριν όσο και μετά από κάθε διάβρεξη. Εξαίρεση αποτελεί ο πληθυσμός που μετρήθηκε στο χειρισμό με Υ.Α.Ε. αμέσως μετά την πρώτη διάβρεξη ο οποίος ήταν μειωμένος σε σχέση με το χειρισμό με νερό. Επίσης οι πληθυσμοί που αναπτύχθηκαν στο χειρισμό με τα Υ.Α.Ε. ήταν υψηλότεροι από τους πληθυσμούς του χειρισμού με Ε.Υ.Α.Ε., είτε πριν είτε μετά από κάθε διάβρεξη. Εξαίρεση αποτελεί πάλι ο πληθυσμός που μετρήθηκε στο χειρισμό με Υ.Α.Ε. αμέσως μετά την πρώτη διάβρεξη.

Παρατηρείται επίσης ότι στους χειρισμούς με νερό και Ε.Υ.Α.Ε. οι πληθυσμοί αμέσως μετά από κάθε διάβρεξη αυξάνουν και έτσι η καμπύλη των πληθυσμών μετά τις διαβρέξεις βρίσκεται ψηλότερα από την καμπύλη των πληθυσμών πριν τις διαβρέξεις. Στην περίπτωση όμως του χειρισμού με Υ.Α.Ε. παρατηρείται μετά την 4^η και 5^η διάβρεξη, (ημέρες 21_{πριν}, 22_{μετά} και 28_{πριν}, 29_{μετά}) μια μικρή μείωση στους πληθυσμούς των βακτηρίων μετά την προσθήκη του αποβλήτου αντί για αύξηση όπως στις άλλες περιπτώσεις. Στις δύο επόμενες διαβρέξεις οι πληθυσμοί πάλι αυξήθηκαν μετά την προσθήκη αποβλήτου.

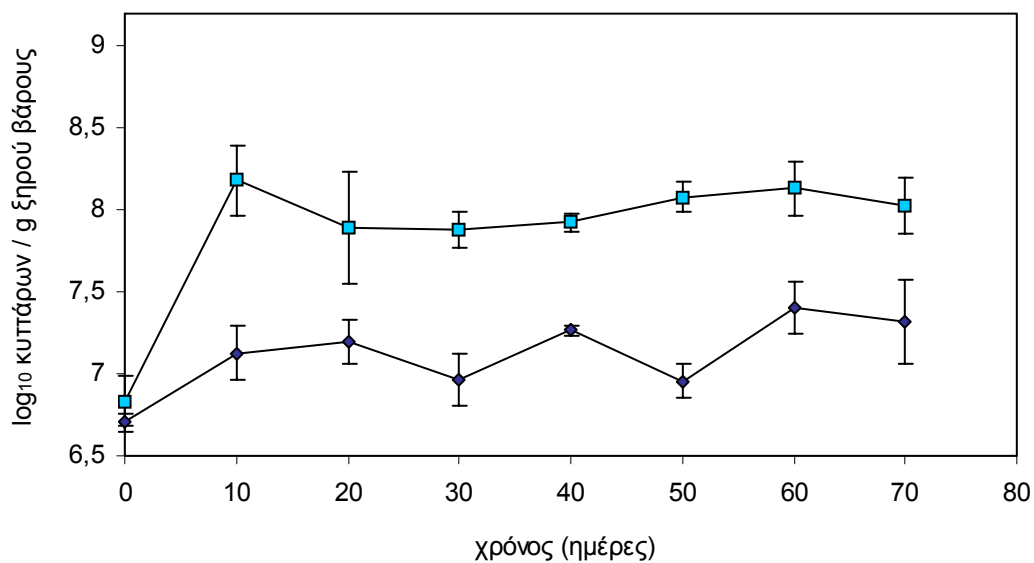
Κατά τη διάρκεια του 2^{ου} πειράματος προσδιορίστηκαν οι πληθυσμοί των βακτηρίων στους τρεις χειρισμούς ανά 10 ημέρες, αμέσως μετά την τελευταία διάβρεξη έως και 70 ημέρες από αυτή. Τα αποτελέσματα δίνονται στο Σχήμα 10.28:



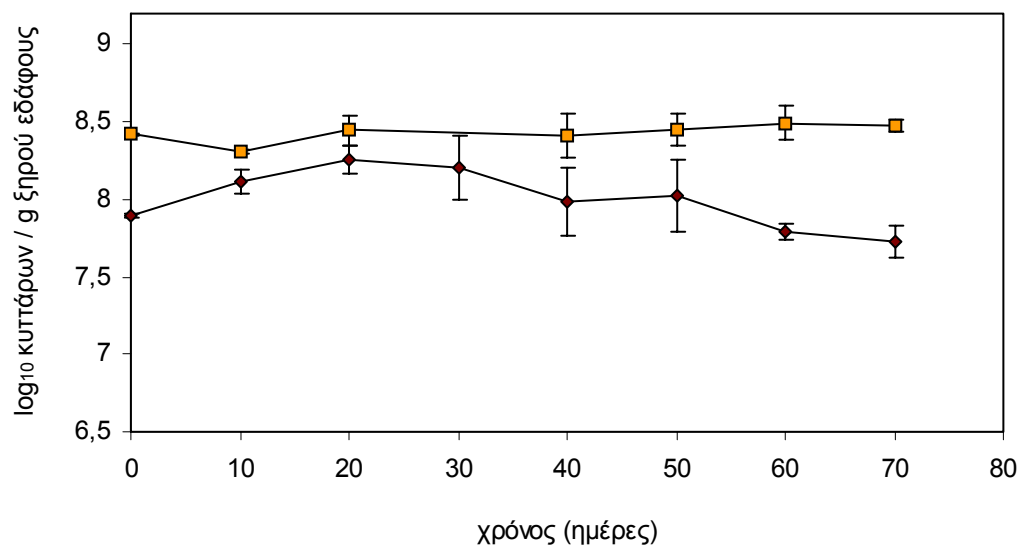
Σχήμα 10.28: Βακτηριακοί πληθυσμοί σε έδαφος που διαβρέχονταν με N. (▲), E.Y.A.E. (◆) και Y.A.E. (■) αμέσως μετά την τελευταία διάβρεξη έως και 70 ημέρες στο 2^ο πείραμα. Οι κάθετες μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.

Στο Σχήμα 10.28 παρατηρείται ότι οι βακτηριακοί πληθυσμοί που αναπτύχθηκαν στο έδαφος που είχε δεχθεί τα Y.A.E διατηρούνται σε υψηλότερα επίπεδα από τους πληθυσμούς των άλλων δύο χειρισμών για όλο το χρονικό διάστημα το οποίο μελετήθηκε (70 ημέρες μετά την τελευταία διάβρεξη). Επίσης οι βακτηριακοί πληθυσμοί που αναπτύχθηκαν στο χειρισμό με τα E.Y.A.E. κυμάνθηκαν μεταξύ των πληθυσμών που αναπτύχθηκαν στο χειρισμό με Y.A.E. και E.Y.A.E.

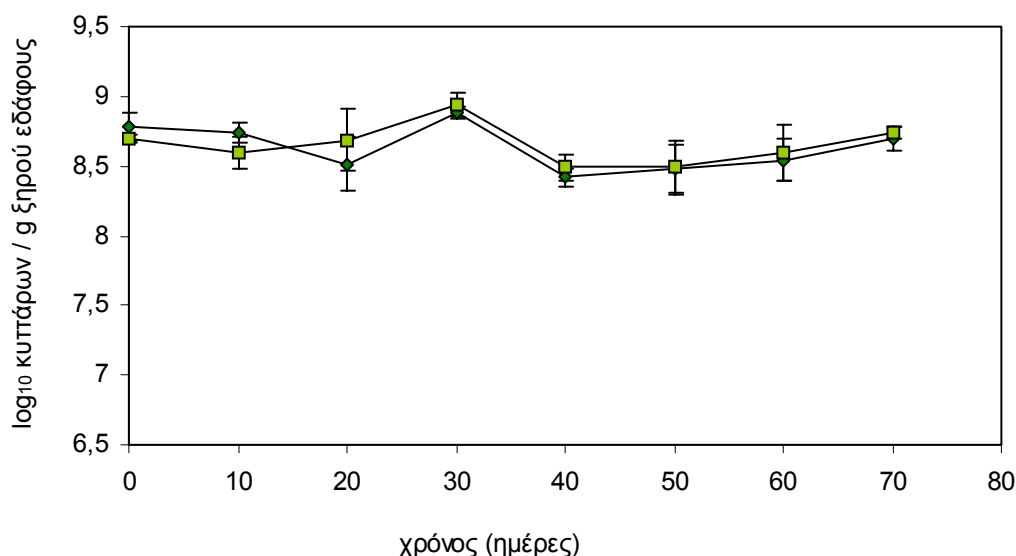
Στο 2ο πείραμα προσδιορίστηκε ο αριθμός των βακτηρίων K- στρατηγικής και r- στρατηγικής αμέσως μετά την τελευταία διάβρεξη έως και 70 ημέρες μετά από αυτή. Τα αποτελέσματα για τους τρεις χειρισμούς δίνονται στις Εικόνες 10.29-10.31.



Σχήμα 10.29 : Πληθυσμοί βακτηρίων r- στρατηγικής (◆) και K- στρατηγικής (■) σε έδαφος αμέσως μετά την τελευταία διάβρεξη με νερό έως και 70 ημέρες μετά, στο 2^ο πείραμα. Οι κάθετες μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.



Σχήμα 10.30 : Πληθυσμοί βακτηρίων r- στρατηγικής (◆) και K- στρατηγικής (■) σε έδαφος αμέσως μετά την τελευταία διάβρεξη με E.Y.A.E. έως και 70 ημέρες μετά, στο 2^ο πείραμα. Οι κάθετες μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.



Σχήμα 10.31: Πληθυσμοί βακτηρίων r- στρατηγικής (♦) και K- στρατηγικής (■) σε έδαφος αμέσως μετά την τελευταία διάβρεξη με Υ.Α.Ε. έως και 70 ημέρες μετά, στο 2^ο πείραμα. Οι κάθετες μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.

Στο Σχήμα 10.29 παρατηρείται ότι στο χειρισμό με νερό κυριαρχούν τα βακτήρια K- στρατηγικής αφού η ομάδα αυτή των μικροοργανισμών είναι προσαρμοσμένη σε χαμηλές συγκεντρώσεις οργανικών υποστρωμάτων ενώ ο πληθυσμός των βακτηρίων r-στρατηγικής βρίσκεται σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα. Η αναλογία των μικροοργανισμών K/r στο χρονικό αυτό διάστημα ήταν κατά μέσο όρο 6,0.

Στο χειρισμό με τα Ε.Υ.Α.Ε. (Σχήμα 10.30) ο αριθμός των βακτηρίων r-στρατηγικής είναι αυξημένος και οι διαφορές μεταξύ των δύο βακτηριακών ομάδων έχουν μειωθεί σε σχέση με το χειρισμό με νερό. Μετά την πάροδο περίπου 50 ημερών ο πληθυσμός των μικροοργανισμών r-στρατηγικής αρχίζει να μειώνεται. Η αναλογία των μικροοργανισμών K/r στο χρονικό διάστημα των 70 ημερών ήταν 3,2 αλλά προς το τέλος του χρονικού αυτού διαστήματος, στις 60 και 70 ημέρες η αναλογία K/r έγινε 5,4. Φαίνεται δηλαδή ότι το έδαφος τείνει να επανέλθει στην αρχική του κατάσταση.

Τέλος, στο χειρισμό με τα Υ.Α.Ε. (Σχήμα 10.31) οι πληθυσμοί των δύο βακτηριακών ομάδων κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα σε όλο το χρονικό διάστημα το οποίο μελετήθηκε και η αναλογία K/r ήταν 1,1. Φαίνεται δηλαδή πως ο χειρισμός με Υ.Α.Ε. μπορεί να διατηρεί σε υψηλά επίπεδα τον πληθυσμό των μικροοργανισμών r-στρατηγικής για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την τελευταία εφαρμογή του αποβλήτου στο έδαφος.

Στον Πίνακα 10.1 δίνονται οι δείκτες C.D. και E.P. (παρ. 5.3) για το ρυθμό ανάπτυξης των αποικιών στους τρεις χειρισμούς.

ΠΙΝΑΚΑΣ 10.1: Δείκτες $\overline{C.D.}$ και $\overline{E.P.}$ για τους βακτηριακούς πληθυσμούς που αναπτύχθηκαν στους τρεις χειρισμούς. Οι αριθμοί στην παρένθεση είναι η τυπική απόκλιση των μέσων. Με διαφορετικά γράμματα υποδηλώνονται οι σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων των διαφόρων χειρισμών (στο ίδιο υπόστρωμα) σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05.

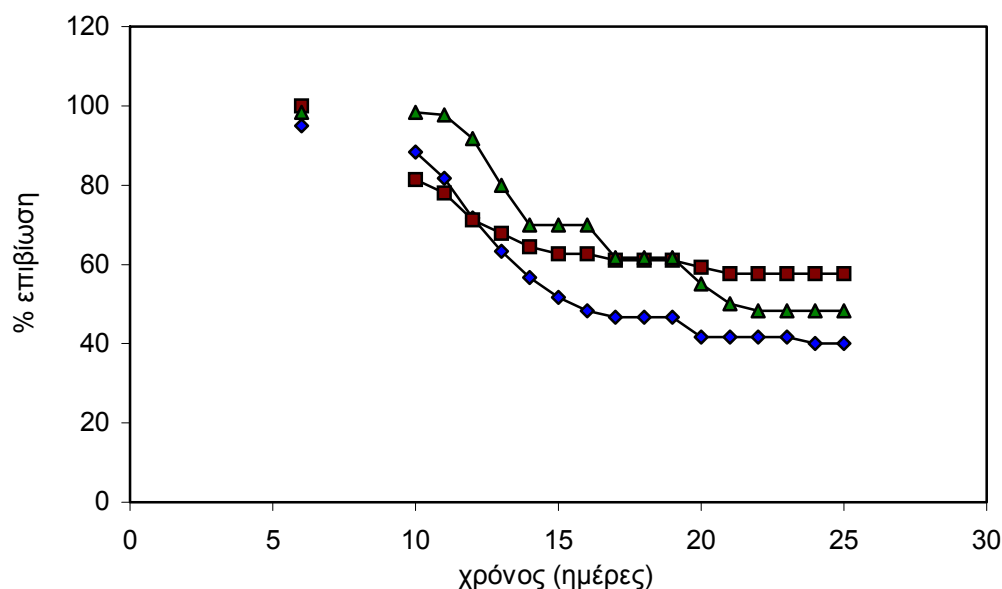
	$\overline{C.D.}$		$\overline{E.P.}$	
	N.A.	N.A. (1/100)	N.A.	N.A. (1/100)
N.	33.9 (± 2.9) ^(a)	28 (± 2) ^(a)	0.438 (± 0.021) ^(a)	0.443 (± 0.017) ^(a)
E.Y.A.E.	34.6 (± 4.9) ^(a)	27.9 (± 1.4) ^(a)	0.393 (± 0.037) ^(b)	0.433 (± 0.025) ^(aβ)
Y.A.E.	39.41 (± 1.6) ^(b)	35.8 (± 2.6) ^(b)	0.362 (± 0.025) ^(b)	0.411 (± 0.025) ^(b)

Στον παραπάνω πίνακα είναι εμφανές ότι οι υψηλότερες τιμές του δείκτη $\overline{C.D.}$ εμφανίζονται στο χειρισμό με Y.A.E. με σημαντικές διαφορές από τους χειρισμούς με E.Y.A.E. και Νερό και στα δύο υποστρώματα. Η αύξηση του δείκτη $\overline{C.D.}$ υποδηλώνει μεταβολή του πληθυσμού των βακτηρίων σε είδη που έχουν την τάση να αυξάνουν ταχύτερα. Ο δείκτης αυτός στο χειρισμό με E.Y.A.E. δε διαφέρει σημαντικά από το χειρισμό με νερό.

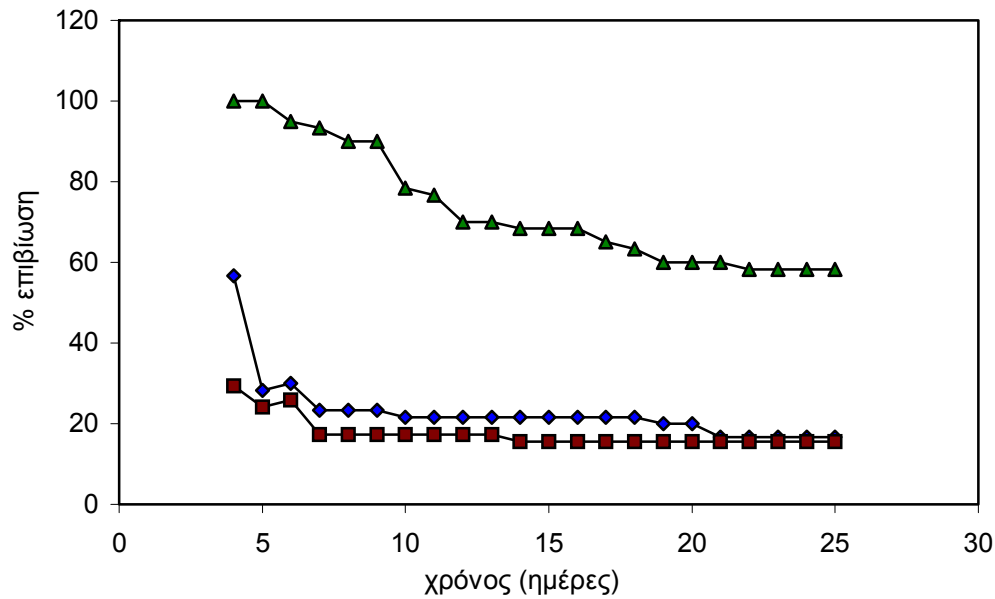
Η μείωση του δείκτη $\overline{E.P.}$ στους χειρισμούς με Y.A.E. και E.Y.A.E. υποδηλώνει τη μείωση της διασποράς των βακτηριακών αναλογιών που αναπτύχθηκαν στα τρία χρονικά διαστήματα που μελετήθηκαν: αυξήθηκε δηλαδή ο πληθυσμός σε κάποια ομάδα (=αναλογία του πληθυσμού που αναπτύσσεται σε διάστημα 0-2 ημέρες, ή 2-4 ημέρες ή 4-6 ημέρες) χωρίς όμως να γίνεται διάκριση από το συγκεκριμένο δείκτη σε ποια ομάδα έγινε η αύξηση.

10.6 Μελέτη της επίδρασης των προσθηκών Υ.Α.Ε. και Ε.Υ.Α.Ε. στην επισχετικότητα του εδάφους έναντι του *Rhizoctonia solani*

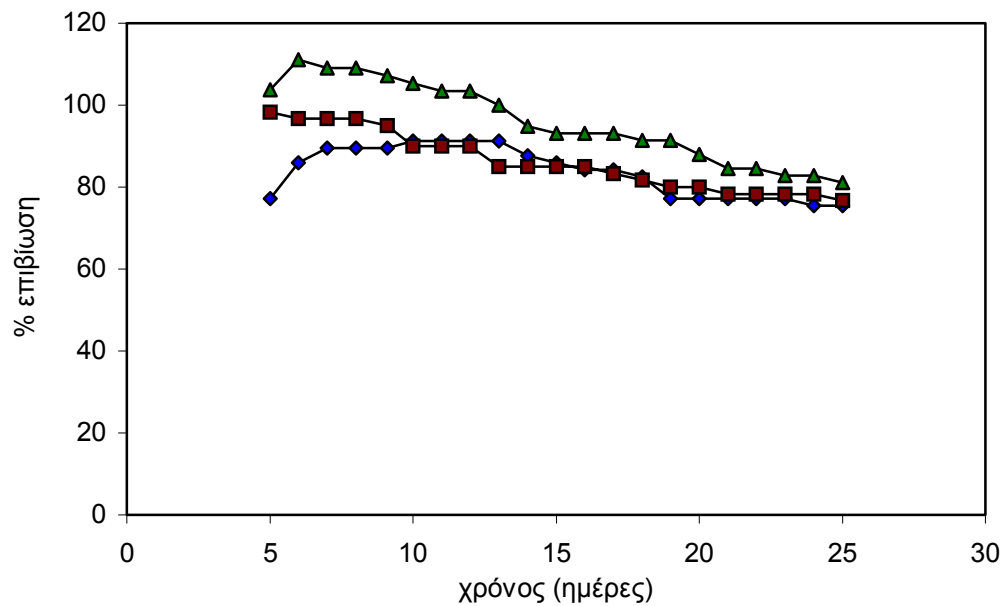
Η επισχετικότητα του εδάφους που δέχθηκε είτε ανεπεξέργαστο είτε επεξεργασμένο απόβλητο ελαιοτριβείων κατά τη διάρκεια του 1^{ου} πειράματος μελετήθηκε 45 ημέρες μετά την τελευταία διάβρεξη με τα δύο αυτά υγρά, σε σχέση με το έδαφος μάρτυρα το οποίο διαβρέχονταν μόνο με νερό. Για το λόγο αυτό έγινε τεχνητή εισαγωγή του μύκητα στο έδαφος και φυτεύτηκαν σπόροι μαρουλιού ταυτόχρονα με την εισαγωγή του παθογόνου, καθώς και σε 10 και 20 ημέρες μετά (αναφέρονται ως 1^η, 2^η και 3^η σπορά) (παράγρ. 6.1). Τα αποτελέσματα δίνονται στα Σχήματα 10.32-10.34.



Σχήμα 10.32: Επιβίωση φυτών μαρουλιού σε έδαφος που διαβρέχτηκε με νερό (♦), Ε.Υ.Α.Ε. (■) και Υ.Α.Ε. (▲) και στη συνέχεια μολύνθηκε με *Rhizoctonia solani*, στην 1^η σπορά του 1^{ου} πειράματος.



Σχήμα 10.33: Επιβίωση φυτών μαρουλιού σε έδαφος που διαβρέχτηκε με νερό (◆), E.Y.A.E. (■) και Y.A.E. (▲) και στη συνέχεια μολύνθηκε με *Rhizoctonia solani*, στη 2^η σπορά του 1^{ου} πειράματος.

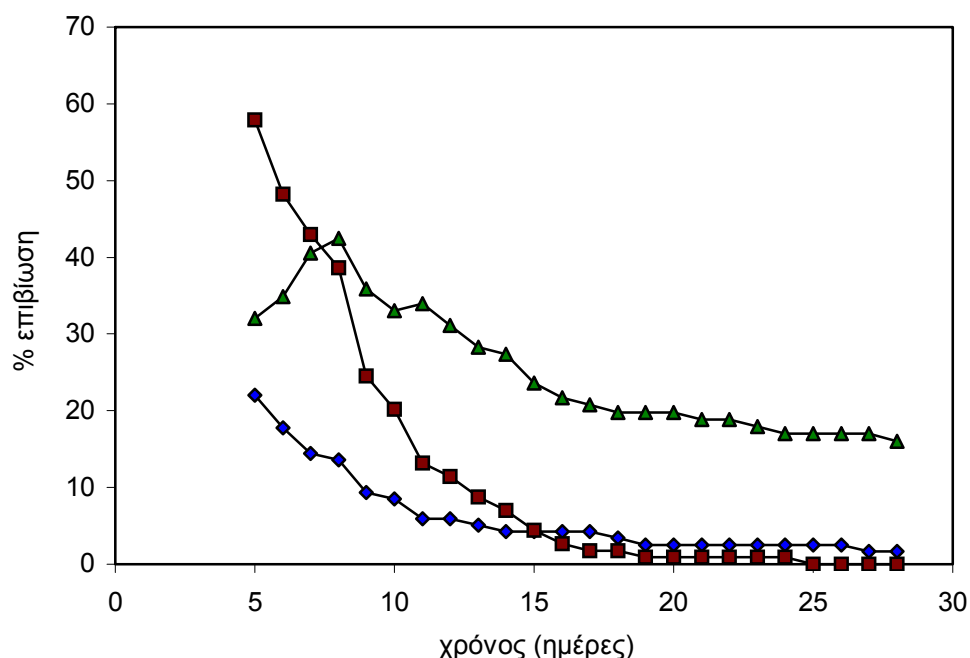


Σχήμα 10.34: Επιβίωση φυτών μαρουλιού σε έδαφος που διαβρέχτηκε με νερό (◆), E.Y.A.E. (■) και Y.A.E. (▲) και στη συνέχεια μολύνθηκε με *Rhizoctonia solani*, στην 3^η σπορά του 1^{ου} πειράματος.

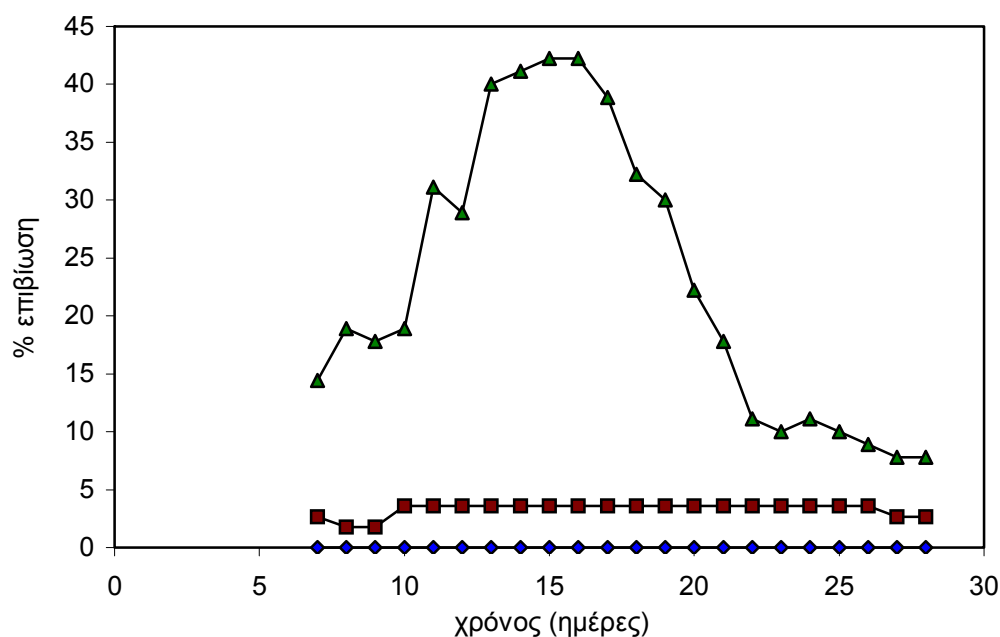
Στα Σχήματα 10.32-10.34 φαίνεται ότι ο χειρισμός με Y.A.E. οδήγησε σε σημαντική εκδήλωση επισχετικότητας έναντι του *Rhizoctonia solani*. Σημαντικές διαφορές σε σχέση με το χειρισμό με νερό παρατηρήθηκαν και στους τρεις χρόνους σποράς. Στην 1^η σπορά σημαντικές διαφορές υπήρξαν μόνο την 11^η και 12^η ημέρα

($p < 0,05$). Στη 2^η σπορά όπου σημειώθηκε και η μεγαλύτερη προσβολή στο μάρτυρα, οι διαφορές ήταν σημαντικές σε όλο το χρονικό διάστημα που μελετήθηκε ($p < 0,05$). Στην 3^η σπορά οι διαφορές ήταν σημαντικές έως τη 10^η ημέρα ($p < 0,05$). Στον 3^ο χρόνο σποράς η προσβολή του μάρτυρα ήταν μειωμένη και έτσι ήταν δύσκολο να διεξαχθούν συμπεράσματα για την επιβίωση του μύκητα συναρτήσει του χρόνου παραμονής του στο έδαφος των τριών χειρισμών. Τέλος, ο χειρισμός με Ε.Υ.Α.Ε. δεν οδήγησε σε σημαντική εκδήλωση επισχετικότητας σε σχέση με το χειρισμό με νερό σε κανένα από τους τρεις χρόνους σποράς ($p > 0,05$) με μοναδική εξαίρεση την 5^η ημέρα της 3^{ης} σποράς.

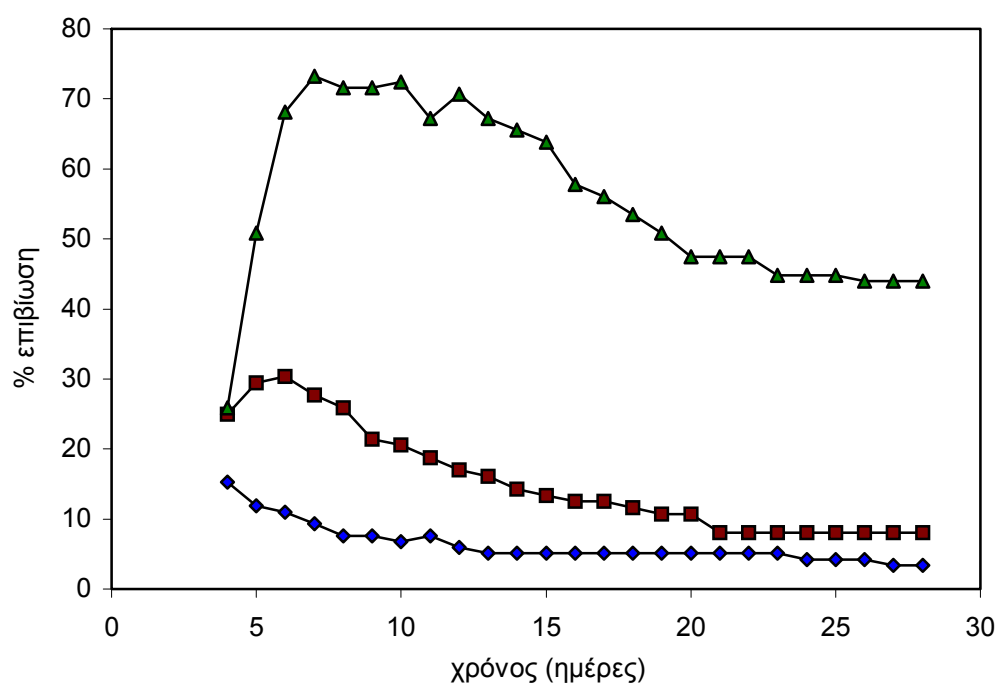
Τα αποτελέσματα της μελέτης της επισχετικότητας του εδάφους που δέχθηκε Υ.Α.Ε. και Ε.Υ.Α.Ε. έναντι του *Rhizoctonia solani* στο 2^ο πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκαν μεγαλύτερες ποσότητες αποβλήτων στο στάδιο των διαβρέξεων, παρουσιάζονται στα Σχήματα 10.35-10.38. Στο 2^ο πείραμα η 1^η σπορά αναφέρεται στην ταυτόχρονη εισαγωγή του παθογόνου και φύτευση των σπόρων μαρουλιού, η 2^η σπορά στην φύτευση των σπόρων μαρουλιού 5 ημέρες μετά την εισαγωγή του παθογόνου, η 3^η και 4^η σπορά στη φύτευση των σπόρων 10 και 15 ημέρες μετά την εισαγωγή του παθογόνου στο έδαφος.



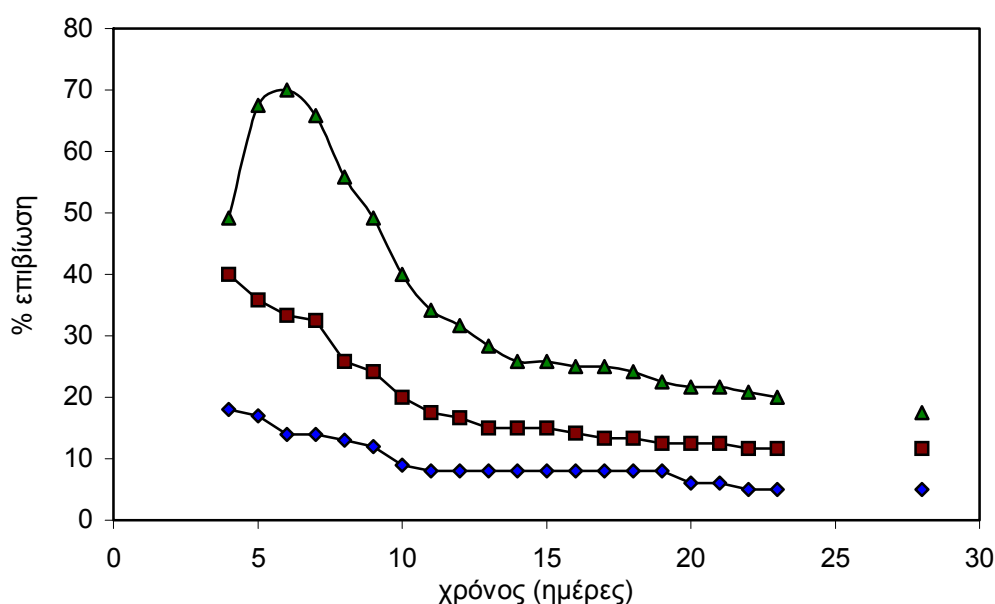
Σχήμα 10.35: Επιβίωση φυτών μαρουλιού σε έδαφος που διαβρέχτηκε με νερό (♦), Ε.Υ.Α.Ε. (■) και Υ.Α.Ε. (▲) και στη συνέχεια μολύνθηκε με *Rhizoctonia solani*, στην 1^η σπορά του 2^{ου} πειράματος.



Σχήμα 10.36: Επιβίωση φυτών μαρουλιού σε έδαφος που διαβρέχτηκε με νερό (♦), E.Y.A.E. (■) και Y.A.E. (▲) και στη συνέχεια μολύνθηκε με *Rhizoctonia solani*, στη 2^η σπορά του 2^{ου} πειράματος.



Σχήμα 10.37: Επιβίωση φυτών μαρουλιού σε έδαφος που διαβρέχτηκε με νερό (♦), E.Y.A.E. (■) και Y.A.E. (▲) και στη συνέχεια μολύνθηκε με *Rhizoctonia solani*, στην 3^η σπορά του 2^{ου} πειράματος.



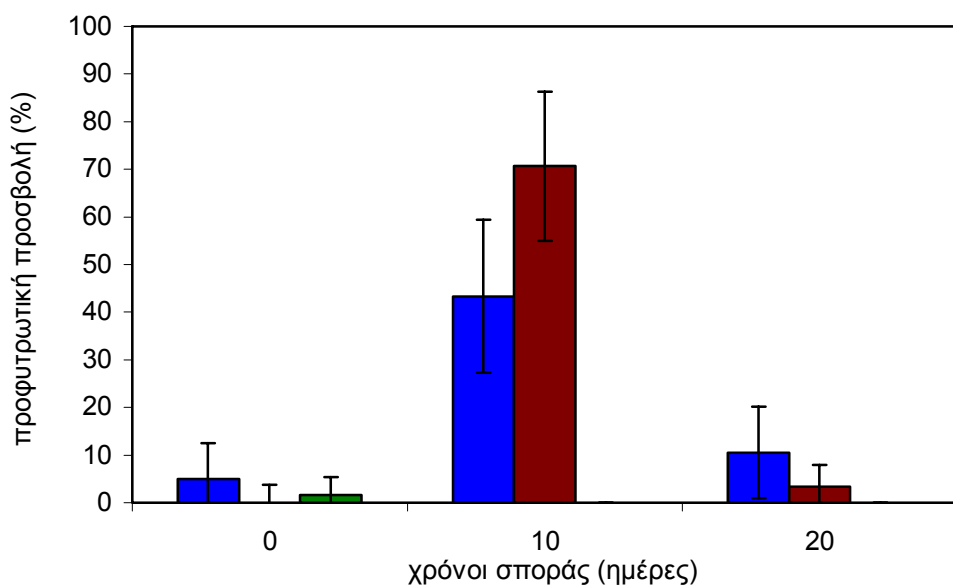
Σχήμα 10.38: Επιβίωση φυτών μαρουλιού σε έδαφος που διαβρέχτηκε με νερό (♦), E.Y.A.E. (■) και Y.A.E. (▲) και στη συνέχεια μολύνθηκε με *Rhizoctonia solani*, στην 4^η σπορά του 2^{ου} πειράματος.

Σε όλους τους χρόνους σποράς παρατηρείται αυξημένη επιβίωση των φυτών στο χειρισμό με το ανεπεξέργαστο απόβλητο και στις περισσότερες περιπτώσεις οι διαφορές με το χειρισμό με νερό είναι σημαντικές. Στο χειρισμό με το επεξεργασμένο απόβλητο παρατηρείται μικρή αύξηση στην επιβίωση των φυτών η οποία είναι σημαντική μόνο για μικρό χρονικό διάστημα. Συγκεκριμένα, στην 1^η σπορά (Σχήμα 10.35) ο χειρισμός με Y.A.E. διαφέρει σημαντικά από το χειρισμό με νερό σε όλο το χρονικό διάστημα το οποίο μελετήθηκε ($p < 0,05$) με εξαίρεση την 5^η και 6^η ημέρα, ενώ ο χειρισμός με E.Y.A.E. διαφέρει σημαντικά έως και την 9^η ημέρα μετά τη σπορά ($p < 0,05$) ενώ στη συνέχεια οι διαφορές σε σχέση με το χειρισμό με νερό είναι μη σημαντικές. Στη 2^η σπορά (Σχήμα 10.36) ο χειρισμός με Y.A.E. διαφέρει σημαντικά από το χειρισμό με νερό σε όλο το χρονικό διάστημα το οποίο μελετήθηκε ($p < 0,05$), ενώ ο χειρισμός με E.Y.A.E. δεν έδωσε σημαντικές διαφορές ($p > 0,05$). Στην 3^η σπορά (Σχήμα 10.37) ο χειρισμός με Y.A.E. διαφέρει σημαντικά από το χειρισμό με νερό σε όλο το χρονικό διάστημα το οποίο μελετήθηκε ($p < 0,05$) με εξαίρεση την 9^η ημέρα, ενώ ο χειρισμός με E.Y.A.E. δεν διαφέρει σημαντικά από το χειρισμό με νερό ($p > 0,05$). Τέλος, στην 4^η σπορά (Σχήμα 10.38) ο χειρισμός με Y.A.E. διαφέρει σημαντικά από το χειρισμό με νερό έως και τη 13^η ημέρα μετά τη σπορά ($p < 0,05$) ενώ στη συνέχεια οι διαφορές είναι μη σημαντικές. Ο χειρισμός

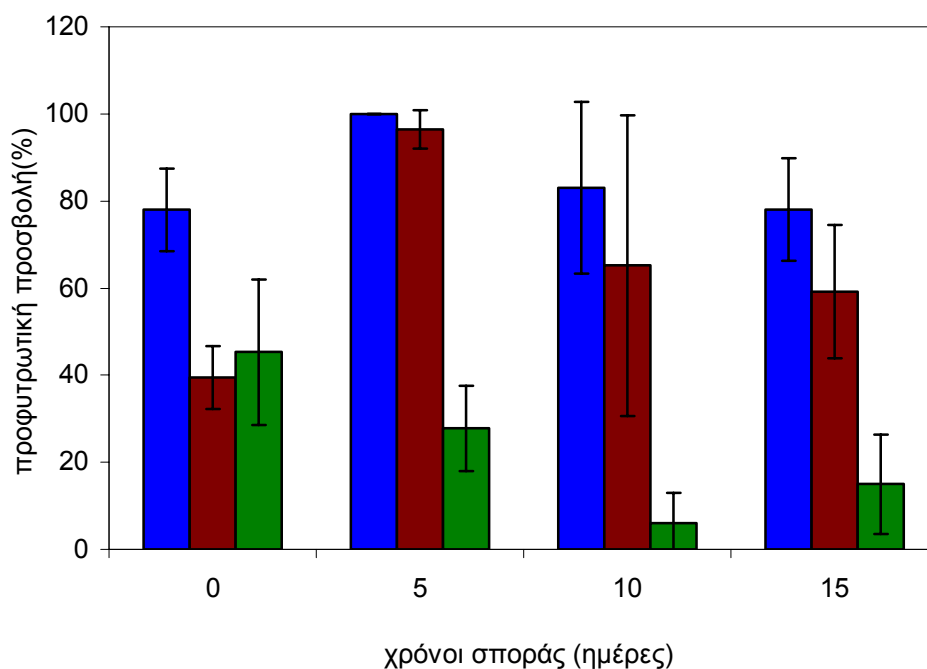
με Ε.Υ.Α.Ε. στην 4^η σπορά δεν είχε σημαντικές διαφορές από το χειρισμό με νερό ($p>0,05$).

Γενικά παρατηρήθηκε ότι στο 2^ο πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκαν μεγαλύτερες ποσότητες αποβλήτων η εκδήλωση επισχετικότητας έναντι του *Rhizoctonia solani* στο έδαφος που δέχθηκε Υ.Α.Ε. ήταν εντονότερη από αυτή που παρατηρήθηκε στο 1^ο πείραμα. Στην περίπτωση του χειρισμού με Ε.Υ.Α.Ε. η χρήση μεγαλύτερων ποσοτήτων αποβλήτου στο στάδιο των διαβρέξεων στο 2^ο πείραμα δε φάνηκε να επιδρά ιδιαίτερα στην εκδήλωση επισχετικότητας έναντι του παθογόνου αν και στο 2^ο πείραμα η εικόνα ήταν σαφώς βελτιωμένη και υπήρξαν σε ορισμένες περιπτώσεις σημαντικές διαφορές.

Στα Σχήματα 10.39-10.40 δίνεται η προφυτρωτική προσβολή των σπόρων μαρουλιού από το *Rhizoctonia solani* και στα δύο πειράματα. Με την προφυτρωτική προσβολή γίνεται καλύτερη εκτίμηση του δυναμικού μολύσματος του παθογόνου διότι στα αποτελέσματα δεν επιδρούν φαινόμενα επιμόλυνσης των φυτών από γειτονικά προσβεβλημένα φυτά ή από την αύξηση του ριζικού συστήματος.



Σχήμα 10.39: Προφυτρωτική προσβολή σπόρων μαρουλιού στους χειρισμούς με νερό (■), Ε.Υ.Α.Ε. (■) και Υ.Α.Ε. (■) κατά τη διάρκεια του 1^{ου} πειράματος, στους τρεις χρόνους σποράς. Οι κάθετες γραμμές αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.



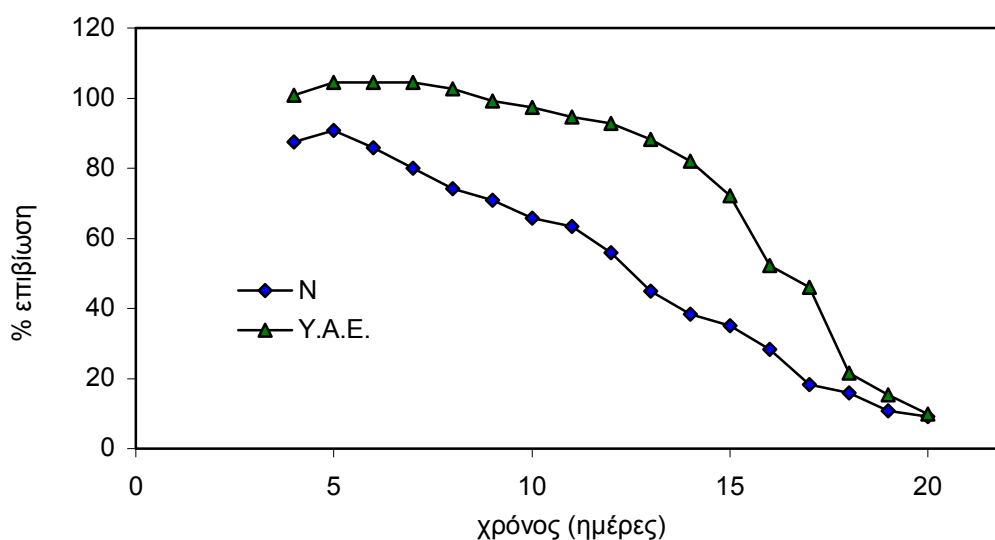
Σχήμα 10.40: Προφυτωτική προσβολή σπόρων μαρουλιού στους χειρισμούς με νερό (■), E.Y.A.E. (■) και Y.A.E. (■) κατά τη διάρκεια του 2^{ου} πειράματος, στους τρεις χρόνους σποράς. Οι κάθετες γραμμές αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.

Στο Σχήμα 10.39 είναι εμφανές ότι η προφυτωτική προσβολή στο έδαφος που δέχθηκε τα Y.A.E. κυμάνθηκε σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε όλους τους χρόνους σποράς, ακόμα και στη 2^η σπορά όπου η προσβολή στους άλλους δύο χειρισμούς ήταν υψηλή. Οι διαφορές του χειρισμού με Y.A.E. από το χειρισμό με νερό ήταν σημαντικές στη 2^η και 3^η σπορά ($p < 0,05$) ενώ στην 1^η σπορά οι διαφορές δεν ήταν σημαντικές ($p > 0,05$). Ο χειρισμός με E.Y.A.E. δεν είχε σημαντικές διαφορές από το χειρισμό με νερό ($p > 0,05$) σε κανένα από τους χρόνους σποράς.

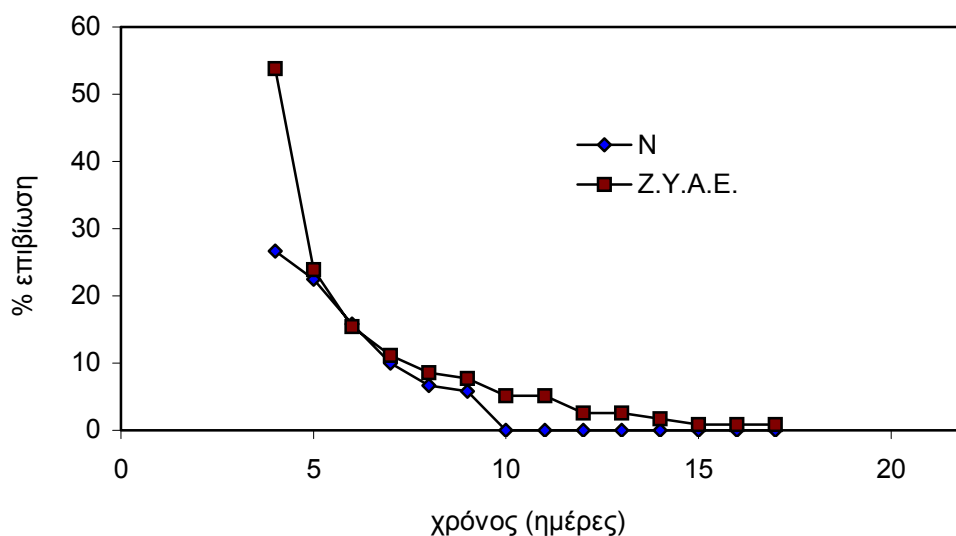
Στο Σχήμα 10.40 φαίνεται ότι η προφυτωτική προσβολή των σπόρων μαρουλιού στο 2^ο πείραμα ήταν σημαντικά μειωμένη στο έδαφος που δέχθηκε το ανεπεξέργαστο απόβλητο ελαιοτριβείων σε όλους τους χρόνους σποράς ($p > 0,05$). Στο έδαφος που διαβρέχτηκε με το επεξεργασμένο απόβλητο η προφυτωτική προσβολή ήταν μικρότερη από αυτή του χειρισμού με νερό σε όλους τους χρόνους σποράς αλλά σημαντικές διαφορές έχουμε μόνο στο χρόνο σποράς 0 ($p < 0,05$).

Επίσης μελετήθηκε η επίδραση που έχουν οι προσθήκες Y.A.E. και E.Y.A.E. στο *Rhizoctonia solani* όταν ενσωματωθεί στο έδαφος κατά τη διάρκεια των διαβρέξεων. Τα

αποτελέσματα της προσβολής των σπόρων μαρουλιού για τους δύο χειρισμούς με τα απόβλητα σε σχέση με το χειρισμό με νερό δίνονται στα Σχήματα 10.41 και 10.42.



Σχήμα 10.41 Επιβίωση φυτών μαρουλιού στους χειρισμούς με νερό (♦) και Y.A.E. (▲) σε έδαφος που μολύνθηκε με το *Rhizoctonia solani* στο στάδιο των διαβρέξεων.



Σχήμα 10.42: Επιβίωση φυτών μαρουλιού στους χειρισμούς με νερό (♦) και E.Y.A.E. (■) σε έδαφος που μολύνθηκε με το *Rhizoctonia solani* στο στάδιο των διαβρέξεων.

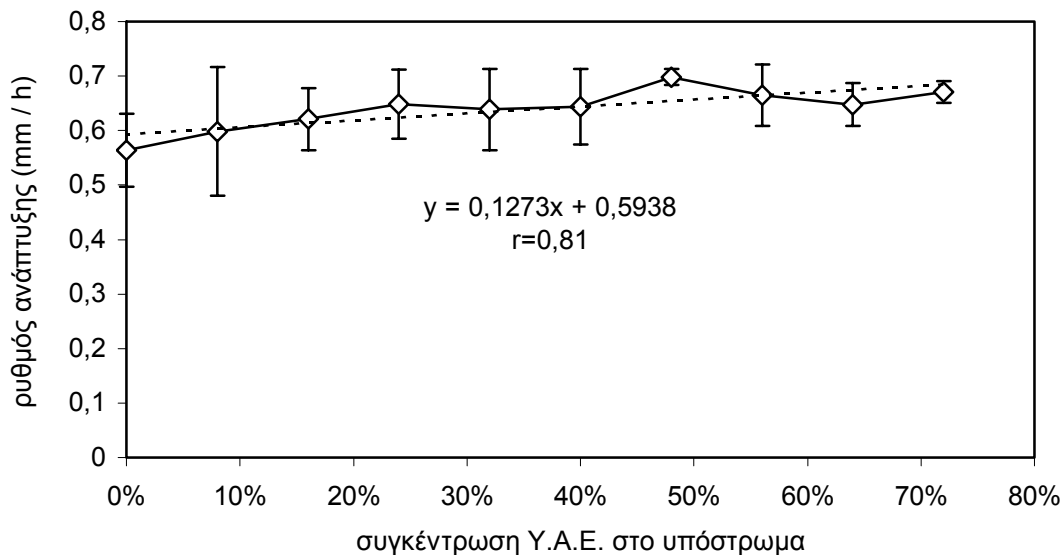
Στο Σχήμα 10.41 όπου παρουσιάζεται η επιβίωση των φυτών μαρουλιού όταν η εισαγωγή του παθογόνου στο έδαφος έγινε κατά τη διάρκεια των διαβρέξεων με τα Y.A.E., παρατηρείται ότι η επιβίωση στο χειρισμό με Y.A.E. είναι αυξημένη σε σχέση με το χειρισμό με νερό. Οι διαφορές είναι σημαντικές έως και τη 15^η ημέρα (καθώς και τη

17^η ημέρα) μετά τη σπορά ($p < 0,05$) ενώ από τη 16^η ημέρα και μετά δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές. Εάν συγκριθούν οι καμπύλες του Σχήματος 10.41 με τις καμπύλες των Σχημάτων 10.35-10.38 όπου η εισαγωγή του παθογόνου είχε γίνει 45 ημέρες μετά το τέλος των διαβρέξεων με τα Υ.Α.Ε., φαίνεται ότι η επισχετικότητα που εκδηλώνεται όταν το παθογόνο εισαχθεί στο έδαφος μετά το τέλος του σταδίου των διαβρέξεων είναι εντονότερη από την επισχετικότητα που εκδηλώνεται όταν το παθογόνο εισαχθεί κατά τη διάρκεια του σταδίου των διαβρέξεων. Στη δεύτερη περίπτωση η επισχετικότητα εκδηλώθηκε περισσότερο ως καθυστέρηση στην προσβολή ενώ στην πρώτη τα ποσοστά επιβίωσης στο χειρισμό με Υ.Α.Ε. ήταν σαφώς υψηλότερα από αυτά που παρατηρήθηκαν στο χειρισμό με νερό και διατηρούνταν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Στην περίπτωση της εισαγωγής του μύκητα και σπορά του μαρουλιού κατά τη διάρκεια των διαβρέξεων με τα Ε.Υ.Α.Ε. (Σχήμα 10.42), δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές από το χειρισμό με νερό ($p > 0,05$) εκτός από την 4^η ημέρα μετά τη σπορά. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά που περιγράφονται στα Σχήματα 10.35-10.38 όπου το παθογόνο εισήχθη στο έδαφος 45 ημέρες μετά το τέλος του σταδίου των διαβρέξεων. Ο χειρισμός αυτός οδηγεί σε μικρή εκδήλωση επισχετικότητας η οποία είναι σημαντική για μικρό μόνο χρονικό διάστημα.

11. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ Υ.Α.Ε. ΚΑΙ Ε.Υ.Α.Ε. ΣΤΟ ΡΥΘΜΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ *RHIZOCTONIA SOLANI*

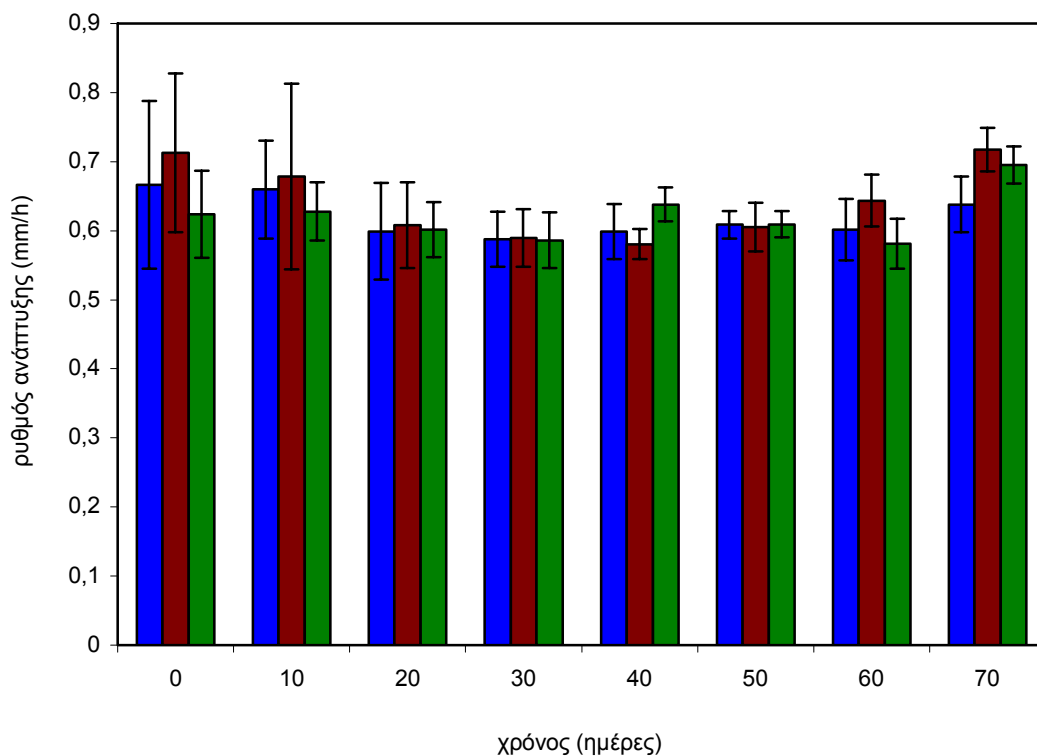
Στην προσπάθεια να ερμηνευτεί η επισχετική δράση του εδάφους που διαβρέχονταν με τα Υ.Α.Ε. έναντι του *Rhizoctonia solani* ελέγχθηκε η επίδραση που έχουν αυτά στο ρυθμό ανάπτυξής του. Ελέγχθηκε δηλαδή, το κατά πόσο κάποια συστατικά του αποβλήτου μπορούν να περιορίζουν την ανάπτυξη του μύκητα, και αυτό στη συνέχεια να εκδηλώνεται ως περιορισμένη προσβολή στα φυτά. Έτσι, μελετήθηκε ο ρυθμός ανάπτυξης του μύκητα σε στερεό υπόστρωμα το οποίο ως βάση έχει εκχύλισμα εδάφους και στη συνέχεια συμπληρώνεται με Υ.Α.Ε. σε διάφορες συγκεντρώσεις (παράγρ. 5.4.1). Τα αποτελέσματα δίνονται στο Σχήμα 11.1.



Σχήμα 11.1: Ταχύτητα γραμμικής αύξησης του *Rhizoctonia solani* σε στερεό υπόστρωμα σε σχέση με την περιεκτικότητά του σε Υ.Α.Ε. Η διακεκομμένη γραμμή αφορά την γραμμή τάσης και οι μπάρες την τυπική απόκλιση των μέσων.

Στο Σχήμα 11.1 παρατηρείται ότι ο μύκητας όχι μόνο δεν παρεμποδίζεται από το απόβλητο αλλά και ότι υπάρχει θετική συσχέτιση του ρυθμού ανάπτυξής του με τη συγκέντρωση των Υ.Α.Ε. στο υπόστρωμα. Αυτό δείχνει ότι κάποια συστατικά του αποβλήτου ευνοούν την ανάπτυξη του μύκητα (πιθανώς να χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα). Βέβαια η μικρή κλίση της γραμμής τάσης δείχνει ότι μια τέτοια επίδραση είναι αρκετά μικρή.

Στην παραπάνω μέθοδο μελέτης της επίδρασης ενός υποστρώματος στο ρυθμό ανάπτυξης κάποιου μύκητα, εμπεριέχονται δύο παράγοντες που την επηρεάζουν: οι ουσίες που ευνοούν την ανάπτυξή του και οι ουσίες που την παρεμποδίζουν. Το αποτέλεσμα που παρατηρείται, είναι ένας συνδυασμός των δύο αυτών παραγόντων. Στο απόβλητο που μελετήθηκε είναι δυνατό να εμπεριέχονται και οι δύο αυτοί παράγοντες (ουσίες που εύκολα χρησιμοποιούνται ως πηγή C από τους μικροοργανισμούς όπως τα απλά σάκχαρα, και ουσίες που έχουν παρεμποδιστική δράση σε πολλά είδη μικροοργανισμών όπως οι φαινολικές ενώσεις και τα λιπαρά οξέα). Στην πράξη όμως όταν έγινε η εισαγωγή του μύκητα στο έδαφος (45 ημέρες μετά την τελευταία διάβρεξη με τα απόβλητα) θα μπορούσαν να είχαν απομείνει μόνο κάποιες από τις παρεμποδιστικές ουσίες και να είχαν εξαντληθεί οι ουσίες που χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα. Έτσι, μελετήθηκε το κατά πόσο το εδαφικό εκχύλισμα από τους τρεις χειρισμούς σε διάφορους χρόνους μετά την τελευταία διάβρεξη, μπορεί να παρεμποδίζει ή αντίθετα να ευνοεί την ανάπτυξη του *Rhizoctonia solani*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 11.2:



Σχήμα 11.2: Ρυθμός ανάπτυξης του *Rhizoctonia solani* σε στερεό υπόστρωμα το οποίο περιείχε εδαφικό εκχύλισμα από τις επεμβάσεις με νερό (■), E.Y.A.E. (■), και Y.A.E. (■), σε διάφορους χρόνους μετά την τελευταία διάβρεξη. Οι μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.

Είναι εμφανές στο Σχήμα 11.2 ότι οι ρυθμοί ανάπτυξης του *Rhizoctonia solani* σε στερεά υποστρώματα με εκχυλίσματα εδάφους από τους τρεις χειρισμούς, δε διαφέρουν μεταξύ τους. Έτσι όλες οι συγκρίσεις μεταξύ των τριών χειρισμών στους διάφορους χρόνους μετά την τελευταία διάβρεξη δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p>0,05$). Μοναδική εξαίρεση αποτελεί ο ρυθμός αύξησης του μύκητα στα εδαφικά εκχυλίσματα που παραλήφθησαν 70 ημέρες μετά την τελευταία διάβρεξη με τα υγρά των επεμβάσεων, όπου εκεί η αύξηση του μύκητα ήταν ταχύτερη στα εδαφικά εκχυλίσματα των χειρισμών με Υ.Α.Ε. και Ε.Υ.Α.Ε. σε σχέση με το εδαφικό εκχύλισμα του χειρισμού με νερό ($p<0,05$). Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με τα αποτελέσματα του Σχήματος 11.1, καθώς και με τα αποτελέσματα της μελέτης της επισχετικότητας όταν ο μύκητας εισήχθηκε στο έδαφος κατά τη διάρκεια των διαβρέξεων (Σχήματα 10.41 και 10.42), στο ότι το απόβλητο δεν επηρεάζει ιδιαίτερα την ανάπτυξή του παθογόνου και κυρίως στο ότι η οποιαδήποτε δράση τους είναι μάλλον ευνοϊκή παρά παρεμποδιστική.

12. ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Κατά τη διάρκεια του 2^{ου} πειράματος απομονώθηκαν από τους τρεις χειρισμούς βακτήρια τα οποία εμφάνιζαν αντιμικροβιακή δράση έναντι του *R. solani* σε τρυβλία (παρ. 7.1). Από τις απομονώσεις αυτές επιλέχθηκαν αντιπροσωπευτικά στελέχη για παραπέρα μελέτη (ταυτοποίηση και μελέτη της παρεμπόδισης διαφόρων μυκήτων).

12.1. Ταυτοποιήσεις βακτηρίων

12.1.1. Ακτινοβακτήρια

Τα ακτινοβακτήρια απομονώθηκαν κυρίως από το χειρισμό με νερό (τα στελέχη N₁₁, N_(H), N_(I) και N_(ΣΤ)). Στο χειρισμό με τα ανεπεξέργαστα απόβλητα δεν απομονώθηκαν καθόλου ακτινοβακτήρια. Ένα στέλεχος B_Γ απομονώθηκε στο χειρισμό με το επεξεργασμένο απόβλητο.

Στον Πίνακα 12.1 δίνονται τα αποτελέσματα των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της ομάδας στην οποία ανήκει κάθε απομόνωση (παράγρ.7.2). Οι δοκιμές αναγράφονται με τη σειρά στην οποία βρίσκονται στη βάση δεδομένων MATIDEN.

Από τα στοιχεία του Πίνακα 12.1 η ταξινόμηση των στρεπτομυκήτων έχει ως εξής.

B_Γ: *Streptomyces griseus* group (1: 0,9894, 2: 0,4306, 3: 0,1700)

N₁₁: *Streptomyces griseus* group (1: 0,8924, 2: 0,4499, 3: 0,2065)

N_(H): *Streptomyces griseus* group (1: 0,9266, 2: 0,4414, 3: 0,1904)

N_(I): *Streptomyces collinus* group (1: 0,9954, 2: 0,4197, 3: 0,0866)

N_(ΣΤ): *Streptomyces collinus* group (1: 0,9958, 2: 0,4079, 3: 0,6623)

Όπου :1: Η πιθανότητα Willcox (όσο οι τιμές πλησιάζουν τη μονάδα τόσο περισσότερο ταιριάζει το άγνωστο στέλεχος στην ομάδα). Για να ταξινομηθεί με επιτυχία το στέλεχος θα πρέπει η πιθανότητα αυτή να είναι μεγαλύτερη από 0,8

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2: Η ταξινομική απόσταση (εκφράζει την απόσταση του άγνωστου στελέχους από το κέντρο της ομάδας στην οποία τοποθετήθηκε και όσο μικρότερη είναι η τιμή τόσο η σχέση του με την ομάδα είναι μεγαλύτερη).

3: το τυπικό σφάλμα της ταξινομικής απόστασης (όπου τιμές μικρότερες του 2-3 είναι αποδεκτές)

Πίνακας 12.1: Αποτελέσματα των δοκιμών για την εμφάνιση ή όχι διαφόρων χαρακτήρων από τους στρεπτομύκητες που απομονώθηκαν.

	ΧΑΡΑΚΤΗΡΑΣ	ΣΤΕΛΕΧΟΣ				
		B _I	N _{II}	N _(H)	N _(I)	N _(ΣΤ)
1	ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ANTONITOLΗΣ	-	-	+	+	+
2	ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΚΕΛΛΟΒΙΟΖΗΣ	+	+	+	+	+
3	ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΡΑΜΝΟΖΗΣ	+	+	+	+	+
4	ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΡΑΦΙΝΟΖΗΣ	-	-	-	+	+
5	ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΙΝΟΣΙΤΟΛΗΣ	+	-	-	+	+
6	ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ ΝΑΤΡΑΖΙΔΙΟ 0,01%	+	+	+	-	-
7	ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΜΑΝΝΙΤΟΛΗΣ	+	+	+	+	+
8	ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΞΥΛΟΖΗΣ	+	+	+	+	+
9	ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ NaCl 7%	+	+	+	+	+
10	ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ ΦΑΙΝΟΛΗ 0,1%	-	-	-	+	+
11	ΑΥΞΗΣΗ ΣΤΟΥΣ 45 °C	-	-	-	-	-
12	ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΗΝ ΡΙΦΑΜΠΙΚΙΝΗ	-	-	-	-	-
13	ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΗΝ ΝΕΟΜΥΚΙΝΗ	+	+	+	-	-
14	ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΑΡΒΟΥΤΙΝΗΣ	+	+	+	+	+
15	ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΞΑΝΘΙΝΗΣ	-	-	-	-	-
16	ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΑΛΛΑΝΤΟΪΝΗΣ	+	+	+	+	+
17	ΑΝΑΣΤΟΛΗ A. NIGER	+	+	-	-	-
18	ΑΝΑΣΤΟΛΗ S. MURINUS					
19	ΑΝΑΓΩΓΗ ΝΙΤΡΙΚΩΝ	+	+	+	-	-
20	ΠΑΡΑΓΩΓΗ H ₂ S	+	+	+	+	+
21	ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΠΗΚΤΙΝΗΣ	-	-	-	+	+
22	ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΛΕΚΙΘΙΝΗΣ	-	+	+	-	-
23	ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗ L-ΥΔΡΟΞΥΠΡΟΛΙΝΗΣ	-	-	+	-	-
24	ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗ L-ΙΣΤΙΔΙΝΗΣ	+	+	+	+	+
25	ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗ DL-ΑΜΙΝΟΒΟΥΤΥΡΙΚΟΥ	-	-	-	+	-
26	ΔΙΑΜΕΡΙΣΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΥΚΗΛ. ΥΠΟΣΤΡΩΜ.	-	-	-	-	-
27	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕΛΑΝΙΝΗΣ	-	+	-	+	+

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας 12.1 (συνέχεια): Αποτελέσματα των δοκιμών για την εμφάνιση ή όχι διαφόρων χαρακτήρων από τους στρεπτομύκητες που απομονώθηκαν.

28	ΚΟΚΚΙΝΗ ΧΡΩΣΤΙΚΗ ΜΥΚΗΛ.ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ	-	-	-	-	-
29	ΑΝΑΣΤΟΛΗ <i>B. SUBTILIS</i>	-	-	+	-	-
30	ΓΚΡΙ ΣΠΟΡΙΑ	-	-	+	-	-
31	ΚΟΚΚΙΝΑ ΣΠΟΡΙΑ	-	-	-	-	-
32	ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΣΠΟΡΙΩΝ ΜΕ ΠΡΟΕΚΒΟΛΕΣ	-	-	-	+	+
33	ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΣΠΟΡΙΩΝ ΛΕΙΑ	+	+	+	-	-
34	ΑΛΥΣΙΔΕΣ ΣΠΟΡΙΩΝ BIV	-	-	-	+	+
35	ΑΛΥΣΙΔΕΣ ΣΠΟΡΙΩΝ SPIR	-	-	-	-	-
36	ΑΛΥΣΙΔΕΣ ΣΠΟΡΙΩΝ RA	-	-	-	-	-
37	ΑΛΥΣΙΔΕΣ ΣΠΟΡΙΩΝ RF	+	+	+	-	-
38	ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΙΝΟΥΛΙΝΗΣ	+	-	-	+	+
39	ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΦΡΟΥΚΤΟΖΗΣ	+	+	+	+	+
40	ΚΙΤΡΙΝΟΚΑΦΕ ΧΡΩΣΤΙΚΗ ΜΥΚΗΛ. ΥΠΟΣΤΡΩΜ	+	+	-	-	-
41	ΠΡΑΣΙΝΑ ΣΠΟΡΙΑ	+	+	-	-	-

1.2.1.2. Άλλα βακτήρια

Από τις βακτηριακές απομονώσεις που επιλέχθηκαν για παραπέρα μελέτη το στέλεχος N1 απομονώθηκε από το έδαφος που διαβρέχονταν με νερό και όλα τα υπόλοιπα στελέχη από το έδαφος που διαβρέχονταν με το ανεπεξέργαστο απόβλητο. Στο χειρισμό με νερό απομονώθηκαν επίσης Gram (+) στελέχη που σχηματίζουν ενδοσπόριο και σχημάτιζαν ζώνη παρεμπόδισης στο *Rhizoctonia solani*, τα οποία δε μελετήθηκαν επιπλέον.

Για την ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών έγινε κατ' αρχήν χρώση Gram και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν οι αντίστοιχες πλακέτες του συστήματος BIOLOG με τα κατάλληλα υποστρώματα για Gram+ ή Gram- βακτήρια (παράγρ. 7.3). Τα αποτελέσματα των δοκιμών στις 24 ώρες όπου με + σημειώνονται οι θετικές αντιδράσεις, με – οι αρνητικές και με / οι αμφίβολες, καθώς και τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης δίνονται στον Πίνακα 12.2 όπου:

Sim: ο δείκτης ομοιότητας (πρέπει sim για τις 24 h >0,5 για να είναι το αποτέλεσμα αποδεκτό)

Dist: τιμή η οποία σχετίζεται με τον αριθμό των αναντίστοιχων αντιδράσεων.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας 12.2: Αποτελέσματα των αντιδράσεων για την ταυτοποίηση των βακτηριακών απομονώσεων.

N₁ (GRAM -): *Alcaligenes faecalis ss. faecalis*

(sim: 0,952 dist: 0,717)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
D	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
E	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
F	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	/
G	/	-	+	/	+	+	+	/	/	/	-	-
H	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

K₂ (GRAM-): *Alcaligenes faecalis ss. faecalis*

(sim: 0,885 dist: 1,717)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
D	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
E	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
F	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	/
G	/	-	+	/	+	+	+	/	/	/	-	-
H	-	+	-	-	/	-	-	-	-	-	-	-

K₇ (GRAM +): *Bacillus megaterium*

(sim: 0,834 dist: 2,447)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	/	+	/	-	/	-	-	-	-	-
B	-	-	/	/	+	-	-	-	+	/	+	-
C	-	-	+	/	-	+	-	-	-	-	+	-
D	-	-	/	+	-	-	-	/	-	+	-	+
E	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	/	+	-	-	/	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας 12.2: Αποτελέσματα των αντιδράσεων για την ταυτοποίηση των βακτηριακών απομονώσεων (συνέχεια).

K₈ (GRAM +): *Bacillus subtilis* var. *globigi*

(sim: 0,836 dist: 2.42)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	/	+	/	-	-	-	-	/	-	-
B	-	-	+	/	+	-	-	-	+	-	+	-
C	-	-	/	-	/	+	-	-	-	-	+	-
D	/	-	-	+	-	-	/	+	-	+	-	+
E	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	/
G	-	-	+	-	+	/	-	-	/	-	-	-
H	/	/	/	+	+	-	-	-	-	-	-	-

K₁₀ (GRAM+): *Bacillus subtilis* var. *globigii*

(sim: 0,853 dist: 2,152)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	+	+	+	+	-	+	/	/	/	/	/
B	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
C	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-
D	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
E	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	/
G	-	-	-	-	-	/	-	-	-	-	-	/
H	+	/	+	+	+	-	-	-	-	-	/	/

K₂₁ (GRAM+): *Bacillus megaterium*

(sim: 0,877 dist: 1,819)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	/	+	-	-	-	/	/	-	-	-
B	-	-	-	/	+	-	-	-	/	-	+	-
C	-	-	+	/	-	+	-	-	-	-	+	-
D	-	-	/	+	-	-	-	-	-	-	-	+
E	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	/	/	-	-	/	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας 12.2: Αποτελέσματα των αντιδράσεων για την ταυτοποίηση των βακτηριακών απομονώσεων (συνέχεια).

K₂₃ (GRAM+): *Bacillus pumilus*

(sim: 0,586 dist: 4,863)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
B	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-
C	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
D	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+
E	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+
G	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
H	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

K₂₈ (GRAM+): *Bacillus pumilus*

(sim: 0,725 dist: 4,134)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	/	+	/	-	-	-	-	+	/	-
B	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-
C	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
D	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+
E	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+
G	/	/	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
H	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των βακτηρίων έχουν ως εξής:

N₁ : *Alcaligenes faecalis* ss. *faecalis* (sim: 0,952 dist: 0,717)

K₂ : *Alcaligenes faecalis* ss. *faecalis* (sim: 0,885 dist: 1,717)

K₇ : *Bacillus megaterium* (sim: 0,834 dist: 2,447)

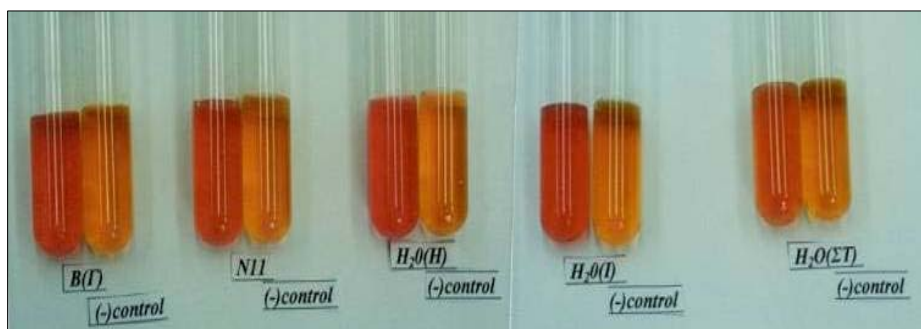
K₈ : *Bacillus subtilis* var. *globigi* (sim: 0,836 dist: 2,42)

K₁₀ : *Bacillus subtilis* var. *globigii* (sim: 0,853 dist: 2,152)

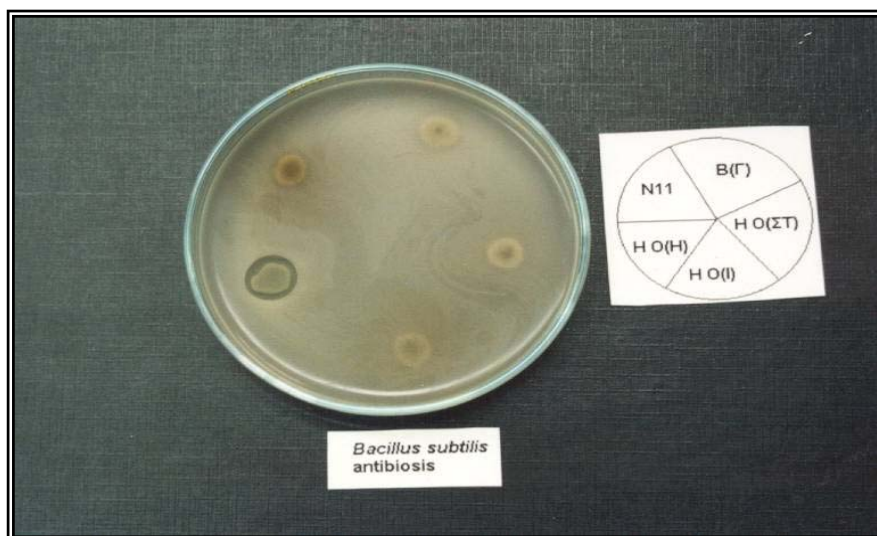
K₂₁ : *Bacillus megaterium* (sim: 0,877 dist: 1,819)

K₂₃ : *Bacillus pumilus* (sim: 0,586 dist: 4,863)

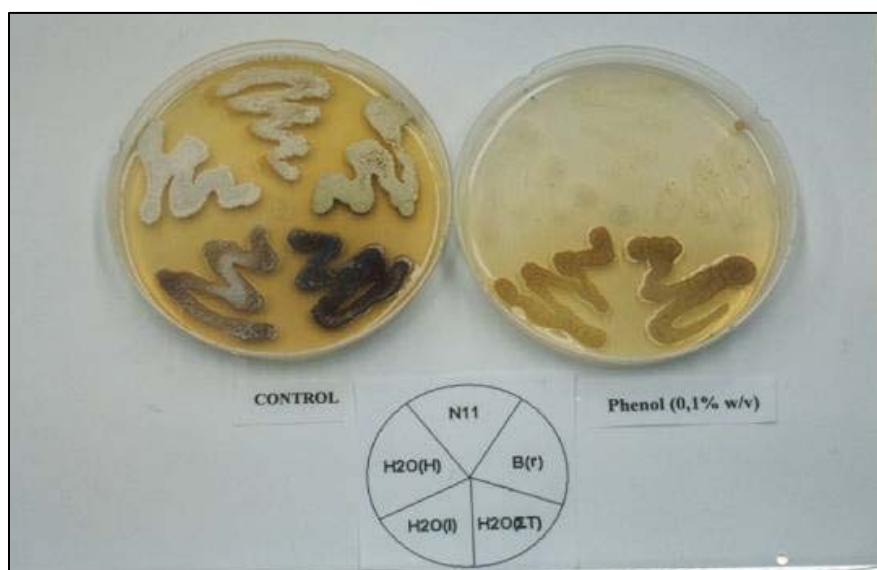
K₂₈ : *Bacillus pumilus* (sim: 0,725 dist: 4,134)



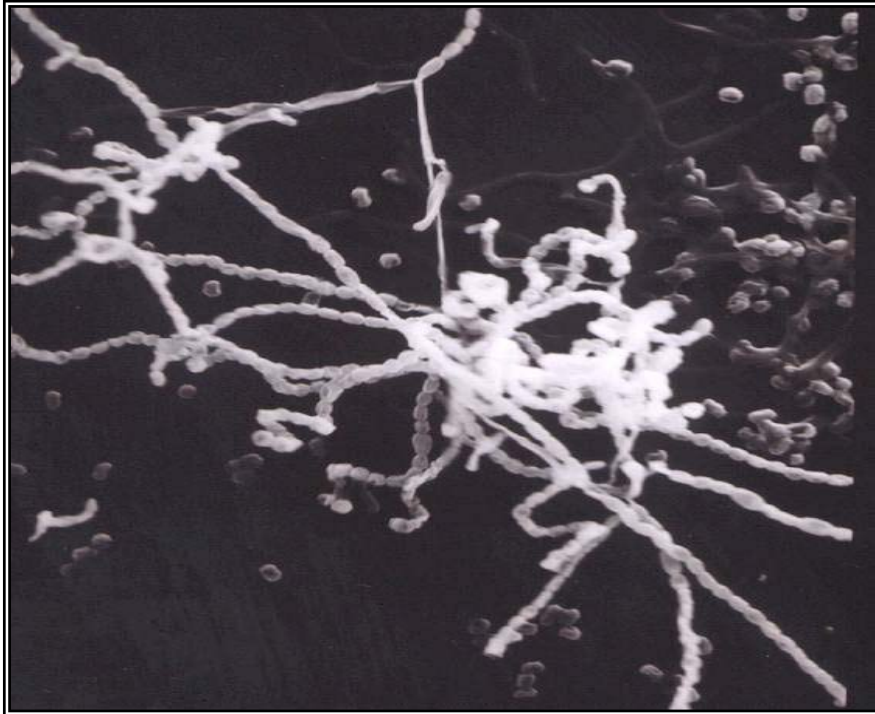
Εικόνα 12.1: Δοκιμή για την αποικοδόμηση της αλλαντοΐνης από τα ακτινοβακτήρια του γένους *Streptomyces*



Εικόνα 12.2: Δοκιμή για την παρεμπόδιση του *Bacillus subtilis* από τα ακτινοβακτήρια του γένους *Streptomyces*



Εικόνα 12.3: Δοκιμή για την ανθεκτικότητα σε φαινόλη των ακτινοβακτηρίων του γένους *Streptomyces*

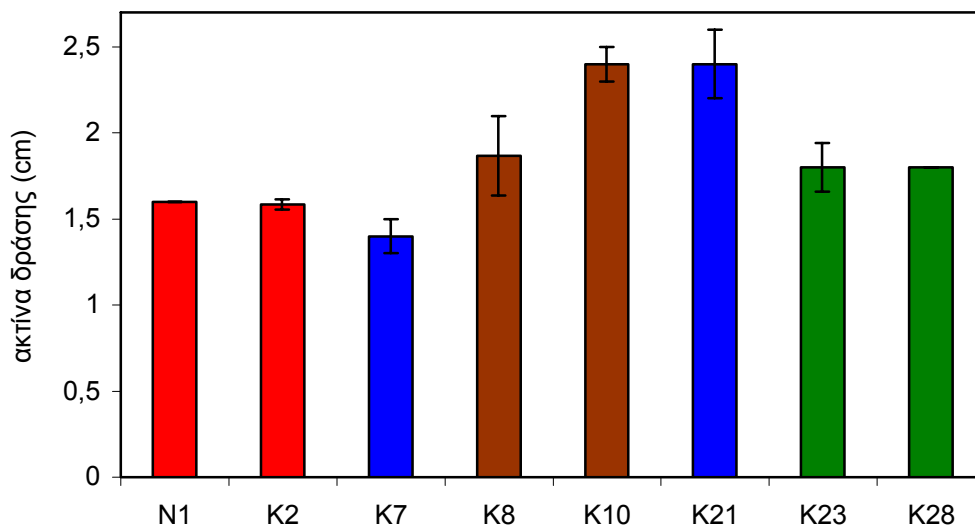


Εικόνα 12.4: Ευθείες αλυσίδες λείων σπορίων των απομονώσεων B_Γ, N₁₁ και N_H των στρεπτομυκήτων της ομάδας *Streptomyces griseus* (φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης).

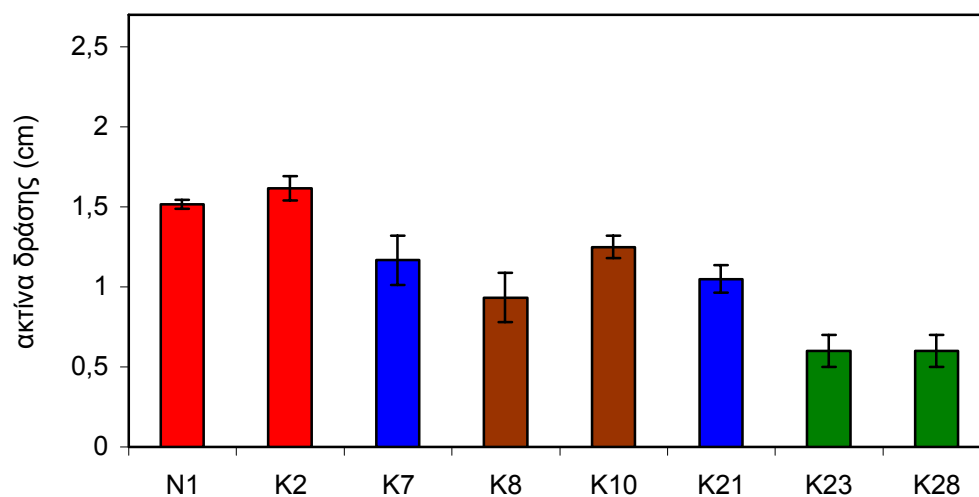
12.2. Μελέτη της αντιμυκητιακής δράσης των βακτηριακών απομονώσεων

Τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από τους τρεις χειρισμούς μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν σε τρυβλία την ανάπτυξη διαφόρων μυκήτων η οποία εκφράστηκε με τον προσδιορισμό της ακτίνας δράσης (παράγρ. 5.4.3). Οι μύκητες που μελετήθηκαν ήταν εκτός από το *Rhizoctonia solani*, οι *Pythium debaryanum* και *Fusarium oxysporum* οι οποίοι είναι επίσης φυτοπαθογόνοι και ο σαπροφυτικός μύκητας *Aspergillus niger*.

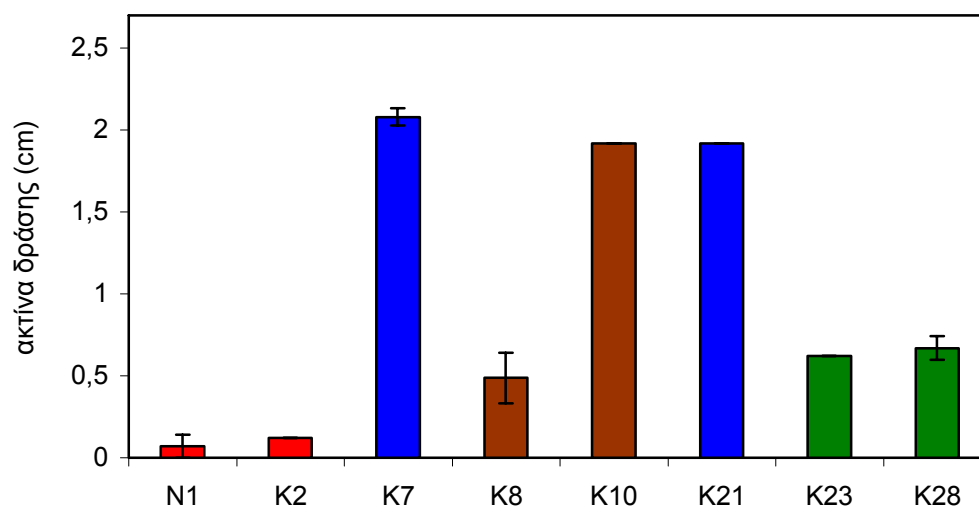
Στα Σχήματα 12.1-12.4 δίνονται οι ζώνες δράσης που δημιούργησαν τα διάφορα βακτηριακά στελέχη στους τέσσερις μύκητες.



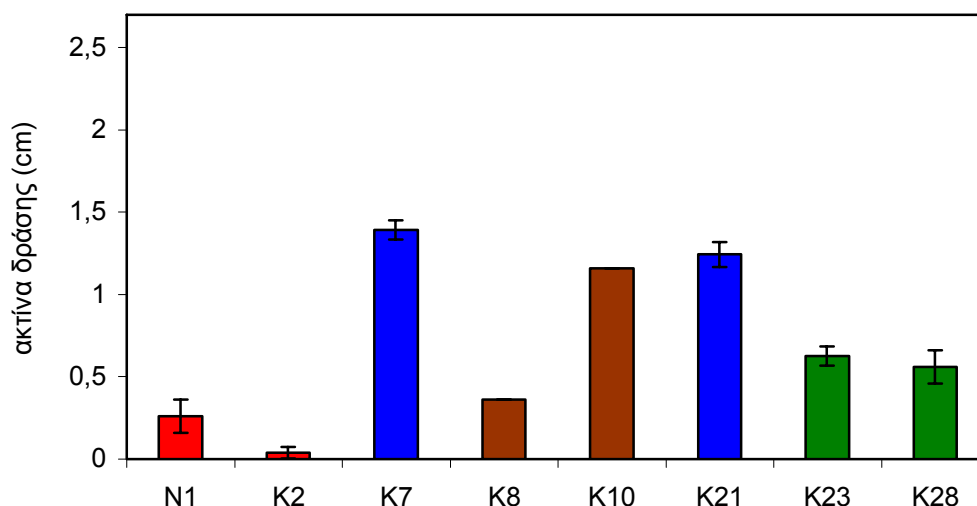
Σχήμα 12.1: Αντιμυκητιακή δράση των βακτηριακών απομονώσεων *Alcaligenes faecalis* (■), *Bacillus megaterium* (■), *Bacillus pumilus* (■) και *Bacillus subtilis* (■) έναντι του *Rhizoctonia solani*. Οι κάθετες μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.



Σχήμα 12.2: Αντιμυκητιακή δράση των βακτηριακών απομονώσεων *Alcaligenes faecalis* (■), *Bacillus megaterium* (■), *Bacillus pumilus* (■) και *Bacillus subtilis* (■) έναντι του *Pythium debaryanum*. Οι κάθετες μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.



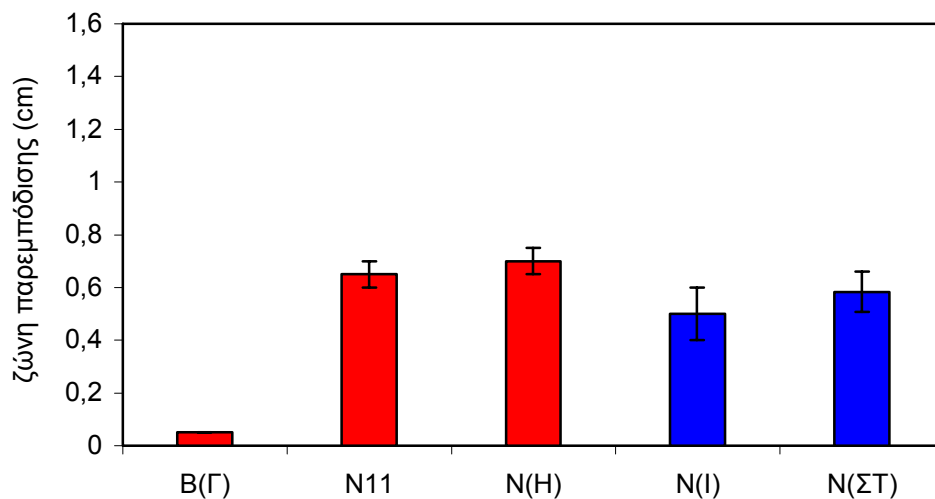
Σχήμα 12.3: Αντιμυκητιακή δράση των βακτηριακών απομονώσεων *Alcaligenes faecalis* (■), *Bacillus megaterium* (■), *Bacillus pumilus* (■) και *Bacillus subtilis* (■) έναντι του *Fusarium oxysporum*. Οι κάθετες μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.



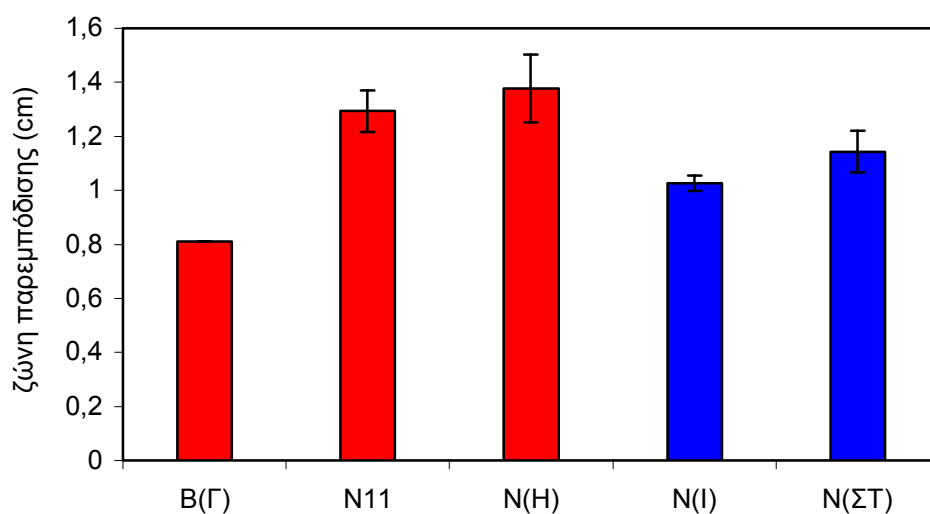
Σχήμα 12.4: Αντιμυκητιακή δράση των βακτηριακών απομονώσεων *Alcaligenes faecalis* (■), *Bacillus megaterium* (■), *Bacillus pumilus* (■) και *Bacillus subtilis* (■) έναντι του *Aspergillus niger*. Οι κάθετες μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.

Είναι εμφανές στα Σχήματα 12.1-12.4 ότι εκτός από τα δύο Gram (-) στελέχη N₁ και K₂ που ανήκουν στο γένος *Alcaligenes* όλα τα υπόλοιπα στελέχη, τα οποία ανήκουν στο γένος *Bacillus* δημιουργούν ζώνες δράσης σε μικρό ή μεγάλο βαθμό σε όλους τους μύκητες που μελετήθηκαν. Τα στελέχη *Alcaligenes faecalis* N₁ και K₂, δεν επέδρασαν σημαντικά στους μύκητες *Fusarium oxysporum* και *Aspergillus niger* των οποίων ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν μικρότερος από το ρυθμό ανάπτυξης των *Rhizoctonia solani* και *Pythium debaryanum* στους οποίους εμφάνισαν εντονότερη δράση. Τα στελέχη *Bacillus pumilus*, K₂₃ και K₂₈ και το στέλεχος *Bacillus subtilis* K₈ επέδρασαν σημαντικά στην ανάπτυξη του *Rhizoctonia solani* και λιγότερο στους υπόλοιπους μύκητες. Τέλος, τα στελέχη *Bacillus megaterium* K₇ και K₂₁ και το στέλεχος *Bacillus subtilis* K₁₀ φαίνεται να είναι δραστικά σε όλους τους μύκητες που μελετήθηκαν.

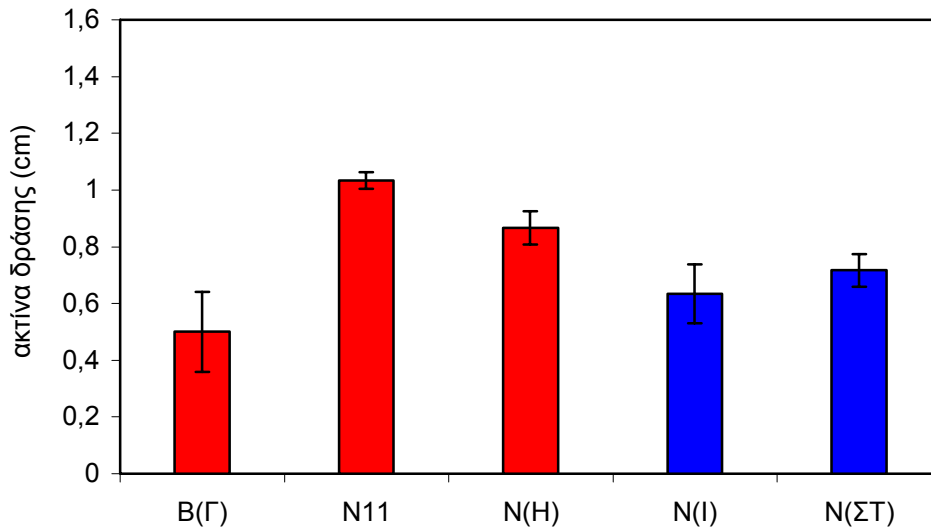
Στα Σχήματα 12.5-12.8 εξετάζεται η επίδραση των στελεχών στρεπτομυκήτων στους ίδιους μύκητες.



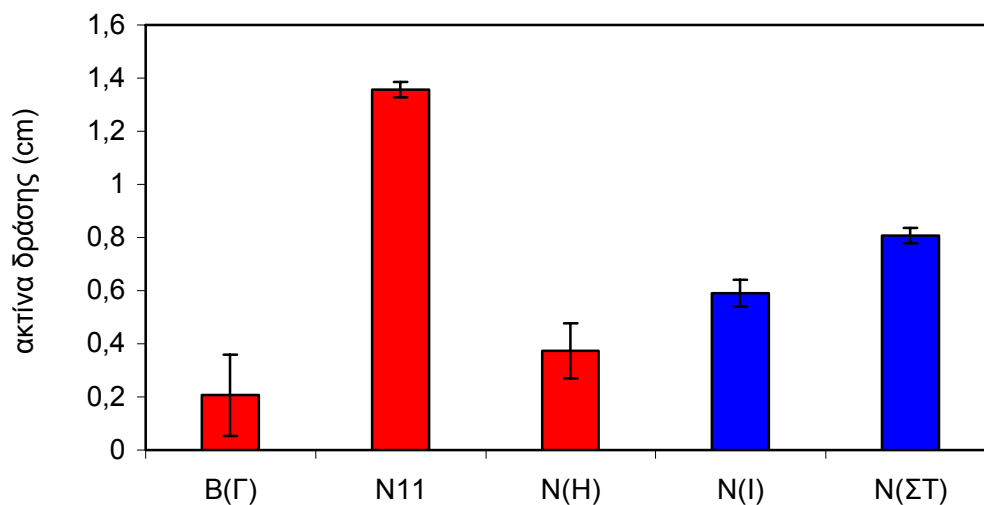
Σχήμα 12.5: Αντιμυκητιακή δράση των στελεχών στρεπτομυκήτων της ομάδας *Streptomyces griseus* (■) και *Streptomyces collinus* (■) έναντι του *Rhizoctonia solani*. Οι κάθετες μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.



Σχήμα 12.6: Αντιμυκητιακή δράση των στελεχών στρεπτομυκήτων της ομάδας *Streptomyces griseus* (■) και *Streptomyces collinus* (■) έναντι του *Pythium debaryanum*. Οι κάθετες μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.



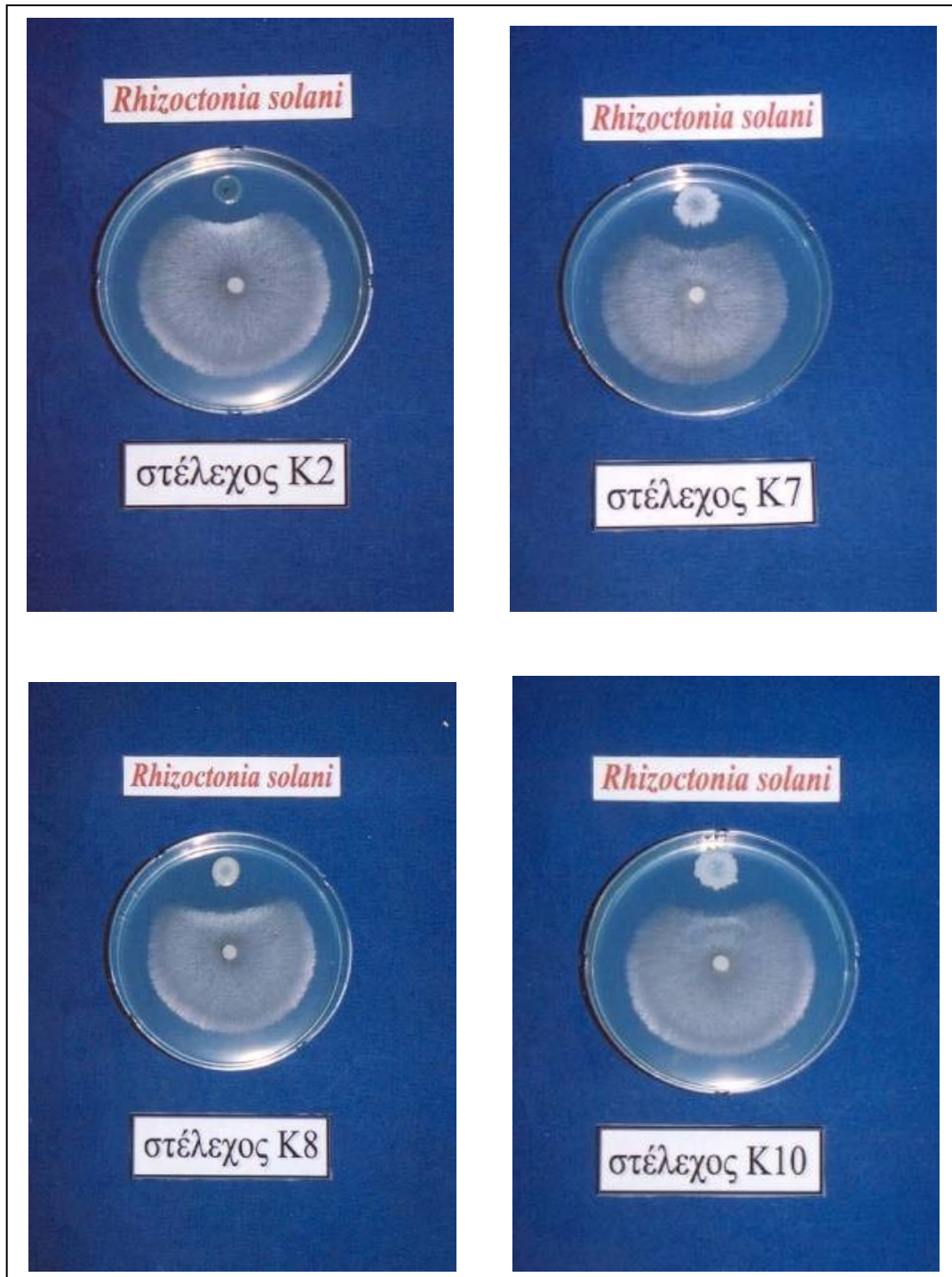
Σχήμα 12.7: Αντιμυκητιακή δράση των στελεχών στρεπτομυκήτων της ομάδας *Streptomyces griseus* (■) και *Streptomyces collinus* (■) έναντι του *Fusarium oxysporum*. Οι κάθετες μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.



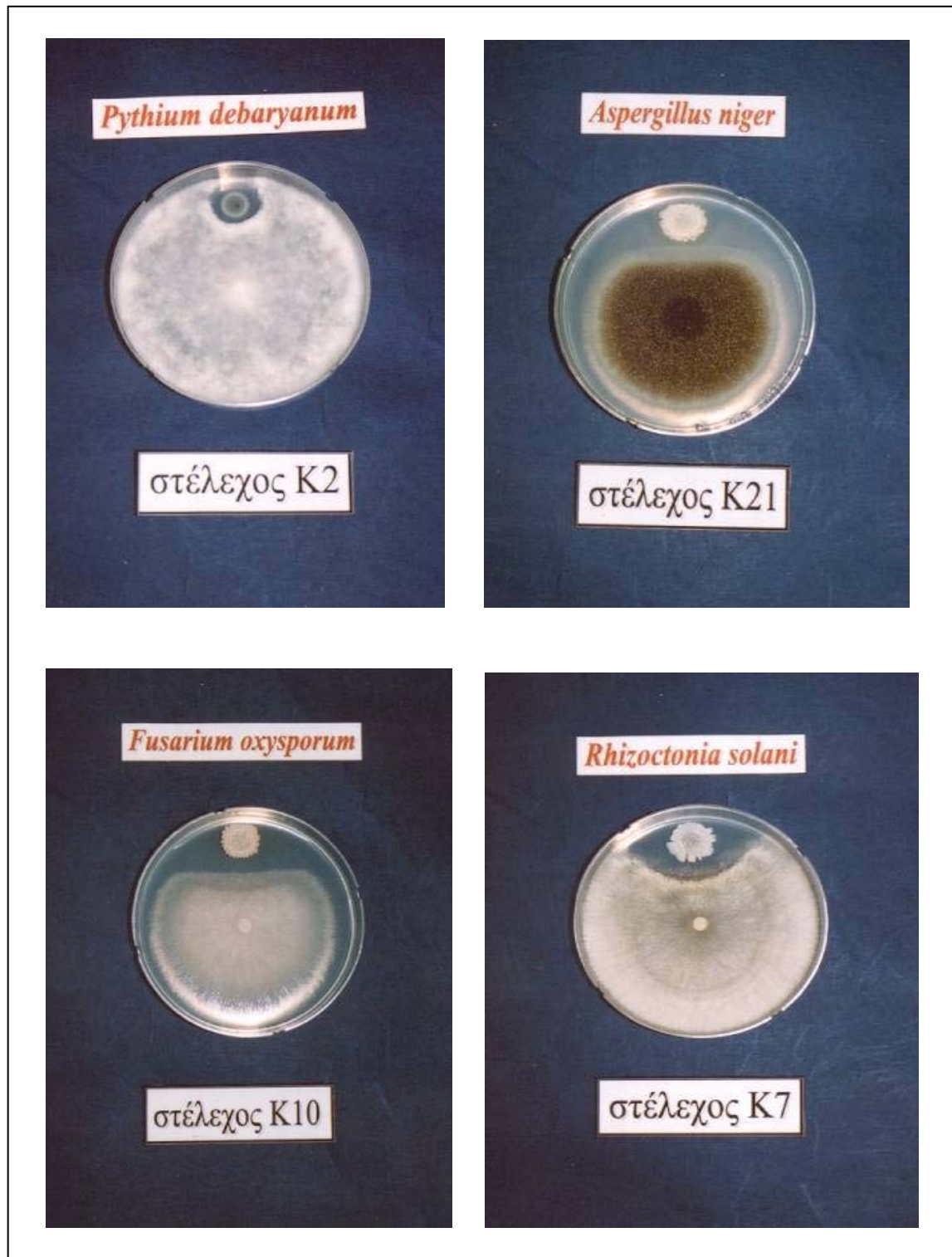
Σχήμα 12.8: Αντιμυκητιακή δράση των στελεχών στρεπτομυκήτων της ομάδας *Streptomyces griseus* (■) και *Streptomyces collinus* (■) έναντι του *Aspergillus niger*. Οι κάθετες μπάρες αφορούν την τυπική απόκλιση των μέσων.

Οι απομονώσεις ακτινομυκήτων του γένους *Streptomyces* φαίνεται επιδρούν λιγότερο στους μύκητες σε σχέση με τις προηγούμενες βακτηριακές απομονώσεις. Ο πιο ευαίσθητος μύκητας φαίνεται πως είναι ο *Pythium debaryanum* και ο λιγότερο ευαίσθητος ο *Rhizoctonia solani*. Επίσης τα δύο στελέχη N₁₁ και N_(H) που ανήκουν στην ομάδα του *Streptomyces griseus* φαίνονται ως τα πιο αποτελεσματικά, τα στελέχη N_(I) και N_(ΣΤ), της

ομάδας *Streptomyces collinus* είναι λιγότερο αποτελεσματικά ενώ το στέλεχος B_(Γ) της ομάδας *Streptomyces griseus* παρεμποδίζει μόνο τον *Pythium debaryanum*.



Εικόνα 12.5: Αντιμυκητιακή δράση των βακτηριακών απομονώσεων στο μύκητα *Rhizoctonia solani*.



Εικόνα 12.6: Αντιμυκητιακή δράση των βακτηριακών απομονώσεων στους διάφορους μύκητες που μελετήθηκαν.

13.1 Επίδραση των Υ.Α.Ε. και Ε.Υ.Α.Ε. στις χημικές ιδιότητες του εδάφους

Η προσθήκη Υ.Α.Ε. και Ε.Υ.Α.Ε. στο έδαφος οδήγησε σε μικρή αύξηση του pH. Η μικρή αύξηση του εδαφικού pH με την προσθήκη Υ.Α.Ε. στο έδαφος παρ' όλο που το υγρό αυτό εμφανίζει όξινη αντίδραση, αναφέρεται και από άλλους ερευνητές (Tardioli et al. 1997, Paredes et al. 1987, Χατζηπαυλίδης 1999) και είναι αποτέλεσμα της αύξησης της συγκέντρωσης κατιόντων όπως τα Ca^{++} , K^+ , Na^+ , κ.λπ.. Η αύξηση του pH μετά από την προσθήκη όξινου υγρού όπως είναι τα Υ.Α.Ε. οφείλεται επίσης και στην οξείδωση των ασθενών οργανικών οξέων από τους μικροοργανισμούς οι οποίοι χρησιμοποιούν H^+ και παράγουν CO_2 κατά την αντίδραση: $\text{C}_x\text{H}_{2x-1}\text{O}_x^- + \text{H}^+ \rightarrow x \text{CO}_2 + x \text{H}_2\text{O}$ (Conyers et al. 1995, Yan et al. 1996). Η ανεξαρτησία των μεταβολών στις τιμές του pH από την ποσότητα του υγρού διάβρεξης, υποδηλώνει την ενεργή συμμετοχή των μικροοργανισμών στην αποικοδόμηση των όξινων συστατικών του αποβλήτου. Το μέγεθος της μεταβολής του pH που παρατηρήθηκε στους χειρισμούς με Υ.Α.Ε. και Ε.Υ.Α.Ε., δεν επιφέρει σημαντικές αλλαγές στη βιοδιαθεσιμότητα των ανόργανων στοιχείων (Πίνακας 1.2). Δεδομένου ότι η συγκέντρωση των ανόργανων στοιχείων αυξάνει, η συνολική επίδραση από την προσθήκη των αποβλήτων όσο αφορά τη βιοδιαθεσιμότητά τους, θα είναι θετική. Στην περίπτωση προσθήκης μεγαλύτερων ποσοτήτων αποβλήτων (413 ml/kg εδάφους Υ.Α.Ε. και 411 ml/kg εδάφους Ε.Υ.Α.Ε.) το τελικό pH μετά την τελευταία διάβρεξη διαμορφώθηκε στο 8,1 στο χειρισμό με Υ.Α.Ε. και στο 8,3 στο χειρισμό με Ε.Υ.Α.Ε. το οποίο πλησιάζει τα όρια των αλατούχων εδαφών. Στην περίπτωση αυτή ενδεχομένως να δημιουργηθεί πρόβλημα στη βιοδιαθεσιμότητα κάποιων ιχνοστοιχείων και του φωσφόρου ο οποίος σε υψηλά pH σχηματίζει αδιάλυτα φωσφορικά άλατα με το μαγνήσιο και το ασβέστιο. Πάντως, αναμένεται να επέλθει μείωση του pH μετά την πάροδο κάποιου χρονικού διαστήματος όπως έχει παρατηρηθεί να συμβαίνει μετά την προσθήκη Υ.Α.Ε. στο έδαφος (Tardioli et al. 1997, Paredes et al. 1987).

Το επόμενο μέγεθος που μετρήθηκε ήταν η ηλεκτρική αγωγιμότητα, η οποία αποτελεί μέτρο της συγκέντρωσης των αλάτων στο έδαφος. Οι προσθήκες τόσο των Υ.Α.Ε. όσο και των Ε.Υ.Α.Ε. παρ' όλο που τα δύο αυτά υγρά έχουν υψηλή αγωγιμότητα, οδήγησαν σε σημαντική μεν αύξηση της αγωγιμότητας του εδάφους (4,5 φορές αύξηση στην περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκαν οι μεγαλύτερες ποσότητες αποβλήτου), δεν προσεγγίστηκαν όμως φυτοτοξικά επίπεδα. Η αγωγιμότητα του εδάφους που δέχθηκε τα

δύο αυτά απόβλητα οφείλεται στην αύξηση της συγκέντρωσης ιόντων όπως το κάλιο ο φώσφορος το ασβέστιο κ.ά. τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των φυτών και η αύξηση της συγκέντρωσής τους στο έδαφος θεωρείται ως θετική επίδραση.

Η προσθήκη Υ.Α.Ε ή Ε.Υ.Α.Ε. στο έδαφος, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του pH και της αγωγιμότητάς του. Η αύξηση των δύο αυτών παραμέτρων οφείλεται σε ιόντα ωφέλιμα για τα φυτά, ενώ ταυτόχρονα αυξάνει και η οργανική ουσία η οποία είναι ιδιαίτερα επιθυμητή στα φτωχά σε οργανική ουσία εδάφη της χώρας μας. Συμπεραίνεται ότι οι προσθήκες των δύο αυτών αποβλήτων θα βελτιώσουν την ποιότητα του εδάφους και δεν θα το υποβαθμίσουν.

13.2. Επίδραση των Υ.Α.Ε. και Ε.Υ.Α.Ε. στις βιολογικές ιδιότητες του εδάφους

Η προσθήκη οργανικής ουσίας με υψηλό λόγο C/N (όπως είναι τα Υ.Α.Ε.) στο έδαφος, οδήγησε σε εκδήλωση αζωτοδέσμευσης. Το ίδιο φαινόμενο έχει παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές (Garcia-Barrionuevo et al. 1992, Balis et al. 1996, Χατζηπαυλίδης 1999) και φαίνεται πως αποτελεί μια σταθερή επίδραση των Υ.Α.Ε. στους μικροβιακούς πληθυσμούς. Αυτό είναι πολύ θετικό για την οικονομία του αζώτου στο έδαφος καθώς επίσης και για το ρυθμό της αποικοδόμησης του αποβλήτου ο οποίος εξαρτάται και από το λόγο C/N (Alexander 1977, Eiland et al. 2001).

Παρατηρήθηκε ότι μετά από προσθήκη της τάξης των 200 ml Υ.Α.Ε./kg εδάφους η αζωτοδέσμευση σταματά και η επιπλέον προσθήκη δεν οδηγεί σε εκδήλωση αζωτοδέσμευσης. Από το σημείο αυτό οι μικροοργανισμοί θα πρέπει να ανακυκλώσουν το διαθέσιμο άζωτο για την αποικοδόμηση του αποβλήτου και πιθανά αυτό να αποτελέσει αιτία για καθυστέρηση της αποικοδόμησης. Οι αζωτοδεσμευτικοί μικροοργανισμοί συγκαταλέγονται μεταξύ εκείνων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για την «υγεία» ενός εδάφους διότι πέρα από τη συμμετοχή τους στον κύκλο του αζώτου, παρουσιάζουν και ευαισθησία σε ξενοβιοτικές ενώσεις (Filip 2002, Van Bruggen & Semenov 2000). Η μείωση της αζωτοδέσμευσης μετά από παρατεταμένες προσθήκες αποβλήτου μπορεί να οφείλεται σε ανταγωνισμό από την ανάπτυξη άλλων μικροβιακών πληθυσμών οι οποίοι είτε παρεμποδίζουν τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια είτε τα ανταγωνίζονται αποτελεσματικότερα στη χρησιμοποίηση του διαθέσιμου υποστρώματος. Επίσης είναι πιθανό να εκδηλώνεται τοξικότητα έναντι των αζωτοδεσμευτικών

μικροοργανισμών λόγω της συσσώρευσης κάποιων ουσιών από τις συνεχείς προσθήκες αποβλήτων, οι οποίες δεν αποικοδομούνται άμεσα.

Με την προσθήκη E.Y.A.E. στο έδαφος, δεν παρατηρείται διέγερση της αζωτοδέσμευσης. Αυτό οφείλεται στο ότι το απόβλητο αυτό είναι ήδη εμπλουτισμένο με άζωτο από το στάδιο της αερόβιας βιολογικής επεξεργασίας του. Απόβλητα με λόγο C/N μεγαλύτερο του 20/1 θα οδηγήσουν σε προσωρινή ακινητοποίηση του αζώτου ενώ εάν ο λόγος αυτός είναι μικρότερος του 20/1 θα απελευθερωθεί αμμωνιακό άζωτο το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα φυτά (Sylvia et al. 1998). Ο λόγος C/N του επεξεργασμένου αποβλήτου είναι περίπου 12/1 (Χατζηπαυλίδης, 1999) που σημαίνει περίσσεια αζώτου για την παραπέρα αποικοδόμησή του αποβλήτου στο έδαφος και απελευθέρωση αζώτου.

Ως εμπόδιο για την εφαρμογή των ανεπεξέργαστων αποβλήτων στο έδαφος έχουν αναφερθεί οι φυτοτοξικές τους ιδιότητες οι οποίες οφείλονται στην ιδιαίτερη σύσταση της οργανικής ουσίας που εμπεριέχεται σ' αυτά.

Η εκδήλωση συμπτωμάτων φυτοτοξικότητας είναι έντονη εάν τα ανεπεξέργαστα απόβλητα εφαρμοστούν απ' ευθείας σε καλλιέργειες, ενώ εξαλείφονται ή μειώνονται σε σημαντικό βαθμό όταν περάσει κάποιο χρονικό διάστημα από την εφαρμογή των αποβλήτων και την καλλιέργεια του εδάφους (Bonari et al. 1993). Επίσης διαφορετικές καλλιέργειες εκδηλώνουν διαφορετική ευαισθησία στις φυτοτοξικές ιδιότητες του αποβλήτου ενώ κάποιες άλλες ευνοούνται σημαντικά από το απόβλητο (Cegarra et al. 1996). Ως φυτοτοξικά κλάσματα της οργανικής ουσίας αναφέρονται οι ενώσεις μικρού μοριακού βάρους (όπως τα μικρού μοριακού βάρους οργανικά οξέα) ενώ οι μεγαλομοριακές ενώσεις δεν παίζουν σημαντικό ρόλο στη φυτοτοξικότητα (Keeling et al. 1994). Έχει αναφερθεί επίσης ότι οι πολυφαινολικές ενώσεις των Y.A.E. οι οποίες είναι υπεύθυνες για το σκούρο χρώμα των αποβλήτων εμφανίζουν μικρή τοξικότητα στους μικροοργανισμούς και δεν είναι ευκολα βιοαποικοδομήσιμες. Αντίθετα οι απλές φαινόλες και ταννίνες είναι έντονα τοξικές αλλά βιοαποικοδομήσιμες. Η οξειδωση και στη συνέχεια ο πολυμερισμός των ταννινών των Y.A.E. οδηγεί στο σχηματισμό σκουρόχρωμων πολυφαινολικών ενώσεων (Assas et al. 2000).

Από τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής φάνηκε ότι η φυτοτοξική δράση μετά την πάροδο κάποιου χρονικού διαστήματος από την εφαρμογή των αποβλήτων στο έδαφος εξαλείφεται. Όταν χρησιμοποιήθηκαν μικρές ποσότητες αποβλήτων δεν

εκδηλώθηκε κανένα σύμπτωμα τοξικότητας σε σχέση με τη βλαστικότητα, αλλά και σε σχέση με τα μήκη ριζιδίων των φυτών που αναπτύχθηκαν σε έδαφος από τους τρεις χειρισμούς. Όταν έγινε χρήση μεγαλύτερων ποσοτήτων αποβλήτων εκδηλώθηκε φυτοτοξικότητα σε κάποια ενδιάμεσα στάδια από την τελευταία διάβρεξη του εδάφους με τα δύο απόβλητα. Το φαινόμενο ήταν εντονότερο στο χειρισμό με Υ.Α.Ε. και ασθενέστερο στο χειρισμό με Ε.Υ.Α.Ε. όπου η οργανική ουσία που προστέθηκε ήταν λιγότερη. Το φαινόμενο αυτό φαίνεται να σχετίζεται με την αποικοδόμηση της οργανικής ουσίας και την αύξηση της μικροβιακής δραστηριότητας λόγω της αναμόχλευσης και του αερισμού του εδάφους (priming effect). Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι διάφοροι χειρισμοί στο έδαφος, μπορεί να οδηγήσουν στη διάσπαση των σταθερών εδαφικών συσσωματωμάτων ή στη βελτίωση του καθεστώτος αερισμού με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των μικροβιακών πληθυσμών (Kuzuyakov et al. 2000). Έτσι, φυτοτοξίνες μπορεί να παράγονται σε κάποια στάδια της αποικοδόμησης της οργανικής ουσίας του εδάφους από τη μικροβιακή δράση, οι οποίες όμως είναι ασταθείς και γρήγορα αποικοδομούνται (Zucconi et al. 1981). Είναι χαρακτηριστικό ότι η ένταση του φαινομένου που παρατηρήθηκε εξαρτάται από την ποσότητα του άνθρακα που δέχθηκε το έδαφος: μεγάλη ποσότητα άνθρακα στο χειρισμό με Υ.Α.Ε. οδήγησε σε έντονα φαινόμενα φυτοτοξικότητας, μικρότερη ποσότητα άνθρακα στο χειρισμό με Ε.Υ.Α.Ε. έδωσε την ίδια εικόνα με μικρότερη ένταση, ενώ η ακόμα μικρότερη ποσότητα άνθρακα στο 1^ο πείραμα δεν οδήγησε στην εκδήλωση φυτοτοξικής δράσης.

Δύο ακόμα παράγοντες θα μπορούσαν να συσχετιστούν με τη φυτοτοξικότητα που εμφανίστηκε στο 2^ο πείραμα. Ο πρώτος είναι η πιθανή συσσώρευση κάποιων φυτοτοξικών ουσιών από τη συνεχή προσθήκη αποβλήτων. Οι ουσίες αυτές οι οποίες δεν αποικοδομομήθηκαν στο χρονικό διάστημα που μεσολάβησε από την εφαρμογή των αποβλήτων, θα είχαν συγκέντρωση μεγαλύτερη στο 2^ο πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκαν μεγαλύτερες ποσότητες αποβλήτων, από αυτή του 1^{ου} πειράματος. Στην περίπτωση αυτή η φυτοτοξικότητα θα έπρεπε να εμφανίζεται έντονη στις προκαταρκτικές δοκιμές και στον 1^ο χρόνο σποράς και να μειώνεται (ή να παραμένει σταθερή εφ' όσον εξακολουθούν να μη διασπώνται οι ουσίες αυτές) στους επόμενους χρόνους σποράς, κάτι που δεν παρατηρήθηκε.

Ο δεύτερος παράγοντας είναι υψηλότερη αγωγιμότητα του εδάφους στο 2^ο πείραμα σε σχέση με το 1^ο πείραμα λόγω της προσθήκης μεγαλύτερης ποσότητας αποβλήτων. Εάν η αγωγιμότητα επιδρούσε αρνητικά στη βλάστηση των σπόρων, θα

έπρεπε η φυτοτοξικότητα να εμφανίζεται περίπου σταθερή σε όλους τους χρόνους σποράς και ακόμα θα έπρεπε να εμφανίζονταν και στα προκαταρκτικά πειράματα για τον έλεγχο της φυτοτοξικότητας. Επίσης η εκδήλωση φυτοτοξικότητας στο χειρισμό με E.Y.A.E. δεν θα έπρεπε να είχε μικρότερη ένταση όπως παρατηρήθηκε, άλλα ίση με το χειρισμό με Y.A.E. , αφού η αγωγιμότητα η οποία μετρήθηκε μετά το τέλος των διαβροχών ήταν ίδια και για τους δύο χειρισμούς.

Η αναπνευστική δραστηριότητα του εδάφους η οποία αποτελεί μέτρο της μικροβιακής δραστηριότητας, είναι ενδεικτική για το ρυθμό με τον οποίο ο οργανικός άνθρακας που προστέθηκε στο έδαφος ανοργανοποιείται με τη μορφή CO₂. Η προσθήκη οργανικής ουσίας, είτε ως Y.A.E. είτε ως E.Y.A.E., έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της αναπνευστικής δραστηριότητας του εδάφους και η έντασή της φαίνεται πως είναι ανάλογη της ποσότητας της οργανικής ουσίας που προστίθεται. Έτσι, η αναπνευστική δραστηριότητα στο χειρισμό με Y.A.E. ήταν υψηλότερη από αυτή που μετρήθηκε στο χειρισμό με E.Y.A.E. ενώ στο έδαφος-μάρτυρα ήταν συνεχώς σε χαμηλά έως μηδενικά επίπεδα. Επίσης μεταξύ των ίδιων χειρισμών, η αναπνευστική δραστηριότητα ήταν υψηλότερη στο 2^ο πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκαν μεγαλύτερες ποσότητες αποβλήτων. Τέλος η αναπνευστική δραστηριότητα ανά ml αποβλήτου ήταν ίδια μεταξύ των ίδιων χειρισμών και στα δύο πειράματα που σημαίνει ότι ο ρυθμός αποικοδόμησης των αποβλήτων είναι ο ίδιος ακόμα και όταν οι προσθήκες ήταν πιο εντατικές και σε μεγαλύτερες ποσότητες, αφού οι μικροοργανισμοί αυξάνουν σε ανάλογα μεγέθη τη δραστηριότητά τους ώστε να ανταπεξέλθουν στην αύξηση του υποστρώματος.

Η προσθήκη οργανικής ουσίας στο έδαφος, οδηγεί σε μια επιλογή των μικροβιακών πληθυσμών οι οποίοι μπορούν να την αποικοδομήσουν και συνεπώς οδηγεί σε μια αρχική μείωση της βιοποικιλότητας (Van Bruggen & Semenov 2000). Οι συνεχείς προσθήκες αποβλήτου, ασκούν εντονότερη φυσική επιλογή στους πληθυσμούς, με αποτέλεσμα να μειωθεί ακόμα περισσότερο η βιοποικιλότητα. Η μείωση όμως της βιοποικιλότητας και η επιλεκτική αύξηση ορισμένων μόνο ομάδων μικροοργανισμών, θα έχει ως συνέπεια τη μείωση της αποτελεσματικότητας με την οποία αποικοδομούνται σύνθετα οργανικά υποστρώματα όπως τα Y.A.E. και τα E.Y.A.E., αφού περισσότερες μικροβιακές ομάδες θα διαθέτουν μεγαλύτερη ποικιλία ενζυμικών συστημάτων, ή θα μπορούν να δρουν συνεργιστικά για την αποικοδόμηση σύνθετων υποστρωμάτων. Η μείωση της αναπνευστικής δραστηριότητας / ml προστιθέμενου αποβλήτου που

παρατηρήθηκε μετά την 3^η διάβρεξη με τα απόβλητα, αποδίδεται στη μείωση της βιοποικιλότητας από την έντονη φυσική επιλογή που ασκούν τα απόβλητα αυτά στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Η αλλαγή της μικροβιακής κοινότητας με τις συνεχείς προσθήκες, είναι ενδεικτική και από την μείωση της αζωτοδέσμευσης η οποία αποδόθηκε στη μείωση του πληθυσμού των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων. Με το τέλος των διαβρέξεων και την πάροδο του χρόνου, θα ακολουθήσουν και άλλα είδη μικροοργανισμών τα οποία θα αποικοδομήσουν τα πιο σύνθετα κλάσματα της οργανικής ουσίας καθώς και τα μεταβολικά προϊόντα και τα νεκρά κύτταρα των μικροοργανισμών που προηγήθηκαν και η βιοποικιλότητα αναμένεται να αυξηθεί (Van Bruggen & Semenov 2000).

Οι ολικοί βακτηριακοί πληθυσμοί ήταν αυξημένοι στο χειρισμό με Υ.Α.Ε. και χαμηλότεροι στο χειρισμό με νερό ενώ στο χειρισμό με Ε.Υ.Α.Ε. οι πληθυσμοί κυμάνθηκαν κάπου μεταξύ των δύο προηγούμενων χειρισμών. Είναι εμφανές ότι η αύξηση της οργανικής ουσίας του εδάφους οδηγεί σε αύξηση του ολικού πληθυσμού των μικροοργανισμών. Εκτός από τις διαφορές στο μέγεθος των βακτηριακών πληθυσμών υπήρχε και μια ποιοτική διαφορά μεταξύ των πληθυσμών των τριών χειρισμών. Στο χειρισμό με νερό κυριαρχούσαν τα βακτήρια Κ-στρατηγικής (αργή αύξηση και προτίμηση σε υποστρώματα με χαμηλή συγκέντρωση άνθρακα), στο χειρισμό με Υ.Α.Ε. τα βακτήρια r-στρατηγικής (γρήγορη αύξηση σε υποστρώματα με υψηλή συγκέντρωση άνθρακα) αυξήθηκαν περισσότερο και τα επίπεδά τους ήταν ίδια με τα επίπεδα των μικροοργανισμών Κ-στρατηγικής, ενώ στο χειρισμό με Ε.Υ.Α.Ε. η εικόνα ήταν ενδιάμεση: αυξήθηκαν και οι δύο ομάδες πληθυσμών αλλά περισσότερο οι μικροοργανισμοί Κ-στρατηγικής. Τα βακτήρια που υιοθετούν την r-στρατηγική στον αποικισμό της οργανικής ουσίας είναι αυτά που αυξάνονται ταχύτατα όταν οι συγκεντρώσεις εύκολα αποικοδομήσιμων οργανικών ουσιών στο έδαφος είναι μεγάλες. Η βιοδιαθεσιμότητα των οργανικών υποστρωμάτων είναι αυτή που θα καθορίσει την αναλογία των μικροοργανισμών που υιοθετούν την Κ ή την r-στρατηγική σ' ένα έδαφος (Stenström et al. 2001).

13. 3. Επίδραση των Υ.Α.Ε. και Ε.Υ.Α.Ε. στην επισχετικότητα του εδάφους

Η επισχετική δράση του εδάφους που δέχονταν τα απόβλητα έναντι του *Rhizoctonia solani* εκδηλώθηκε και στους δύο χειρισμούς (Υ.Α.Ε. και Ε.Υ.Α.Ε.) με εντονότερα αποτελέσματα στο 2^ο πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκαν μεγαλύτερες ποσότητες από τα δύο απόβλητα. Η επισχετικότητα ήταν ιδιαίτερα αυξημένη στο χειρισμό με Υ.Α.Ε. ενώ η επισχετικότητα που εκδηλώθηκε στο έδαφος που δέχθηκε Ε.Υ.Α.Ε. δεν ήταν τόσο έντονη.

Αβιοτικοί παράγοντες όπως η αγωγιμότητα και το pH τα οποία αυξήθηκαν στους χειρισμούς με τα απόβλητα δε φαίνεται να επιδρούν στην εκδήλωση της επισχετικότητας αφού ο χειρισμός με Ε.Υ.Α.Ε. ο οποίος είχε πιο ακραίες τιμές στις παραμέτρους αυτές οδήγησε σε ενδιάμεσα αποτελέσματα σε σχέση με το χειρισμό με Υ.Α.Ε.

Παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μύκητα από το ίδιο το απόβλητο ή από κάποιες ενώσεις που εμπεριέχονται σ' αυτό όπως οι φαινόλες, επίσης δεν μπορούν να θεωρηθούν υπεύθυνες, αφού ο *Rhizoctonia solani* φαίνεται ότι μπορεί να αυξάνει σε φρέσκο απόβλητο (το οποίο αναφέρεται ως τοξικό σε άλλους μικροοργανισμούς) ενώ οι δοκιμές με εκχυλίσματα από το έδαφος επίσης δεν έδειξαν να τον παρεμποδίζουν. Ο *Rhizoctonia solani* άλλωστε μπορεί να αυξάνει σαπροφυτικά στο έδαφος εκμεταλλευόμενος τα υπολείμματα οργανικής ουσίας για να επιβιώσει. Επίσης διαθέτει ενζυμικό σύστημα (λακάσες) το οποίο σχετίζεται με την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων και της λιγνίνης (Wahleithner et al. 1996) και αυτό αποτελεί μια ακόμα ένδειξη ότι το υπόστρωμα δεν αποτελεί παράγοντα για την εκδήλωση επισχετικής δράσης. Αντιθέτως, θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι πιθανά να βρίσκει διαθέσιμο υπόστρωμα για να αυξηθεί στο έδαφος. Αυτό φαίνεται και από το γεγονός της μείωσης της επισχετικής δράσης του εδάφους, όταν ο μύκητας ενσωματώθηκε στο έδαφος κατά τη διάρκεια των διαβρέξεων με τα απόβλητα.

Οι παράγοντες που φαίνεται να επιδρούν περισσότερο στην εκδήλωση της επισχετικότητας είναι βιολογικοί. Από τους βιολογικούς παράγοντες που μελετήθηκαν ο εμπλουτισμός του εδάφους με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια δε φαίνεται να συσχετίζεται άμεσα με την εκδήλωση επισχετικότητας. Ο εμπλουτισμός αυτός έγινε τεχνητά στο έδαφος που δέχθηκε Ε.Υ.Α.Ε. τα οποία είναι προϊόν της αερόβιας βιολογικής επεξεργασίας με στέλεχος *Azotobacter vinelandii*. Στο έδαφος που δέχθηκε Υ.Α.Ε. ο

πληθυσμός των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων αυξήθηκε μέσω φυσικής επιλογής στα αρχικά στάδια της εφαρμογής του αποβλήτου. Οι πληθυσμοί που διαμορφώνονται στο επεξεργασμένο απόβλητο κατά το στάδιο της αερόβιας βιολογικής επεξεργασίας δεν μπορούν να θεωρηθούν υπεύθυνοι ούτε για την μικρή επισχετικότητα που εμφανίστηκε στο έδαφος που δέχθηκε Ε.Υ.Α.Ε. αφού η όποια επισχετικότητα στο χειρισμό αυτό εκδηλώθηκε όταν η εισαγωγή του παθογόνου έγινε μετά την πάροδο κάποιου χρονικού διαστήματος από την εφαρμογή του αποβλήτου. Όταν το παθογόνο εισήχθη στο έδαφος κατά τη διάρκεια των διαβρέξεων με το απόβλητο, δεν εκδηλώθηκε επισχετικότητα.

Ο εμπλουτισμός του εδάφους με οργανική ουσία οδήγησε σε αύξηση της μικροβιακής δραστηριότητας, η οποία ειδικά στο χειρισμό με Υ.Α.Ε. διατηρήθηκε σε υψηλά επίπεδα για όλο το χρονικό διάστημα το οποίο μελετήθηκε. Η αυξημένη μικροβιακή δραστηριότητα είναι παράγοντας που μπορεί να οδηγήσει σε καταστολή των παθογόνων μυκήτων. Η χρησιμοποίηση κομποστοποιημένων οργανικών υποστρωμάτων ως οργανική προσθήκη στο έδαφος, μπορεί να οδηγήσει σε επίσχεση της δράσης φυτοπαθογόνων μυκήτων. Μεταξύ των διαφόρων μηχανισμών στις περιπτώσεις αυτές είναι και η γενικευμένη επισχετικότητα η οποία επάγεται από την αύξηση της μικροβιακής δραστηριότητας. Σχετικά με την ενσωμάτωση κομποστοποιημένης οργανικής ουσίας στο έδαφος και την καταστολή που αυτή επιφέρει στο *Rhizoctonia solani* αναφέρεται ότι σε ώριμες κομπόστες όπου ο διαθέσιμος οργανικός άνθρακας είναι λίγος και υπάρχει ισχυρός ανταγωνισμός για το υπόστρωμα, τα σκληρώτια του παθογόνου αδρανοποιούνται λόγω του παρασιτισμού από την μικροβιακή κοινότητα. Όταν η κομποστοποιημένη οργανική ουσία που προστίθεται στο έδαφος είναι σταθεροποιημένη σε μεγάλο βαθμό, τότε δεν υποστηρίζει την αύξηση της μικροβιακής δραστηριότητας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην καταστέλλεται η δράση του μύκητα όπως ακριβώς συμβαίνει και σε εδάφη φτωχά σε οργανική ουσία (Hoitink et al. 1997). Άλλος μηχανισμός για την καταστολή της δράσης του *Rhizoctonia solani* λόγω της αύξησης της οργανικής ουσίας του εδάφους και της μικροβιακής δραστηριότητας είναι η μείωση της επίδρασης ριζόσφαιρας. Στην περίπτωση αυτή, οι δραστήριοι μικροοργανισμοί δεν επιτρέπουν την διάχυση θρεπτικών συστατικών προς το παθογόνο του οποίου δεν διεγείρεται η αύξηση και η προσβολή εμφανίζεται μειωμένη. Η αύξηση της μυκόστασης, δηλαδή η μη βλάστηση των ληθαργικών μορφών του παθογόνου, λόγω έντονης μικροβιακής δραστηριότητας είναι επίσης μεταξύ των μηχανισμών που επιδρούν κατασταλτικά σε παθογόνους μύκητες. Έτσι τα σκληρώτια του *Rhizoctonia solani* δε

βλαστάνουν σε χειρισμούς όπου η μικροβιακή δραστηριότητα είναι έντονη λόγω της πιθανής παρουσίας παρεμποδιστικών ουσιών ή και λόγω στέρησής τους από θρεπτικά στοιχεία.

Εκτός από την αυξημένη μικροβιακή δραστηριότητα, το μέγεθος των πληθυσμών καθώς και η διαφοροποίηση των μικροβιακών κοινοτήτων είναι σημαντικός παράγοντας υπεύθυνος για την εκδήλωση της επισχετικότητας. Όπως ήδη αναφέρθηκε, στο χειρισμό με Υ.Α.Ε. αυξήθηκε ο αριθμός των βακτηρίων r-στρατηγικής σε αντίθεση με το χειρισμό με νερό όπου κυριαρχούν τα βακτήρια K-στρατηγικής. Όταν προστίθεται εύκολα αφομοιώσιμη οργανική ουσία στο έδαφος, ένα κλάσμα της καταναλώνεται για τη μετατροπή των ληθαργικών μορφών των μικροοργανισμών σε ενεργές μορφές. Οι ληθαργικές μορφές των μικροοργανισμών αποτελούν και το μεγαλύτερο ποσοστό της μικροβιακής βιομάζας σε εδάφη τα οποία δεν έχουν δεχθεί πρόσφατα οργανικές προσθήκες. Ένα επιπρόσθετο μέρος της οργανικής ουσίας, θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για να υποστηριχθεί η μικροβιακή αύξηση. Έτσι μπορεί να παρατηρηθεί το φαινόμενο να μην αυξηθεί η μικροβιακή βιομάζα μετά από οργανική προσθήκη αλλά να αυξηθεί μόνο η μικροβιακή δραστηριότητα (αναπνευστική). Αυτό συμβαίνει όταν η οργανική προσθήκη επαρκεί μόνο για τη μετατροπή των ληθαργικών μορφών σε ενεργές και δεν επαρκεί και για την υποστήριξη της μικροβιακής αύξησης στη συνέχεια. Σε εδάφη όπου κυριαρχούν οι ενεργοί ή οι μικροοργανισμοί r-στρατηγικής, η αύξηση της μικροβιακής βιομάζας θα πραγματοποιηθεί γρηγορότερα και με μικρότερη απαίτηση σε ποσότητα οργανικής ουσίας από τα εδάφη όπου κυριαρχούν οι ληθαργικοί ή οι μικροοργανισμοί K-στρατηγικής (Stenström et al. 2001). Η επίδραση των οργανικών προσθηκών στους μικροοργανισμούς του εδάφους μπορεί να θεωρηθεί ανάλογη με την επίδραση της ριζόσφαιρας. Εκεί οι μικροοργανισμοί του εδάφους ανταποκρίνονται στις ριζικές εκκρίσεις με τρόπο ανάλογο με τις οργανικές προσθήκες. Έτσι, εάν στο έδαφος κυριαρχούν οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται σε βλαστική μορφή ή οι μικροοργανισμοί r-στρατηγικής, η ανταπόκριση στις εκκρίσεις της ρίζας θα είναι άμεση, η αύξηση της μικροβιακής βιομάζας και συνεπώς ο επιτυχής αποικισμός της ρίζας, θα πραγματοποιηθούν γρηγορότερα. Το ποσό των εκκρίσεων που θα οδηγήσει σε αύξηση της βιομάζας των ριζοσφαιρικών μικροοργανισμών όταν στο έδαφος υπερτερούν οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται σε βλαστική μορφή, θα είναι μικρότερο από αυτό που απαιτείται όταν κυριαρχούν οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται σε ληθαργική μορφή. Στην περίπτωση όπου ο πληθυσμός των μικροοργανισμών K-στρατηγικής ή ο πληθυσμός

των ληθαργικών μορφών των μικροοργανισμών είναι μεγάλος, ένα μέρος των εκκρίσεων θα χρησιμοποιηθεί για τη μετατροπή των ανθεκτικών μορφών επιβίωσης σε βλαστικές και μόνο στη συνέχεια θα ακολουθήσει η αύξηση της βιομάζας. Αυτή η καθυστέρηση στην αύξηση της βιομάζας είναι πολύ σημαντική αφού το κυριότερο σημείο της διαφυγής των ριζικών εκκρίσεων θεωρείται ότι είναι η καλύπτρα όπου εκεί οι μικροοργανισμοί του εδάφους βρίσκονται κυρίως υπό τη μορφή ανθεκτικών μορφών επιβίωσης. Στη μορφή αυτή οι μικροοργανισμοί καθυστερούν στο να ανταποκριθούν στο υπόστρωμα που τους διατίθεται και αρχίζουν να αυξάνονται. Η καθυστέρηση του αποικισμού της ρίζας και κυρίως της περιοχής της καλύπτρας, μειώνεται από τη διατήρηση της αναλογίας των μικροοργανισμών r-στρατηγικής σε υψηλά επίπεδα.

Σ' ένα έδαφος που δέχεται οργανικές προσθήκες, είναι πολύ σημαντικό για την εκδήλωση επισχετικότητας (εκτός από το μέγεθος των πληθυσμών και την αναπνευστική δραστηριότητα) και το στάδιο στο οποίο βρίσκεται η αποικοδόμηση της οργανικής ουσίας κατά την εισαγωγή του παθογόνου. Η προσθήκη οργανικής ουσίας στο έδαφος θα οδηγήσει σε αύξηση των πληθυσμών τόσο των μικροοργανισμών r-στρατηγικής όσο και των μικροοργανισμών K-στρατηγικής. Το πόσο θα αυξηθεί η κάθε ομάδα, εξαρτάται από το είδος της οργανικής ουσίας που προστίθεται, δηλαδή εάν αποτελείται κυρίως από εύκολα αποικοδομήσιμα μικρού μοριακού βάρους μόρια, ή από δύσκολα αποικοδομήσιμες μεγαλομοριακές ενώσεις. Στα πρώτα στάδια της αποικοδόμησης της οργανικής ουσίας, η υψηλή μικροβιακή δραστηριότητα ή οι υψηλοί μικροβιακοί πληθυσμοί δεν είναι πάντα ενδεικτικά για την εκδήλωση επισχετικότητας. Μπορεί δηλαδή να μετρώνται υψηλοί μικροβιακοί πληθυσμοί και μικροβιακή δραστηριότητα και ταυτόχρονα να δημιουργούνται συνθήκες ευνοϊκές για την αύξηση σαπροφυτικών παθογόνων μυκήτων οι οποίοι χρησιμοποιούν την K-στρατηγική στον αποικισμό, λόγω «περίσσειας» υποστρώματος. Αυτό συμβαίνει όταν η εισαγωγή του παθογόνου γίνεται κατά την έναρξη της αποικοδόμησης της οργανικής ουσίας όπου η περίσσεια υποστρώματος οδηγεί στην αύξηση και των δύο ομάδων μικροοργανισμών. Στην περίπτωση που ένας παθογόνος μύκητας που υιοθετεί την K-στρατηγική, όπως ο *R. solani*, εισαχθεί στο έδαφος όταν το υπόστρωμα διατίθεται σε αφθονία, μπορεί να αυξήσει τον πληθυσμό του και να μην εκδηλωθεί έντονη επισχετικότητα. Κάτι τέτοιο παρατηρήθηκε όταν ο *R. solani* εισήχθη στο έδαφος κατά τη διάρκεια των διαβρέξεων με τα απόβλητα, όπου η επισχετικότητα που εκδηλώθηκε ήταν μειωμένη σε σχέση με την

επισχετικότητα που εκδηλώθηκε όταν το παθογόνο εισήχθηκε μετά το τέλος των χειρισμών με τα απόβλητα.

Η αύξηση του πληθυσμού των μικροοργανισμών οι οποίοι έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν τον *Rhizoctonia solani* in vitro ενδεχομένως να είναι ένας ακόμα παράγοντας για την επισχετικότητα που εκδηλώθηκε στο χειρισμό με Υ.Α.Ε. Από το χειρισμό αυτό απομονώθηκαν βακτήρια των γενών *Bacillus* (*B. pumilus*, *B. subtilis*, και *B. megaterium*) καθώς και βακτήρια του είδους *Alcaligenes faecalis*. Στο χειρισμό με νερό οι απομονώσεις των ανταγωνιστικών βακτηρίων ανήκαν στα ίδια γένη ενώ επιπλέον απομονώθηκαν και ακτινομύκητες του γένους *Streptomyces* (στελέχη τα οποία ανήκουν στις ομάδες *S. griseus* και *S. collinus*). Τα είδη αυτά είναι ευρέως διαδεδομένα και αποτελούν συχνές απομονώσεις στελεχών στρεπτομυκήτων στα εδάφη της χώρας μας (Κατσίφας 1999).

Η μείωση της βιοποικιλότητας με την ενσωμάτωση οργανικής ουσίας στο έδαφος παρατηρήθηκε και στις απομονώσεις ανταγωνιστικών βακτηρίων. Τα βακτήρια του γένους *Streptomyces* και γενικά τα ακτινοβακτήρια τα οποία δεν απομονώθηκαν στο χειρισμό με Υ.Α.Ε. θεωρούνται ότι χρησιμοποιούν την Κ-στρατηγική στον αποικισμό: Αποικοδομούν πιο ανθεκτικές μορφές οργανικών υπολειμμάτων και δεν ανταποκρίνονται άμεσα στην προσθήκη οργανικών υποστρωμάτων διότι είναι λιγότερο ανταγωνιστικοί από τα βακτήρια όταν στο υπόστρωμα υπάρχουν απλά οργανικά μόρια (Alexander, 1977). Έχει αναφερθεί επίσης ότι στη ριζόσφαιρα η βιοποικιλότητα των ακτινοβακτηρίων του γένους *Streptomyces* ήταν μειωμένη σε σχέση με τη βιοποικιλότητα που παρατηρήθηκε στο υπόλοιπο έδαφος. Η επιλεκτική πίεση που ασκεί η ριζόσφαιρα στους μικροοργανισμούς του εδάφους μείωσε τον αριθμό των ειδών των στρεπτομυκήτων που μπορούσαν να την αποικίσουν (Katsifas et al. 1999).

Τα βακτηριακά στελέχη των γενών *Alcaligenes* και *Bacillus* αναφέρεται ότι μπορούν να αποικοδομούν οργανικά μόρια όπως οι φαινόλες (Hill et al. 1996, Bastos et al. 2000). Συγκεκριμένα για τα βακτήρια του γένους *Bacillus* έχει αναφερθεί ότι τα Υ.Α.Ε. είναι τοξικά και παρεμποδίζουν την αύξησή τους (Paredes et al. 1986, Moreno et al. 1990). Από την άλλη πλευρά, είδη του γένους *Bacillus* αναφέρονται ότι αποικοδομούν φαινολικές ενώσεις (Karmakar et al. 2000) καθώς επίσης στέλεχος του είδους *Bacillus pumillus* έχει χρησιμοποιηθεί για την βιοαποικοδόμηση των Υ.Α.Ε. και μάλιστα έχει διαπιστωθεί ότι όταν αυτά είναι αρκετά πυκνά τότε ενισχύεται το ενζυμικό σύστημα το

οποίο είναι υπεύθυνο για την αποικοδόμηση των φαινολικών (Ramos-Cormenzana et al. 1996).

Στελέχη του είδους *Alcaligenes faecalis* αναφέρονται για τη χρήση τους ως P.G.P.R. τόσο για τις αντιμυκητιακές τους ιδιότητες όσο και για την παραγωγή αυξητικών ορμονών όπως το ινδολοξικό οξύ (Lin et al. 2000, Honda et al. 1998).

Τα βακτήρια του γένους *Bacillus* είναι περισσότερο γνωστά για τη χρήση τους ως P.G.P.R. από τα στελέχη του είδους *Alcaligenes faecalis* και έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για το βιολογικό έλεγχο του *Rhizoctonia solani* αλλά και άλλων φυτοπαθογόνων μυκήτων. Τα στελέχη που κυρίως αναφέρονται ανήκουν στα είδη *Bacillus subtilis* και *Bacillus megaterium*. Χαρακτηρίζονται από γρήγορη αύξηση και ικανότητα αποικισμού των ριζών, παράγουν αντιμικροβιακές ουσίες ή και φυτοορμόνες και επιπλέον έχουν την ιδιότητα του σχηματισμού ανθεκτικών ενδοσπορίων τα οποία τους επιτρέπουν να διατηρούν υψηλούς πληθυσμούς στο έδαφος για μεγάλο χρονικό διάστημα. (Safiyazon et al. 1995, Bannen & Backman 1997, Emmert & Handelsman 1999, Knox et al. 2000, Pengoo et al. 2000, Zheng & Sinclair 2000, Fiddaman et al. 2000, Probanza et al. 2001).

Τα ανταγωνιστικά βακτήρια παρ' όλο που απομονώθηκαν και στο χειρισμό με νερό, στο χειρισμό με Υ.Α.Ε. ο πληθυσμός τους ήταν πολλαπλάσιος. Σημαντικότερο είναι το ότι τα βακτήρια στο χειρισμό με νερό βρίσκονται κυρίως σε κατάσταση ληθαργικών μορφών λόγω έλλειψης διαθέσιμου υποστρώματος, ενώ αντίθετα στο χειρισμό με Υ.Α.Ε. ενδεχομένως είναι ενεργά σε μεγαλύτερο ποσοστό όπως φάνηκε και από τις μετρήσεις της αναπνευστικής δραστηριότητας. Ο μηχανισμός της παρεμπόδισης παθογόνων μυκήτων μέσω της αύξησης του πληθυσμού συγκεκριμένων μικροοργανισμών οι οποίοι παράγουν αντιμικροβιακές ενώσεις όταν καλλιεργούνται σε εργαστηριακές συνθήκες είναι κάτι που αμφισβητείται. Αυτό οφείλεται στο ότι η παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών στο έδαφος δεν είναι τόσο έντονη όσο στα συνθετικά εργαστηριακά υποστρώματα και αυτές γρήγορα αδρανοποιούνται από τη μικροβιακή δραστηριότητα. Πάντως η συμμετοχή των αντιμικροβιακών ουσιών στον ανταγωνισμό, παρ' όλο που μπορεί να μην αποτελούν το μοναδικό μηχανισμό, δεν αμφισβητείται.

13.3. Γενικά συμπεράσματα

1) Η χρήση Υ.Α.Ε. και Ε.Υ.Α.Ε. ως οργανική προσθήκη στο έδαφος, οδήγησε σε αύξηση της επισχετικότητας του εδάφους έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani*. Η επισχετικότητα η οποία εκδηλώθηκε ήταν εντονότερη στο χειρισμό του εδάφους με Υ.Α.Ε. και λιγότερο έντονη στο χειρισμό του εδάφους με Ε.Υ.Α.Ε. Επίσης η επισχετικότητα που εκδηλώθηκε ήταν εντονότερη όταν το παθογόνο εισάγονταν μετά την πάροδο κάποιου χρονικού διαστήματος από τις εφαρμογές των αποβλήτων στο έδαφος και ασθενέστερη όταν το παθογόνο εισάγονταν κατά την περίοδο των εφαρμογών των αποβλήτων στο έδαφος.

2) Η επισχετικότητα η οποία εκδηλώθηκε οφείλονταν σε βιολογικούς παράγοντες.

Η αύξηση της μικροβιακής δραστηριότητας μπορεί να καταστείλει την αύξηση του *Rhizoctonia solani* μέσω του μηχανισμού της γενικευμένης επισχετικότητας καθώς και με τη μείωση της ριζόσφαιρας. Στην περίπτωση αυτή ο ρόλος των μικροβιακών ειδών δεν είναι τόσο σημαντικός όσο το σύνολο της ενεργής μικροβιακής κοινότητας η οποία ανταγωνίζεται το παθογόνο για το διαθέσιμο υπόστρωμα.

Η επιλεκτική αύξηση των μικροοργανισμών οι οποίοι χρησιμοποιούν την γ-στρατηγική στον αποικισμό της οργανικής ουσίας φαίνεται να είναι ένας ακόμη παράγοντας ο οποίος σχετίζεται με τη μείωση της προσβολής από το παθογόνο. Οι μικροοργανισμοί αυτοί οι οποίοι χαρακτηρίζονται από τη γρήγορη ανταπόκριση σε εύκολα αποικοδομήσιμες οργανικές ενώσεις και υψηλούς ρυθμούς πολλαπλασιασμού, αποικίζουν γρήγορα και αποτελεσματικά τη ριζόσφαιρα και κυρίως τα προπορευόμενα ριζικά άκρα, παρέχοντας μεγαλύτερη προστασία στο φυτό από το παθογόνο.

Ο μηχανισμός της εξειδικευμένης επισχετικότητας μέσω της παρεμπόδισης του παθογόνου από συγκεκριμένα είδη μικροοργανισμών τα οποία παράγουν αντιμυκητιακές ενώσεις, φαίνεται να σχετίζεται περισσότερο με την ενεργοποίηση των πληθυσμών αυτών οι οποίοι στο χειρισμό του εδάφους με νερό ήταν σε μικρότερους πληθυσμούς και κατά πάσα πιθανότητα σε αδρανείς μορφές επιβίωσης λόγω της έλλειψης διαθέσιμου υποστρώματος.

14. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ahmed M. & Wardle D. A. (1994) Allelopathic potential of vegetative and flowering ragwort (*Senecio jacobaea* L.) plants against associated pasture species. *Plant and Soil* **164**, 61-68.
2. Akino S. & Ogoshi A. (1995) Pathogenicity and host specificity in *Rhizoctonia solani*. *Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases*, 37-49. Elsevier Science Ltd.
3. Aktas E. S., Imre S. & Ersoy L. (2001) Characterization and lime treatment of olive mill wastewater. *Water Research* **35**, 2336-2340.
4. Alexander M. (1977). *Soil Microbiology*. John Wiley & Sons, New York.
5. Ali S., Fernandez-Lafuente R. & Cowan D. A. (1998) Meta-pathway degradation of phenolics by thermophilic Bacilli. *Enzyme and Microbial Technology* **23**, 462-468.
6. Anderson J. P. E. & Domsch K. H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry* **10**, 215-221.
7. Andrikopoulos N. K., Kaliora A. C., Assimopoulou A. N., Papageorgiou V. P. (2002) Inhibitory activity of minor polyphenolic and nonpolyphenolic constituents of olive oil against in vitro low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Medicinal Food* **5** (No 1) in press.
8. Arshad M.A. & Martin S. (2002) Identifying critical limits for soil quality indicators in agro-ecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **88**, 153-160.
9. Assas N., Marouani L. & Hamdi M. (2000) Scale down and optimization of olive mill wastewaters decolorization by *Geotrichum candidum*. *Bioprocess Engineering* **22**, 503-507.
10. Azón-Aguilar C. & Barea J. M. (1997) Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: Significance and potentials. *Scientia Horticulturae* **68**, 1-24.
11. Backman P. A., Brannen P. M. & Mahaffee W. F. (1994) Plant response and disease control following seed inoculation with *Bacillus subtilis*. *Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria*, Proceedings of the Third International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, Adelaide March 7-11, 1994

- 12.** Badalucco L. & Hopkins D. W. (1997) Available carbon in soil determined from substrate utilization kinetics: comparison of substrates and soil amendments. *Journal of Microbiological Methods* **30**, 43-47.
- 13.** Baker K. F. & Cook R. J. (1974) Biological control of plant pathogens. W. H. Freeman and Co.
- 14.** Baker K. F. (1987) Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **25**, 67-85.
- 15.** Balis C., Chatzipavlidis I. & Flouri F. (1996) Olive mill waste as a substrate for nitrogen fixation. *International Biodeterioration & Biodegradation* **38**, 169-178.
- 16.** Barazani O. & Friedman J. (2000) Effect of exogenously applied L-tryptophan on allelochemical activity of Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGRP). *Journal of Chemical Ecology* **26**, 343-349.
- 17.** Barker D. J. & Stuckey D. C. (1999) A review of soluble microbial products (SMP) in wastewater treatment systems. *Water Research* **33**, 3063-3082.
- 18.** Bastos A. E. R., Moon D. H., Rossi A., Trevors J. T. & Tsai S. M. (2000) Salt-tolerant phenol-degrading microorganisms isolated from Amazonian soil samples. *Archives of Microbiology* **174**, 346-352.
- 19.** Beare M. H., Neely C. L., Coleman D. C. & Hargrove W. L. (1990) A substrate-induced respiration (sir) method for measurement of fungal and bacterial biomass on plant residues. *Soil Biology and Biochemistry* **22**, 585-594.
- 20.** Beare M. H., Vikram Reddy M., Tiam G. & Srivastava S. C. (1997) Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function in the tropics: the role of decomposer biota. *Applied Soil Ecology* **6**, 87-108.
- 21.** Benhamou N. & Nicole M. (1999) Cell biology of plant immunization against microbial infection : The potential of induced resistance in controlling plant diseases. *Plant Physiology Biochemistry* **37**, 703-719.
- 22.** Benitez F. J., Beltran-Heredia J., Torregrosa J. & Acero J. L. (1997a) Improvement of the anaerobic biodegradation of olive mill wastewaters by prior ozonation pretreatment. *Bioprocess Engineering* **17**, 169-175.
- 23.** Benitez J., Beltran-Heredia J., Torregrosa J., Acero J. L. & Cercas V. (1997b) Aerobic degradation of olive mill wastewaters. *Applied Microbiology and Biotechnology* **47**, 185-188.

24. Blomberg G.V. & Lugtenberg B.J.J. (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biotechnology* **4**, 343-350.
25. Bonari E., Macchia M., Angelini L. G. & Ceccarini L. (1993) The waste waters from olive oil extraction: their influence on the germinative characteristics of some cultivated and weed species. *Agricoltura Mediterranea* **123**, 273-280.
26. Borja R., Alba J., Garrido S. E. Martinez L., García M. P., Monteoliva M. & Ramos-Cormenzana A. (1995a) Effect of aerobic pretreatment with *Aspergillus terreus* on the anaerobic digestion of olive-mill wastewater. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **22**, 233-246.
27. Borja R., Martín A., Alonso V. García I. & Banks C. J. (1995b) Influence of different aerobic pretreatments on the kinetics of anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Water Research* **29**, 489-495.
28. Borja R., Alba J., Martín A., Alonso V. & Sánchez E. (1998) Comparative effect of different aerobic pretreatments on the kinetics and macroenergetic parameters of anaerobic digestion of olive mill wastewater in continuous mode. *Bioprocess Engineering* **18**, 127-134.
29. Bouma J. (2002) Land quality indicators of sustainable land management across scales. *Agriculture Ecosystems and Environment* **88**, 129-136
30. Bowen G. D. & Rovira A.D. (1976) Microbial colonization of plant roots. *Annual Review of Phytopathology* **14**, 121-144.
31. Brady N. C. & Weil R. R. (1996) *The Nature and Properties of Soils*. Prentice-Hall International.
32. Brannen P. M. & Backman P. A. (1994) Suppression of *Fusarium* wilt of cotton with *Bacillus subtilis* hopper box formulations. *Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria*, Proceedings of the Third International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Adelaide, March 7-11, 1994
33. Brown M. E. (1974) Seed and root bacterization. *Annual Review of Phytopathology* **12**, 181-197.
34. Bruehl G.W. (1975) Systems and mechanisms of residue possession by pioneer fungal colonists. *Biology and Control of Soil-Borne Plant Pathogens*, 77-83. The American Phytopathological Society.

35. Buyer J. & Leong J. (1986) Iron transport-mediated antagonism between plant growth promoting and plant-deleterious *Pseudomonas* strains. *The Journal of Biological Chemistry* **261**, 791-794.
36. Buyer J. S. & Kaufman D. D. (1996) Microbial diversity in rhizosphere of corn grown under conventional and low-input systems. *Applied Soil Ecology* **5**, 21-27.
37. Cabrera F., López R., Martínez-Bordiú A., Dupuy de Lome & Murillo J. M. (1996) Land treatment of olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation* **38**, 215-225.
38. Campbell R. (1983) *Microbial Ecology*. Blackwell Scientific Publications.
39. Capasso R., Evidente A., Schivo L., Orru G., Marcialis M. A. & Cristinzio G. (1995) Antibacterial polyphenols from olive oil mill wastewaters. *Journal of Applied Bacteriology* **79**, 393-398.
40. Cegarra J., Paredes C., Roig A., Bernal M.P. & García D. (1996) Use of olive mill wastewater compost for crop production. *International Biodeterioration & Biodegradation* **38**, 193-203.
41. Chatjipavlidis I., Antonakou M., Demou D., Flouri F. & Balis C. (1996) Bio-fertilization of olive oil mills liquid wastes. The pilot plant in Messinia, Greece. *International Biodeterioration & Biodegradation* **38**, 183-187.
42. Coley Smith J. R. (1979) Survival of plant pathogenic fungi in soil in the absence of host plants. *Soil Borne Plant Pathogens*, 39-57. Academic Press.
43. Connolly R. D. (1998) Modeling effects of soil structure on the water balance of soil-crop systems: a review. *Soil & Tillage Research* **48**, 1-19.
44. Conyers M. K., Uren N. C. & Helyar K. R. (1995) Causes of changes in pH in acidic mineral soils. *Soil Biology and Biochemistry* **27**, 1383-1392.
45. Conyers M. K., Heenan D. P., Poile G. J., Gulis B. R., & Helyar K. R. (1996) Influence of dryland agricultural management practices on the acidification of a soil profile. *Soil & Tillage Research* **37**, 127-141.
46. Cook R. J. & Baker K. F. (1983) The nature and practice of biological control of plant pathogens. *Am. Phytopath. Soc.*
47. Cox L., Celis R., Hermosin M. C., Becker A. & Cornejo J. (1997) Porosity and herbicide leaching in soils amended with olive-mill wastewater. *Agriculture, Ecosystem and Environment* **65**, 151-161.

48. Crawford D. L. (1998) Use of *Streptomyces* bacteria to control plant pathogens and degrade turf thatch. United States Patent: 5,968,503.
49. Daly J. M. (1984) The role of recognition in plant disease. *Annual Review of Phytopathology* **22**, 273-307.
50. De Leij F. A. A. M., Whipps J. M. & Lynch J. M. (1993) The use of colony development for the characterization of bacterial communities in soil and on roots. *Microbial Ecology* **27**, 81-97.
51. De Vrije T., Antoine N., Buitelaar R. M., Bruckner S., Dissevelt M., Durand A., Gerlagh M., Jones E. E., Lüth P., Oostra J., Ravensberg W. J., Renaud R., Rinzema A., Weber F. J. & Whipps J. M. (2001) The fungal biocontrol agent *Coniothyrium minitans*: production by solid-state fermentation, application and marketing. *Applied Microbiology Biotechnology* **56**, 58-68.
52. Di Gioia D., Fava F., Bertin L. & Marchetti L. (2001a) Biodegradation of synthetic and naturally occurring mixtures of mono-cyclic aromatic compounds present in olive mill wastewaters by two aerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* **55**, 619-626.
53. Di Gioia D., Bertin L., Fava F. & Marchetti L. (2001b) Biodegradation of hydroxylated and methoxylated, phenylacetic and phenylpropenoic acids present in olive mill wastewaters by two bacterial strains. *Research Microbiology* **152**, 83-93.
54. Díaz-Zorita M., Perfect E. & Grove J. H. (2002) Disruptive methods for assessing soil structure. *Soil & Tillage Research* **64**, 3-22.
55. Doran J. (2002) Soil health and global sustainability: translating science into practice. *Agriculture Ecosystems and Environment* **88**, 119-127.
56. Ehaliotis C., Papadopoulou K., Kotsou M., Mari I. & Balis C. (1999) Adaptation and population dynamics of *Azotobacter vinelandii* during aerobic biological treatment of olive-mill wastewater. *FEMS Microbiology Ecology* **30**, 301-311.
57. Eigenberg R. A., Doran J. W., Nienaber J. A., Ferguson R. B. & Woodbury B. L. (2002) Electrical conductivity monitoring of soil condition and available N with animal manure and a cover crop. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **88**, 183-193.
58. Eiland F., Klammer M., Lind A. M., Leth M. & Baath E. (2001) Influence of initial C/N ratio on chemical and microbial composition during long term composting of straw. *Microbial Ecology* **41**, 272-280.

59. Elad Y., Chet I., Boyle P. & Henis Y. (1983) Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* - scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology* **73**, 85-88.
60. Emmert E. A. B., & Handelsman J. (1999) Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters* **171**, 1-9.
61. Fiddaman P. J., O' Neill T. M. & Rossal S. (2000) Screening of bacteria for suppression of *Botrytis cinerea* and *Rhizoctonia solani* on lettuce (*Lactuca sativa*) using leaf disk bioassays. *Annual Applied Biology* **137**, 223-235.
62. Fiestas Ros de Ursinos J. A. & Borja-Padilla R. (1996) Biomethanization. *International Biodeterioration & Biodegradation* **38**, 145-153.
63. Filip Z. (2002) International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **88**, 169-174.
64. Fiorelli F., Pasetti L. & Galli E. (1996) Fertility-promoting metabolites produced by *Azotobacter vinelandii* grown on olive mill wastewaters. *International Biodeterioration & Biodegradation* **38**, 165-167.
65. Fischer U. R. & Velimirov B. (2000) Comparative study of the abundance of various bacterial morphotypes in an eutrophic freshwater environment determined by AODC and TEM. *Journal of Microbiological Methods* **39**, 213-224.
66. Flouri F., Sotirchos D., Ioannidou S. & Balis C. (1996) Decolorization of olive oil mill liquid wastes by chemical and biological means. *International Biodeterioration & Biodegradation* **38**, 189-192.
67. Franco I., Baca M. T., Hurtarte M., Leita L., De Nobili M. & Gallardo-Lara F. (1996) Reduction in phytotoxicity of olive mill waste with compost and its influence on the soil-plant system. *The Science of Composting* **2**, 1161-1165.
68. Gamliel A., Austerweil M. & Kritzman G. (2000) Non-chemical approach to soilborne pest management-organic amendments. *Crop Protection* **19**, 847-853.
69. Garcia-Barrionuevo A., Moreno E., Quevedo-Sarmiento J., Gonzalez-Lopez J. & Ramos-Cormenzana A. (1992) Effect of wastewaters from olive oil mills (alpechin) on *Azotobacter* nitrogen fixation in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **24**, 281-283.
70. Garcia Garcia. I., Peña J. P. R., Venceslada B. J. L., Martín M. A., Santos M. M. A. & Gómez R. E. (2000) Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry* **35**, 751-758.

71. Garrett (1970) Pathogenic root infecting fungi. *Cambridge University Press*.
72. Gilligan C. A. (1983) Modeling of soilborne pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **21**, 45-64.
73. Gonzalez-Lopez J., Pozo C., Martinez-Toledo M. V., Rodelas B. & Salmeron V. (1996) Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter chroococcum* H23 in wastewater from olive oil mills (alpechin). *International Biodeterioration & Biodegradation* **38**, 271-276.
74. Graham P.H. & Vance C.P. (2000) Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Research* **65**, 93-106.
75. Gramss G., Ziegenhagen D. & Sorge S. (1999) Degradation of soil humic extract by wood- and soil-associated fungi, bacteria and commercial enzymes. *Microbial Ecology* **37**, 140-151.
76. Griffin G. J. & Roth D. A. (1979) Nutritional aspects of soil mycostasis. *Soil Borne Plant Pathogens*, 79-96. Academic Press.
77. Grünwald N. J., Hu S. & van Bruggen A. H. C. (2000) Short-term cover crop decomposition in organic and conventional soils: characterization of soil C, N, microbial and plant pathogen dynamics. *European Journal of Plant Pathology* **106**, 37-50.
78. Gupta S., Arora D. K. & Srivastava A. K. (1995) Growth promotion of tomato plants by rhizobacteria and imposition of energy stress on *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry* **27**, 1051-1058.
79. Haas D., Blumer C. & Keel C. (2000) Biocontrol ability of fluorescent pseudomonads genetically dissected: Importance of positive feedback regulation. *Current Opinion in Biotechnology* **11**, 290-297.
80. Hamdi M., BouHamed H. & Ellouz R. (1991) Optimization of the fermentation of olive mill wastewaters by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **36**, 285-288.
81. Hamdi M. & Ellouz R. (1992) Use of *Aspergillus niger* to improve filtration of olive mill wastewaters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **53**, 195-200.
82. Hamdi M. (1996) Anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *Process Biochemistry* **31**, 105-110.
83. Hardy R. W. F., Holsten R. D., Jackson E. K. & Burns R. C. (1968) The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology* **43**, 1185-1207.

84. Harris A. R. (1994) Plant growth promotion and biological controls of damping-off container-growth seedlings using soil bacteria and fungi. *Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria, Proceedings of the Third International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* Adelaide, March 7-11, 1994
85. Henis Y. & Ben-Yphet Y. (1970) Effect of propagule size of *Rhizoctonia solani* on saprophytic growth, infectivity and virulence on bean seedlings. *Phytopathology* **60**, 1351-1356.
86. Henis Y. & Katan J. (1975) Effect of inorganic amendments and soil reaction on soil-borne plant diseases. *Biology and Control of Soil-Borne Plant Pathogens*, 100-106. The American Phytopathological Society.
87. Henis Y., Ghaffar A. & Baker R. (1979) Factors affecting suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology* **69**, 1164-1169.
88. Hill G. A., Milhe B. J. & Nawrocki P. A. (1996) Cometabolic degradation of 4 - chlorophenol by *Alcaligenes eutrophus*. *Applied Microbiology Biotechnology* **46**, 163-168.
89. Hoffland E., Van Beusichem M. L. & Jeger M. J. (1999) Nitrogen availability and susceptibility of tomato leaves to *Botritis cinerea*. *Plant and Soil* **210**, 263-272.
90. Hoitink H. A. J. & Fahy P. C. (1986) Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts. *Annual Review of Phytopathology* **24**, 93-114.
91. Hoitink H. A. J., Stone A. G. & Han D. Y. (1997) Suppression of plant diseases by composts. *HortScience* **32**, 184-187.
92. Honda N., Hirai M., Takashi A. & Shoda M. (1998) Antifungal effect of a heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis*. *Biotechnology Letters* **20**, 703-705.
93. Höpper H., Steinberg G. & Allabouvette C. (1995) Involvement of clay type and pH in the mechanisms of soil suppressiveness to *fusarium* wilt of flax. *Soil Biology Biochemistry* **27**, 955-962.
94. Hornby D. (1983) Suppressive soils. *Annual Review of Phytopathology* **21**, 65-85.
95. Howell C. R. & Stipanovic R. D. (1979) Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology* **69**, 480-482.
96. Hsu S. C. & Lockwood J. L. (1973) Soil fungistasis: behavior of nutrient-independed spores and sclerotia in a model system. *Phytopathology* **63**, 334-337.
97. Hu S. & van Bruggen A. H. C. (1997) Microbial dynamics associated with multiphasic decomposition of C-labeled cellulose in soil. *Microbial Ecology* **33**, 134-143.

- 98.** Hu S. & Van Bruggen A. H. C. (1998) Efficiencies of chloroform fumigation in soil: effects of physiological states of bacteria. *Soil Biology & Biochemistry* **30**, 1841-1844.
- 99.** Hu S. J., Van Bruggen A. H. C. & Grünwald N. J. (1999) Dynamics of bacterial populations in relation to carbon availability in a residue-amended soil. *Applied Soil Ecology* **13**, 21-30.
- 100.** Huisman O. C. (1982) Interrelations of root growth dynamics to epidemiology of root invading fungi. *Annual Review of Phytopathology* **20**, 303-327.
- 101.** Isaac S. (1992) *Fungal – Plant Interactions*. Chapman & Hall
- 102.** Joerger R. D. & Bishop P. E. (1988) Bacterial alternative nitrogen fixation systems. *CRC Critical Reviews in Microbiology* **16**, 1-14.
- 103.** Karmakar B., Vohra R. M., Nandanwar H., Sharma P., Gupta K. G. & Sobti R. C. (2000) Rapid degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol and vanillin by a newly isolated strain of *Bacillus coagulans*. *Journal of Biotechnology* **80**, 195-202.
- 104.** Kataoka N., Tokiwa Y., Tanaka Y., Takeda K. & Suzuki T. (1996) Enrichment culture and isolation of slow-growing bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* **45**, 771-777.
- 105.** Katsifas E. A., Giannoutsou E. P. & Karagouni A. D. (1999) Diversity of *Streptomyces* among specific Greek terrestrial ecosystems. *Letters in Applied Microbiology* **29**.
- 106.** Keeling A., Paten K. & Mullett G. (1994) Germination and growth of plants in media containing unstable refuse-derived-compost. *Soil Biology Biochemistry* **26**, 767-772.
- 107.** Kennedy A. C. (1999) Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **74**, 65-76.
- 108.** Kloepper J. W., Leong J., Teintze M., Schroth N. (1980a) Enhanced plant growth by siderophores produced by plant-growth promoting rhizobacteria. *Nature* **286**, 885-886.
- 109.** Kloepper J. W., Schroth M. N. & Miller T. D. (1980b) Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology* **70**, 1078-1082.
- 110.** Kloepper J. W. & Schroth M. N. (1981) Relationship of in vitro antibiosis of plant growth promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology* **71**, 1020-1024.
- 111.** Knosp O., Von Tigerstrom M. & Page W. J. (1984) Siderophore-mediated uptake of iron in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* **159**, 341-347.

- 112.** Knox O. G. G., Killham K. & Leifert C. (2000) Effects of increased nitrate availability on the control of plant pathogenic fungi by the soil bacterium *Bacillus subtilis*. *Applied Soil Ecology* **15**, 227-231.
- 113.** Knupp G., Rücker G., Ramos-Cormenzana A., Garrido Hoyas S., Neugebauer M. & Ossenkop T. (1996). Problems of identifying phenolic compounds during the microbial degradation of olive mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation* **38**, 277-282.
- 114.** Kögel-Knabner I. (2002) The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* **34**, 139-162.
- 115.** Kozdrój J. & van Elsas J. D. (2000) Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biology and Biochemistry* **32**, 1405-1417.
- 116.** Kuter G. A., Nelson E. B., Hoitink H. A. J. & Madden L.V. (1983) Fungal populations in container media amended with composted hardwood bark suppressive and conducive to *Rhizoctonia* damping-off. *Phytopathology* **73**, 1450-1456.
- 117.** Kuzyakov Y., Friedel J. K. & Stahr K. (2000) Review of mechanisms and quantification of priming effect. *Soil Biology Biochemistry* **32**, 1485-1498.
- 118.** Lazazzera B. A. (2000) Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase. *Current Opinion in Microbiology* **3**, 177-182.
- 119.** Lebuhn M., Heulin T. & Hartman A. (1997) Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Phaenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. *FEMS Microbiology Ecology* **22**, 325-334.
- 120.** Leong J. (1986) Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **24**, 187-209.
- 121.** Lewis J.A. & Papavizas G.C. (1975) Survival and multiplication of soil-borne plant pathogens as affected by plant tissue amendments. *Biology and Control of Soil-Borne Plant Pathogens*, 84-89. The American Phytopathological Society.
- 122.** Lin M., Smalla K., Heuer H. & van Elsas J. D. (2000) Effect of an *Alcaligenes faecalis* inoculant strain on bacterial communities in flooded soil microcosms planted with rice seedlings. *Applied Soil Ecology* **15**, 211-225.
- 123.** Lindahl V., Aa K. & Olsen R. A. (1996) Effects on microbial activity by extraction of indigenous cells from soil slurries. *FEMS Microbial Ecology* **21**, 221-230.

- 124.** Lockwood J. L. & Schippers B. (1984) Evaluation of siderophores as a factor in soil mycostasis. *Transactions of British Mycological Society* **82**, 589-594.
- 125.** Lockwood J. L. (1986) Soilborne plant pathogens: concepts and connections. *Phytopathology* **76**, 20-27.
- 126.** Lopez M. J. & Ramos-Cormenzana A. (1996) Xanthan production from olive-mill wastewaters. *International Biodeterioration & Biodegradation* **38**, 263-270.
- 127.** Lumsden R. D., Lewis J. A. & Millner P. D. (1983) Effect of composted sewage sludge on several soilborne pathogens and diseases. *Phytopathology* **73**, 1543-1548.
- 128.** Lundquist E. J., Jackson L. E., Scow K. M. & Hsu C. (1999) Changes in microbial biomass and community composition, and soil carbon and nitrogen pools after incorporation of rye into three California agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry* **31**, 221-236.
- 129.** Madrid L. & Díaz-Barrientos E. (1998) Release of metals from homogeneous soil columns by wastewater from an agricultural industry. *Environmental Pollution* **101**, 43-48.
- 130.** Maloney P. E., van Bruggen A. H. C. & Hu S. (1997) Bacterial community structure in relation to the carbon environments in lettuce and tomato rhizospheres and in bulk soil. *Microbial Ecology* **34**, 109-117.
- 131.** Manimekalai R. & Swaminathan T. (2000) Removal of hazardous compounds by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioprocess Engineering* **22**, 29-33.
- 132.** Manios V. & Balis C. (1983) Respirometry to determine optimum conditions for the biodegradation of extracted olive press-cake. *Soil Biology and Biochemistry* **15**, 75-83.
- 133.** Martirani L., Giardina P., Marzullo L. & Sannia G. (1996) Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research* **30**, 1914-1918.
- 134.** Mayak S., Tirosh T. & Glick B. R. (1999) Effect of wild type and mutant Plant Growth Promoting Rhizobacteria on the rooting of mung bean cuttings. *Journal of Plant Growth Regulation* **18**, 49-53.
- 135.** Mercadé M. E., Manresa M. A., Robert M., Espuny M. J., de Andrés C. & Guinea J. (1993) Olive oil mill effluent (oome). New substrate for biosurfactant production. *Bioresource Technology* **43**, 1-6.
- 136.** Mew T. W., Rosales A. M & Maningas G. V (1994) Biological control of *Rhizoctonia solani* sheath blight and blast of rice. *Improving Plant Productivity with*

Rhizosphere Bacteria, Proceedings of the Third International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Adelaide, March 7-11, 1994

137. Mitchel J. E. (1979) Dynamics of the inoculum potential. *Soil Borne Plant Pathogens*, 3-20. Academic Press.

138. Molina Alcaide E. & Nefzaoui A. (1996) Recycling of olive oil by-products: possibilities of utilization in animal nutrition. *International Biodeterioration & Biodegradation* **38**, 227-235.

139. Monteoliva-Sánchez M., Incerti C., Ramos-Cormenzana 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. *International Biodeterioration & Biodegradation* **38**, 211-214,

140. Moreno E., Perez J., Ramos-Cormenzana A. & Martinez J. (1987) Antimicrobial effect of wastewater from olive oil extraction plants selecting soil bacteria after incubation with diluted waste. *Microbiosphere* **51**, 169-174.

141. Moreno J., De La Rubia T., Ramos-Cormenzana A. & Vela G. R. (1990) Growth and nitrogenase activity of *Azotobacter vinelandii* on soil phenolic acids. *Journal of Applied Bacteriology* **69**, 850-855.

142. Nandakumar R., Babu S., Viswanathan R., Raguchander T. & Samiyappan R. (2001) Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology and Biochemistry* **33**, 603-612.

143. Neely C. L., Beare M. H., Hardgrove W. L. & Coleman D. C. (1991) Relationships between fungal and bacterial substrate-induced respiration, biomass and plant residue decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* **23**, 947-954.

144. Nehl D. B., Allen S. J. & Brown J. F. (1996) Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. *Applied Soil Ecology* **5**, 1-20. Bulluck L. R., Brosius M., Evanylo G. K. & Ristaino J. B. (2002) Organic and synthetic fertility amendments influence soil microbial, physical and chemical properties on organic and conventional farms. *Applied Soil Ecology* **19**, 147-160.

145. Neilands J. B. & Leong S. A. (1986) Siderophores in relation to plant growth and disease. *Annual Review of Phytopathology* **37**, 187-208.

146. Nelson E. B. & Hoitink H. A. J. (1982) Factors affecting suppression of *Rhizoctonia solani* in container media. *Phytopathology* **72**, 275-279.

- 147.** Nortcliff S. (2002) Standarization of soil quality attributes. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **88**, 161-168.
- 148.** Ntougias S. & Russell N. J. (2000) *Bacillus* sp. WW3-SN6, a novel facultatively alkaliphilic bacterium isolated from the washwaters of edible olives. *Extremophiles* **4**, 201-208.
- 149.** Ohta H. & Hattori T. (1983) Oligotrophic bacteria on organic debris and plant roots in a paddy field soil. *Soil Biology and Biochemistry* **15**, 1-8.
- 150.** Owen R. M., Giacosa A., Hull W. E., Haubner R., Spiegelhalder B. & Bartsch H. (2000) The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur. J. Cancer* **36**, 1235-1247.
- 151.** Oyarzum P. J., Gerlagh M. & Zadoks J. C. (1998) Factors associated with soil receptivity to some fungal root rot pathogenes of peas. *Applied Soil Ecology* **10**, 151-169.
- 152.** Page W. J. & Grant G. A. (1988) Partial repression of siderophore-mediated iron transport in *Azotobacter vinelandii* grown with mineral iron. *Canandian Journal of Microbiology* **34**, 675-679.
- 153.** Panikov N. S. (1999) Understanding and prediction of soil microbial community dynamics under global chang. *Applied Soil Ecology* **11**, 161-176.
- 154.** Papadeli M., Roussis A., Papadopoulou K., Venieraki A., Chatjipavlidis I., Katinakis P. & Balis C. (1996) Biochemical and molecular characterization of an *Azotobacter vinelandii* strain with respect to its ability to grow and fix nitrogen in olive mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation* **38**, 179-181.
- 155.** Papavizas G. C., Adams P. B., Lumsden R. D., Lewis J. A. Dow R. L. Ayers W. A. & Kantzes J. G. (1975) Ecology and epidemiology of *Rhizoctonia solani* in field soil. *Phytopathology* **65**, 871-877.
- 156.** Papavizas G. C. & Lumsden R. D. (1980) Biological control of soilborne fungal propagules. *Annual Review of Phytopathology* **18**, 389-413.
- 157.** Paredes M., Monteoliva-Sánchez M., Moreno E., Perez J., Ramos-Cormenzana A. & Martinez J. (1986) Effect of wastewaters from olive oil extraction plants on the bacterial population of soil. (1986) *Chemosphere* **15**, 659-664.
- 158.** Paredes M. J., Moreno E., Ramos-Cormenzana A. & Martinez J. (1987) Characteristics of soil after pollution with wastewaters from olive oil extraction plants. *Chemosphere* **16** 1557-1564.

- 159.** Paredes C., Bernal M. P., Roig A., Cegarra J. & Sánchez-Monedero M. A. (1996) Influence of the bulking agent on the degradation of olive-mill wastewater sludge during composting. *International Biodeterioration & Biodegradation* **38**, 205-210.
- 160.** Paredes C., Cegarra J., Roig A., Sánchez-Monedero M. A. & Bernal M. P. (1999) Characterization of olive mill wastewater (alpechin) and its sludge for agricultural purposes. *Bioresource Technology* **67**, 111-115.
- 161.** Paredes C., Roig A., Bernal M. P., Sánchez-Monedero M. A. & Cegarra J. (2000) Evolution of organic matter and nitrogen during co-composting of olive mill wastewater with solid organic wastes. *Biology and Fertility of Soils* **32**, 222-227.
- 162.** Pasetti L., Fiorelli F. & Tomati U. (1996) *Azotobacter vinelandii* biomass production from olive-mill wastewaters for heavy metal recovery. *International Biodeterioration & Biodegradation* **38**, 163-167.
- 163.** Paul K. I., Black A. S. & Conyers M. K. (2001) Effect of plant residue return on the development of surface soil pH gradients. *Biology and Fertility of Soils* **33**, 75-82.
- 164.** Peng H. X., Sivasithamparam K. & Turner D. W. (1999) Chlamydospore germination and Fusarium wilt of banana plantlets in suppressive and conducive soils are affected by physical and chemical factors. *Soil Biology and Biochemistry* **31**, 1363-1374.
- 165.** Pengnoo A., Kusongwiriyawong C., Nilratana L. & Kanjanamaneesathian M. (2000) Greenhouse and field trials of the bacterial antagonists in pellet formulation to suppress sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. *BioControl* **45**, 245-256.
- 166.** Pichereau V., Hartke A. & Auffray Y. (2000) Starvation and osmotic stress induced multiresistances. Influence of extracellular compounds. *International Journal of Food Microbiology* **55**, 19-25.
- 167.** Piperidou C. I., Chaidou C. I., Stalikas C. D., Soulti K., Pilidis G. A. & Balis C. (2000) Bioremediation of olive oil mill wastewater: chemical alterations induced by *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **48**, 1941-1948.
- 168.** Press C. M. & Kloepper J. W. (1994) Growth chamber and field screening procedures for evaluation of bacterial inoculants for control of *Rhizoctonia solani* on cotton. *Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria, Proceedings of the Third International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* Adelaide, March 7-11, 1994
- 169.** Priha O., Grayston S., Pennanen T. & Smolander A. (1999) Microbial activities related to C and N cycling and microbial community structure in the rhizospheres of *Pinus*

sylvestris, *Picea abies* and *Betula pendula* seedlings in an organic and mineral soil. *FEMS Microbiology Ecology* **30**, 187-199.

170. Probanza A., Mateos J. L., Lucas García J. A., Ramos B., De Felipe M. R. & Gutierrez Manero F. J. (2001) Effects of inoculation with PGPR *Bacillus* and *Pisolithus tinctorius* on *Pinus pinea* L. Growth, Bacterial rhizosphere colonization, and mycorrhizal infection. *Microbial Ecology* **41**, 140-148.

171. Quimby P. C. King L. R. & Grey W. E. (2002) Biological control as a means of enhancing the sustainability of crop/land management systems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **88**, 147-152.

172. Ramamoorthy V., Viswanathan R., Raguchander T., Prakasam V. & Samiyappam R. (2001) Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection* **20**, 1-11.

173. Ramos-Cormenzana A., Juárez-Jiménez B. & Garcia-Pareja M. P. (1996) Antimicrobial activity of olive mill wastewaters (alpechin) and biotransformed olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation* **38**, 283-290.

174. Ranalli A. (1991a) The effluent from olive mills: proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. Part I. *Olivae* **37**, 30-39.

175. Ranalli A. (1991b) The effluent from olive mills: proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. Part II. *Olivae* **38**, 26-40.

176. Ranalli A. (1991c) The effluent from olive mills: proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. Part III. *Olivae* **39**, 18-34.

177. Rehm B. H. A. & Valla S. (1997) Bacterial alginates: biosynthesis and application. *Applied Microbiology and Biotechnology* **48**, 281-288.

178. Requena N., Azcon R. & Baca M. T. (1996) Chemical changes in humic substances from compost due to incubation with lingo-cellulolytic microorganisms and effects on lettuce growth. *Applied Microbiology and Biotechnology* **45**, 857-863.

179. Rey M., Delgado-Jarana J. & Benitez T. (2001) Improved antifungal activity of a mutant *Trichoderma harzianum* CECT 2413 which produces more extracellular proteins. *Applied Microbiology Biotechnology* **55**, 604-608.

180. Robles A., Lucas R., Alvarez de Chienfuegos G. & Gálvez A. (2000a) Phenol-oxidase (laccase) activity in strains of the hyphomycete *Chalara paradoxa* isolated from olive mill wastewater disposal ponds. *Enzyme and Microbial Technology* **26**, 484-490.

- 181.** Robles A., Rosario L., Alvarez de Cienfuegos G. & Gálvez A. (2000b) Biomass production and detoxification of wastewaters from the olive oil industry by strains of *Penicillium* isolated from wastewater disposal ponds. *Bioresource Technology* **74**, 217-221.
- 182.** Rodriguez H. & Fraga R. (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* **17**, 319-339.
- 183.** Rodriguez M. M., Perez J., Ramos-Cormenzana A. & Martinez J. (1988) Effect of extracts obtained from olive oil mill wastewaters on *Bacillus megaterium* ATCC 33085. *Journal of Applied Bacteriology* **64**, 219-226.
- 184.** Rowell D.L. (1994) Soil Science methods & applications. Longman Scientific and Technical, U.K.
- 185.** Rozzi A. & Malpei F. (1996) Treatment and disposal of olive mill effluents. *International Biodeterioration & Biodegradation* **38**, 135-144.
- 186.** Ryder M. H., Yan Z., Terrace T. E., Rovira A. D., Tang W. & Correll R. L. (1999) Use of strains of *Bacillus* isolated in China to suppress take-all and *Rhizoctonia* root rot and promote seedling growth of glasshouse-growth wheat in Australian soils. *Soil Biology and Biochemistry* **31**, 19-29.
- 187.** Safiyazov J. S., Mannanov & Sattarova R. K. (1995) The use of bacterial antagonists for the control of cotton diseases. *Field Crops Research* **43**, 51-54.
- 188.** Sánchez Villasclaras S., Martínez Sancho M. E., Espejo Caballero M. T. & Delgado Pérez A. (1996) Production of microalgae from olive mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation* **38**, 245-247.
- 189.** Sarathchandra S. U., Burch G. & Cox N. R. (1997) Growth patterns of bacterial communities in the rhizoplane and rhizosphere of white clover (*Trifolium repens* L.) and perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) in long-term pasture. *Applied Soil Ecology* **6**, 293-299.
- 190.** Saviozzi A., Riffaldi R., Levi-Minzi R., Scagnozzi A. & Vanni G. (1993) Decomposition of vegetation-water sludge in soil. *Bioresource Technology* **44**, 223-228.
- 191.** Sayadi S. & Ellouz R. (1992) Decolourization of olive mill wastewaters by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of the lignin-degrading system. *Applied Microbiology and Biotechnology* **37**, 813-817.

- 192.** Sayadi S., Allouche N., Jaoua M. & Aloui F. (2000) Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment. *Process Biochemistry* **35**, 725-735.
- 193.** Schippers B., Bakker A. W. & Bakker P. A. H. M. (1987) Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual Review of Phytopathology* **25**, 339-358.
- 194.** Schoeman M. W., Webber J. F. & Dickinson D. J. (1999) The development of ideas in biological control applied to forest products. *International Biodegradation & Biodeterioration* **43**, 109-123.
- 195.** Schroth M. N. & Hancock J. G. (1982) Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. *Science* **216**, 1376-1381.
- 196.** Schulten H.-R. & Leinweber P. (2000) New insights into organic-mineral particles: composition, properties and models of molecular structure. *Biology and Fertility of Soils* **30**, 399-432.
- 197.** Scioli C. & Vollaro L. (1997) The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters. *Water Research* **31**, 2520-2524.
- 198.** Semenov A. M., van Bruggen A. H. C. & Zelenev V. V. (1999) Moving waves of bacterial populations and total organic carbon along roots of wheat. *Microbial Ecology* **37**, 116-128.
- 199.** Shen D. (1997) Microbial diversity and application of microbial products for agricultural purposes in China. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **62**, 237-245.
- 200.** Smiley R.W. (1975) Forms of nitrogen and the pH in the root zone and their importance to root infections. *Biology and Control of Soil-Borne Plant Pathogens*, 55-62. The American Phytopathological Society.
- 201.** Stenström J., Svensson K. & Johansson M. (2001) Reversible transition between active and dormant microbial states in soil. *FEMS Microbiology Ecology* **36**, 93-104.
- 202.** Stolp H. (1988) Dispersal of microorganisms and development of microbial populations. *Microbial Ecology: Organisms, Habitats, Activities*. Cambridge University Press.
- 203.** Stülke J. & Hillen W. (1999) Carbon catabolite repression in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* **2**, 195-201.

- 204.** Sturz A. V., Carter M. R. & Johnston H. W. (1997) A review of plant disease. Pathogen interactions and microbial antagonism under conservation tillage in temperate humid agriculture. *Soil & Tillage Research* **41**, 169-189.
- 205.** Sutherland I. W. (1996) Microbial biopolymers from agricultural products: production and potential. *International Biodeterioration & Biodegradation* **38**, 249-261.
- 206.** Sylvia D. M., Fuhrmann J. J., Hartel P. G. & Zuberer D. A. (1998) Principles and applications of soil microbiology. Prentice Hall.
- 207.** Tardioli S., Bànnè E. & Santori F. (1997) Species-specific selection on soil fungal population after olive mill waste-water treatment. *Chemosphere* **34**, 2329-2336.
- 208.** Theenhaus A. & Scheu S. (1996) Successional changes in microbial biomass, activity and nutrient status in faecal material of the slug *Arion rufus* (gastropoda) deposited after feeding on different plant materials. *Soil Biology and Biochemistry* **28**, 569-577.
- 209.** Tomashow L. S. (1996) Biological control of plant root pathogens. *Current Opinion in Biotechnology* **7**, 343-347.
- 210.** Tomati U., Galli E., Fiorelli F. & Pasetti L. (1996) Fertilizers from composting of olive mill wastewaters. *International Biodeterioration & Biodegradation* **38**, 155-162.
- 211.** Van Bruggen A. H. C. & Semenov A. M. (2000) In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Applied Soil Ecology* **15**, 13-24.
- 212.** Van Gestel M., Merckx R. & Vlassak K. (1996) Spatial distribution of microbial biomass in microaggregates of a silty-loam soil and the relation with resistance of microorganisms to soil drying. *Soil Biology Biochemistry* **20**, 503-510.
- 213.** Van Tran V., Omar N., Berge O. & Balandreau J. (1994) Selection of bacteria for enhanced plant growth and results of field tests. *Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria, Proceedings of the Third International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* Adelaide, March 7-11, 1994
- 214.** Vandenberg P. A., Gonzalez C. F., Wright A. M. & Kunka B. S. (1983) Iron chelating compounds produced by soil pseudomonads: correlation with fungal growth inhibition. *Applied and Environmental Microbiology* **46**, 128-132.
- 215.** Vassilev N., Vassileva M., Azcon R., Fenice M., Federici F. & Barea J. M. (1988) Fertilizing effect of microbially treated olive mill wastewater on *Trifolium* plants. *Bioresource Technology* **66**, 133-137.

- 216.** Verstraete W. & Top E. M. (1999) Soil clean-up: lessons to remember. *International Biodeterioration & Biodegradation* **43**, 147-153.
- 217.** Visioli F. & Galli C. (1998) The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: New findings. *Nutr. Rev.* **56**, 142-147.
- 218.** Wahleithner J. A., Xu F., Brown K. M., Brown S. H., Golightly Torben Halkier E. J., Kauppinen S., Pederson A. & Schneider P. (1996) The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Curr. Genet.* **29**, 395-403.
- 219.** Weller D. M. (1988) Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **26**, 379-407.
- 220.** West S. B., Albrecht S. L. & Skirvin W. (2000) Crop residue position and interference with wheat seedling development. *Soil & Tillage Research* **55**, 175-182.
- 221.** Williams S. T., Goodfellow M., Alderson G., Wellington E. M. H., Sneath P. H. A. & Sackin M. J. (1983a) Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *Journal of General Microbiology* **129**, 1743-1813.
- 222.** Williams S. T., Goodfellow M., Wellington E. M. H., Vickers J. C., Alderson G., Sneath P. H. A., Sackin M. J. & Mortimer A. M. (1983b) A probability matrix for identification of some *Streptomyces*. *Journal of General Microbiology* **129**, 1815-1830.
- 223.** Witter E. & Kanal A. (1998) Characteristics of the soil microbial biomass in from a long-term field experiment with different levels of C input. *Applied Soil Ecology* **10**, 37-49.
- 224.** Wuest S. B., Albrecht S. L. & Skirvin K. W. (2000) Crop residue position and interference with wheat seedling development. *Soil & Tillage Research* **55**, 175-182.
- 225.** Yan F., Schubert S. & Mengel K. (1996) Soil pH increase due to decarboxylation of organic anions. *Soil Biology and Biochemistry* **28**, 617-624.
- 226.** Zaborina O., Latus M., Eberspächer J., Golovleva L. A. & Lingens F. (1995) Purification and characterization of 6-chlorohydroxyquinol 1,2-dioxygenase from *Streptomyces rochei* 303: comparison with an analogous enzyme from *Azotobacter* sp. strain GP1. *Journal of Bacteriology* **177**, 229-234.
- 227.** Zervakis G., Yiatras P. & Balis C. (1996) Edible mushrooms from olive oil mill wastes. *International Biodeterioration & Biodegradation* **38**, 237-243.

- 228.** Zheng X. Y. & Sinclair J. B. (2000) The effects of traits of *Bacillus megaterium* on seed and root colonization and their correlation with the suppression of *Rhizoctonia solani* root rot of soybean. *BioControl* 45, 223-243.
- 229.** Zucconi F., Pera A. & Forte M. (1981) Evaluating toxicity of immature compost. *BioCycle* March/April, 54-57.
- 230.** Αλεξιάδης Κ. 1976. Φυσική και χημική ανάλυσις του εδάφους. Θεσσαλονίκη.
- 231.** Γεωργακάκης Δ. (1989). Εφαρμογή της αναερόβιας χώνευσης στην επεξεργασία των κατσίγαρων και δυνατότητες διάθεσης των τελικών υγρών. Πρακτικά ημερίδας «Διαχείριση αποβλήτων ελαιουργείων» 31/03/1989 Ηράκλειο Κρήτης.
- 232.** ΕΘΙΑΓΕ, ΠΕΓΕΑΛ Ξυλοκάστρου (1995) Μια πρώτη προσέγγιση για την αξιολογηση του αποτελέσματος των εδαφολογικών αναλύσεων. Εκδόσεις Χ. Παπαστελάτος.
- 233.** Καραγκούνη-Κύρτσου Α. Δ. (1999) Μικροβιολογία. Εκδόσεις Α. Σταμούλης
- 234.** Κατσίφας Ε. Α. (1999) Επίδραση διαφόρων παραγόντων στην επιβίωση και την αύξηση στρεπτομυκήτων σε δείγματα εδάφους. Διδακτορική διατριβή, Τομέας Βοτανικής του Βιολογικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Αθηνών.
- 235.** Κώτσου Μ., Μάρη Ι., Τασιοπούλου Σ., Κυριακού Α., και Μπαλής Κ. (2000). Επίδραση του υγρού αποβλήτου ελαιοτριβείων στην επισχετικότητα εδάφους έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani*. 10⁰ Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, 3-5 Οκτωβρίου, Καλαμάτα.
- 236.** Μάρη Ι. (2000) Διαχείριση γεωργικών αποβλήτων: Αναπνευσμετρική εκτίμηση της πορείας σταθεροποίησης οργανικών υποστρωμάτων υπό συνθήκες αερόβιας θερμόφιλης χώνευσης (composting). Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής του Γ.Π.Α.
- 237.** Μπαλής Κ. (1986) Σημειώσεις στο μάθημα της μικροβιολογίας εδάφους. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- 238.** Μπαλής Κ. (1996) Τα γεωργικά απόβλητα σαν συντελεστής αυτάρκειας καλλιεργητικών συστημάτων. Η περίπτωση των ελαιουργικών αποβλήτων. *Πρακτικά συμποσίου: Ελιά-Ελαιόλαδο-Μεσογειακή Διατροφή*, 8-10 Νοεμβρίου 1996 Καλαμάτα.
- 239.** Νταλής Δ. (1989) Αναερόβια βιολογική επεξεργασία υγρών αποβλήτων ελαιουργείων προς παραγωγή βιοαερίου. Πρακτικά ημερίδας «Διαχείριση αποβλήτων ελαιουργείων» 31/03/1989 Ηράκλειο Κρήτης.

- 240.** Φλουρή Φ. (1984) Επίδραση αέριων ακόρεστων υδρογονανθράκων στη μικροχλωρίδα του εδάφους. Διδακτορική διατριβή, Εργαστήριο Μικροβιολογίας της Ανωτάτης Γεωπονικής Σχολής Αθηνών.
- 241.** Φλουρή Φ., Χατζηπαυλίδης Ι. & Μπαλής Κ. (1994) Η γεωργία ως αποδέκτης των αποβλήτων της. Πρακτικά Διεθνούς Δημερίδας με θέμα «Διαχείριση Αποβλήτων Ελαιουργείων» Σητεία 16-17 Ιουνίου 1994.
- 242.** Φλουρή Φ., Χατζηπαυλίδης Ι., Μπαλής Κ., Σέρβης Δ. και Τζεράκης Σ. (1988). Εφαρμογή των Υ.Α.Ε. στο έδαφος. Πρακτικά συνεδρίου «Οι ελαιώνες του Αιγαίου» Μυτιλήνη 25-27/02/1988.
- 243.** Χατζηπαυλίδης Ι. (1999) Επιπτώσεις των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων στην δυναμική και τις δράσεις των μικροβιακών πληθυσμών εμπλουτισμού στο έδαφος. Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Υ.Α.Ε. :	Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείων
Ε.Υ.Α.Ε. :	Επεξεργασμένα Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείων
Ο.Δ.Β.:	Ολικός Δείκτης Βλαστικότητας
P. G. P. R. :	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
D.R.B. :	Deleterious Rhizobacteria
COD :	Chemical Oxygen Demand
BOD :	Biological Oxygen Demand